

ČASOPIS MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU



# MEDICINSKA ISTRAŽIVANJA

UREĐIVAČKI ODBOR - EDITORIAL BOARD

GLAVNI I ODGOVORNI UREDNIK - EDITOR-IN-CHIEF

*Prof. dr Đorđe Radak*

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  
Prof. dr Predrag Peško, dopisni član SANU  
Prof. dr Nebojša Lalić, dopisni član SANU  
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  
Николай Романович Палев - Rusija, Russia  
Basil D. Thanopoulos - Grčka, Greece  
Nicholas Kastilambros - Grčka, Greece  
Александр Аметов - Rusija, Russia  
Manuel Serrano-Rios - Španija, Spain  
Felipe F. Casanueva - Španija, Spain  
Maria Angelica Milgino - Brazil, Brasil  
Ralf Ferdinand Basting - Nemačka, Germany  
Albert Hofman - Holandija, Netherland  
Guido Macchiarelli - Italija, Italy

TEHNIČKI SEKRETAR

Milanka Ćirić



# MEDICINSKA ISTRAŽIVANJA

GODINA 2012.

SADRŽAJ - CONTENTS

VOL. 46. Sveska 2

- UČESTALOST NEMELANOCITNIH MALIGNIH TUMORA KOŽE KOD GRADSKJE  
I SEOSKE POPULACIJE U BOSNI I HERCEGOVINI  
THE FREQUENCY OF NONMELANOCYTIC MALIGNANT SKIN TUMORS  
IN URBAN AND RURAL POPULATION IN BOSNIA AND HERZEGOVINA . . . . . 5  
*Darko Lukić, Jadran Bandić, Reuf Karabeg, Nenad Babić, Sanja Sibinčić, Predrag Lazić,  
Duško Vasić, Dara Gušić, Vladimir Gužvić*
- DIJAGNOZA I REZULTATI HIRURŠKOG LEČENJA POVRŠNO ŠIREĆEG  
I NODULARNOG MELANOMA KOŽE  
DIAGNOSIS AND RESULTS OF SURGICAL TREATMENT  
OF SUPERFICIAL EXPENDING AND NODULAR SKIN MELANOMA . . . . . 11  
*Darko Lukić, Jadran Bandić, Zoran Tačević, Đorđe Radak, Nenad Babić, Sanja Sibinčić,  
Predrag Lazić, Dara Gušić, Vladimir Gužvić*
- TERAPIJA POSTOPERATIVNE ATRIJALNE FIBRILACIJE  
MANAGEMENT OF POSTOPERATIVE ATRIAL FIBRILLATION . . . . . 16  
*Dragana Unić-Stojanović, Srdjan Babić, Miomir Jović, Djordje Radak*
- KLINIČKI ZNAČAJ OTKRIVANJA I NADOKNADE DEFICITA ANTITROMBINA  
U VASKULARNOJ HIRURGIJI  
CLINICAL SIGNIFICANCE OF DISCOVERING AND COMPENSATING  
ANTITHROMBIN DEFICIENCY IN VASCULAR SURGERY . . . . . 25  
*Evgenija Strugarević, Branko Čalija, Predrag Jovanović, Đorđe Radak*
- CITOHEMIJSKA ANALIZA ALFA NAFTIL ACETAT ESTERAZE  
U ATEROSKLEROZNIM LEZIJAMA HUMANE KAROTIDNE ARTERIJE  
CYTOCHEMICAL ANALYSIS OF ALPHA NAPHTHYL ACETATE ESTERASE  
IN ATHEROSCLEROTIC LESIONS OF HUMAN CAROTID ARTERY. . . . . 33  
*Danijela Vučević, Đorđe Radak, Davor Kovačević, Ivan Milovanović, Tatjana Radosavljević, Dušan Mladenović,  
Sanjin Kovačević, Lea Mascarell Maričić*
- ULOGA TROMBINA U PROLIFERACIJI GLATKIH MIŠIĆNIH ČELIJA  
KRVNIH SUDOVA (VSMC) I ATEROSKLEZOZI  
THE ROLE OF THROMBIN IN THE PROLIFERATION OF VASCULAR  
SMOOTH MUSCLE CELLS (VSMC) AND ATHEROSCLEROSIS . . . . . 44  
*Katarina Smiljanić, Sonja Zafirović, Milan Obradović, Zoran Gluvić,  
Edita Stokić, Biljana Putniković i Esma R. Isenović*

GOJAZNOST, REZISTENCIJA NA INSULIN I KARDIOVASKULARNA OBOLJENJA  
OBESITY, INSULIN RESISTANCE AND CARDIOVASCULAR DISEASE . . . . . 54  
*Ermina Sudar, Sonja Zafirović, Milan Obradović, Sanja Soskić, Aleksandra Jovanović,  
Edita Stokić, Zoran Gluvić i Esmā R. Isenović*

SAVREMENOST ASORTIMANA ANTIPSIHOTIKA  
U TERAPIJI SHIZOFRENIJE U REPUBLICI SRBIJI  
MODERN ASSORTMENT OF ANTIPSYCHOTICS FOLLOWING THE THERAPY  
OF SCHIZOPHRENIA IN THE SERBIA REPUBLIC. . . . . 60  
*Marija Mileković*

<sup>1</sup> General hospital Doboj

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

<sup>3</sup> Clinical center of University of Sarajevo,

<sup>4</sup> FZORS Banja Luka,

<sup>5</sup> Health center „Medico-S“, Banja Luka,

## THE FREQUENCY OF NONMELANOCYTIC MALIGNANT SKIN TUMORS IN URBAN AND RURAL POPULATION IN BOSNIA AND HERZEGOVINA

### UČESTALOST NEMELANOCITNIH MALIGNIH TUMORA KOŽE KOD GRADSKO I SEOSKE POPULACIJE U BOSNI I HERCEGOVINI

Darko Lukić<sup>1</sup>, Jadran Bandić<sup>2</sup>, Reuf Karabeg<sup>3</sup>, Nenad Babić<sup>4</sup>, Sanja Sibinčić<sup>5</sup>, Predrag Lazić<sup>1</sup>, Duško Vasić<sup>1</sup>, Dara Gušić<sup>4</sup>, Vladimir Gužvić<sup>4</sup>

**Summary:** With the prospective clinical study, which lasted from June 2004 to June 2011, were included examinees who reported themselves to the examination of skin tumors. The examinees were divided into two groups.

The first group, the group A (408 examinees) was consisted of permanent inhabited examinees, living and working in rural areas. In the second group, the group B (389 examinees) was classified of examinees who live and work in the cities of Banja Luka, Sarajevo, Doboj and Bijeljina in Bosnia and Herzegovina.

The parameters for comparison during the analysis were: prolonged exposure to sunlight during the year, the protection of skin when exposed to sunlight, frequency of nonmelanocytic skin carcinomas (NMSC), the position of NMSC and stage of lesions advancing.

The aim of this study is analyze of the frequency of malignant skin tumors in the population that lives in rural and urban area primarily in terms of exposure to UV sunlight.

It was found that the nonmelanocytic skin carcinoma is twice often in examinees who belong to the rural population. Examinees, who live and work in the city, use protection from UV rays three times more frequently (18,5%) than the rural population (5,3%).

Examinees who are often exposed to UV rays of the sun, for job outdoors, are the risk group for development of nonmelanocytic skin cancer

(NMSC). It is possible to reduce the number of cases of NMSC in Bosnia and Herzegovina by educating the population about the harmful effects of UV radiation and the principles of protection of the skin from the sun.

**Key words:** UV rays, skin, tumors

**Sažetak:** Prospektivnom kliničkom studijom, koja je trajala od juna 2004.godine do juna 2011. godine, obuhvaćeni su ispitanici koji su se javili na pregled kožnih tumora. Ispitanici su podeljeni u 2 grupe.

Prvu, grupu A (408 ispitanika), činili su ispitanici koji su stalno nastanjeni, borave i rade na seoskom području. U drugu, grupu B (389 ispitanika), svrstani su ispitanici koji žive i rade u gradovima Banja Luka, Sarajevo, Doboj i Bijeljina u Bosni i Hercegovini.

Parametri za poređenje, u toku analize bili su: prolongirano izlaganje suncu tokom godine, zaštita kože pri izlaganju suncu, učestalost nemelanocitnih karcinoma kože (NMSC), pozicija NMSC i stepen uznapredovalosti lezije.

Cilj rada je analiza učestalosti malignih tumora kože kod stanovništva koje je nastanjeno u seoskom i gradskom području prevashodno sa aspekta izloženosti UV sunčevom zračenju.

Utvrđeno je da su nemelanocitni karcinomi kože dva puta češći kod ispitanika koji pripadaju seoskoj populaciji. Ispitanici koji su nastanjeni i rade u gradu tri puta češće (18,5%), koriste zaštitu od UV zraka sunca od seoske populacije (5,3%).

Ispitanici koji se veoma često izlažu UV zracima sunca, radi posla na otvorenom, su rizična grupa za razvoj nemelanocitnih karcinoma kože (NMSC). Edukacijom te populacije o štetnim efektima UV zračenja i principima zaštite kože od sunca, moguće je redukovati broj obolelih od NMSC u Bosni i Hercegovini.

**Ključne reči:** UV zračenje, koža, tumori

## Introduction

Nonmelanocytic skin cancers (NMSC) are the most common skin cancers in human population. The incidence of skin NMSC in Europe is 100 per 100 000 of inhabitants, and in Australia is 900 per 100 000 of inhabitants.<sup>1</sup> BCC makes up about 75% of all non-melanoma skin cancers. Number of NMSC is increasing constantly in the world. Thus, in the USA during 2010 was diagnosed 3.5 million among 2 million patients.<sup>1</sup>

Nonmelanocytic skin cancers (NMSC) can occur anywhere on the skin and on the mucous membranes. It rarely occurs on normal, intact skin. On the contrary, it usually occurs on skin that damaged by UV solar radiation.<sup>2</sup>

The most important cutaneous carcinogen is ultraviolet (UV) radiation. Approximately 80% of skin cancers (excluding melanoma) develop on skin exposed to sun. Prolonged skin exposure to sunlight can lead to skin cancer, for the harmful effects of UV radiation are cumulative.<sup>3</sup>

Bosnia is located in the zone of high to extremely high UV radiation during the five months every year in the period from May to September. Safely time for staying in the sun during the summer months is up to 10am and after 4 pm.<sup>4</sup>

UV index values are also elevated in the mid-day period during April and October, and during those months, especially during sunny days, it should be protected from the sun. The mean values of the UV index have months March and November, and only extremely sensitive people, with skin phototype I, need protection in period around 12 am, during sunny days. The period from the 19<sup>th</sup> of December to 20<sup>th</sup> of February is the safest, when there is no danger for sensitive people, too, except in the mountains where the altitude is over 1000 meters.

Recent studies indicate that UV radiation grows from year to year, and it can be expected doubling

of the number of patients with skin cancer over the next 10 years.<sup>1,4</sup>

## The aim of the study

The aim of this study is analyze of the frequency of nonmelanocytic malignant skin tumors in the population that lives in rural and urban area primarily in terms of exposure to UV sunlight.

## Examinees and methods

With the prospective clinical study, which lasted from June 2004 to June 2011, were included examinees who reported themselves to the examination of skin tumors. The examinees were divided into 2 groups.

The first group, the group A (408 examinees) was consisted of permanent inhabited examinees, residing and working in rural areas. In the second group, the group B (389 examinees) was classified of examinees who live and work in the cities of Banja Luka, Sarajevo, Doboj and Bijeljina in Bosnia and Herzegovina.

For diagnosis were used: anamnesis, clinical examination and computerized dermoscopy, and after excision the definitive analysis of pathohistological analysis.

The observed parameters during the analysis were: gender, age, the prolonged exposure to sunlight, use of protection from UV rays, frequency of nonmelanocytic skin carcinomas (NMSC), anatomical position of skin tumor and stage of lesions advancing, in case of NMSC. Tables 1 and 2 show the distribution of examinees by gender and age.

Table 1. Gender of examinees

Gender of examinees	Group A	Group B
Male	224(55,7 %)	250(64,2%)
female	178(44,3 %)	139(35,8%)
Total	402(100%)	389(100%)

Table 2. Age of examinees

Age of examinees	Group A	Group B
20-30	34(8,5%)	18(4,6 %)
30-40	52(12,9%)	39(10,1%)
40-50	88(21,8%)	75(19,3 %)
50-60	113(28,2%)	124(31,8%)
Over 60	115(28,6%)	133(34,2%)
Total	402(100%)	389(100%)

**Results**

Research results are presented in Tables 3-7 and Graph 1-3. The parameters for comparison during the analysis were: prolonged exposure to sunlight during the year, skin protection during sun exposure, frequency of nonmelanocytic skin carcinomas (NMSC), the position of NMSC and stage of lesions progressing.

Table 3. Prolonged exposure to sunlight during the year

Prolonged exposure to sunlight	Group A	Group B
During holiday	0 (0%)	88(22,6%)
Rarely	27(6,7%)	76(19,6%)
Often	69(17,1%)	133(34,2%)
Very often	306(76,2%)	92(23,6%)
Total	402(100%)	389(100%)

Graph 1. Prolonged exposure to sunlight during the year

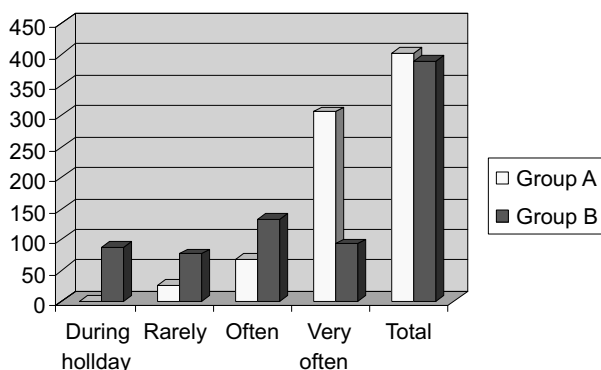


Table 4. Skin protection during sun exposure

Protection from UV	Group A	Group B
Yes	21(5,3%)	72(18,5%)
No	348 (86,5%)	215(55,3%)
Occasionally	33(8,2%)	102(26,2%)
Total	402(100%)	389(100%)

Table 5. Frequency of skin tumors

Frequency	Group A	Group B
NMSC	140(34,8%)	68(17,4%)
Other lesions	262(65,2%)	321(82,5%)
Total	402(100%)	389(100%)

Graph 2: Frequency of skin tumors

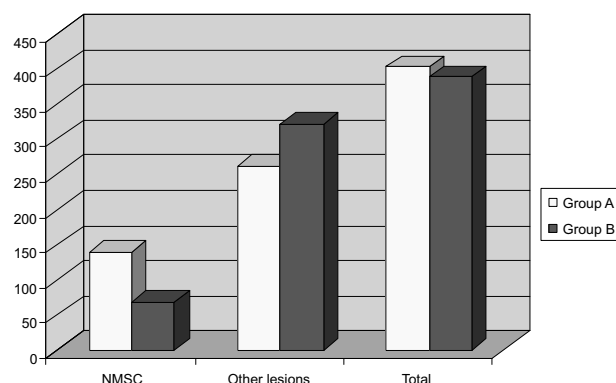


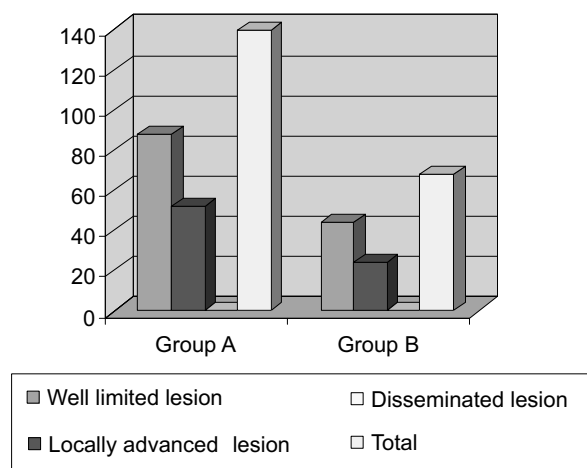
Table 6. Position of NMSC

NMSC-position	Group A	Group B
Skin without sun protection	119 (85%)	40 (72%)
Skin with sun protection	21 (15%)	18(28%)
Total	140 (100%)	68(100%)

Table 7. The degree of progressing of lesion

The degree of progression	Group A	Group B
Well limited lesion	88 (62,8%)	44 (64,7%)
Locally advanced lesion	52 (37,2%)	24 (35,3%)
Disseminated lesion	0 (0%)	0 (0%)
Total	140 (100%)	68 (100%)

Graph 3: The degree of progressing of lesion



With the statistical analysis was determined a significant statistical difference between observed groups A and B in the following characteristics: -regarding the characteristics of *prolonged exposure to sunlight during the year*, there is a signif-

icant statistically difference ( $p < 0.01$  99% confidence),  $Z = 2.54372$ ,

-regarding the characteristics of *skin protection during sun exposure*, there is a significant statistically difference ( $p < 0.01$  99% confidence),  $Z = 2.75012$ ,

-regarding the characteristics of *frequency of skin tumors*, there is statistically difference ( $< 0.05$ ), but not a significant because  $p > 0.01$ ,

-regarding the characteristics of *position of NMSC*, there is a significant statistically difference ( $p < 0.01$  99% confidence),  $Z = 2.522210$ .

## Discussion

The most difficult consequence of prolonged exposure to sunlight is skin cancer. It takes 10-15 years abused the sun to form a hearth of skin cancer. Prolonged effects of ultraviolet (UV) rays and compromise mechanisms that recover damaged skin are leading to defects in the mechanisms of protection, which causes accelerated skin aging and skin cancer.<sup>2</sup>

Many epidemiological studies have shown that frequency of skin cancer is growing in people who are often exposed to sun's ultraviolet (UV) rays. The incidence of skin cancer doubles every 10 years. It comes to exceptional frequency of skin cancer in countries where existed valid dates about it, such as United States of America (USA) and Australia. In the USA is estimated that about 1.35 million inhabitants of the country will suffer from skin cancer annually.<sup>1</sup>

Knowing the fact that elevated UV radiation from the sun directly cause skin cancer in these countries, as in other Western countries, there has regularly monitored for years the level of UV index radiation and daily published dates through the media about the UV index.<sup>4</sup>

In our country, this problem is still insufficient and sporadic presented most of the population.

The increase in morbidity from skin cancer is probably evident in most health institutions in Bosnia and Herzegovina, over the past 10 years. There are no accurate dates, of course, for lack of a central registry, so that about the actual number of patients with skin cancer presents sporadic estimates based on samples from several urban and suburban regions.<sup>3</sup>

In group A 302 (75,2%) of examinees are very often (for work) exposed to UV radiation of sun-

light, whereas the number in group B is 92 (23,6%) of examinees. The group A is exposed very often to sun's UV rays, primarily because of work outside in rural households. The group B is exposed to sunlight more during the holidays. By the characteristics, there was found a high statistical difference.

In both cases, the harmful effects of UV rays of the sun are cumulative (added together), and eventually lead to the development of skin cancer. The proper attitude to UV radiation means the permanent and timely protection against it. Today, there are clear principles of protection adults and children.<sup>4-8</sup> The initial exposure to sunlight should be limited and progressive. Any sun exposure must be adapted to a particular skin type.

It is necessary to use sophisticated products with protective factors to protect the skin from UV rays. Protective preparations should be applied to skin 30 minutes before sun exposure. Protection should be applied to regions of the body that exposed to the sunlight and this should be repeated every hour during prolonged exposure to sun's UV rays. Sunscreens with the highest SPF are used in the first days of exposure to sun. When the skin gradually turns dark, it can be used protection with a lower factor. Protective preparations do not prevent tanning of skin, but it protects skin from UV radiation and the consequential sunburns. Moisture and wet skin are not protected from UV radiation, on the contrary, this skin is more sensitive to the harmful effects of UV radiation. UV rays are reflected from the surface of the water (sea, pool, lake) and stone, which enhances their effect. Sea salt on the skin irritates the skin in addition to increase the harmful effects of UV radiation.<sup>9</sup>

Thus, the possibilities of protection from UV radiation exist and it is very simple and efficient. It is imperative to use optimum protection from UV radiation in accordance with know UV index.

In group A, only 21 (5,3%) of examinees are using protection from sun's UV rays. Three time more examinees, in group B, are using protective factors for sun protection, which means 72 (18,5%) of them. There are three times more examinees, in group B then in group A, who occasionally use UV protection. By these characteristics, it was determined significant statistical difference between studied groups. However, the number of examinees who protected themselves from sun's UV rays



is very small, and the reason for this is probably inadequately informed of examinees about the risk of exposure to sun's UV rays.

Although, nonmelanocytic skin malignant cancer (NMSC) can appear for no apparent reason, it is clear that prolonged exposure to sunlight is a major predisposing factor.<sup>1-3</sup>

NMSC often starts as trivial erosion of the epidermis, or as a small wound with prolonged healing. It usually heals by forming crust, which spontaneously falls off, but leaving a vulnerable area. During the time, vulnerable area increases and becomes surrounded by an irregular edge.

NMSC is usually positioned on parts of the body that are most exposed to sunlight. Skin that is damaged by UV rays with visible solar spots and actinic keratoses, is predilective place.<sup>10</sup>

In our examinees in group A, NMSC were diagnosed in 140 (34,8%) of examinees, while in group B 64 (16,4%) of examinees, which was statistically different, but not significantly higher. NMSC is positioned in the sun-exposed areas of skin at 85% of cases in group A, while in group B at 72% of cases, therefore, no statistical differences between groups.

Most of NMSC has limited potential for growth, but it can be very aggressive and then can reach a significant size and penetrate deeply. On the face, it can destroy the eyes and nose, or can penetrate through the skull and attack brain membranes. NMSC is fatal in this form.<sup>11</sup>

NMSC is at an advanced stage in 52 (37,2%) of our examinees in group A, while in group B in 24 (35,3%) of examinees, which is without significant statistical difference. In a number of examinees, NMSC was extremely neglected to the extreme stage.

Various studies have determined the parameters and risk factors that lead to the progression and

dissemination of NMSC. These are the macroscopic parameters (size, shape and multifocality of the tumor) and microscopic parameters (the degree of cell differentiation).<sup>9,10</sup>

NMSC is not generally characterized by an aggressive mood with rapid formation of metastases. Cancers that occur on sun-damaged skin have very little tendency to metastases, with an incidence approximately 0,5%.<sup>11</sup> On the contrary, NMSC that occurs after inflammation and degenerative processes have much higher degree of metastases than those that develop on sun-damaged skin.<sup>12</sup>

During our analysis it is not verified disseminated NMSC in any case, even at very advanced lesions.

### **Conclusions**

Nonmelanocytic skin cancers are two times more common in examinees that belong to the rural population. More than 2/3 of NMSC are located in regions of the body that are exposed to the sun, while in 1/3 of examinees NMSC is diagnosed at an advanced stage.

Examinees who reside and work in the city (18,5%), use protection from UV rays of the sun three times more than rural population (5,3%), but it is very little to the total number of examinees.

Examinees that are often exposed to sun's UV rays, because of the work outdoors are at risk group for development nonmelanocytic skin cancers (NMSC). It is possible to reduce the number of cases of NMSC in Bosnia and Herzegovina by educating the population about the harmful effects of UV radiation and the principles of protection of the skin from the sunlight.

## 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. Lukić D.: *Tumori kože*, Medicinski fakultet Banja Luka, 2010; 45:52
3. Lukić D, Bandić J, Ivić D. *Rezultati lečenja planocelularnog i bazocelularnog karcinoma kože glave i vrata i drugih anatomskih regija*. Medicinska istraživanja, 2006;40(1): 29-35.
4. Lukić D., J.Bandić. *Ultravioletno zračenje u Republici Srpskoj i Srbiji u periodu od 2000.godine do 2004.godine*. Medicinska Istraživanja, 2006; 36:41.
5. Anwar, U., Ghazal, A.S.K., Ahmad, M., Sharpe, D.T. *Horrible 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, Pt. 1), 1468-1471
7. Padgett JK, Hendrix JD Jr. *Cutaneous malignancies and their management*. Otolaryngol Clin North Am, 2001;34:523-553
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; Vol. 42, No. 3, pp. 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), str. 1165-71

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

<sup>2</sup> Centre for Burns, Plastic and Reconstructive Surgery, Belgrade

<sup>3</sup> IKVB «Dedinje», Beograd

<sup>4</sup> FZORS Banja Luka,

<sup>5</sup> Health center „Medico-S“, Banja Luka,

<sup>6</sup> General hospital Doboj

## DIAGNOSIS AND RESULTS OF SURGICAL TREATMENT OF SUPERFICIAL EXPENDING AND NODULAR SKIN MELANOMA

### DIJAGNOZA I REZULTATI HIRURŠKOG LEČENJA POVRŠNO ŠIREĆEG I NODULARNOG MELANOMA KOŽE

Darko Lukić<sup>1</sup>, Jadran Bandić<sup>1</sup>, Zoran Tačević<sup>2</sup>, Đorđe Radak<sup>3</sup>, Nenad Babić<sup>4</sup>, Sanja Sibinčić<sup>5</sup>, Predrag Lazić<sup>6</sup>, Dara Gušić<sup>4</sup>, Vladimir Gužvić<sup>4</sup>

**Summary:** With the prospective study, from June 2004 to June 2011, were compared the results in the diagnosis and treatment of two pathological forms of melanoma. The examinees were divided into 2 groups. The first group, the group A (28 examinees) was consisted of examinees with superficial expending melanoma. In the second group, the group B (31 examinees) was classified of examinees with nodular melanoma.

The parameters for comparison the results of treatment were the diagnosis, number of the relapses, elapsed time from surgery to relapse and results of treatment.

The aim of this study was analyze of diagnosis and results of treatment of skin melanoma, from the aspect of specific morphological form of tumor.

Dermoscopy showed a percentage of 100% accuracy of diagnosis of superficial melanoma. A percentage of accuracy was 96, 8% in the case of nodular melanoma. Dermoscopy is a diagnostic method of choice for early diagnosis of melanoma.

It can be assumed that the superficial melanoma is easier for treatment, because of statistically small number of relapses. Nodular melanoma was fatal in 10 patients, while in the five-year period, superficial melanoma was not fatal for any examinees.

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

**Sažetak:** Prospektivnom studijom u periodu od juna 2004. do juna 2011. godine, upoređivani su rezultati u dijagnostici i lečenju dva patološka oblika melanoma kože. Ispitanici su podeljeni u 2 grupe. Prvu, grupu A (28 ispitanika), činili su ispitanici sa površno širećim melanomom. U drugu, grupu B (31 ispitanika), svrstani su ispitanici sa nodularnim melanomom.

Parametri za poređenje rezultata lečenja bili su: dijagnostika, broj recidiva (meta), vreme proteklo od operacije do recidiva i rezultat lečenja.

Cilj rada bio je analiza dijagnoze i lečenja melanoma kože, sa aspekta specifičnosti morfološkog oblika tumora.

Dermoskopija je pokazala procenat tačnosti dijagnoze, površnih melanoma od 100%. U slučaju nodularnih melanoma, procenat tačnosti bio je 96,8%. Dermoskopija je dijagnostička metoda izbora, za ranu dijagnozu melanoma.

Zbog statistički znatno manjeg broja recidiva, može se pretpostaviti da je površni melanom lakši za lečenje. Nodularni melanom je bio fatalan za 10 ispitanika, dok u petogodišnjem periodu, ni jedan ispitanik sa superficijelnim melanomom nije završio letalno.

**Ključne reči:** koža, melanom, dijagnoza, lečenje

**Introduction**

The clinical diagnosis of skin melanoma is often extremely difficult. Melanoma is very addicted to mimicry, sometimes quite inconspicuous, or entirely harmless looking. It can be unpigmented. This type of melanoma can trick even the specialists who deal with melanoma. Therefore, it is impossible to exaggerate the necessity of careful observation of all changes on the skin, causing the slightest doubt.<sup>1</sup>

Two main types of melanoma differ according to the stage of tumor progression. These are the «in situ» melanomas and invasive melanomas.<sup>2</sup>

Invasive melanomas can be nodular, who are in so-called vertical growth phase, or superficial melanomas in radial growth phase.

In superficial melanomas, neoplastic melanocytes (melanoma cells) are limited to the epidermis (melanoma «in situ»), or epidermis and papillary dermis without producing tumor mass (microinvasive melanoma). This phase can succeed tumorigenic stage after varying period.

Tumorigenic melanoma can arise from previously existing nontumorigenic component, or it can arise again («de novo»), when it becoming nodular melanoma.

Tumorigenic vertical growth phase is the phase of dermal invasion, with the formation of nodules. Thus, fully developed melanoma may have two parts of lesion: nontumorigenic and nodular.

All the main types of melanomas originate, almost without exception, from the melanocytes at the dermal-epidermal junction. Although these lesions usually associated with pre-existing nevus, more than half of the lesions arise «de novo», or complete press out predecessor. Approximately 5-10 % of melanomas belong to the category of «unclassified», or other.<sup>1-5</sup>

**The aim of the study**

The aim of this study was analyze of diagnosis and results of treatment of skin melanoma, from the aspect of specific morphological form of tumor.

**Materials and methods**

With the prospective study, from June 2004 to June 2011, were compared the results of treatment of two pathological forms of melanoma. The examinees were divided into 2 groups. The first group,

the group A (28 examinees) was consisted of examinees with superficial expending melanoma. In the second group, the group B (31 examinees) was classified of examinees with nodular melanoma.

All changes on the skin of all examinees were treated with the Computerized Digital Dermoscopy (CDD), and after that, we did another relevant preoperative diagnosis.

All examinees were treated with radical tumor excision with 3-5 cm of tissue in the radius of the lesion. Most examinees were treated with intraoperative subepidermal infiltration of methylene blue in the area of melanoma, and sentinel and ex tempore diagnosis, too. After the surgery, the examinees were referred to the oncology consulting team. Our examinees were controlled every 6 months or earlier if necessary.

Tables 1, 2 and 3 show the distribution of examinees by gender, age and tumor thickness.

*Table 1. Gender of examinees*

Gender	Group A	Group B
Male	12(42,8%)	19(61,2%)
Female	16(57,2%)	12(38,8%)
Total	28(100%)	31(100%)

*Table 2. Age of examinees*

Age of examinees	Group A	Group B
20-30	3(10,8%)	2(6,4%)
30-40	8(28,5%)	4(12,9%)
40-50	7(25%)	11(35,5%)
50-60	3(10,7%)	13(41,9%)
>60	7(25%)	1(3,3%)
Total	28(100%)	31(100%)

*Table 3. Distribution of examinees according to thickness of melanoma (Breslow)*

Thickness of melanoma	Group A	Group B
<1mm	3(10,8%)	0(0%)
1-2mm	7(25%)	3(9,7%)
2-3mm	12(42,8%)	10(32,3%)
3-4mm	6(21,4%)	9(29%)
4-5mm		5(16,1%)
>5mm		4(12,9%)
Total	28(100%)	31(100%)

**Results**

Research results are presented in Tables 4-7, and Graph 1-3. The parameters for comparison were:

the diagnosis of melanoma, relapses (metastasis), the time elapsed from surgery to relapse and results of treatment.

Table 4. Diagnosis of melanoma

Diagnosis	Grupa A	Grupa B
Advisory clinical diagnosis		
true	11(39,2%)	25(80,5%)
false	17(60,8%)	6(19,5%)
Dermoscopy		
true	28(100%)	30(96,8%)
false	0(0%)	1(3,2%)
Total	28 (100%)	31(100%)

Graph 1. Diagnosis of melanoma

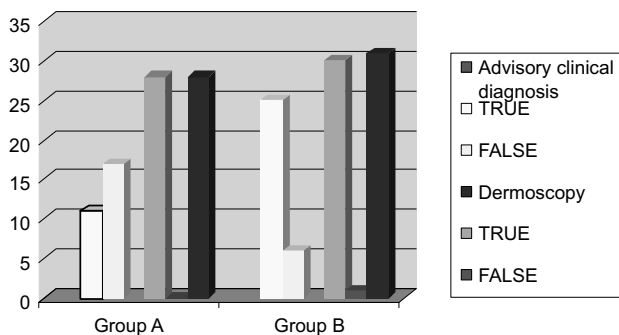


Table 5. Relapse (metastasis)

Relapse	Group A	Group B
Yes	3(10,7%)	14(45,1%)
No	25(89,3%)	17(54,9%)
Total	28(100%)	31(100%)

Graph 2. Relapse (metastasis)

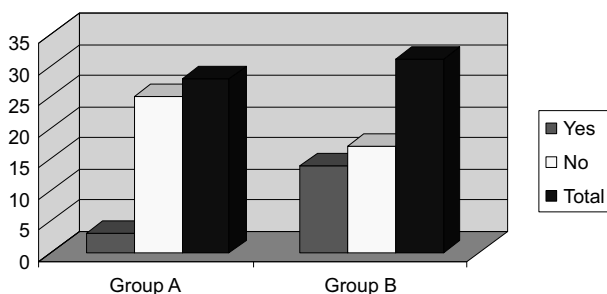


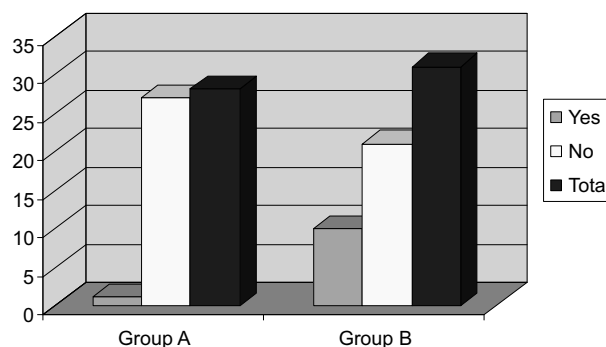
Table 6. Period from operation to relapse (metastasis)

Period (months)	Group A (N=3)	Group B (N=14)
12-24		1
24-36	1	3
36-48	1	3
48-60	1	4
60-72		3
Average	30	46

Table 7. Lethal outcome

	Group A	Group B
Yes	1(3,5%)	10(32,2%)
No	27(96,5%)	21(67,8%)
Total	28(100%)	31(100%)

Graph 3. Lethal outcome



With the statistical analysis of differences between groups A and Groups B, the following were determined:

There is a significant statistical difference between group A and group B in terms of characteristics of *clinical diagnosis* ( $p < 0.01$  99% confidence),  $Z = 2.589651$ ,

There is a statistical difference between group A and group B in terms of characteristics of *relapse* ( $p < 0.01$  99% confidence),  $Z = 2.543819$ ,

There is a statistical difference between group A and group B in terms of characteristics of *lethal outcome* ( $p < 0.01$  99% confidence),  $Z = 3.223401$ .

### Discussion

Computerized Digital Dermoscopy (CDD) is the most modern diagnostic method for early detection of suspicious pigmented lesions and melanomas. Dermoscopy is a superficial skin contact microscopy. This is the «in vivo» diagnosis with a new dimension of analysis of clinical morphological structures of the skin. Dermoscopy is now re-

presented in all known centers for early detection of malignant diseases of skin.<sup>1,6</sup>

All of our examinees were treated by digital dermoscopy for all changes of the skin, after anamnesis and clinical inspection.

An advisory clinical diagnosis of superficial melanomas in 17(60,8%) of examinees was incorrect in group A, while in group B clinical diagnosis was incorrect in 6 (19,3%) of examinees, which was statistically significant. At first, the reason for this is inconspicuous of superficial melanomas and their resemblance to ordinary or dysplastic nevi. Surface spreading melanoma is the most common form of melanoma. The lesions are slightly raised, with tangible boundaries and irregular outline. There are frequent variations in color: from tawny, brown, black, and blue to gray. The clinical diagnosis of such lesions is always questionable. On the contrary, the beginning of the nodular vertical growth characterizes development of papules accompanied by the creation of nodes, sometimes with ulceration, which creates too late and it is usually easy to notice.<sup>7</sup>

Nodular, a phase of vertical growth of melanoma could be developed in connection with any of nontumorigenic shape and creating so-called «a complex primary melanoma». It could be seen, in such cases, tumorigenic section near or inside of borders of nontumorigenic melanoma, which is always clinically extremely suspect.<sup>7,8,9</sup>

Morphologically habitual melanoma or «ordinary melanoma» is nodular melanoma. It differs from the complex melanoma according to that morphologically habitual melanoma is tumorigenic melanoma, but without clinically or histologically obvious nontumorigenic section around. That kind of melanoma is more difficult for clinical diagnosis.<sup>9,10</sup>

In group A, dermoscopic diagnosis was 100% accurate, while in group B, dermoscopic finding in 1 (3,2%) of examinees was not accurate in relation to the pathohistological analysis. It was an amorphous nodular melanoma, dermoscopic without any visible morphological structures.

Some of superficial melanomas on the skin remain relatively less aggressive. Actually, those melanomas are very little spreading in the epidermis, with the feature to remain high in corium, in other words, don't affect significantly layers below the level of interpapillary extensions.<sup>11</sup>

Nodular melanoma has only vertical growth and worse prognosis than superficial expanding melanoma. However, when the other risk factors are under control, such as thickness, prognosis of nodular melanoma is as worse as prognosis of other forms of melanoma.<sup>1</sup>

Sporadic spreading is almost mainly uncommon for thin melanoma (thinner than 1mm), and it is frequently at melanomas thicker than 2 mm. Lymphatic metastases usually occur earlier than hematogenous metastases. Even if metastases usually occur within 5 years after appearance of the disease, their appearance can be prolonged, particularly at thin melanomas. Late metastases are rare after 10 years.<sup>12</sup>

Only 3 (10,8%) of our examinees in group A were operated melanoma thinner than 1mm, while 12 (42,8%) of them had melanoma thickness of 2-3mm. Thicker melanomas were prevailed in group B. Only in 3 (9,7%) of examinees melanomas were in the zone of 1-2mm, while thickness of melanoma was over 3mm in the majority of examinees 18 (58%).

Prognosis is poor for patients with stage disease with metastasis. In a recent study, middle survival period for metastatic melanoma was 7, 5 months. Patients with cutaneous, nodular or visceral metastases had a survival period of 12,5 months and an estimated 14% of five years survival.<sup>13</sup>

By Clark the percentage of patients with relapses or metastasis in postoperative period of five years, with stage I disease is 0%, in stage II disease is 4%, in stage III disease is 33%, in stage IV disease is 61%, and in stage V disease is 78%.<sup>1</sup>

In group A, in the five-year period, relapse of diseases in the form of skin metastases were observed in 3(10,7%) of examinees. In group B, metastases appeared in 14 (45,1%) of examinees. In 4 examinees were cutaneous metastases, while others had visceral metastases.

Melanoma invasion of subcutaneous tissues usually means very poor prognosis. Surgical excision of these lesions is not successful, for it is regularly delayed.<sup>1,6,13</sup> Examinees in group B, 10(32,2%) of them with visceral metastases died.

### Conclusions

Advisory clinical diagnosis of superficial melanoma proved to be not accurate in most examinees. Dermoscopy showed a percentage accuracy of diagnosis by 100% of superficial expanding melanoma. The percentage of accuracy was 96,8%, in the

case of nodular melanoma. Dermoscopy is a diagnostic method of choice for early diagnosis of melanoma.

In the group of examinees that was treated for superficial melanoma were determined 3 relapses in the form of skin metastases, and in the group that was treated for nodular melanoma were determined 14 relapses with metastases. It can be assumed

that the superficial melanoma is easier for treatment, for statistically small number of relapses.

Nodular melanoma was fatal for 10 examinees, while in five-year period no one of examinees with superficial melanoma died.

## References

1. Lukić D.: Tumori kože. Medicinski fakultet Banja Luka, 2010; 45-48.
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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.
6. Lukić D, Bandić J, Lazić P. Rana detekcija melanoma, jedino rešenje za izlječenje opake bolesti. *Medicinska istraživanja.* 2005;39(1):48-53
7. 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.
8. Andersen BL, Shapiro CL, Farrar WB, Crespino T, Wells-Digregorio S. Psychological responses to cancer recurrence *Cancer*, 2005;104:1540-7.
9. Pennington, B.E., Leffe, D.J. Mohs micrographic surgery: Established uses and emerging trends. *Oncology, Willston Park, Aug.* 2005;19(9), str. 1165-71
10. Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.H., Winkeimann, R.K. *Malignant epithelial tumors. Dermatology, Berlin: Springer-Verlag.* 1991;1018-35
11. 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;Vol. 42, No. 3, pp. 145-50
12. Friedman, Rigel, *Cancer of the Skin. Philadelphia: Saunders*, 1991;132-55
13. Padgett JK, Hendrix JD Jr. *Cutaneous malignancies and their management. Otolaryngol Clin North Am*, 2001;34:523-553

## TERAPIJA POSTOPERATIVNE ATRIJALNE FIBRILACIJE

### MANAGEMENT OF POSTOPERATIVE ATRIAL FIBRILLATION

Dragana Unić-Stojanović<sup>1</sup>, Srdjan Babić<sup>1</sup>, Miomir Jović<sup>1,2</sup>, Djordje Radak<sup>1,2</sup>

**Sažetak:** Postoperativna atrijalna fibrilacija je najčešća postoperativna komplikacija u kardiovaskularnoj hirurgiji. Postoperativna atrijalna fibrilacija (PAF) minimalno produžava trajanje postoperativnog lečenja bolesnika i povećava učestalost postoperativnih komplikacija. Primena beta blokatora, amjodarona, statina, steroida, magnezijuma i sotalola pokazuje efikasnost u prevenciji PAF. Primena beta blokatora i amjodarona može biti praćena nastankom značajnih neželjenih reakcija. Međutim, perioperativna profilaktička primena statina je efikasna u prevenciji nastanka PAF i praćena je nižom incidencijom neželjenih reakcija. Terapija PAF se zasniva na kontroli frekvencije u komorama, kontrolisrčanog ritma i prevenciji tromboembolija. U cilju kontrole komorske frekvencije, koriste se beta blokatori, antagonisti kalcijumskih kanala i amjodaron. Kod bolesnika sa hemodinamskom nestabilnošću, indikovana je električna kardioverzija. Antikoagulantna terapija se koristi kao dodatak antiaritmčkoj terapiji PAF trajanja 48-h i duže ili u slučaju rizika nastanka cerebrovaskularnog tromboembolizma. U budućnosti, dabigatran bi mogao da se koristi za perioperativnu terapiju PAF, s obzirom da tokom njegove primene nije potreban monitoring antikoagulantnog efekta a ima brz početak dejstva i kratak poluživot. Prevencija nastanka postoperativne atrijalne fibrilacije je značajan perioperativni cilj, koji zahteva specifične perioperativne i druge pri-stupe.

**Ključne reči:** Atrijalna fibrilacija, kardiovaskularna hirurgija, statini, kontrola frekvencije, antikoagulantna terapija.

**Summary:** Postoperative atrial fibrillation (PAF) is the most frequent complication that occurs after cardiovascular surgery. PAF does slightly prolong the duration of hospital stay and increases the incidence of postoperative complications. Drug treatment with beta-blockers, amiodarone, statins, steroids, magnesium and sotalol can be effective in preventing PAF. The use of beta-blockers and amiodarone requires caution due to the possibility of drug-related adverse effects. However, perioperative prophylactic treatment with statins seems to be effective for preventing PAF and is associated with a low incidence of adverse effects. PAF can be treated by rhythm control, heart-rate control and antithrombotic therapy. For the purpose of heart rate control, beta blockers, calcium-channel antagonists and amiodarone are used. In patients with unstable hemodynamics, cardioversion may be performed for rhythm control. Anticoagulation is used in addition to heart-rate maintenance therapy in cases of PAF 48-h or more duration or in cases with a history of cerebrovascular thromboembolism. In the future, dabigatran could be used for perioperative management of PAF, because it does not require regular monitoring and has a quick onset of action with short serum half-life. Preventing PAF is an important goal and requires specific perioperative management as well as other approaches.

**Keywords:** Atrial fibrillation, Cardiovascular surgery, Statins, Rate control, Anticoagulant therapy



## Uvod

Postoperativna atrijalna fibrilacija (PAF) je najčešća postoperativna komplikacija u kardiovaskularnoj hirurgiji [29]. U poređenju sa hroničnom atrijalnom fibrilacijom (AF), postoperativna atrijalna fibrilacija minimalno produžava trajanje postoperativnog lečenja bolesnika i ne utiče na mortalitet. Postoji značajna povezanost PAF i incidencije komplikacija, kao što su kardiovaskularne komplikacije, bubrežna insuficijencija, infekcije i cerebrovaskularni inzult [47].

Cilj našeg rada je da prikazemo etiologiju, osnovne karakteristike i preventivne i terapijske mere PAF, navodeći najnovije rezultate publikovanih radova.

## PAF karakteristike

Atrijalna fibrilacija je najčešća postoperativna komplikacija hirurške revaskularizacije miokarda, koja nastaje kod oko 30% bolesnika. Incidencija tog poremećaja ritma je najveća posle valvularne hirurgije (30-40%) i kombinovanih hirurških procedura (40-60%)[3]. Takođe, AF je česta postoperativna komplikacijau nekardijalnoj hirurgiji, kao što su lobektomija pluća (učestalost 10-20%) ili pulmektomija (40%). PAF najčešće nastaje drugog postoperativnog dana i uobičajeno je prolaznog karaktera, mada kod oko 40% bolesnika ima tendenciju ponavljanja [47]. Rezultati novijih istraživanja ukazuju da PAF produžava trajanje lečenja u jedinici intenzivnog lečenja (2 dana u grupi bolesnika bez PAF nasuprot 3,6 dana u PAF grupi,  $p < 0,001$ ), trajanje bolničkog lečenja (7 danau grupi bolesnika bez PAF, odnosno 10 danau PAF grupi,  $p < 0,001$ ) i povećava incidenciju nastanka cerebrovaskularnog inzulta (CVI) (2,4%u grupi bolesnika bez PAF, odnosno 5,3% u PAF grupi,  $p < 0,001$ ) i rizik 30-dnevnog mortaliteta (3,0% u grupi bolesnika bez PAF odnosno 6,0% u PAF grupi,  $p < 0,001$ )[3].

Preoperativni faktori rizika za nastanak postoperativne atrijalne fibrilacije su prikazani u tabeli 1. Incidencija nastanka PAF je posebno visoka kod bolesnika starijih od 70 godina [3,5,34]. Konvencionalni faktori rizika za PAF su uvećana leva pretkomorai hipertrofija leve komore[34,35]. Drugi faktori rizika su gojaznost[48], diabetes mellitus [34,35] i metabolički sindrom [48]. Intraoperativni faktori rizika za nastanak AF su

prikazani u tabeli 2, a obuhvataju pretkomorsko oštećenje, ishemiju pretkomora, uvođenje vaskularnog katetera i nagle promene zapremine cirkulišuće krvi [34,35,48]. Postoperativni faktori rizika za nastanak AF su prikazani u tabeli 3i uključuju opterećenje volumenom, dizbalans elektrolita, supraventrikularne ekstrasistole i simpatičku hiperaktivnost [18]. Studije novijeg datuma, ukazuju da je inflamatorna reakcija značajan faktor rizika za PAF[28,46].

## Prevenција PAF

Konvencionalno, za terapiju PAF se koriste nedihidropiridinski antagonisti kalcijumskih kanala i digitalis[49]. Iako su nedihidropiridinski antagonisti kalcijumskih kanala efikasni u lečenju supraventrikularne tahikardije [4], njihova primena je praćena neželjenim efektima (atrioventrikularni blok, srćana insuficijencija) [54] i zbog toga nisu podesni za profilaktičku primenu. Rezultati meta-analize ukazuju da digitalis nije efikasan u prevenciji PAF, zato što je perioperativno naglašen simpatički tonus, a dejstvo digitalisatokom atrijalnih aritmija zasniva se na dejstvu na parasimpatički tonus i sniženju ventrikularne frekvencije[41]. U tabeli 5 su prikazane metode prevencije PAF.

## Beta blokatori

Beta blokatori pripadaju II klasi antiaritmika po Vaughan-Williams klasifikaciji. Beta blokatori su efikasni u terapiji supraventrikularnih aritmija [8], tahikardije[6] i lidokain-rezistentne ventrikularne fibrilacije[53]. Peroperativna profilaktička primena beta blokatora smanjuje kardiovaskularimorbiditet [7,11,43,44].

Colemani sar. [14] su pokazali da perioperativna primena beta blokatora skraćuje dužinu bolničkog lečenja ( $10,22 \pm 11,38$  danau grupi koja prima beta blokatore, odnosno  $12,40 \pm 15,67$  dana u placebo grupi,  $p = 0,001$ ) i smanjuje učestalost PAF (23,5% u grupi koja prima beta blokatore, odnosno 28,4% u placebo grupi;  $p = 0,02$ ).

Lindenauer isar. [31] su pokazali da profilaktička primena beta blokatora smanjuje bolnički mortalitet visoko rizičnih bolesnika, ali istovremeno pogoršava ishod lečenja nisko rizičnih bolesnika.

POISE studija [42], je velika randomizovana, kontrolisana studija kojom je pokazano da perioperativna primena beta blokatora smanjuje inciden-

ciju kardiovaskularnih neželjenih reakcija (5,8% bolesnika u metoprolol grupi, odnosno 6,9% bolesnika u placebo grupi,  $p=0,04$ ), ali povećava incidencijunastanka CVI (1,0% bolesnika u metoprolol grupi, odnosno 0,5% bolesnika u placebo grupi,  $p=0,03$ ) i smrtnog ishoda (3,1% bolesnika u metoprolol grupi, odnosno 2,3% bolesnika u placebo grupi,  $p=0,005$ ). Moguće objašnjenje za tako dobijene rezultate je veća učestalost beta blokatorima indukovane hipotenzije (15% u metoprolol grupi, odnosno 9,7% u placebo grupi) i bradikardije (6,6% u metoprolol grupi, odnosno 2,4% u placebo grupi).

Meta-analiza koja je obuhvatila 33 randomizovane kontrolisane studije pokazala je da beta blokatori smanjuju incidenciju nefatalnog infarkta miokarda i miokardne ishemije ali povećavaju incidenciju nastanka nefatalnog CVI, hipotenzije i bradikardije koje je potrebno lečiti [9].

Nove preporuke za primenu beta blokatora date su posle dobijanja rezultata POISE studije. Beta blokatori su, u odsustvu kontraindikacija, preporučeni za prevenciju PAF prema *American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/European Society of Cardiology (ESC)* (Američki kardiološki koledž/Američko udruženje za srce/Evropsko kardiološko društvo) preporukama za menadžment bolesnika sa AF [23]. Preporučena je preoperativna i rana postoperativna primena beta blokatora kod bolesnika bez kontraindikacija u aortokoronarnoj hirurgiji prema ACC/AHA preporukama u cilju smanjenja incidencije i/ili posledica AF [17]. Prema preporukama za lečenje bolesnika podvrgnutih nekardijalnoj hirurgiji indikovano je nastavak terapije beta blokatorima kod bolesnika koji već primaju terapiju beta blokatorima za stanja koja pripadaju ACC/AHA klasi I [22].

### Amjodaron

Amjodaron pripada klasi III antiaritmika prema Vaughan-Williams klasifikaciji. Amjodaron se primenjuje za prevenciju i lečenje PAF. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, jedonedeljna preoperativna *per os* primena amjodarona smanjuje incidenciju PAF (25% u amjodaronskoj grupi, odnosno 53% u placebo grupi,  $p=0,03$ ) [16], kao i postoperativna intravenska primena (35% odnosno 47%,  $p=0,01$ ) [24].

Preporučena je primena amjodarona za prevenciju AF kod visoko rizičnih bolesnika [23]. Meta-analiza randomizovanih placebo kontrolisanih studija je pokazala da je perioperativna primena amjodarona udružena sa povećanom incidencijom neželjenih reakcija (bradikardija, hipotenzija) [39]. Faktori rizika za nastanak neželjenih reakcija su intravenska primena amjodarona i primena više od 1 g amjodarona dnevno [39]. Iz tog razloga, profilaktička primena amjodarona je preporučena samo ako postoji visok rizik za nastanak PAF.

### Statini

Statini pokazuju plejotropno dejstvo, uključujući modifikaciju aterosklerotskog plaka i poboljšanje endotelne funkcije. Antiinflamatorni efekat statina ima značajnu ulogu u redukciji nastanka PAF i perioperativnih kardiovaskularnih komplikacija [33,40].

Mariscalco i sar. [51] su pokazali da PAF nastaje kod 29,5% bolesnika koji su preoperativno dobijali statine i kod 40,9% bolesnika koji nisu bili na terapiji statinima ( $p=0,021$ ). Meta-analiza randomizovanih studija je pokazala da preoperativna primena statina smanjuje učestalost nastanka postoperativnog infarkta miokarda i PAF [51].

Prema sadašnjim preporukama, statini nisu uključeni u standardni protokol za prevenciju PAF pre kardiovaskularne hirurgije. Međutim, s obzirom da statini imaju neznatne neželjene efekte, njihova primena se smatra bezbednom u prevenciji PAF.

### Anti-inflamatorni lekovi

Kardiovaskularna hirurgija uz primenu vantelesnog krvotoka je praćena nastankom značajnog sistemskog inflamatornog odgovora, koji delimično može biti odgovoran za nastanak PAF [1,30]. Bolesnici sa PAF imaju značajno više vrednosti C-reaktivnog proteina (CRP), broja leukocita i inflamatornih citokina u poređenju sa bolesnicima bez PAF [1,30].

Rezultati randomizovane kontrolisane studije Halonena i sar. [26] pokazuju da primena hidrokortizona smanjuje incidenciju PAF. Kortikosteroidi pokazuju antiinflamatorni efekat i postoperativno smanjenjuju koncentraciju CRP, nastanak mučnine, povraćanja i anoreksije, a pozitivno utiču na absorpciju *per os* primenjenih lekova, uključujući

beta blokatore, čime značajno doprinose smanjenju učestalosti PAF.

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi, takođe, smanjuju učestalost PAF. Međutim, nesteroidni antiinflamatorni lekovi imaju nefrotoksični efekat, zbog čega se ne preporučuju za prevenciju atrijalne fibrilacije [12].

### **Magnezijum**

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju prisustvo hipomagnezijemije kod bolesnika kod kojih nastaje PAF [45]. Meta-analiza je pokazala da primena magnezijuma smanjuje učestalost nastanka PAF (28% bolesnika u kontrolnoj grupi odnosno 18% bolesnika u terapijskoj grupi) [37]. Iako postoje podaci o prevenciji nastanka PAF peroperativnom primenom magnezijuma, postoje još uvek kontroverze oko njegove primene.

### **Hirurška revaskularizacija miokarda bez primene vantelesnog krvotoka**

Hirurškarevaskularizacija miokarda se izvodi sa (*on-pump*) ili bez primene vantelesnog krvotoka (VTK) (*off-pump*). Smatralo se da je incidencija PAF niža posle aortokoronarne hirurgije bez primene VTK u poređenju sa konvencionalnom hirurgijom tokom koje se koristi VTK [50]. Međutim, rezultati studije, koju su sprovedi Moler isar. [38], kod visoko rizičnih bolesnika ukazuju da incidencija kardiovaskularnih komplikacija, uključujući PAF, je slična kada se porede hirurška revaskularizacija miokarda sa ili bez primene VTK. Još uvek postoji kontroverzno mišljenje o redukciji nastanka PAF primenom *off-pump* hirurške revaskularizacije miokarda aortokoronarnim premošćenjem.

### **Atrijalni pejsmejker**

Profilaktička primena atrijalnog pejsmejкера u prevenciji PAF posle kardiovaskularne hirurgije je bazirana na činjenici da pejsmejker prvenstveno utiče na unutarpretkomorsko sprovođenje impulsa atrijalnu refrakternost. Atrijalni pejsing sprečava nastanak PAF sledećim mehanizmima: smanjuje se bradikardijom indukovano širenje atrijalne repolarizacije, poništava se okidač atrijalne fibrilacije *overdrive* supresijom i menja se obrazac atrijalne aktivacije primenom istovremene aktiva-

cije obe pretkomore [18]. Meta-analize su pokazale da monoatrijalni i biatrijalni pejsmejker smanjuju učestalost PAF i da je biatrijalni pejsing korisniji od monoatrijalnog pejsiga u prevenciji PAF [11,15]. Glavni neželjeni efekat profilaktičke primene atrijalnog pejsinga je mogući proaritmogeni efekat uzrokovan neadekvatnom senzitivnošću. Potrebna su dalja ispitivanja o koristi atrijalnog pejsinga u prevenciji PAF.

### **Terapija PAF**

PAF je uobičajeno prolaznatako da lečenje nije potrebno. Međutim, lečenje PAF je indikovano kod bolesnika sa kompromitovanom srčanom funkcijom, ako AF traje duže od 48 h u slučaju postojanja visokog rizika za nastanak cerebralne tromboembolije [17,23]. Slično lečenju hronične AF, terapija PAF se zasniva na kontroli ritma, kontroli komorske frekvencije i primeni antitrombotičnih lekova.

Kontrolisanje komorske frekvencije tokom perzistentne AF postiže se farmakološki primenom beta blokatora ili nehidropiridinskih antagonista kalcijumovih kanala. U slučaju akutne potrebe za smanjenjem frekvencije ventrikularnog odgovora tokom atrijalne fibrilacije, preporučena je intravenska primena beta blokatora (esmolol) ili nehidropiridinskih antagonista kalcijumovih kanala (verapamil, diltiazem) i amjodarona [10]. Beta blokatori, u poređenju sa antagonistima kalcijumovih kanala, ubrzavaju konverziju postoperativne supraventrikularne aritmije u sinusni ritam i efikasniji su u kontroli ventrikularne frekvencije tokom AF [8]. Kod bolesnika bez hemodinamske nestabilnosti, preporučeno je kontrolisanje i održavanje srčane frekvencije u opsegu 90-115 udara/min [23]. Kardioverzija AF nije preporučena kod asimptomatskih ili minimalno simptomatskih bolesnika. Prvo je indikovano korigovanje osnovnog problema. Zapravo, samo lečenje osnovnog uzroka nastanka postoperativne atrijalne fibrilacije dovodi do konverzije poremećaja ritma u sinusni ritam [23].

PAF dovodi do gubitka atrijalne kontrakcije (*atrial kick*) i do 20-30% smanjenja minutnog volumena srca. Kod hemodinamski nestabilnih bolesnika (često posle kardiovaskularne hirurgije), preporučeno je održavanje ili ponovno uspostavljanje sinusnog ritma [23]. Kod bolesnika kod kojih nastane postoperativna AF za uspostavljanje sinusnog

ritma preporučena je medikamentna kardioverzija primenom ibutilida ili električna kardioverzija [23]. Za farmakološku konverziju AF u sinusni ritam koriste se različiti antiaritmici: flekainid, dofetilid, ibutilid, propafen, amiodaron, prokainamid, ibutilid i sotalol. Iako su antiaritmici iz klase III antiaritmika efikasniji od placeba u terapiji PAF, sotalol je poželjniji u ovakvim prilikama jer svojim beta blokatorskim svojstvima usporava srčanu frekvenciju a proaritmijaska toksičnost se retko ispoljava. Međutim, sotalol nije tako efikasan u uspostavljanju sinusnog ritma. U slučaju neefikasnosti farmakološke kardioverzije, preporučena je električna kardioverzija. Kod bolesnika sa rekurentnom ili refrakternom AF indikovana je primena antiaritmika u cilju održavanja sinusnog ritma. Za održavanje sinusnog ritma preporučeni su dofetilid (klasa I, LOE A) i amiodaron i ibutilid (klasa IIa, LOE A) [23].

PAF je udružena sa povećanim rizikom nastanka kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih komplikacija, prvenstveno sa nastankom CVI [47]. Antitrombotična terapija se primenjuje kao dodatak antiaritmikima ako PAF traje duže od 48h ili u slučaju postojanja rizika za nastanak cerebrovaskularnog tromboembolizma. Antikoagulantna terapija je efikasnija od primene aspirina u prevenciji CVI kod bolesnika sa AF. U slučaju kontraindikacija za antikoagulantnu terapiju, indikovana je primena aspirina u dnevnoj dozi od 81-325 mg [23]. Za bolesnike bez mehaničkog srčanog zalistka koji imaju visok rizik za nastanak CVI (prethodni tromboembolizam (inzult, TIA, sistemska embolija) i reumatska stenoza mitralnog ušća) [23] preporučena je oralna antikoagulantna terapija primenom antagonista vitamina

K uz održavanje vrednosti internacionalnog normalizovanog odnosa od 2,0-3,0 [27]. Nema jasnog konsenzusa o optimalnom trajanju antikoagulantne terapije, iako je preporučeno da se data terapija isključi po uspostavljanju sinusnog ritma, s obzirom da u tom slučaju rizik primene date terapije prevazilazi korist za bolesnika. Zapravo, antikoagulantna terapija u perioperativnom periodu povećava rizik nastanka krvarenja [36]. Prema tome, izbor antitrombotične terapije treba da bude zasnovan na apsolutnom riziku za nastanak CVI sa jedne strane i krvarenja s druge strane, i relativnom riziku i koristi za svakog pojedinačnog bolesnika.

U nedavno sprovedenoj RE-LY studiji primena dabigatrana u dozi od 150 mg je praćena nižom incidencijom inzulta i sistemske embolije, mada je incidencija nastanka značajnog krvarenja slična primeni varfarina [13]. Dabigatran je potentni, direktni kompetitivni inhibitor trombina, koji ima brzi početak dejstva i kratak serumski poluživot i ne zahteva monitoring antikoagulantnog dejstva [13]. Nema interakcije između dabigatrana i istovremeno uzete hrane i lekova. Očekuje se da se perioperativna primena ovog leka u terapiji PAF poveća u budućnosti.

### **Zaključak**

Saznanje da postoperativna atrijska fibrilacija utiče na ishod lečenja bolesnika, dovelo je do intenzivnog ispitivanja optimalnog načina prevencije i terapije ove postoperativne komplikacije. Prevencija nastanka postoperativne atrijske fibrilacije je značajan perioperativni cilj, koji zahteva specifične perioperativne i druge pristupe.

## Reference

1. Abdelhadi RH, Gurm HS, Van Wagoner DR, Chung MK. Relation of an exaggerated rise in white blood cells after coronary bypass or cardiac valve surgery to development of atrial fibrillation post-operatively. *Am J Cardiol.* 2004;93:1176-8.
2. Almassi GH, Pecsí SA, Collins JF, Shroyer AL, Zenati MA, Grover FL. Predictors and impact of postoperative atrial fibrillation on patients' outcomes: a report from the Randomized On Versus Off Bypass trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;143(1):93-102.
3. Almassi GH, Schowalter T, Nicolosi AC, Aggarwal A, Moritz TE, Henderson WG, Tarazi R, Shroyer AL, Sethi GK, Grover FL, Hammermeister KE. Atrial fibrillation after cardiac surgery: a major morbid event? *Ann Surg.* 1997;226:501-11.
4. Andrews TC, Reimold SC, Berlin JA, Antman EM. Prevention of supraventricular arrhythmias after coronary artery bypass surgery. A meta-analysis of randomized control trials. *Circulation.* 1991;84:III236-44.
5. Aranki SF, Shaw DP, Adams DH, Rizzo RJ, Couper GS, VanderVliet M, Collins JJ Jr, Cohn LH, Burstin HR. Predictors of atrial fibrillation after coronary artery surgery. Current trends and impact on hospital resources. *Circulation.* 1996;94:390-7.
6. Atarashi H, Kuruma A, Yashima M, Saitoh H, Ino T, Endoh Y, Hayakawa H. Pharmacokinetics of landiolol hydrochloride, a new ultra-short-acting b-blocker, in patients with cardiac arrhythmias. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68:143-50.
7. Auerbach AD, Goldman L. b-Blockers and reduction of cardiac events in noncardiac surgery: scientific review. *JAMA.* 2002;287:1435-44.
8. Balser JR, Martinez EA, Winters BD, Perdue PW, Clarke AW, Huang W, Tomaselli GF, Dorman T, Campbell K, Lipsett P, Breslow MJ, Rosenfeld BA. Beta-adrenergic blockade accelerates conversion of postoperative supraventricular tachyarrhythmias. *Anesthesiology.* 1998;89:1052-9.
9. Bangalore S, Wetterslev J, Pranesh S, Sawhney S, Gluud C, Messerli FH. Perioperative beta blockers in patients having noncardiac surgery: a meta-analysis. *Lancet.* 2008;372:1962-76.
10. Beattie WS, Wijeyesundera DN, Karkouti K, McCluskey S, Tait G. Does tight heart rate control improve beta-blocker efficacy? An updated analysis of the noncardiac surgical randomized trials. *Anesth Analg.* 2008;106:1039-48.
11. Burgess DC, Kilborn MJ, Keech AC. Interventions for prevention of post-operative atrial fibrillation and its complications after cardiac surgery: a meta-analysis. *Eur Heart J.* 2006;27:2846-57.
12. Cheruku KK, Ghani A, Ahmad F, Pappas P, Silverman PR, Zelinger A, Silver MA. Efficacy of nonsteroidal anti-inflammatory medications for prevention of atrial fibrillation following coronary artery bypass graft surgery. *Prev Cardiol.* 2004;7:13-8.
13. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, Pogue J, Reilly PA, Themeles E, Varrone J, Wang S, Alings M, Xavier D, Zhu J, Diaz R, Lewis BS, Darius H, Diener HC, Joyner CD, RE-LY Steering Committee and Investigators. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2009;361:1139-51.
14. Coleman CI, Perkerson KA, Gillespie EL, Kluger J, Gallagher R, Horowitz S, White CM. Impact of prophylactic postoperative beta-blockade on post-cardiothoracic surgery length of stay and atrial fibrillation. *Ann Pharmacother.* 2004;38:2012-6.
15. Daoud EG, Snow R, Hummel JD, Kalbfleisch SJ, Weiss R, Augostini R. Temporary atrial epicardial pacing as prophylaxis against atrial fibrillation after heart surgery: a meta-analysis. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2003;14:127-32.
16. Daoud EG, Strickberger SA, Man KC, Goyal R, Deeb GM, Bolling SF, Pagani FD, Bitar C, Meissner MD, Morady F. Preoperative amiodarone as prophylaxis against atrial fibrillation after heart surgery. *N Engl J Med.* 1997;337:1785-91.
17. Eagle KA, Guyton RA, Davidoff R, Edwards FH, Ewy GA, Gardner TJ, Hart JC, Herrmann HC, Hillis LD, Hutter AM Jr, Lytle BW, Marlow RA, Nugent WC, Orszulak TA, American College of Cardiology, American Heart Association. ACC/AHA guideline update for coronary artery bypass graft sur-

- gery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1999 Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery). *Circulation*. 2004;2004(110):e340-437.
18. Echahidi N, Pibarot P, O'Hara G, Mathieu P. Mechanisms, prevention, and treatment of atrial fibrillation after cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:793-801.
  19. Echahidi N, Mohty D, Pibarot P, Despre's JP, O'Hara G, Champagne J, Philippon F, Daleau P, Voisine P, Mathieu P. Obesity and metabolic syndrome are independent risk factors for atrial fibrillation after coronary artery bypass graft surgery. *Circulation*. 2007;116:1213-9.
  20. Epstein AE, Alexander JC, Gutterman DD, Maisel W, American College of Chest Physicians. Anticoagulation: American College of Chest Physicians guidelines for the prevention and management of postoperative atrial fibrillation after cardiac surgery. *Chest*. 2005;128(2 Suppl):24--7.
  21. Ferguson TB Jr, Coombs LP, Peterson ED, Society of Thoracic Surgeons National Adult Cardiac Surgery Database. Preoperative beta-blocker use and mortality and morbidity following CABG surgery in North America. *JAMA*. 2002;287:2221-7.
  22. Fleisher LA, Beckman JA, Brown KA, Calkins H, Chaikof EL, Fleischmann KE, Freeman WK, Froehlich JB, Kasper EK, Kersten JR, Riegel B, Robb JF. 2009 ACCF/AHA focused update on perioperative beta blockade incorporated into the ACC/AHA 2007 guidelines on perioperative cardiovascular evaluation and care for noncardiac surgery: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2009;120:e169-276.
  23. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Kay GN, Le Huez JY, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann LS, Smith SC Jr, Priori SG, Estes NA 3rd, Ezekowitz MD, Jackman WM, January CT, Lowe JE, Page RL, Slotwiner DJ, Stevenson WG, Tracy CM, Jacobs AK, Anderson JL, Albert N, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Guyton RA, Halperin JL, Hochman JS, Kushner FG, Ohman EM, Stevenson WG, Tarkington LG, Yancy CW, American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force. ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2011;2011(123):e269-367.
  24. Guarnieri T, Nolan S, Gottlieb SO, Dudek A, Lowry DR. Intravenous amiodarone for the prevention of atrial fibrillation after open heart surgery: the Amiodarone Reduction in Coronary Heart (ARCH) trial. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:343-7.
  25. Hagens VE, Ranchor AV, Van Sonderen E, Bosker HA, Kamp O, Tijssen JG, Kingma JH, Crijns HJ, RACE Study Group. Effect of rate or rhythm control on quality of life in persistent atrial fibrillation. Results from the Rate Control Versus Electrical Cardioversion (RACE) Study. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:241-7.
  26. Halonen J, Halonen P, Ja'rvinen O, Taskinen P, Auvinen T, Tarkka M, Hippelä'inen M, Juvonen T, Hartikainen J, Hakala T. Corticosteroids for the prevention of atrial fibrillation after cardiac surgery: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007;297:1562-7.
  27. Hylek EM, Go AS, Chang Y, Jensvold NG, Henault LE, Selby JV, Singer DE. Effect of intensity of oral anticoagulation on stroke severity and mortality in atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2003;349:1019-26.
  28. Ishii Y, Schuessler RB, Gaynor SL, Yamada K, Fu AS, Boineau JP, Damiano RJ Jr. Inflammation of atrium after cardiac surgery is associated with inhomogeneity of atrial conduction and atrial fibrillation. *Circulation*. 2005;111:2881-8.
  29. Jin R, Hiratzka LF, Grunkemeier GL, Krause A, Page US 3rd. Aborted off-pump coronary artery bypass patients have much worse outcomes than on-pump or successful off-pump patients. *Circulation*. 2005;112:1332-7.
  30. Lamm G, Auer J, Weber T, Berent R, Ng C, Eber B. Postoperative white blood cell count predicts atrial fibrillation after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2006;20:51-6.
  31. Lindenauer PK, Pekow P, Wang K, Mamidi DK, Gutierrez B, Benjamin EM. Perioperative

- b*-blocker therapy and mortality after major noncardiac surgery. *N Engl J Med*. 2005;353:349-61.
321. Mariscalco G, Lorusso R, Klersy C, Ferrarese S, Tozzi M, Vanoli D, Domenico BV, Sala A. Observational study on the beneficial effect of preoperative statins in reducing atrial fibrillation after coronary surgery. *Ann Thorac Surg*. 2007;84:1158-64.
  33. Marin F, Pascual DA, Roldan V, Arribas JM, Ahumada M, Tornel PL, Oliver C, Goz-Plana J, Lip GY, Valde's M. Statins and postoperative risk of atrial fibrillation following coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol*. 2006;97:55-60.
  34. Mathew JP, Parks R, Savino JS, Friedman AS, Koch C, Mangano DT, Browner WS. MultiCenter Study of Perioperative Ischemia Research Group Atrial fibrillation following coronary artery bypass graft surgery: predictors, outcomes, and resource utilization. *JAMA*. 1996;276:300-6.
  35. Mathew JP, Fontes ML, Tudor IC, Ramsay J, Duke P, Mazer CD, Barash PG, Hsu PH, Investigators of the Ischemia Research and Education Foundation, Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. A multicenter risk index for atrial fibrillation after cardiac surgery. *JAMA*. 2004;291:1720-9.
  36. Meurin P, Weber H, Renaud N, Larrazet F, Tabet JY, Demolis P, Ben Driss A. Evolution of the postoperative pericardial effusion after day 15: the problem of the late tamponade. *Chest*. 2004;125:2182-7.
  37. Miller S, Crystal E, Garfinkle M, Lau C, Lashevsky I, Connolly SJ. Effects of magnesium on atrial fibrillation after cardiac surgery: a meta-analysis. *Heart*. 2005;91:618-23.
  38. Moller CH, Perko MJ, Lund JT, Andersen LW, Kelbaek H, Madsen JK, Winkel P, Gluud C, Steinbrüchel DA. No major differences in 30-day outcomes in high-risk patients randomized to off-pump versus on-pump coronary bypass surgery: the best bypass surgery trial. *Circulation*. 2010;121(4):498-504
  39. Patel AA, White CM, Gillespie EL, Kluger J, Coleman CI. Safety of amiodarone in the prevention of post-operative atrial fibrillation: a meta-analysis. *Am J Health Syst Pharm*. 2006;63:829-37.
  40. Patti G, Chello M, Candura D, Pasceri V, D'Ambrosio A, Covino E, Di Sciascio G. Randomized trial of atorvastatin for reduction of postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery: results of the ARMYDA-3 (Atorvastatin for Reduction of Myocardial Dysrhythmia After cardiac surgery) study. *Circulation*. 2006;114:1455-61.
  41. Podrid PJ. Prevention of post-operative atrial fibrillation: what is the best approach? *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:340-2.
  42. POISE Study Group, Devereaux PJ, Yang H, Yusuf S, Guyatt G, Leslie K, Villar JC, Xavier D, Chrolavicius S, Greenspan L, Pogue J, Pais P, Liu L, Xu S, Ma' laga G, Avezum A, Chan M, Montori VM, Jacka M, Choi P. Effects of extended-release metoprolol succinate in patients undergoing non-cardiac surgery (POISE trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2008;371:1839-47.
  43. Poldermans D, Boersma E, Bax JJ, Thomson IR, van de Ven LL, Blankensteijn JD, Baars HF, Yo TI, Trocino G, Vigna C, Roelandt JR, van Urk H. The effect of bisoprolol on perioperative mortality and myocardial infarction in high-risk patients undergoing vascular surgery. Dutch Echocardiographic Cardiac Risk Evaluation Applying Stress Echocardiography Study Group. *N Engl J Med*. 1999;341:1789-94.
  44. Poldermans D, Boersma E, Bax JJ, Thomson IR, Paelinck B, van de Ven LL, Scheffer MG, Trocino G, Vigna C, Baars HF, van Urk H, Dutch Echocardiographic Cardiac Risk Evaluation Applying Stress Echocardiography Study Group. Bisoprolol reduces cardiac death and myocardial infarction in high-risk patients as long as 2 years after successful major vascular surgery. *Eur Heart J*. 2001;22:1353-8.
  45. Satur CM. Magnesium and cardiac surgery. *Ann R Coll Surg Engl*. 1997;79:349-54.
  46. Tselentakis EV, Woodford E, Chandy J, Gaudette GR, Saltman AE. Inflammation effects on the electrical properties of atrial tissue and inducibility of post-operative atrial fibrillation. *J Surg Res*. 2006;135:68-75.
  47. Villareal RP, Hariharan R, Liu BC, Kar B, Lee VV, Elayda M, Lopez JA, Rasekh A, Wilson JM, Massumi A. Postoperative atrial fibrillation and mortality after coronary artery bypass surgery. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:742-8.

48. Wang TJ, Parise H, Levy D, D'Agostino RB Sr, Wolf PA, Vasan RS, Benjamin EJ. Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA*. 2004;292:2471-7.
49. Wijeyesundera DN, Beattie WS, Rao V, Karski J. Calcium antagonists reduce cardiovascular complications after cardiac surgery: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1496-505.
50. Wijeyesundera DN, Beattie WS, Djajani G, Rao V, Borger MA, Karkouti K, Cusimano RJ. Off-pump coronary artery surgery for reducing mortality and morbidity: meta-analysis of randomized and observational studies. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:872-82.
51. Winchester DE, Wen X, Xie L, Bavry AA. Evidence of preprocedural statin therapy a meta-analysis of randomized trials. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:1099-109.
52. Wyse DG, Waldo AL, DiMarco JP, Domanski MJ, Rosenberg Y, Schron EB, Kellen JC, Greene HL, Mickel MC, Dalquist JE, Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management (AFFIRM) Investigators. A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2002;347:1825-33.
53. Van Dantzig JM, Koster RW, Biervliet JD. Treatment with esmolol of ventricular fibrillation unresponsive to lidocaine and procainamide. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1991;5:600-3.
54. Zeltser D, Justo D, Halkin A, Rosso R, Ish-Shalom M, Hochenberg M, Viskin S. Drug-induced atrioventricular block: prognosis after discontinuation of the culprit drug. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:105-8.

Tabela 1. Preoperativni faktori rizika nastanka postoperativne atrijske fibrilacije  
 Table 1. Preoperative risk factors for postoperative atrial fibrillation

Faktori rizika	
Starost	Diabetes
Uvećana leva pretkomora	Gojaznost
Hipertrofična leva komora	Metabolički sindrom
Hipertenzija	

Tabela 2. Intraoperativni faktori rizika za nastanak postoperativne atrijske fibrilacije  
 Table 2. Intraoperative risk factors for postoperative atrial fibrillation

Faktori rizika	
Oštećenje pretkomora	Iznenadne promene cirkulatornog volumena
Miokardna ishemija	Venska kanulacija

Tabela 3. Postoperativni faktori rizika za nastanak postoperativne atrijske fibrilacije  
 Table 3. Postoperative risk factors for postoperative atrial fibrillation

Faktori rizika	
Hipervolemija	Supraventrikularne ekstrasistole
Povećano naknadno opterećenje	Dizbalans autonomnog nervnog sistema
Hipotenzija	Elektrolitni dizbalans
Inflamacija	

Tabela 4. Preventivne mere za nastanak postoperativne atrijske fibrilacije  
 Table 4. Prevention of postoperative atrial fibrillation

Faktori rizika	
Beta blokatori	Steroidi
Amjodaron	Statini
Off pump koronarna revaskularizacija	Pejsmejker



Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet  
Institut za kardiovaskularne bolesti "Dedinje"  
Klinika za vaskularnu hirurgiju

## KLINIČKI ZNAČAJ OTKRIVANJA I NADOKNADE DEFICITA ANTITROMBINA U VASKULARNOJ HIRURGIJI

### CLINICAL SIGNIFICANCE OF DISCOVERING AND COMPENSATING ANTITHROMBIN DEFICIENCY IN VASCULAR SURGERY

Evgenija Strugarević, Branko Čalija, Predrag Jovanović, Đorđe Radak

**Sažetak:** Antitrombin (AT), ranije nazivan antitrombin III (ATIII) odlikuje se značajnom i snažnom ulogom prirodnog antikoagulansa i inhibitora serinskih proteaza kojim se inaktivira delovanje enzima koji aktivno učestvuju u aktivaciji faktora koagulacije. Pored toga, antitrombin poseduje i antiinflamatorne efekte koji, takođe, zavise od aktivnosti plazmatskih faktora koagulacije. Nasledni deficit AT je retko i uglavnom neprepoznato stanje koje je udruženo sa neadekvatnim antikoagulantnim endogenim odgovorom i zbog toga se kod osoba sa ovim deficitom ne obuzdava patološka aktivacija koagulacionih serinskih proteaza. Nasleđuje se kao autozomno dominantno stanje, pa nasledni deficit AT u tipičnim uslovima snižava aktivnost AT na 40 – 60%. Kao rezultat toga osobe sa naslednim deficitom AT imaju za 50% i više povećan rizik od venskog tromboembolizma (VTE). Specifično za deficit AT je da se rizik od VTE povećava za tri do sedam puta, u odnosu na deficit ostalih faktora koji utiču na nastajanje tromboembolije i koji su definisani kao faktori trombofilije. Na osnovu toga može se sagledati kakav značaj ima održavanje nivoa AT u granicama od 80-120%. Na osnovu podataka iz literature i klinickog iskustva, većina autora ne preporučuje dugotrajnu antikoagulantnu trombopofilaksu nadoknadom AT, posebno ne kod asimptomatskih stanja, jer se uz primenu heparina sa nadoknadom antitrombina povećava rizik od krvarenja. Međutim, kratkotrajna nadoknada koncentrata antitrombina ima veliki značaj u sprečavanju venskog tromboembolizma (VTE) u specifičnim situacijama kao što su hirurške intervencije, trauma, trudnoća, porođaj i neposredni postporođajni period. Koncentrat AT, standardni heparin ili

heparini male molekulske mase (HMMM), sveža plazma, i rekombinantni humani AT (rhAT) su u savremenim uslovima primenjeni kao terapijski postupci kod pacijenata sa deficitom AT. Cilj ovog rada je da ukaže na značaj nadoknade antitrombina u zbrinjavanju pacijenata sa naslednim i stečenim deficitom AT u akutnim tromboembolijskim stanjima nastalim posle hirurških intervencija, porođaja i traume.

**Ključne reči:** *Nasledni deficit antitrombina, venski tromboembolizam, antikoagulacija, antitrombin, trombopofilaksa*

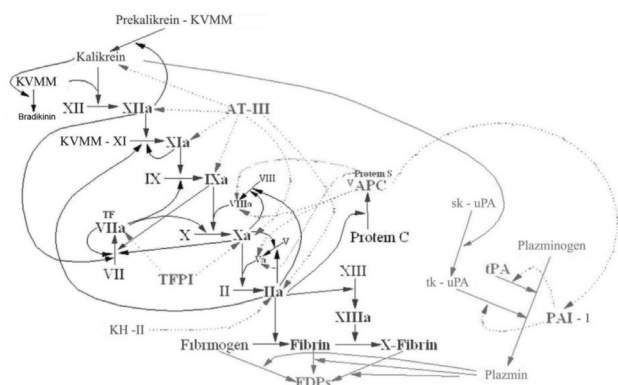
**Summary:** Antithrombin (AT) functions as a potent natural anticoagulant and serine protease inhibitor inactivating many enzymes in the coagulation cascade. Antithrombin also possesses anti-inflammatory properties, many of which are mediated by its actions as an anticoagulant. Hereditary AT deficiency is a rare, underrecognized medical condition that is associated with inadequate endogenous anticoagulation thought to result from impaired inhibition of serine protease coagulation factors. Inherited as an autosomal dominant trait, congenital AT deficiency typically reduces functional AT levels to 40–60% of normal. As a result, individuals with hereditary AT deficiency have a  $\geq 50\%$  lifetime risk of venous thromboembolism (VTE). Specifically, AT deficiency is associated with a three- to seven-fold higher risk of VTE compared with other thrombophilias. Thus, maintaining adequate levels of AT during high-risk periods is an important. Long-term anticoagulant thromboprophylaxis is not recommended in asymptomatic patients with AT deficiency because of the increased risk of haemorrhage. However,

treatment guidelines recommend short-term thromboprophylaxis in high-risk clinical settings, including surgery, trauma, and management of pregnancy, labour, and delivery. The goal of treatment for patients with hereditary AT deficiency is an increase in AT activity to 80–120% of normal levels. Plasma-derived AT, heparin or LMWH, fresh frozen plasma (FFP), and human recombinant AT (rhAT) are treatment options for individuals with hereditary AT deficiency. The objective of this review is to discuss hereditary AT deficiency and the role of AT replacement therapy in the treatment of patients with this congenital disorder or with an increased risk for acute venous thromboembolism.

**Keywords:** Hereditary antithrombin deficiency, venous thromboembolism, anticoagulation, antithrombin, thromboprophylaxis

**Uvod**

Antitrombin (AT) je glikoprotein koji ima 58,2-kD i deluje kao prirodni antikoagulans i inhibitornim delovanjem na trombin. Sintetiše se u jetri i cirkuliše u plazmi, AT je inhibitor raznih serinskih proteaza (SERPINI) i inaktivira enzime u koagulacionoj kaskadi, posebno trombin (faktor IIa) i faktor Xa. (slika 1)<sup>1-3</sup>. AT se u plazmi nalazi u dva izoformna oblika: alfa (90%-95%) i beta (5%-10%). Alfa oblik odlikuje se snažnim inhibitornim efektom, a beta oblik ima slabiji inhibitorni efekat na faktore koagulacije<sup>4-6</sup>.

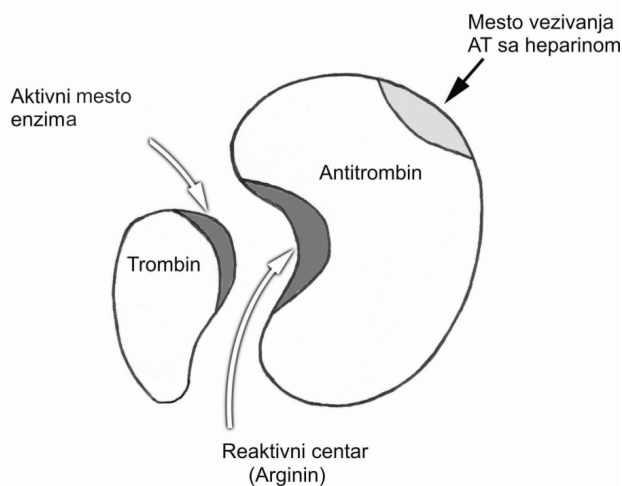


KVMM-kinogen velike molekulske mase; AT-antitrombin; KH-II-kofaktor heparina II; f-faktor; TF-tkivni faktor; APC-aktivirani protein C; sk-koncentracija u serumu; tk-koncentracija u tkivu, uPA-aktivator

plazminogena uree; tPA-aktivator plazminogena tkiva; PAI-1-inhibitor aktivacije plazminogena; FDP-degradacioni produkti fibrina

Slika 1. Faktori koagulacione kaskade i mesta delovanja antitrombina

Prve pretpostavke o postojanju antitrombina dao je Morawitz davne 1905. g. Tek posle više od pola veka, 1965. g. Olav Egeberg opisao je porodicu kod čijih članova je otkrio da je tromboza vena nastala usled urođenog deficita antitrombina<sup>7</sup>. Antitrombin pripada porodici serpin-a i to su prirodni inhibitori u koje se pored antitrombina ubrajaju kofaktor heparina II (KHII), alfa2-antiplazmin, inhibitor aktivatora plazminogena -1 (PAI-1), inhibitor komponente 1 komplementa (C1-inhibitor) i alfa1-antitripsin<sup>8</sup>. Za razliku od nekih direktnih inhibitora trombina (kao na primer agratroban), koji se odlikuje reverzibilnim, prolaznim efektom na aktivnost trombina, AT inhibira trombin (faktor IIa) ireverzibilno, nepovratno. Inhibitorno delovanje AT na enzime faktora koagulacije, u prirodnim uslovima odvija se polako i sporo. Međutim, u prisustvu heparina u molekulama AT se indukuju konformacione promene, a kao rezultat tih promena aktivnost AT se povećava >1,000-puta (slika 2)<sup>9-10</sup>.



Slika 2. Aktivna mesta antitrombina za vezivanje trombina i heparina

Pored snažne antikoagulantne aktivnosti AT se odlikuje i antiinflamatornim osobinama. Poznato je da inflamacija može početi aktiviranjem faktora koagulacije, ali antiinflamatorni efekti AT ne zavisi isključivo od faktora koagulacije jer AT dejstvuje i preko receptora na leukocitima i ćelijama endotela (Tabela 1)<sup>11-14</sup>.

	Fiziološki efekti
<b>Inhibicija trombina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prevencija aktivacije trombocita i ćelija endotela</li> <li>• supresija faktora koji pokreću interakciju neutrofila i ćelija endotela (IL-1, IL-6, IL-8, PHM, P-selektin)</li> </ul>
<b>Inhibicija faktora Xa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• supresija faktora koji pokreću aktivaciju neutrofila i ćelija endotela (IL-6, IL-8, E-selektin)</li> </ul>
<b>Inhibicija faktora VIIa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prevencija stvaranja kompleksa sa tkivnim faktorom i istovremeno aktivaciju citokina (IL-6, IL-8)</li> </ul>
<b>Sinteza prostaciklina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• supresija aktivacije trombocita (adhezija i agregacija)</li> <li>• inhibicija vezivanja neutrofila za ćelije endotela</li> <li>• snižava oslobađanje IL-6, IL-8, FNT iz ćelija endotela</li> </ul>
<b>Inaktivacija leukocita</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prevencija efekta "kotrljanja" neutrofila, adhezije i oštećenja tkiva</li> </ul>
AT-antitrombin; IL - interleukin; PHM - protein hemotakse monocita; FNT - faktor nekroze tumora	

Tabela 1. Antiinflamatorni efekti antitrombina

Najvažnija funkcija antitrombina je inhibicija trombina (po čemu je AT i dobio ime). Međutim, AT inhibira i druge enzime faktora koagulacione kaskade (FXIa, FXa, FXIa, FXIIa), koji, takođe, mogu stimulisati stvaranje različitih medijatora inflamacije i proliferacije, kao što su: interleukin (IL)-6, IL-8, E-selektin i ćelijski receptori na monocitima i ćelijama endotela<sup>11-13</sup>. Antitrombin može pretrpeti promene u strukturi proteina zamenu amino-kiselina čime se smanjuje inhibitorna funkcija AT.

Antitrombin se vezuje i za ćelije endotela i pomaže u oslobađanju trombomodulina koji blokira aktivnost trombina. AT pomaže u oslobađanju inhibitora tkivnog faktora (TFPI) i tako povećava kapacitet AT za neutralisanje aktiviranih faktora koagulacije (FVIIa).

Nasledni deficit AT udružen je sa neadekvatnom antikoagulacijom kao rezultat oštećene inhibicije serinske proteaze faktora koagulacije. Usled toga u plazmi je povećan nivo peptida (fragmenti protrombina 1 i 2) koji su pokazatelji aktivnosti trombina čime se posredno potvrđuje odsustvo inhibitorne aktivnosti AT u plazmi<sup>14-15</sup>.

Nasledeno kao autosomno dominantno stanje, nasledni deficit AT ima za posledicu snižen nivo AT na 40 – 60% u odnosu na normalnih 80 – 120%. Zbog toga je za 50% povećan rizik od venskog tromboembolizma (VTE), posebno kod pac-

ijenata koji se podvrgavaju hirurškim intervencijama, kod žena u trudnoći ili posle porođaja i kod osoba koje su pretrpele teške povrede tela<sup>16</sup>. U svim tim kliničkim stanjima neophodna je nadoknada AT.

### Mutacije specifične za trombofiliju

Mutacije specifične za trombofiliju su: rezistencija za aktivisani protein C; faktor V Leiden; deficit proteina C i proteina S; deficit antitrombina; mutacije gena trombomodulina; deficit metilen tetrahidrofolat reduktaze (MTHFR); visoka koncentracija lipoproteina a (Lp-a)<sup>17-18</sup>.

### Mutacije antitrombina

Tip mutacije i fenotipske karakteristike: heterozigotni oblik koji se odnosi na mesto vezivanja heparina (HBS) karakteriše se malim rizikom za trombozu. Kada se umesto **treonina** na poziciji 85 nađe **metionin**, mutacija se naziva **WIBBLE** i karakteriše se blagim oblikom tromboze, za razliku od toga kada je treonin na istoj poziciji zamenjen sa **lizinom** mutacija se naziva **WOBBLE** i karakteriše se teškim oblicima tromboze.

Homozigotni oblik deficita AT naziva se i **Kumamoto**, povezan je sa konsagvinitetom i specifično za ovu mutaciju je da su pored tromboza vena česte tromboze arterija, posebno moždanih i da pogađa osobe mlađe životne dobi (<17 godina).

### Klasifikacija deficita antitrombina

Tip1: heterozigotni oblik karakteristiše se istovremenim gubitkom antigena i funkcione inhibitorne aktivnosti proteina AT za više od 50%. Kada se pojavi kao homozigotni oblik, smrtni ishod uglavnom nastaje u fetalnoj dobi.

Tip2: ima normalan antigen, ali je usled zamenjene amino kiseline funkcionalna aktivnost AT poremećena. U zavisnosti od promena amino kiseline na mestu vezivanja trombina (reaktivno mesto) ili vezivanja heparina, tip2 je podeljen na tri podtipa. 1) tip2a (mesto vezivanja trombina); 2) tip 2b i 3) tip 2c. Tip2a udružen je sa visokim rizikom za trombozu, a tip2b ima mali rizik od nastajanja tromboze u venama.

## Značaj otkrivanje naslednog deficita antitrombina

U normalnim uslovima aktivnost i nivo AT u plazmi kod zdravih osoba iznosi 1 J/ml (0,8 – 1,2 J/ml). Dakle, laboratorijski izmerena aktivnost AT izražava se u procentima i normalno iznosi 80 – 120%. Kod novorođenčadi aktivnost AT normalno iznosi oko 60%, i aktivnost se povećava u narednih 6 meseci. Nasledni deficit AT je retka i najčešće neprepoznata medicinska pojava. U opštoj populaciji deficit AT podeljen je na dva tipa, tip1 i tip2. Češći je deficit tip1 nego tip2. Pouzdanih podataka o učestalosti ovog deficita u našoj zemlji nema, kako u opštoj populaciji (na primer kod davalaca krvi) tako i kod bolesnih osoba. Pacijenti sa VTE imaju 20 puta češće deficit AT nego zdrave osobe (davaoci krvi). Značajno je napomenuti i to da nosioci mutacije za trombofiliju imaju visok rizik od VTE u ranim i srednjim godinama života<sup>19</sup>.

Osobe sa naslednim deficitom AT tip1 imaju za oko 50% sniženu funkcionalnu aktivnost AT kao i nivo antigena AT. Za razliku od njih, osobe sa deficitom AT tip2 imaju normalan nivo antigena AT, ali je funkcionalna aktivnost AT snižena za 50%. Do sada je opisano više od 120 mutacija na AT<sup>18</sup>.

Nasledni deficit AT često ostaje neprepoznat sve do prve pojave tromboze. To se desava u ranim godinama života, od 10 do 35 (uglavnom oko 24 godine), na osnovu podataka iz literature, kod 65% pacijenata sa naslednim deficitom.

Prva tromboza često nastaje spontano (36%), ali se rizik povećava u trudnoći (13%), posle porođaja (15%), u hirurškim intervencijama (13%) i posle traume (3%).

Iako tromboze najčešće počinju u venama donjih ekstremiteta, VTE može nastati u bilo kom delu organizma (u venama ilijake, mezenterijuma, pluća i bubrega). Tromboza iz vena donjih ekstremiteta širi se do pluća (embolija). Kod pacijenata sa trombozom dubokih vena (TDV) rizik od plućne embolije povećava se za 240% kada imaju urođeni deficit AT. Zato je izuzetno važno tokom trudnoće posvetiti posebnu pažnju u otkrivanju tromboze (fizikalnim, ultrazvučnim i laboratorijskim kontrolama)<sup>20-24</sup>.

Za testiranje funkcionalne aktivnosti AT koristi se hromogeni test, kojim se inicijalno testira deficit AT. Ovaj funkcionalni test ima visoku specifičnost i osetljivost i pokazuje preciznost od 90%. Ipak,

klasifikacija deficita AT postavlja se na osnovu: porodične anemneze, kliničkog pregleda, laboratorijskog skrining testiranja i genetskog ispitivanja. Tretman deficita AT određuje se na osnovu kliničke slike i laboratorijske provere funkcije AT<sup>21</sup>.

## Faktori koji dovode do stečenog deficita antitrombina<sup>23-27</sup>

- Novorođenče. Normalno je da koncentracija antitrombina u plazmi neposredno po rođenju deteta bude oko 60% u odnosu na odraslu osobu. U tom uzrastu nema opasnosti od tromboze jer inhibiciju trombina obavlja alfa2-makroglobulin.
- Sindrom akutne disfunkcije pluća (ARDS). Poznato je da usled ARDS nastaje deficit antitrombina. Takvi pacijenti produženo borave na mehaničkoj ventilaciji koja ,takođe, utiče na sniženje nivoa AT čime se povećava rizik od tromboze.
- Trudnoća. Nivo AT snižava se posebno u drugom i trećem trimestru u trudnoći. Bolesti udružene sa trudnoćom kao što su eklampsija, hipertenzija, hepatopatija sa porastom transaminaza i diseminovana intravaskularna koagulacija (DIK) mogu uticati na snižavanje nivoa AT.
- Bolesti jetre. U jetri se sintetiše antitrombin i ostali inhibitori hemostaze, takođe, i prokoagulansi. Zato jetra ima centralnu ulogu u regulisanju hemostaze i poremećaji u funkciji ovog organa ima za posledicu narušavanje njene homeostazne uloge. Posle ortotopske transplantacije jetre veoma je važno održavati koncentraciju antitrombina i drugih inhibitora u fiziološkim granicama.
- Bolesti bubrega. U nefrotskom sindromu je karakteristično da AT prelazi iz plazme u urin i tako se gubi. Međutim, kada primarno postoji deficit AT u plazmi to može uzrokovati taloženje fibrinskih vlakana u glomerulima i trombozu u venama bubrega što ,takođe, dovodi do oštećenja funkcije bubrega.
- Transplantacija kostne srži. Često može biti udružena sa patološkim stanjem kao što je bolest okludiranih vena (VOD), posebno kada se kostna srž uzima od nesrdonih davalaca. U terminalnim venulama jetre talože se mikrotrombi i zbog toga se remeti i gubi njena funkcija.
- Sepsa.

- Potrosna koagulopatija. DIK, trombozna mikro-angiopatija i akutna hemolizna transfuziona reakcija
- Lekovima indukovani deficit antitrombina.
  - a) Heparin (nefrakcionisani) i heparini male molekulske mase (HMMM, LMWH) mogu redukovati nivo AT u plazmi do 30%.
  - b) Hormon (estrogen) sadržan u oralnim kontraceptivima
  - c) Citostatiki koji sadrže asparaginazu

### **Zbrinjavanje naslednog i stečenog deficita AT**

Kod pacijenata sa deficitom AT preporučuje se nadoknada AT za kratkotrajnu tromboprofilaksu u definisanim kliničkim situacijama kao što su: hirurška intervencija, zbrinjavanje traume, pri porođaju, u neposrednom posle porođajnom periodu (2 – 3 nedelje), Dugotrajna antikoagulantna terapija sa koncentratom AT ne preporučuje se kod osoba sa naslednim deficitom AT.

### **Prevenција i lečenje VTE**

Za prevenciju i lečenje venskog tromboembolizma primenjuju se preparati za a) parenteralnu primenu: nefrakcionisani heparin (NH), heparini male molekulske mase (HMMM), fondaparin (inhibitor faktora Xa); i b) oralno: antagonisti vitamina K (varfarin i drugi). U narednom periodu očekuje se primena lekova nove generacije, koji ne zavise od antitrombina (kao na primer argatroban), takođe, i antikoagulansi za oralnu primenu kao što su rivaroksaban ili dabigatran etexilate (koji deluju isključivo na faktor Xa).

U sadašnjoj svakodnevnoj praksi u prevenciji i lečenju akutnih stanja tromboze i tromboembolijskih komplikacija koriste se infuzije nefrakcionisanog heparina, potkožne aplikacije heparina male molekulske mase ili fondaparina i po potrebi nastavlja sa oralnim antagonistima vitamina K.

Nadoknada antitrombina neophodna je u određenim situacijama kada se samo heparinom nije postigao željeni terapijski efekat. U takve situacije se ubrajaju:

- Maligniteti
- Sepsa
- Operacije na srcu
- Rizične trudnoće i porođaji
- Transplantacija jetre
- Trauma

### **Nefrakcionisani heparin i heparini male molekulske mase**<sup>28-32</sup>

Standardni ili nefrakcionisani heparin i heparini male molekulske mase (HMMM; low molecular weight heparin - LMWH) su najčešće ordinirani antikoagulansi u kliničkoj praksi. Sam heparin nema direktno antikoagulantno dejstvo već potencira aktivnost antitrombina, kome se u prisustvu heparina usled konfirmacionih promena u molekulama AT povećava više od 1000 puta inhibitorno delovanje na enzime faktora koagulacije. Primena heparina ima ograničeno delovanje u određenim situacijama, kao što je na primer rezistencija na heparin, koja je češća nego što se misli (posebno kod pacijenata podvrgnutih velikim hirurškim intervencijama). Rezistencija na heparin najčešća je zbog deficita AT, ali može biti uzrokovana i zbog povišenih nivoa proteina u plazmi za koje se vezuje heparin (faktor VIII, fibrinogen). I lekovi kao što su aprotinin i nitroglicerol mogu, takođe, indukovati rezistenciju na heparin. Rezistencija se značajno češće viđa kod pacijenata koji primaju nefrakcionisani heparin, a ređe kod pacijenata tretiranih HMMM. Rezistencija na heparin kod pacijenata podvrgnutih kardiohirurškim intervencijama sa limitiranim aktivisanim vremenom koagulacije (ACT <400 sekundi) zbrinjava se dodavanjem 1-2 ml (5000 – 10000 IJ) nefrakcionisanog heparina, a ukoliko se ne postigne željeni ACT (>480 sekundi) uvodi se nadoknada AT (koncentrat u dozi od 500 -1000 IJ ili sa 2 – 3 jedinice sveže plazme)

### **Zamrznuta sveža plazma**

Zamrznuta sveža plazma sadrži i antitrombin (oko 1 J/ml) i može se primeniti kod osoba sa deficitom AT. Međutim, rizik od prenošenja uzročnika transfuzijom prenosivih infektivnih bolesti (hepatitis B i C, HIV) moguć je i pored savremenih metoda testiranja. Sa transfuzijom plazme mogu se preneti i druge bolesti ili neželjene komplikacije kao što su akutno oštećenje pluća, preopterećenje cirkulacije volumenom, prioni koji uzrokuju Creutzfeldt-Jacob-ovu bolest i drugo. Pored toga, postoji i rizik od neželjenih post-transfuzionih reakcija kao što su alergijske, anafilaktoidne, anafilaktične i hemolizne.

**Nadoknada antitrombina** <sup>33-35</sup>

Deficit antitrombina, nasledni ili stečeni, nadoknađuje se primenom sveže plazme prikupljene od dobrovoljnih davalaca ili koncentratima antitrombina. Koncentrati AT dobijaju se na dva načina, iz pulova donirane plazme ili rekombinantnom tehnologijom. (tabela 2) <sup>35</sup>.

Za postizanje terapijskog efekta AT, potrebno je koristiti formulu:

$$\text{željeni nivo AT} - \text{izmereni nivo AT} \times \text{telesna masa (kg)} \\ \text{podeljeno sa 1,4}$$

Poznato je da jedan mililitar sveže plazme sadrži 1 jedinicu (J) antitrombina. Da bi se postigao i održao efekat AT, neophodno je laboratorijsko ispitivanje njegove funkcije, koja treba da je >80%. Za održavanje aktivnosti AT u plazmi potrebno je ponavljati laboratorijsko testiranje nivoa AT posle primene koncentrata ili plazme. Laboratorijsko ispitivanje ponavlja se posle 30 - 60 minuta i posle 24h od primene koncentrata.

**Koncentrati AT**

Koncentrati antitrombina kao komercijalni proizvod dobijaju se iz pulirane plazme davalaca krvi ili rekombinantnom tehnologijom (tabela 3). Njihova primena je indikovana kod pacijenata sa hereditarnim deficitom AT, ali se u kliničkoj medicini često primenjuju i kod pacijenata sa stečnim deficitom AT, posebno posle hirurških intervencija, porođaja i traume u cilju sprečavanja rizika od tromboembolijskih komplikacija <sup>33-35</sup>.

Produkt	Proizvodjač	Indikacije
Atenativ®	Octapharma	Nasledni deficit AT Stečeni deficit AT
Kybernin®	CSL Behring	Steceni deficit AT
Anthrobin P1500	CSL Behring	Nasledni deficit AT Diseminovana intravaskularna koagulacija
Atryn®	GTC Biotherapeutics	Nasledni deficit AT

Tabela 2. Vrste komercijalnih koncentrata antitrombina koji se koriste u kliničkoj praksi

U našoj zemlji do sada je primenjivan samo koncentrat AT pripremljen iz pulirane plazme davalaca krvi. U literaturi se uglavnom navode prime-

ri iz kliničke prakse koji se zasnivaju na relativno malom broju ispitanika. Iznose se iskustva autoriteta iz odedjenih kliničkih oblasti ili kao prikazi slučajeva. Biro za hranu i lekove (FDA) u SAD odobrio je primenu koncentrata AT za pacijente sa naslednim deficitom AT u cilju prevencije tromboembolijskih komplikacija udruženih sa hirurškom intervencijom, porođajem ili traumom. Poznato je da hirurške proceure i trauma aktiviraju faktore koagulacije i to uzrokuje potrošnju i snižavanje nivoa AT u plazmi. Naša iskustva u Institutu za kardiovaskularne bolesti Dedinje (IKVBD) podudaraju se sa nalazima drugih autora koji su pokazali da su sniženi nivoi AT udruženi sa neželjenim reakcijama kao sto su tromboembolijska stanja, sepsa, multiorganska oštećenja, produženo lečenje u jedinicama intenzivnog lečenja i bolnici. I u našoj ustanovi kombinovanom primenom antikoagulanasa (nefrakcionisani heparin, HMMM i fondaparin) i koncentrata AT (dobijenih frakcionisanjem plazme) u pre-, peri- i postoperativnom periodu značajno je redukovana pojava neželjenih komplikacija posle operacija na srcu, aorti i velikim arterijama. Istovremeno je, kod većine bolesnika, bio skraćen boravak u jedinici intenzivnog lečenja i bolnici, a snižen je i mortalitet u odnosu na raniji period. Indikacija za primenu koncentrata AT u IKVBD zasnivala se na osnovu laboratorijski izmerene aktivnosti AT (<60% u dva merenja), vrste hirurške intervencije i vremenskog intervala antikoagulantne terapije (heparin, HMMM, fondaparin). Ordinirana doza koncentrata AT infundovana je u periodu od 2-3 dana, uz laboratorijsku kontrolu aktivnosti AT. Koncentrat antitrombina (Kybernin®) primenjuje se u IKVBD od 1996. godine. Jedna bočica koncentrata AT sadrži 500 IJ, a rastvara se sa 10 ml priloženog rastvora. Pored ovog i drugih preparata dobijenih iz frakcionisane plazme, na tržištu se od 2009. g. nalazi i rekombinantni AT (rhAT) koji je, takođe, odobren za kliničku primenu od strane FDA u SAD.

**Zaključak**

Antitrombin je prirodan inhibitor serinskih proteaza, enzima aktivisanih faktora koagulacije koji imaju važnu ulogu u patološkim hiperkoagulabilnim stanjima. Istovremeno, AT ima i antiinflamatorno delovanje jer inflamaciju, takođe, pokreću aktivisani faktori koagulacije. Nasledni deficit AT

udružen je sa 50% nižom inhibitornom aktivnosti AT u plazmi i zbog toga se povećava rizik od tromboembolijskih promena i otežava lečenje takvih pacijenata.

Lečenje pacijenata sa naslednim deficitom AT je indikovano u kliničkim stanjima sa visokim rizikom od tromboze. Koncentrat antitrombina do-

kazano je efikasan i bezbedan farmakološki proizvod koji se u savremenoj klinickoj medicini primenjuje za zbrinjavanje naslednog i stečenog deficita AT i prevenciju tromboembolijskih komplikacija posle hirurških intervencija, traume i porođaja.

## Reference

1. Olds RJ, Lane DA, Mille B, Chowdhury V, Thein SL. Antithrombin: the principal inhibitor of thrombin. *Semin Thromb Hemost*. 1994;20(4):353-72.
2. Hirsh J, Piovellá F, Pini M. Congenital antithrombin III deficiency. Incidence and clinical features. *Am J Med* 1989; 87 (Suppl 3B): 34S-38S.
3. Maclean PS, Tait RC. Hereditary and acquired antithrombin deficiency: epidemiology, pathogenesis and treatment options. *Drugs* 2007; 67: 1429-1440.
4. Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res*. Dec 2000;10(12):1845-64.
5. Tanaka KA, Levy JH. Regulation of thrombin activity--pharmacologic and structural aspects. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007; 21: 33-50.
6. Roemisch J, Gray E, Hoffmann JN, et al. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13: 657-670.
7. Egeberg o. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh.* Jun 15 1965;13:516-30.
8. Picard V, Chen JM, Tardy B, Aillaud MF, Boiteux-Vergnes C, Dreyfus M, et al. Detection and characterisation of large SERPINC1 deletions in type I inherited antithrombin deficiency. *Hum Genet*. Sep 17 2009;
9. Muñoz EM, Linhardt RJ. Heparin-binding domains in vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1549-1557
10. Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia*. Nov 2008;14(6):1229-39.
11. Rao LV, Nordfang O, Hoang AD, Pendurthi UR. Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/tissue factor activity on cell surfaces. Comparison with tissue factor pathway inhibitor/factor Xa-induced inhibition of factor VIIa/tissue factor activity. --*Blood*. Jan 1 1995;85(1):121-9.
12. Yamashiro K, Kiryu J, Tsujikawa A, et al. Inhibitory effects of antithrombin III against leukocyte rolling and infiltration during endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jun 2001;42(7):1553-60.
13. Dunzendorfer S, Kaneider N, Rabensteiner A, et al. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan-mediated regulation of human neutrophil migration by the serpin antithrombin III. *Blood*. Feb 15 2001;97(4):1079-85.
14. Cooper PC, Coath F, Daly ME, Makris M. The phenotypic and genetic assessment of antithrombin deficiency. *Int J Lab Hematol*. Jun 2011;33(3):227-37.
15. Opal SM. Interactions between coagulation and inflammation. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 545-554.
16. Buller HR, ten Cate JW. Acquired antithrombin III deficiency: laboratory diagnosis, incidence, clinical implications, and treatment with antithrombin III concentrate. *Am J Med* 1989; 87 (3B): 44S-48S
17. Kottke-Marchant K, Duncan A. Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 1326-1336.

18. Foy P, Moll S. *Thrombophilia: 2009 update. Curr Treat Options Cardiovasc Med.* Apr 2009;11(2):114-28.
19. Wells PS, Blajchman MA, Henderson P, et al. *Prevalence of antithrombin deficiency in healthy blood donors: a cross-sectional study. Am J Hematol* 1994; 45: 321-324.
20. Yamada T, Kuwata T, Matsuda H, Deguchi K, Morikawa M, Yamada T, et al. *Risk Factors of Eclampsia Other Than Hypertension: Pregnancy-Induced Antithrombin Deficiency and Extraordinary Weight Gain. Hypertens Pregnancy.* Dec 9 2011.
21. Perry SL, Ortel TL. *Clinical and laboratory evaluation of thrombophilia. Clin Chest Med* 2003; 24: 153-170.
22. Rossi E, Sz T, Ciminello A, et al. *The risk of symptomatic pulmonary embolism due to proximal deep venous thrombosis differs in patients with different types of inherited thrombophilia. Thromb Haemost.* 2008; 99: 1030-1034.
23. Bates SM, Greer IA, Pabinger I, et al. *Venous thromboembolism, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest* 2008; 133 (6 Suppl): 844S-886S.
24. Alvi AR, Khan S, Niazi SK, Ghulam M, Bibi S. *Acute mesenteric venous thrombosis: improved outcome with early diagnosis and prompt anticoagulation therapy. Int J Surg.* Jun 2009;7(3):210-3.
25. Bushman JE, Palmieri D, Whinna HC, Church FC. *Insight into the mechanism of asparaginase-induced depletion of antithrombin III in treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. Leuk Res.* Jul 2000;24(7):559-65.
26. Hara T, Naito K. *Inherited antithrombin deficiency and end stage renal disease. Med Sci Monit.* Nov 2005;11(11):RA346-54.
27. Rosendaal FR. *Risk factors for venous thrombotic disease. Thromb Haemost.* Aug 1999;82(2):610-9.
28. Williams MR, D'Ambra AB, Beck JR, et al. *A randomized trial of antithrombin concentrate for treatment of heparin resistance. Ann Thorac Surg* 2000; 70: 873-877.
29. Ranucci M, Isgró G, Cazzaniga A, et al. *Different patterns of heparin resistance: therapeutic implications. Perfusion* 2002; 17: 199-204.
30. Bauer KA. *Selective inhibition of coagulation factors: advances in antithrombotic therapy. Semin Thromb Hemost* 2002; 28 (Suppl 2): 15-24.
31. Niebler RA, Christensen M, Berens R, Wellner H, Mikhailov T, Tweddell JS, Bharadwaj J, Jayaraman C, Shrivastava R. *Heparin resistance. Lab Hematol* 2003; 9: 125-131.
32. Hirsh J, Raschke R. *Heparin and low-molecularweight heparin. Chest* 2004; 126: 188S-203S.
33. Ranucci M, Frigiola A, Menicanti L, et al. *Postoperative antithrombin levels and outcome in cardiac operations. Crit Care Med* 2005; 33: 355-360.
34. Bucur SZ, Levy JH, Despotis GJ, et al. *Uses of antithrombin III concentrate in congenital and acquired deficiency states. Transfusion* 1998; 38: 481-498.
35. Rodgers GM. *Role of antithrombin concentrate in treatment of hereditary antithrombin deficiency. An update. Thromb Haemost.* May 2009;101(5):806-12.



<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, Beograd, Srbija

## CITOHEMIJSKA ANALIZA ALFA NAFTIL ACETAT ESTERAZE U ATEROSKLEROZNIM LEZIJAMA HUMANE KAROTIDNE ARTERIJE

## CYTOCHEMICAL ANALYSIS OF ALPHA NAPHTHYL ACETATE ESTERASE IN ATHEROSCLEROTIC LESIONS OF HUMAN CAROTID ARTERY

Danijela Vučević<sup>1</sup>, Đorđe Radak<sup>2</sup>, Davor Kovačević<sup>1</sup>, Ivan Milovanović<sup>1</sup>, Tatjana Radosavljević<sup>1</sup>,  
Dušan Mladenović<sup>1</sup>, Sanjin Kovačević<sup>1</sup>, Lea Mascarell Maričić<sup>1</sup>

**Sažetak:** Uprkos neprestanom ovladavanju bio-medicinskim 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 vršena je analiza citohemijske aktivnosti  $\alpha$ -naftil acetat esteraze (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). ANAE status u imprintima normalnog i aterosklerozno izmenjenog tkiva humane karotidne arterije je određivan primenom citohemijskog scoring sistema (metoda po Higiju, Barnsu i Hejhou, koju su modifikovali Cvetković, Radak i Đorđević-Denić). Naši rezultati uglavnom pokazuju da postoji statistički značajna razlika relativne vrednosti ANAE esteraznog skora u karotidnim arterijama/plakovima između ispitivanih grupa pacijenata. Ovi rezultati mogli bi da ukažu na značaj ANAE u procesu aterogeneze.

**Ključne reči:**  $\alpha$ -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. In our study analysis of  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase (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 in imprints of normal and atherosclerotic human carotid tissue was determined by cytochemical scoring system (Higgy, Burns and Hayhoe's method modified by Cvetković, Radak and Đorđević-Denić). Our results mostly show that there is statistically significant difference in relative score value of ANAE activity in carotid artery/plaque tissue between investigated groups of patients. These 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, zakrečavanja 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 nalaze se u intimi arterija. Osnovna karakteristična lezija je aterosklerozna ploča (plak / franc. *plaque*/), tj. *aterom* (grčki *atheroma*) (4-6). 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 (7, 8). 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 (9). Međutim, uprkos velikoj pažnji koja se posvećuje proučavanju ateroskleroze, pokretač primarnog patološkog događaja još uvek je nepoznat. U tom smislu posebno polje istraživanja predstavljaju nespecifične esteraze, imajući u vidu ulogu koju ovi enzimi imaju u širokom spektru bolesti, uključujući i ateroskleroza.

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 (10).

U modifikovanim uslovima lokalne mikrosredine nespecifične esteraze u većoj količini prelaze iz lizozoma u vanćelijski prostor. Naime, kod osoba obolelih od ateroskleroze i u pušača sa razvijenom aterosklerozom dolazi do otpuštanja ovih enzima (11, 12), koji u sadejstvu sa kiselim fosfatazama, elastazama, hijaluronidazom, katepsinom, kolagenazama i aktivatorima plazmina mogu da oštete okolne plemenite strukture (13).

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 stimuli (imunski kompleksi, antigeni, limfokini, delovi bakterija, itd.) mogu da pokrenu oslobađanje hidrolitičkih lizozomskih enzima u vanćelijski prostor sa autodestruktivnim posledicama (14). S tim u vezi, histohemijskim metodama utvrđeno je da je aktivnost nespecifičnih esteraza u makrofagima arterijskog zida povišena u toku aterogeneze indukovane hiperholesterolskom dijetom, takođe, i prilikom povreda endotela balon kateterom. Uočeno je, takođe, da je količina esteraza direktno proporcionalna stepenu zasićenosti intime lipoproteinima i drugim makromolekulima (15).

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 (10, 16-18). U tom smislu, utvrđivanje dinamike promene aktivnosti ANAE u aterogenezi bi moglo imati terapijsku implikaciju, s obzirom na to da ovaj enzim može biti potencijalna meta u prevenciji progresije ateroskleroze. Stoga je cilj ovog rada bio da se ispita ekspresija ANAE u humanom karotidnom plaku različite morfologije.

## Materijal i metode

### Ispitanici

Istraživanje, koje je odobrio Etički komitet Medicinskog fakulteta u Beogradu, obuhvatilo je 125 bolesnika primljenih u Institut za kardiovaskularne bolesti "Dedinje" u Beogradu zbog kardioloških i vaskularnih tegoba. Period praćenja ovih bolesnika bio je od oktobra 2007. godine do februara 2008. godine. Od 125 operisanih pacijenata, 100 pacijenta (80%) imalo je ateroskleroza karotidnih krvnih sudova, i zbog stenoze karotidne arterije jednake ili veće od 70%, kao i prisustva fokalnih ili globalnih simptoma cerebralne ishemijske, 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 stenozne karotidnih arterija.

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

- grupa sa karakteristikama fibroznog tkiva u intimalnom i medijalnom delu karotidne arterije (FIB-fibro lipidni 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 vršeno je 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% etil-alkohola, a potom su imprinti (otisci) ispitivanih i kontrolnih uzoraka tkiva bojani citohemijskim bojama za vizualizaciju ANAE.

Aktivnost ANAE u imprintima karotidne arterije/plaka određivana je tehnikom koju su primenjivali Vahštajn (*Wachstein*) i Volf (*Wolf*), a dopu-

nilni Meler (*Mueller*) i njegovi saradnici (19, 20). 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 obuhvatala je 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, specifična polja fotografisana su 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*) (10), a modifikovali Cvetković, Radak i Đorđević-Denić (21). Navedena iskustva odnose se na procenu pozitivnosti citohemijskih reakcija na hematološkim preparatima, kao i na preparatima alveolarnih makrofaga dobijenim bronhoalveolarnom lavezom na eksperimentalnim modelima.

Skoring system zasnovan je na prisustvu različitog stepena esterazne pozitivnosti u granulocitnoj, limfocitnoj i monocitno-makrofagnoj populaciji ćelija (22).

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 sitni-

jih 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 (22).

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 (22). Relativna vrednost skora predstavlja izraz srednje vrednosti skora u odnosu na maksimalnu vrednost skora za pojedinačnu aktivnost ispitivane esteraze, izražena u obliku procenta (22).

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, Kruskal-Wallis test), i kompjuterskih statističkih programa (STATISTICA 7.0 Professional Edition, SPSS 15.0 Professional Edition).

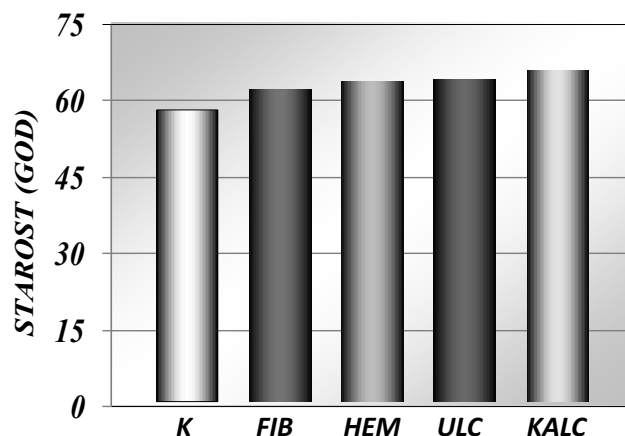
## Rezultati

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  
Graph 1. Distribution of the investigated patients according to age



$K/ULC \rightarrow * - p < 0.05$ ;  $K/KALC \rightarrow ** - p < 0.01$ ;

$KALC/FIB \rightarrow * - p < 0.05$

*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)

$C/ULC \rightarrow * - p < 0.05$ ;  $C/KALC \rightarrow ** - p < 0.01$ ;

$CALC/FIB \rightarrow * - p < 0.05$

*p*- value of statistical significance;

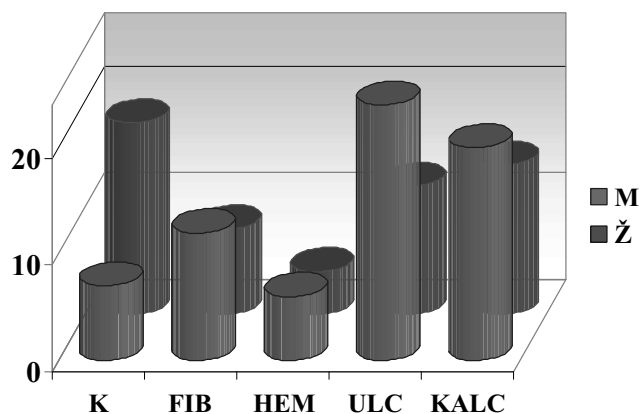
\* -  $p < 0.05$  statistical significance of the difference compared to control group (C);

\*\* -  $p < 0.01$  highly statistical significance of the difference in comparison with control group (C)

Analizom varijanse (ANOVA) za kontinuirane varijable ustanovljeno je 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).

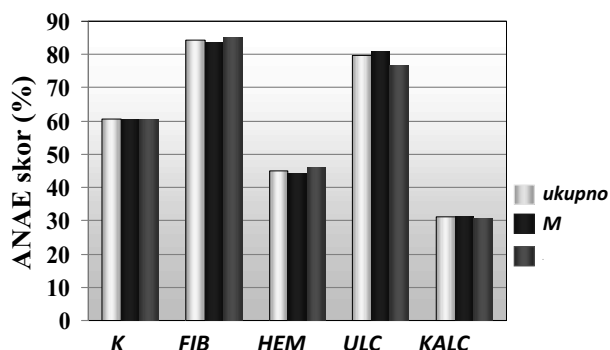
**Pol bolesnika.**- Od 125 bolesnika u našoj studiji, 69 bolesnika je bilo muškog pola, dok je 56 bolesnika bilo ženskog pola. Analizom raspodele ispitanika kontrolne grupe i različitih morfoloških grupa po polu, dobijeni su rezultati prikazani na grafikonu 2.

Grafikon 2. Raspodela ispitivanih pacijenata po polu  
Graph 2. Distribution of the investigated patients according to gender



**Analiza ANAE esterase aktivnosti u kontrolnoj i morfološkim grupama.** - Rezultati dobijeni analizom aktivnosti ANAE u ispitivanim grupama prikazani su na grafikonu 3.

Grafikon 3. Relativne vrednosti skora (%) aktivnosti ANAE u ispitivanih bolesnika  
Graph 3. Relative score values (%) of ANAE activity in investigated patients



Grafikon 3.  
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)

Graph 3.  
C/FIB → \*\*- $p < 0.01$ ; C/ULC → \*\*- $p < 0.01$ ; FIB/HEM → \*\*- $p < 0.01$ ;  
FIB/KALC → \*\*- $p < 0.01$ ; HEM/ULC → \*\*- $p < 0.01$ ; ULC/KALC → \*\*- $p < 0.01$   
 $p$ - value of statistical significance;  
\* - $p < 0.05$  statistical significance of the difference compared to control group (C);  
\*\* -  $p < 0.01$  highly statistical significance of the difference in comparison with control group (C)

U odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora (% skora) aktivnosti ANAE koja je registrovana u kontrolnoj grupi, relativna vrednost skora aktivnosti ove esteraze je kod muškaraca viša, dok je kod žena niža (grafikon 3).

U odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora (% skora) aktivnosti ANAE, koja je registrovana kod ispitanika sa fibrolipidnim plakom, relativna vrednost skora aktivnosti ove esteraze je kod muškaraca niža, dok je kod žena viša (grafikon 3).

Kod 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 kod pacijentkinja viša (grafikon 3).

Kod 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 kod žena niža (grafikon 3).

Kod 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 kod pacijentkinja niža (grafikon 3).

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 kod oba pola u kontrolnoj grupi (grafikon 3).

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 kod oba pola u kontrolnoj grupi (grafikon 3).

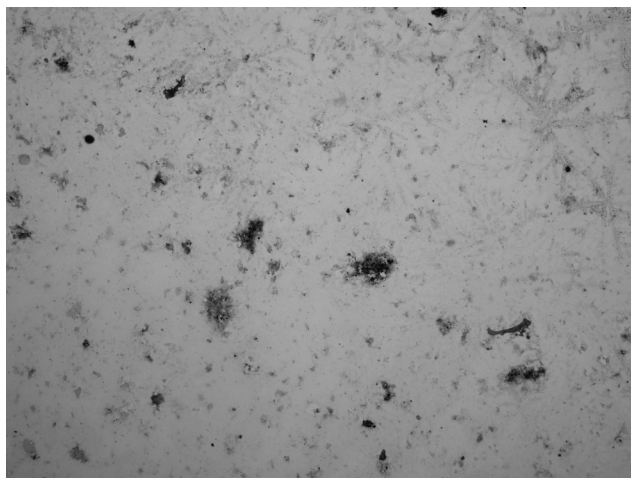
Visoko statistički značajno smanjenje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ANAE uočeno je u HEM i KALC grupi u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti kod oba pola u FIB grupi (grafikon 3).

Poređenjem relativne vrednosti ANAE skora između HEM i ULC grupe, takođe, uočeno je visoko statistički značajno smanjenje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ANAE u HEM grupi u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti kod oba pola u ULC grupi (grafikon 3). 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 kod oba pola u KALC grupi (grafikon 3).

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

*Slika 1. ANAE - imprint kontrolne grupe (K)*

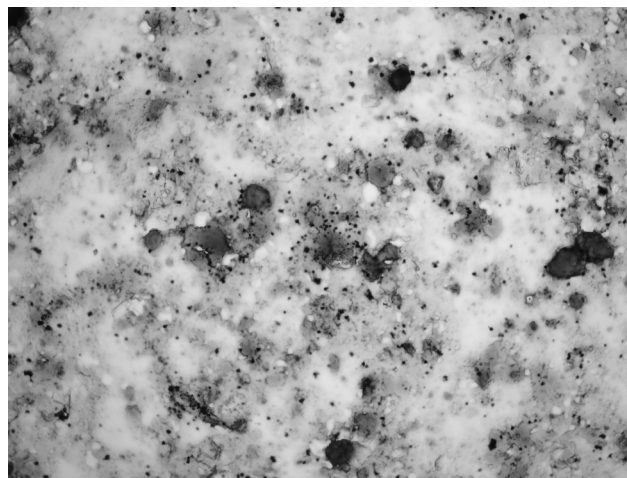
*Picture 1. ANAE - imprint of normal carotid tissue (C)*



*Slika 1.*  
*Zapažaju se esterase pozitivni granulociti i makrofagi (uveličanje 100 x).*

*Picture 1.*  
*One can observe esterase positive granulocytes and macrophages (magnification 100 x).*

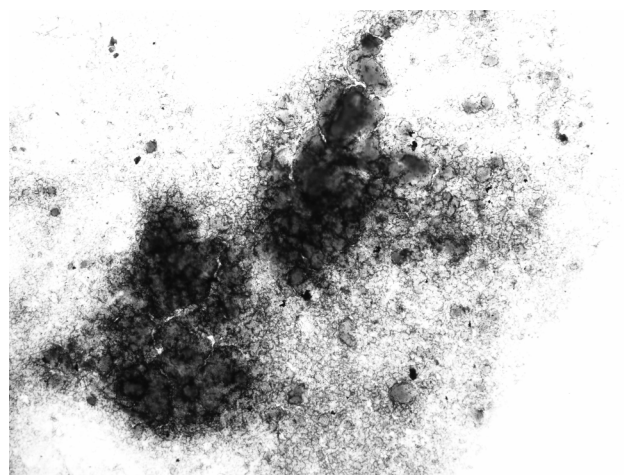
*Slika 2. ANAE - imprint fibrolipidnog plaka (FIB)*  
*Picture 2. ANAE - imprint of fibrous carotid plaque (FIB)*



*Slika 2.*  
*Vide se esterase pozitivni makrofagi i granulociti sa krupnim granulama po obodu ćelije (uveličanje 100 x).*

*Picture 2.*  
*One can observe esterase positive granulocytes and macrophages with large granules, usually accumulated near the plasma membrane (magnification 100 x).*

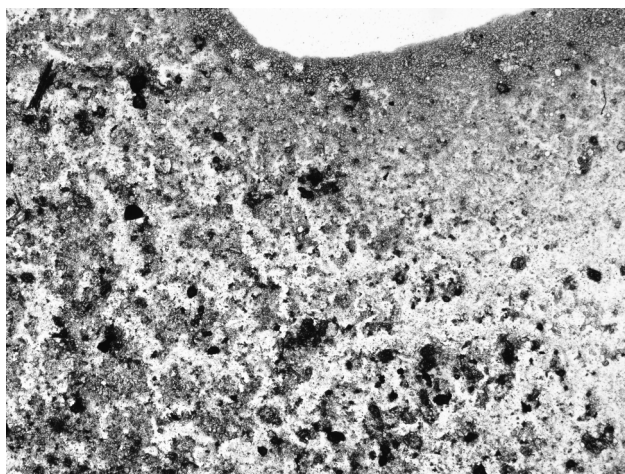
*Slika 3. ANAE - imprint krvarenja u plaku (HEM)*  
*Picture 3. ANAE - imprint of hemorrhage in carotid plaque (HEM)*



*Slika 3.*  
*Uočava se izrazita intraplakalna hemoragija, sa mnoštvom penastih ćelija i esterase pozitivnih makrofaga i granulocita (uveličanje 40 x).*

*Picture 3.*  
*A pronounced hemorrhage into the carotid plaque followed by a great number of foam cells and diffuse arranged positive granulocytes and macrophages can be noticed (magnification 40 x).*

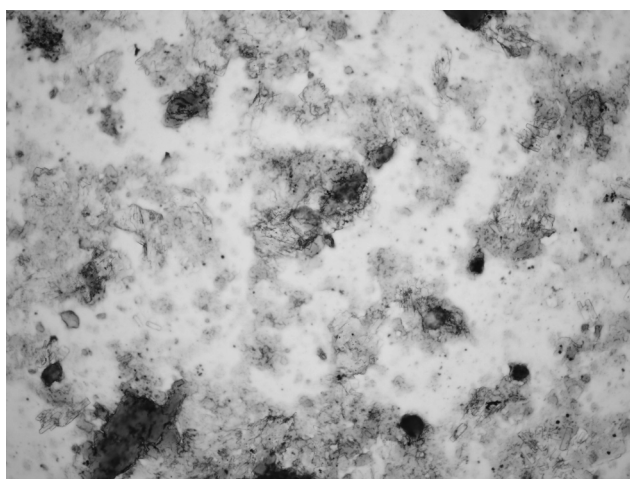
Slika 4. ANAE - imprint egzulcerisanog plaka (ULC)  
 Picture 4. ANAE - imprint of ulcerous carotid plaque (ULC)



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

Picture 4.  
 One can observe plenty of lipophages, as well as positive macrophages and granulocytes, particularly in ulcerous intimal lesion of carotid artery (magnification 100 x).

Slika 5. ANAE - imprint kalcifikovanog plaka (KALC)  
 Picture 5. ANAE - imprint of carotid plaque with deposition of calcium (CALC)



Slika 5.  
 Zapažaju se depoziti kristala karakteristični za kalcifikaciju, kao i makrofagi sa paketima krupnih granula (uveličanje 400 x).

Picture 5.  
 One can see deposition of calcium and esterase positive macrophages with large granules (magnification 400 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% (23).

U našem istraživanju prosečna starost svih ispitivanih bolesnika iznosila je  $62.80 \pm 8.22$  godine. Bolesnici sa aterosklerozom karotidne arterije bili su 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 u skladu je sa opšte prihvaćenim mišljenjem da je ateroskleroza bolest starijeg životnog doba.

Analiza starosti naših bolesnika u odnosu na pol pokazala je 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 pokazalo je da među bolesnicima sa komplikacijama ateroskleroznih lezija karotidnog plaka preovlađuju muškarci starosti između 55 i 65 godina, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (22, 24, 25).

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 (26-28). Različite studije sprovedene u poslednje dve decenije pružile su potvrdu da starenje arterija, koje se karakteriše zadebljanjem i dilatacijom zidova arterija (prvenstveno intime i medije), značajno utiče na razvoj ateroskleroze (29, 30).

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 (31). Takođe, naglašen je 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 uključen je 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 nagomilavaju se u lizozomima i mogu da dovedu do ćelijske smrti. U saglasnosti sa ovim, osobe kod kojih je ustanovljena ova retko zastupljena enzimopatija mogu imati ubranu aterosklerozu (32).

**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 (33). 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 kod bolesnika sa značajnom aterosklerozom karotidne arterije u svim morfološkim grupama u odnosu na ženski pol (grafikon 2). Distribucija naših ispitanika po polu u skladu je sa većom incidencijom karotidne ateroskleroze u muškoj populaciji (33, 34), odnosno kinkinga i koilinga u ženskoj populaciji (35). Pokazano je, takođe, da u svim uzrasnim grupama muškarci imaju veći procenat "mekših" karotidnih plakova, koji su bogati

lipidima, u odnosu na žene (36). Pored toga, kod žena posle menopauze utvrđena je značajna razlika u smislu veće prevalencije karotidnog plaka ( $p < 0.001$ ) u odnosu na žene pre menopauze (37). Posebno je interesantno istraživanje uticaja muških polnih hormona na karotidnu aterosklerozu, koje ukazuje na naglašen razvoj zadebljanja zida zajedničke karotidne arterije i karotidnog bulbusa kod sredovečnih muškaraca u tzv. andropauzi (testosteron  $< 9.8$  nmol/L) (38).

**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 kod ispitanika sa fibrolipidnim karotidnim plakom u odnosu na njenu ukupnu vrednost skora, kao i vrednosti skora kod oba pola u kontrolnoj grupi (grafikon 3, slike 1 i 2). Visoko statistički značajno povećanje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ANAE registrovano je i kod ispitanika sa egzulceracijom karotidnog plaka u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti kod oba pola u kontrolnoj grupi (grafikon 3, slika 4). Ovi naši rezultati potvrđuju tezu da se citohemijska aktivnost ANAE može koristiti kao parametar u ispitivanjima normalnih ćelija, kao i ćelija koje su izmenjene inflamacijskim ili neoplastičnim procesom (17). 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 (21, 39-41). 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 pokazala su da mijeloperoksidaze, oksiduju nitrite, stvarajući pri tom u prvom redu peroksinitrit, koji se smatra najtoksičnijom reaktivnom azotnom vrstom (7). 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 3, 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 auto-destruktivnim posledicama (7). S tim u vezi, kao što je u uvodnom delu istaknuto, utvrđeno je da je aktivnost nespecifičnih esteraza u makrofagi- ma arterijskog zida povišena u toku aterogeneze indukovane hiperholesterolskom dijetom, a takođe i prilikom povreda endotela balon kateterom (15). Uočeno je, takođe, da je količina esteraza direktno proporcionalna stepenu zasićenosti intime lipoproteinima i drugim makromolekulima (17). 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 kod oba pola ispitanika sa egzulceracijom plaka (grafikon 3, slike 3 i 4). Osim toga, visoko statistički značajno povećanje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ANAE nađeno je kod pacijenata sa egzulcerisanim plakom u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti kod oba pola pacijenata sa kalcifikovanim plakom (grafikon 3, slike 4 i 5). Ovi naši rezultati u saglasnosti su sa publikovanim podacima, prema kojima ANAE pozitivnost varira u zavisnosti od stepena aktivacije makrofaga (17). 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, 8). Uzorci aterosklerozno izmenjene humane karotidne arterije u odnosu na kontrolne vrednosti razlikuju se u pogledu stepena i vrste celularnosti. Ovakav nalaz naše studije ukazuje na aktivnu ulogu monocitno-makrofagnih ćelijskih populacija u nastanku i razvoju karotidnog plaka.

### Zaključak

Naši rezultati mogli bi da ukažu na značaj aktivnosti ANAE u procesu aterogeneze. S tim u vezi, uočene varijacije aktivnosti ANAE kod ispitanika sa karotidnim plakovima različite morfologije upućuju na potrebu detaljnijeg ispitivanja uloge ovog enzima u tkivu aterosklerozno izmenjenih arterija.

## Literatura

1. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
2. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(19/26):868-74.
3. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
4. Kanjuh V, Lastić-Maletić S, Velimirović D. Ateroskleroza. U: Maksimović Ž (gl. ur.). *Osnove vaskularne hirurgije i angiologije*, CIBID, Beograd, 2004, 93-5.
5. Vučević D, Radak Đ, Radosavljević T, Mladenović D, Milovanović I. Fibrozni plak kao metabolički stadijum aterogeneze. *Med Istraživ* 2009;43(1):35-47.
6. Vučević D, Čolić J, Šljivančanin T, Radosavljević T, Mladenović D. Lipidni profil i sadržaj gvožđa u serumu kunića sa eksperimentalnom aterosklerozom. *Med Istraživ* 2010;44(2):43-52.
7. Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res* 2006;69:625-35.
8. Gorenne I, Kavoura M, Scott S, Bennett M. Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2006;72:9-17.
9. Rodriguez-Porcel M, Lerman LO, Herrmann J, Sawamura T, Napoli C, Lerman A. Hypercholesterolemia and hypertension have synergistic deleterious effects on coronary endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:885-91.
10. Hayhoe FGJ, Quaglini D. *Haematological cytochemistry*, Churchill & Livingstone, Edinburgh, London, 1990.
11. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:532-55.
12. Krugmann J, Neuenfeld M, Krautschick I. Peroxide treatment changes activity of non specific esterase in vascular endothelium of isolated pig aorta in vitro. *Exp Toxicol Pathol* 1997;49(5):355-9.
13. Calore EE, Sesso A, Puga FR, Cavaliere MJ, Calore NM, Weg R. Sarcoplasmic lipase and non-specific esterase inhibition in myofibers of rats intoxicated with the organophosphate isofenphos. *Exp Toxicol Pathol* 1999;51(1):27-33.
14. Da Fonseca LM, Yavo B, Catalani LH, Falcao RP, Brunetti IL, Campa A. Chemiluminescent determination of esterases in monocytes. *J Biolumin Chemilumin* 1998;13(4):195-200.
15. Tselepis AD, John Chapman M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl* 2002;3(4):57-68.
16. Pussantino L, Patrino R, Cianciotta A, et al. A phylogenetic comparison between acute monocytic leukemia cells and monocytes-macrophages in lower vertebrates. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2003;25(1):87-99.
17. Uphoff CC, Drexler HG. Biology of monocyte-specific esterase. *Leukemia and Lymphoma* 2000;39(3-4):257-70.
18. Aikawa M, Libby P. The vulnerable atherosclerotic plaque. Pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol* 2004;13:125-38.
19. Wachstein M, Wolf G. The histochemical demonstration of esterase activity in human blood and bone marrow smears. *J Histochem Cytochem* 1958;6:457.
20. 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.
21. 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.
22. Cvetković Z. Citohemijska analiza i određivanje oligoelemenata u aterosklerotično promjenenom karotidnom plaku. *Doktorska disertacija*, Medicinski fakultet, Beograd, 2000.
23. Đurić D. Ateroskleroza: epidemiologija, faktori rizika i globalno uspješne 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.

24. Oostrom O. Age-related changes in plaque composition. A study in patients suffering from carotid artery stenosis. *Cardiovasc Pathol* 2005;14:126-34.
25. 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.
26. Tintut Y, Demer LL. Recent advances in multifactorial regulation of vascular calcification. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:555-60.
27. Doherty TM, Fitzpatrick LA, Shaheen A. Genetic determinants of arterial calcification associated with atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 2004;79:197-210.
28. 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.
29. Cheng KS, Mikhalidis DP, Hamilton G, Seifalian MA. A review of the carotid and femoral intima-media thickness as an indicator of the presence of peripheral vascular disease and cardiovascular risk factors. *Cardiovasc Res* 2002;54:528-38.
30. Hegele RA, Al-Shali K, Khan HMR, et al. Carotid ultrasound in one, two and three dimensions. *Vasc Dis Prev* 2005;2:87-91.
31. 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.
32. Porth MC. Cellular adaptation, injury and death. In: Porth MC (ed.). *Pathophysiology. Concepts of altered health states*. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2005, 103-17.
33. Joakimsen O, Bõnaa KH, Bugge ES, Jacobsen BK. Age and Sex Differences in the Distribution and Ultrasound Morphology of Carotid Atherosclerosis The Tromso Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:3007-13.
34. 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.
35. Togay-Isikay C. Carotid artery tortuosity, kinking, coiling: stroke risk factor, marker or curiosity? *Acta Neurol Belg* 2005;105(2):68-72.
36. 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.
37. Sutton-Tyrrell K. Carotid atherosclerosis in premenopausal and postmenopausal women and its association with risk factors measured after menopause. *Stroke* 1998;29:1116-21.
38. Makinen J. Increased carotid atherosclerosis in andropausal middle-aged men. *JACC* 2005;45(10):1603-8.
39. 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.
40. Özcan Z. Determination of alpha naphthyl acetate esterase activity in the peripheral blood leukocytes in Angora rabbits. *Turk J Vet Anim Sci* 2005;29:881-4.
41. Vučević D, Radak Đ, Gajin P, Radosavljević T, Mladenović D, Milovanović I, Stojanović Z, Zec M. Aktivnost alfa naftil butirat esteraze u humanom karotidnom plaku različite morfologije. *Med Istraživ* 2011;45(4):56-65.

<sup>1</sup> Institut "Vinča", Laboratorija za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Univerzitet u Beogradu  
Pfax 522, 11001 Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Odeljenje za endokrinologiju i dijabetes, KBC Zemun, Zemun

<sup>3</sup> Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Institut za internu medicinu,  
Klinički centar Vojvodina, Novi Sad

<sup>4</sup> Odeljenje za kardiologiju, KBC Zemun, Zemun i Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.

## ULOGA TROMBINA U PROLIFERACIJI GLATKIH MIŠIĆIH ĆELIJA KRVNIH SUDOVA (VSMC) I ATEROSKLEROZI

### THE ROLE OF THROMBIN IN THE PROLIFERATION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS (VSMC) AND ATHEROSCLEROSIS

<sup>1</sup>Katarina Smiljanić, <sup>1</sup>Sonja Zafirović, <sup>1</sup>Milan Obradovic, <sup>2</sup>Zoran Gluvić, <sup>3</sup>Edita Stokić,

<sup>4</sup>Biljana Putniković i <sup>1</sup>Esma R. Isenović

**Sažetak:** Glatke mišićne ćelije krvnih sudova (VSMCs) su od vitalnog značaja, kako za strukturu tako i za funkcionisanje i dinamiku krvnih sudova. Proliferacija i abnormalna akumulacija VSMCs su među ključnim događajima u nastanku raznih vaskularnih oboljenja, uključujući aterosklerozu i hipertenziju. Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti ljudske populacije u čijoj osnovi u najvećoj meri dominira ateroskleroza kao patološka komponenta. Ateroskleroza jedan je od glavnih uzroka infarkta miokarda, moždanog udara i perifernih vaskularnih bolesti, koji čine približno polovinu svih smrtnih slučajeva u razvijenim zemljama. Ona uključuje orkestrirane procese endotelijalne disfunkcije, inflamacije, proliferacije VSMCs i reorganizaciju ekstracelularnog matriksa. Dediferencijacija i proliferacija VSMCs predstavljaju ključne događaje u nastanku aterosklerotskih lezija, postangioplastične restenoze i odbacivanja kalema pri bajpasu krvnih sudova.

Trombin je moćni modulator mnogih procesa kao što su regulisanje tonusa i propustljivosti krvnog suda, migracije i proliferacije VSMCs, privlačenja monocita u aterosklerotske lezije i raznih proinflatornih markera, a sve ovo, takođe, doprinosi progresiji kardiovaskularnih oboljenja.

**Ključne reči:** Glatke mišićne ćelije krvnih sudova, ateroskleroza, proliferacija ćelija, endotelijalna disfunkcija, trombin

**Summary:** Vascular smooth muscle cells (VSMCs) are vital to the structure, functioning and dynamics of blood vessels. Proliferation and abnormal accumulation of VSMCs are among the key events in the development of various vascular diseases including atherosclerosis and hypertension. Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality in human population which is based largely dominated by atherosclerosis as a pathological component. Atherosclerosis is a major cause of myocardial infarction, stroke and peripheral vascular disease, which constitute approximately half of all deaths in developed countries. It involves orchestrated processes of endothelial dysfunction, inflammation, proliferation of VSMCs and extracellular matrix reorganization. Dedifferentiation and proliferation of VSMCs is a key event in the development of atherosclerotic lesions, postangioplastic restenosis and rejection of the bypass graft vessels.

Thrombin is a potent modulator of many processes such as regulation of muscle tone and permeability of the blood vessel, migration and proliferation of VSMCs, attracting monocytes into atherosclerotic lesions and a variety of inflammatory markers, and all this also contributes to the progression of cardiovascular disease.

**Keywords:** Vascular smooth muscle cells, atherosclerosis, cell proliferation, endothelial dysfunction, thrombin

## I. Građa, uloga i osobine VSMCs u vaskulaturi

Glatko mišićno tkivo (*lat. "textus muscularis non-striatus"*) ulazi u sastav krvnih i limfnih sudova, organa sistema za varenje, dušnika, mokraćne bešike, materice, kože, unutrašnjih mišića oka itd. Ono je specijalizovano za slabe i spore kontrakcije, a inervisano je od strane autonomnog nervnog sistema.

Zidovi arterija i vena sadrže 3 različita sloja: unutrašnji sloj koji oblaže lumen krvnog suda (*lat. „tunica intima“*) sačinjen uglavnom od endotelijalnih ćelija, srednji sloj koji sadrži koncentrične slojeve glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova (VSMCs, *engl. Vascular Smooth Muscle Cells*) (*lat. "tunica media"*) i spoljašnji sloj (*lat. "tunica adventitia", "tunica externa"*), sačinjen pretežno od vezivnog tkiva koje u zavisnosti od veličine i vrste krvnog suda sadrži različit odnos i stepen elastičnih i kolagenih vlakana.

Srednji sloj, *tunica media*, sastoji se od koncentričnih naslaga VSMCs uronjenih u rastresito vezivno tkivo. Koncentrični slojevi VSMCs koji oblažu endotelijum, regulišu dijametar krvnog suda svojim kontrahovanjem i opuštanjem i time omogućavaju kontrolu krvnog pritiska. *Tunica media*, sa glatkim mišićnim vlaknima čini najdeblji sloj, kako u velikim elastičnim arterijama poput aorte, tako i u arterijama srednje veličine poznatim kao distributivne arterije.

VSMCs su vretenastog oblika i imaju jedno jedro postavljeno u središnjem delu sarkoplazme koje unekoliko prati oblik ćelije svojom spljoštenojajolikom formom. Aktinski i miozinski filamenti drugačije su organizovani, tako da nema poprečne ispruganosti [1].

VSMCs i nakon diferenciranja i sazrevanja ostaju sintetski veoma aktivne. One proizvode prokolagenske i proelastinske molekule po čemu su slične fibroblastima, ali sintetišu i proteoglikanske komponente lamine [2]. I kao terminalno diferencirane (zrele), VSMCs zadržavaju sposobnost ponovnog ulaska u ćelijski ciklus i sledstvene deobe pod uticajem različitih faktora rasta. Jedan od najranijih markera VSMCs diferencijacije je nestin [3].

Aktivirana VSMC ima funkcionalne i morfološke osobine embrionalne VSMC, sposobne da se deli, migrira i sintetiše velike količine ekstracelularnog matriksa i faktora rasta [4]. Fenotipski prelaz VSMCs je reverzibilan i naziva se i fenotipskom

modulacijom. Fenotipskom modulacijom objašnjava se rasprostranjeno učešće VSMCs kako u normalnim, fiziološkim procesima tako i u patofiziološkim poremećajima poput ateroskleroze i hipertenzije.

## II. Ćelijski ciklus VSMCs, mehanizmi proliferacije i antiproliferativni terapijski pristupi

Migratorne i proliferativne aktivnosti VSMCs regulisane su pozitivnim promoterima rasta kao što su faktor rasta krvnih pločica (PDGF, *engl. Platelet-Derived Growth Factor*), endotelin-1 (ET-1, *engl. Endothelin-1*), trombin, faktor rasta fibroblasta (FGF, *engl. Fibroblast Growth Factors*), interleukin (IL, *engl. Interleukin*) -1, mehanički stres poput hipertenzije [5]. Njihovi nizvodni signalni putevi uključuju aktivaciju receptora spregnutog sa G proteinom (GPCR, *engl. G Protein Coupled Receptors*), povećanje intracelularnog kalcijuma ( $Ca^{2+}$ , *engl. Calcium*), aktivaciju protein kinaze C (PKC, *engl. Protein Kinase C*) i Src kinaza, transaktivaciju receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR, *engl. Epidermal Growth Factor Receptor*) preko GPCR, aktivaciju nizvodnih signalnih molekula i kaskada, mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (MAPK, *engl. Mitogen-Activated Protein Kinases*), fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K; *engl. Phosphatidylinositol 3-kinases*) i protein kinaze B (PKB; Akt; *engl. Protein Kinase B*) [6-8].

Na kraju signalne mreže ovih odgovora, mitogeni faktori rasta dele isti krajnji signalni put ćelijskog ciklusa. Faze ćelijskog ciklusa koordinisane su sa ciklin zavisnim kinazama (CDKs, *engl. Cyclin-Dependent Kinases*) koje formiraju holoenzime sa svojim regulatornim subjedinicama, ciklinima [9]. Aktivnosti ciklin-CDK kompleksa zavisi od fosforilacionog statusa CDKs i nivoa ekspresije ciklina. Na početku, povećana akumulacija ciklin D-CDK4 i ciklin E-CDK2 kompleksa u sadejstvu sa ćelijskim nuklearnim antigenom proliferacije (PCNA, *engl. Proliferating Cell Nuclear Antigen*), koordiniše DNK replikaciju regulisanjem prelaza između G1 i S faza [10]. Sledeći G2-M prelaz regulisan je sa ciklin A-CDK2 i ciklin B-CDK1 kompleksima.

Sintetički CDK inhibitori (CVT-313, flavopiridol), genska terapija sa antisens oligodeoksiribonukleotidima (ODN, *engl. oligodeoxyribonucleotides*) prema CDK/ciklinima i prekomerna

ekspresija proteina inhibitora CDK (CKI, *engl. cyclin-dependent kinase inhibitor protein*) smanjuju neointimalnu hiperplaziju u eksperimetalnim postavkama ateroskleroze i angioplastične restenoze [11].

Progresija VSMCs ćelijskog ciklusa regulisana je i specifičnim komponentama ekstracelularnog matriksa (ECM, *engl. extracellular matrix*) i integrinima [12]. Neointimalne VSMCs sintetišu nove ECM komponente i indukuju ekspresiju metaloproteinaza (MPs, *engl. metalloproteinase*) koje preoblikuju okružujući ECM. Očevidno da je ekspresija MPs indukovana unutar neointimalnih lezija [13-16].

### III. Ateroskleroza i druge kardiovaskularne bolesti u čijoj je osnovi prekomerna proliferacija VSMCs

Ateroskleroza je glavni uzrok infarkta miokarda, moždanog udara i perifernih vaskularnih bolesti koji čine približno polovinu svih smrtnih slučajeva u razvijenim zemljama [8]. Kompleksan proces ateroskleroze karakteriše formiranje neointimalnih lezija koje progresivno zagušuju (okludiraju) arterijski lumen [17, 18]. Neointimalno zadebljanje nastaje kao akumulacija ćelijskih elemenata i ekstraćelijskih supstanci u prostoru između *tunica intima* (endotelijskog sloja) i koncentričnih slojeva VSMCs u *tunica media*.

Studije sa hiperholesterolemičnim životinjama i na humanim aterosklerotskim arterijama identifikovale su 3 procesa koji vode formiranju aterosklerotskih lezija [19]: 1) proliferacija VSMCs, makrofaga i limfocita; 2) formiranje vezivnog tkivnog matriksa sastavljenog od elastičnih, kolagenih i proteoglikanskih vlakana i 3) akumulacija lipida, najviše slobodnog i esterifikovanog holesterola u okružujućem matriksu sa pridruženim ćelijama [8].

Najnoviji podaci studija na humanom materijalu, *in vitro* mehanističkih studija i *in vivo* korelacija, sugeriraju važnu ulogu VSMCs u inicijaciji ateroskleroze [7]. VSMCs su glavni proizvođači ekstracelularnog matriksa i u odgovoru na aterosklerske stimulse mogu modifikovati tip matriksnih proteina koje proizvode.

Kao i makrofazi, VSMCs ekspimiraju mnoge receptore za preuzimanje lipida i mogu formirati penaste ćelije, učestvujući u ranoj akumulaciji lipida u plaku. Kao i endotelijalne ćelije, VSMCs

ekspimiraju razne adhezione molekule kao što su vaskularni ćelijski adhezioni molekul (VCAM-1, *engl. Vascular Cell Adhesion Molecule type-1*) i unutarćelijski adhezioni molekul (ICAM-1, *engl. InterCellular Adhesion Molecule type-1*) i migriraju kroz zid krvnog suda. Preko istih molekula VSMCs mogu inhibirati apoptozu drugih ćelija, doprinoseći tako ranoj celularnosti lezije. I one, kao i druge ćelije proizvode citokine (PDGF, transformišući faktor rasta  $\beta$  (TGF $\beta$ , *engl. Transforming Growth Factor  $\beta$* ), interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ , *engl. Interferon  $\gamma$* ), i MCP-1 (*engl. Monocyte Chemotactic Protein-1*)), koji započinju i propagiraju zapaljenski odgovor na lipide.

VSMCs na povredu krvnog suda reaguju ekstenzivnom proliferacijom i migracijom u intimalni deo zida krvnog suda [20], te pored ključne uloge u aterogenezi i hipertenziju razumeju kao povredu krvnog suda, dugotrajnu i ponavljajuću. Primarna hipertenzija vodi hipertrofiji i/ili hiperplaziji VSMCs i sledstvenoj promeni strukture krvnog suda [21], kao što su Yamori i saradnici prvi demonstrirali da VSMCs izolovane iz spontano hipertenzivnih pacova brže rastu nego VSMCs iz Wistar-Kyoto vrste pacova [22].

### IV. Trombin u proliferaciji VSMCs i aterosklerozi

#### IV.1. Funkcije trombina u vaskulaturi

Zgrušavanje krvi je proces karakterisan sekvencijalnom aktivacijom serije serinskih proteinaza i kofaktora, koji kulminira stvaranjem trombina. Trombin je tripsinu slična serinska proteinaza, molekulske mase 36 kDa, koja pokreće mnoštvo enzimskih i ćelijskih reakcija uključujući pretvaranje fibrinogena u fibrin i sledstveno stvaranje fibrinskog čepa, aktivaciju kofaktora V i VIII, aktivaciju krvnih pločica, endotelijalnih ćelija, VSMCs i leukocita. Aktivnost trombina je strogo regulisana putem nekoliko endogenih inhibitornih mehanizama, kao što su antitrombin-heparinski put i signalni put proteina C [23].

Prekursorski protein, protrombin (faktor koagulacije II), sintetiše se samo u jetri u inaktivnoj formi zimogena, sa prosečnim poluživotom od 72h u cirkulaciji. Signal za generisanje trombina se pokreće kada cirkulišući faktori koagulacije dođu u kontakt sa ekstravaskularnim tkivnim fakto-

rom (na primer u slučaju povrede i razaranja endotelijskog sloja krvnog suda). Aktivirani faktor Xa zajedno sa kofaktorom Va prevodi protrombin u svoju aktivnu formu, trombin [24, 25]. Pošto je tkivni faktor eksprimiran samo na površini ćelija koje u fiziološkim uslovima nisu u kontaktu sa krvlju (kao što su VSMCs), za trombin je pretpostavljeno da predstavlja vezu između povrede tkiva i zaraščivanja rana [26], odnosno da ima važnu ulogu u vaskularnom remodelovanju.

Uloga trombina u hemostazi je dvojaka i oprečna. S jedne strane pretvaranje fibrinogena u fibrin predstavlja prokoagulantnu radnju, a vezivanje za protein C i njegovu aktivaciju, antikoagulantnu radnju [27]. Slična situacija je i sa ulogom u vaskularnoj reaktivnosti gde na jednoj strani trombin pokazuje efekte vazodilatacije [28], a na drugoj vazokonstrikciju [29, 30].

Reakcije koje trombin potiče na ćelijskom nivou uključuje aktiviranje krvnih pločica i njihovu agregaciju, hemotaktički efekat na monocite [31], VSMC [32], endotelijalne ćelije [33], limfocite [34] i neutrofile [35]. Mitogeni efekat trombin iskazuje kod VSMC [36], fibroblasta [37, 38] i endotelijalnih ćelija [39]. U endotelijalnim ćelijama trombin stimuliše proizvodnju brojnih faktora: prostaciklina [40], faktora aktivacije krvnih pločica (PAF; *engl. Platelet-Activating Factor*) [41], endotelina [42], von Willebrandovog faktora [43], aktivatora plazminogena (PA, *engl. Plasminogen Activator*) [44] i njegovog inhibitora (PAI, *engl. PA Inhibitor*) [44]. Ovi raznoliki ćelijski odgovori pokrenuti trombinom doprinose patologiji ateroskleroze, tromboze i drugih vaskularnih oboljenja putem inflamatornih i proliferativnih procesa na mestu vaskularne povrede.

#### IV.2. Struktura trombinskih receptora

Receptori aktivirani proteazama (PAR, *engl. Protease-Activated Receptors*) pripadaju familiji GPCR. Oni čine posebnu grupu unutar familije GPCR zbog načina aktivacije putem proteolitičkog cepanja umesto okupiranja receptora ligandom. Do danas je pronađeno i klonirano 4 člana ove grupe: PAR-1, PAR-2, PAR-3 i PAR-4. PAR-1, PAR-3 i PAR4 su trombinski receptori. Trombin prepoznaje aminoterminalni kraj trombina i seče ga, generišući novi amino terminalni kraj tzv. "tethered ligand". Drugi važni domeni su: aminoterminalni hirudinu-sličan domen, takođe

važan za vezivanje trombina (kod PAR-1 i PAR-3), karboksiterminalni kraj koji ima ulogu u usmeravanju isečenog receptora u lizozomsko odeljenje radi degradacije, što nije uobičajeni put recikliranja GPCR (plazma membrana). Treća intracelularna petlja doprinosi mehanizmu internalizacije [45].

#### IV.2.1. Molekularni mehanizam aktivacije PAR-1 receptora i njegove signalizacije

Trombin cepa i aktivira PAR-1 sa visokom efikasnošću: već pri koncentraciji od 10 nM skoro svi ćelijski receptori na površini su aktivirani posle 1 minuta. Nakon vezivanja za 2 specifična mesta na aminoterminalnom kraju trombin podleže konformacionoj promeni i izlaže aktivno mesto sa katalitičkom trijadom (His-365, Asp-419 i Ser-527), odgovornom za sistem prenosa šarže [46][47], što dovodi do efikasnog i trenutnog protelitičkog cepanja.

Presecanje aminoterminalnog kraja PAR1 je ireverzibilno i stvara nov aminoterminalni kraj koji se intramolekulski vezuje za drugu ekstracelularnu petlju i otpočinje prenos signala [34].

Kod ćelija u mirovanju, PARs su povezani sa heterotrimernom  $G_q$  familijom G proteina, koja se sastoji od 3 različite subjedinice nazvane  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$  ( $G\alpha\beta\gamma_q$ ). Kad trombin aktivira receptor, vezani guanozin difosfat (GDP, *engl. guanosine diphosphate*) se izmenjuje sa guanozine-5'-trifosfatom (GTP, *engl. guanosine-5'-triphosphate*) što rezultira u disocijaciji  $\beta\gamma$  subjedinica od  $\alpha$  subjedinice. Ovaj događaj započinje stvaranje širokog panela signalnih mehanizama uključujući inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3, *engl. inozitol-1,4,5-triphosphate*) i diacilglicerol (DAG, *engl. diacylglycerol*), kao i oslobađanje intracelularnog  $Ca^{2+}$ . PAR1 aktivacija, takođe, vodi aktivaciji PKC, MAPK kinaza, receptora tirozin kinaza (RTK, *engl. receptor tyrosine kinases*) i Rho signalnom putu uključenom u promene strukture citoskeleta i ćelijskog oblika fosforilacijom preko lakog lanca miozina sa Rho-kinazom [48, 49]. Drugi signalni put uključuje  $G_{\alpha_i}$  subjedinicu koja inhibira aktivaciju adenil ciklaze, sprečavajući pretvaranje adenzin trifosfata (ATP, *engl. Adenosine-5'-triphosphate*) u ciklični adenzin monofosfat (cAMP, *engl. Cyclic adenosine monophosphate*) [50].

### IV.3. Uloga trombina u aterosklerozi

Endotelijalna disfunkcija, koju karakteriše nesposobnost endotelijuma da reguliše svoje osnovne funkcije (tonus krvnog suda, hemostazu, ćelijsku adheziju, balans elektrolita), smatra se preduslovom za nastanak aterosklerotskog plaka, a trombin se smatra jednim od njenih ključnih okidača [26]. Istovremeni događaji, poput vazokonstrikcije preko sekrecije prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ , *engl. Prostaglandin H2*) i tromboksana  $A_2$  [30], zatim smanjenje dostupnosti azot-monoksida (NO, *engl. Nitric oxide*) (kritično važan faktor za endotelijску relaksaciju i funkciju) usled smanjene aktivnosti *endotelijalne azot oksid sintaze* (eNOS, *engl. endothelial Nitric Oxide Synthase*) [51], smanjene sinteze eNOS u endotelijalnim ćelijama [52] i povećanje aktivnosti arginaze [53, 54], samo su neki od mnogih efekata kojim se objašnjava ključna uloga trombina u endotelijalnoj disfunkciji. Tokom ateroskleroze nivo trombina izrazito je povećan [55].

Nakon ovih događaja, posledično se pod uticajem trombina povećava proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, *engl. Reactive Oxygen Species*) u zidu krvnog suda [56, 57] što olakšava lipidnu peroksidaciju i inicijaciju apoptotskih procesa. Trombin indukuje proizvodnju pro-inflamatornih medijatora, uzrokujući promene u transkripciji gena za IL-1 $\beta$ , IL-6 [58] i faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , *engl. Tumor Necrosis Factor-Alpha*) i MCP-1 u VSMCs [59], dok u endotelijumu povećava ekspresiju IL-6 [60], IL-8 [61], MCP-1, VCAM-1 i ICAM-1, itd., što olakšava regrutovanje cirkulišućih monocita i T limfocita u zidove arterija [57] i doprinosi stvaranju ranih plakova. IL-8 je kandidat za biomarker predviđanja subkliničke ateroskleroze na osnovu podataka iz multipnih kliničkih studija [62]. Većina ovih aktivnosti trombina posredovana je preko PARs [63].

Takođe, trombin posreduje u adheziji leukocita, njihovom kotrljanju (*engl. «rolling of leukocytes»*) i migraciji u aktivirani endotelijum [26]. U ovom procesu transmigracije leukocita, trombin utiče na povećanje oslobađanja  $Ca^{2+}$  iz intracelularnih skladišta [64], što pomaže ligaciji ICAM-1 [65], a sve ovo dalje vodi raskidanju inter-endotelijalnih veza [66, 67].

Kod monocita i makrofaga u aterosklerozi, trombin vodi povećanju ekspresije IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF $\alpha$

i MCP-1, doduše pri višim koncentracijama nego kod VSMCs [59]. PARs su eksprimirani u humanim dendritskim ćelijama, monocitima i makrofazima [68].

Neoangiogeneza je usko povezana sa progresijom plaka. Hemoragija unutar plaka smatra se kritičnim faktorom destabilizacije i vezana je predominantno za neovaskularizaciju *tunica intima* i *media* od strane nezrelih i «curećih» kapilara [69]. Za trombin je pokazano da izaziva neoangiogenezu *in vitro* i *in vivo* [70].

U odmakloj, naprednoj aterosklerotskoj leziji najznačajnija je njegova aktivacija krvnih pločica, koja vodi daljoj inflamatornoj kaskadi i proizvodnji raznih aktivatora i faktora rasta od strane krvnih pločica. Npr., aktivirani trombociti stimulišu nuklearni faktor  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ , *engl. nuclear factor  $\kappa B$* ) signalni put u VSMCs, koji indukuje ekspresiju metaloproteinaza matriksa (MMPs, *engl. Matrix MetalloProteinases*), citokina i faktora rasta [71], kao i MCP-1 [72] što rezultuje u snažnoj proliferaciji i migraciji VSMCs u aterosklerotsku leziju [73]. Svi ovi procesi doprinose progresiji plaka, potom njegovoj destabilizaciji i rupturi [74]. *In vivo* nalazi govore u prilog tome [75, 76].

### IV.4. Uloga trombina u proliferaciji VSMCs

Trombin je uključen u abnormalnu proliferaciju VSMCs povezanu sa aterosklerozom i hipertenzijom [77-79]. Osim posrednih načina doprinosa fenotipskoj modulaciji, migraciji i proliferaciji VSMCs, putem interakcije trombina i drugih ćelija (npr. trombinom aktivirani trombociti luče PDGF koji je snažan mitogen VSMCs [80]), trombin i direktno utiče na proliferaciju i migraciju VSMCs [36, 79, 81].

Za VSMCs se zna da eksprimiraju PAR-1, PAR-2 i PAR-4, od kojih su trombinski PAR-1 i PAR-4. Dominantni receptor preko koga trombin ostvaruje svoju mitogenu ulogu u VSMCs je PAR-1 [82]. Pozitivna regulacija ovih receptora u VSMCs *in vivo* je demonstrirana nakon oslobađanja TGF $\beta_1$ , PDGF i serotoninina iz krvnih pločica [83] i veoma je važna za dalje direktne efekte trombina [26].

Vezivanje trombina za svoj receptor vodi stimulaciji fosfolipaze C, što rezultuje u povećanju intracelularnog nivoa  $Ca^{2+}$  i aktivaciji PKC [6]. Mnoge studije su pokazale kao neophodan signalni korak, transaktivaciju EGFR od strane



PAR-1 aktiviranog trombinom u proliferaciji VSMCs *in vitro* [32, 84, 85].

Takođe, brojni su izveštaji o učešću MAPK kaskade u proliferaciji pod delovanjem trombina i to ekstracelularnim signalom regulisane kinaze 1 i 2 (ERK1/2, *engl. extracellular-signal-regulated kinases 1 and 2*) i p38 kinaze, kao i PI3K/Akt kaskade [82, 86, 87]. Većina ovih izveštaja ukazuje o neophodnosti EGFR transaktivacije kako bi MAPK kinaze i PI3K bile aktivirane [82, 88]. Nedavna studija pokazala je sem ERK1/2 kinaze i uključenost PI3K/Akt kaskade u sprovođenju mitogenog signala od aktiviranog PAR-1 i transaktiviranog EGFR, kao i ulogu NF- $\kappa$ B i aktivirajućeg proteina (AP-1 *engl. Activating Protein type-1*) u ekspresiji EGFR u VSMCs ćelijama pacova [82]. Maruyama i saradnici su prvi pokazali da je proliferacija VSMCs u kulturi izazvana trombinom, regulisana sa NF- $\kappa$ B [89].

U signalnoj mreži proliferacije VSMCs pod delovanjem trombina, važno mesto ima i PKC $\delta$  za koju su Hsieh i saradnici pokazali da učestvuje kao uzvodni signal EGFR transaktivacije [82].

U VSMCs pacova i PC3 (*engl. prostate cancer cell line*) ćelijama kancera prostate *in vitro* pokazano je da trombin posreduje u ćelijskoj proliferaciji, transaktivacijom EGFR preko MP koja ce-

pa membranski prekursor heparin vezujućeg EGF sličnog faktora rasta (HB-EGF, *engl. Heparin-binding EGF-like growth factor*), (pro-HB-EGF) i oslobođeni HB-EGF se vezuje i aktivira EGFR [6, 78, 85, 90]. Ovaj mehanizam je, takođe, demonstriran kod VSMCs pacova i babuna i neophodan je za migraciju VSMCs izazvanu trombinom [32]

### V. Zaključak

Uprkos ohrabrujućim rezultatima, značajni naponi u osnovnim istraživanjima su još uvek preko potrebni, kako bi se identifikovali dodatni ciljni geni i strategije za tretman kardiovaskularnih bolesti. Dalja istraživanja usmerena na razumevanje molekularnih mehanizama efekata trombina na proliferacije VSMCs u patofiziološkim stanjima svakako bi doprinela objašnjenju uloge ovih ćelija u patologiji nastanka kardiovaskularnih oboljenja uključujući i aterosklerozu.

### VI. Zahvalnica

Izrada ovog rada finansirana je sredstvima sa projekata br. 173033 (E.R.I.) od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

## REFERENCE

1. Guyton, A. and Hall., J.E. *Medicinska fiziologija*. Vol. IX.: *Savremena administracija*, Beograd, 1999
2. Šerban, N.M., *Pokretne i nepokretne ćelije*, *Savremena Administracija*, Beograd, 1995
3. 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.
4. Walsh, K., H.R. Periman, and R.C. Smith, *Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation and Cell Cycle*. 1999.
5. Dzau, V.J., R.C. Braun-Dullaeus, and D.G. Sedding, *Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies*. *Nat Med*, 2002. 8(11): p. 1249-56.
6. 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.
7. Doran, A.C., N. Meller, and C.A. McNamara, *Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28(5): p. 812-9.
8. Rivard, A. and V. Andres, *Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases*. *Histol Histopathol*, 2000. 15(2): p. 557-71.
9. Koepp, D.M., J.W. Harper, and S.J. Elledge, *How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle*. *Cell*, 1999. 97(4): p. 431-4.
10. Sherr, C.J., *Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression*. *Proc Assoc Am Physicians*, 1995. 107(2): p. 181-6.
11. Andres, V. and C. Castro, *Antiproliferative strategies for the treatment of vascular proliferative disease*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2003. 1(1): p. 85-98.
12. Assoian, R.K. and M.A. Schwartz, *Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression*. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. 11(1): p. 48-53.
13. Bendeck, M.P., et al., *Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat*. *Circ Res*, 1994. 75(3): p. 539-45.
14. Galis, Z.S., et al., *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.
15. Zempo, N., et al., *Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery*. *J Vasc Surg*, 1994. 20(2): p. 209-17.
16. Southgate, K.M., et al., *Upregulation of basement membrane-degrading metalloproteinase secretion after balloon injury of pig carotid arteries*. *Circ Res*, 1996. 79(6): p. 1177-87.
17. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med*, 1999. 340(2): p. 115-26.
18. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. 105(9): p. 1135-43.
19. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. *Nature*, 1993. 362(6423): p. 801-9.
20. Mnjoyan, 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.
21. Marche, P., T. Herembert, and D.L. Zhu, *Molecular mechanisms of vascular hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat*. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*, 1995. 22(1): p. S114-6.
22. Yamori, Y., et al., *Mechanisms of structural vascular changes in genetic hypertension: analyses on cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats*. *Clin Sci (Lond)*, 1981. 61 Suppl 7: p. 121s-123s.
23. Mann, K.G., S. Butenas, and K. Brummel, *The dynamics of thrombin formation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(1): p. 17-25.
24. Esmon, C.T., et al., *Inflammation, sepsis, and coagulation*. *Haematologica*, 1999. 84(3): p. 254-9.
25. Brass, L.F. and M. Molino, *Protease-activated G protein-coupled receptors on human platelets and endothelial cells*. *Thromb Haemost*, 1997. 78(1): p. 234-41.
26. Borissoff, J.I., et al., *Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze?* *Cardiovasc Res*, 2009. 82(3): p. 392-403.

27. Lane, D.A., H. Philippou, and J.A. Huntington, Directing thrombin. *Blood*, 2005. 106(8): p. 2605-12.
28. Hamilton, J.R. and T.M. Cocks, Heterogeneous mechanisms of endothelium-dependent relaxation for thrombin and peptide activators of protease-activated receptor-1 in porcine isolated coronary artery. *Br J Pharmacol*, 2000. 130(1): p. 181-8.
29. Maki, J., et al., Involvement of reactive oxygen species in thrombin-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 182(11): p. 1435-44.
30. Hirano, K., The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(1): p. 27-36.
31. Bar-Shavit, R., et al., Chemotactic response of monocytes to thrombin. *J Cell Biol*, 1983. 96(1): p. 282-5.
32. 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.
33. Moy, A.B., et al., Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces. *J Clin Invest*, 1996. 97(4): p. 1020-7.
34. Coughlin, S.R., Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 2000. 407(6801): p. 258-64.
35. Bizios, R., et al., Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol*, 1986. 128(3): p. 485-90.
36. McNamara, C.A., et al., Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest*, 1993. 91(1): p. 94-8.
37. Carney, D.H., W. Redin, and L. McCroskey, Role of high-affinity thrombin receptors in postclotting cellular effects of thrombin. *Semin Thromb Hemost*, 1992. 18(1): p. 91-103.
38. Giacco, F., et al., Thrombin-activated platelets induce proliferation of human skin fibroblasts by stimulating autocrine production of insulin-like growth factor-1. *FASEB J*, 2006. 20(13): p. 2402-4.
39. Zania, P., et al., Thrombin mediates mitogenesis and survival of human endothelial cells through distinct mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. 294(5): p. C1215-26.
40. Hallam, T.J., J.D. Pearson, and L.A. Needham, Thrombin-stimulated elevation of human endothelial-cell cytoplasmic free calcium concentration causes prostacyclin production. *Biochem J*, 1988. 251(1): p. 243-9.
41. Prescott, S.M., G.A. Zimmerman, and T.M. McIntyre, Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(11): p. 3534-8.
42. Schini, V.B., et al., Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, 1989. 165(2-3): p. 333-4.
43. Sporn, L.A., V.J. Marder, and D.D. Wagner, Differing polarity of the constitutive and regulated secretory pathways for von Willebrand factor in endothelial cells. *J Cell Biol*, 1989. 108(4): p. 1283-9.
44. Levin, E.G., et al., Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, 1984. 74(6): p. 1988-95.
45. Vu, T.K., et al., Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 1991. 64(6): p. 1057-68.
46. Coughlin SR, Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature*, 2000. 407: p. 258-264.
47. Bahou WF, Proteinase-activated receptors. *Current Topics in Developmental Biology*, 2003. 54: p. 343-369.
48. Kahn, M.L., et al., A dual thrombin receptor system for platelet49. van Nieuw Amerongen, G.P., et al., Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res*, 2000. 87(4): p. 335-40.
50. Zhang, W. and R. W. Colman, Thrombin regulates intracellular cyclic AMP concentration in human platelets through phosphorylation/activation of phosphodiesterase 3A. *Blood*, 2007. 110(5): p. 1475-82.
51. Watts, V.L. and E.D. Motley, Role of protease-activated receptor-1 in endothelial nitric oxide synthase-Thr495 phosphorylation. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009. 234(2): p. 132-9.

52. Ming, X.F., et al., Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(24): p. 8467-77.
53. Yang, L., et al., Arginase activity is increased by thrombin: a mechanism for endothelial dysfunction in arterial thrombosis. *J Am Coll Surg*, 2006. 203(6): p. 817-26.
54. Lewis, C., et al., Arginase blockade lessens endothelial dysfunction after thrombosis. *J Vasc Surg*, 2008. 48(2): p. 441-6.
55. Husmann, M. and M. Barton, Therapeutical potential of direct thrombin inhibitors for atherosclerotic vascular disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 2007. 16(5): p. 563-7.
56. 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.
57. Colotta, F., et al., Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol*, 1994. 144(5): p. 975-85.
58. Tokunou, T., et al., Thrombin induces interleukin-6 expression through the cAMP response element in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(11): p. 1759-63.
59. Kranzhofer, R., et al., Thrombin potently stimulates cytokine production in human vascular smooth muscle cells but not in mononuclear phagocytes. *Circ Res*, 1996. 79(2): p. 286-94.
60. Marin, V., et al., The IL-6-soluble IL-6/Ralpha autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J Immunol*, 2001. 167(6): p. 3435-42.
61. Marin, V., et al., The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in thrombin-induced endothelial chemokine production and leukocyte recruitment. *Blood*, 2001. 98(3): p. 667-73.
62. Aukrust, P., et al., Chemokines and cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28(11): p. 1909-19.
63. Martorell, L., et al., Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 2008. 99(2): p. 305-15.
64. Sandoval, R., et al., Requirement for Ca<sup>2+</sup> signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. 280(2): p. L239-47.
65. van Nieuw Amerongen, G.P., et al., Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(11): p. 2332-9.
66. van Nieuw Amerongen, G.P., et al., Thrombin-induced endothelial barrier disruption in intact microvessels: role of RhoA/Rho kinase-myosin phosphatase axis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. 294(5): p. C1234-41.
67. Delekta, P.C., et al., Thrombin-dependent NF- $\kappa$ B activation and monocyte/endothelial adhesion are mediated by the CARMA3. Bcl10.MALT1 signalosome. *J Biol Chem*, 2010. 285(53): p. 41432-42.
68. Colognato, R., et al., Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood*, 2003. 102(7): p. 2645-52.
69. Virmani, R., et al., Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(10): p. 2054-61.
70. Haralabopoulos, G.C., et al., Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *Am J Physiol*, 1997. 273(1 Pt 1): p. C239-45.
71. Henn, V., et al., CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 1998. 391(6667): p. 591-4.
72. Gawaz, M., et al., Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*, 1998. 98(12): p. 1164-71.
73. Lutgens, E., et al., CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 2007. 17(4): p. 118-23.
74. Yu, G., et al., Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappaB-dependent manner. *Blood*, 2005. 105(9): p. 3545-51.

75. Westrick, R.J., et al., Deficiency of tissue factor pathway inhibitor promotes atherosclerosis and thrombosis in mice. *Circulation*, 2001. 103(25): p. 3044-6.
76. Bea, F., et al., Melagatran reduces advanced atherosclerotic lesion size and may promote plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(12): p. 2787-92.
77. Isenovic, E.R., et al., Insulin, Thrombin, ERK1/2 Kinase And Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation. *Curr Pharm Des*, 2010. 16(35): p. 3895-902.
78. 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.
79. McNamara, C.A., et al., Thrombin and vascular smooth muscle cell proliferation: implications for atherosclerosis and restenosis. *Semin Thromb Hemost*, 1996. 22(2): p. 139-44.
80. Shankar, R., et al., Thrombin receptor-activating peptides differentially stimulate platelet-derived growth factor production, monocytic cell adhesion, and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem*, 1994. 269(19): p. 13936-41.
81. Fager, G., Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1995. 77(4): p. 645-50.
82. 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.
83. Schini-Kerth, V.B., et al., Aggregating human platelets stimulate the expression of thrombin receptors in cultured vascular smooth muscle cells via the release of transforming growth factor-beta1 and platelet-derived growth factorAB. *Circulation*, 1997. 96(11): p. 3888-96.
84. Daub, H., et al., Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 1996. 379(6565): p. 557-60.
85. Prenzel, N., et al., EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 1999. 402(6764): p. 884-8.
86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. Maruyama, I., et al., Thrombin activates NF-kappa B through thrombin receptor and results in proliferation of vascular smooth muscle cells: role of thrombin in atherosclerosis and restenosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1997. 811: p. 429-36.
90. Smiljanic, K., et al., Involvement of the ADAM 12 in thrombin-induced rat's VSMCs proliferation. *Curr Med Chem*, 2011. 18(22): p. 3382-6.

<sup>1</sup> Institut "Vinča", Laboratorija za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Univerzitet u Beogradu, P.fax 522, 11001 Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Insitut za internu medicinu, Klinički centar Vojvodina, Novi Sad

<sup>3</sup> Odeljenje za endokrinologiju i dijabetes, KBC Zemun, Zemun

## GOJAZNOST, REZISTENCIJA NA INSULIN I KARDIOVASKULARNA OBOLJENJA

### OBESITY, INSULIN RESSISTANCE AND CARDIOVASCULAR DISEASE

<sup>1</sup>Emina Sudar, <sup>1</sup>Sonja Zafirović, <sup>1</sup>Milan Obradović, <sup>1</sup>Sanja Soskić, <sup>1</sup>Aleksandra Jovanović, <sup>2</sup>Edita Stokić, <sup>3</sup>Zoran Gluvić i <sup>1</sup>Esma R. Isenović

**Sažetak:** Gojaznost se definiše kao prekomerno prisustvo masnog tkiva u organizmu koje može dovesti do mnogih zdravstvenih komplikacija koje pogoršavaju kvalitet života i skraćuju životni vek. Gojaznost je rezultat fizioloških odgovora organizma u situaciji kada je kalorijski unos veći od stvarnih energetske potrebe organizma u dužem vremenskom periodu, bez adekvatnog utroška energije. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (WHO) gojaznost zauzima peto mesto u paleti vodećih uzroka smrti na globalnom nivou i može se definisati kao hroničan poremećaj metabolizma koji je udružen sa kardiovaskularnim oboljenjima (CVD) kao i sa povećanom stopom morbiditeta i mortaliteta.

Danas je prihvaćeno mišljenje da je gojaznost usko povezana sa razvojem rezistencije na insulin (IR). Metaboličke i hormonske promene, koje su posledica pre svega visceralne gojaznosti karakteristične za metabolički sindrom, dovode vremenom do pojave IR u adipoznom tkivu, jetri i mišićnom tkivu. Pretpostavlja se da IR koja se javlja usled gojaznosti predstavlja prvi korak u razvoju CVD. Delimično, IR povećava rizik za nastanak nekih CVD zbog hipertenzije i dislipidemije, kao i promena u adipocitokinima, koje vode inflamaciji krvnih sudova. Osim toga, gojaznost nepovoljno utiče kako na hemodinamiku, tako i na strukturu i funkciju kardiovaskularnog sistema (CVS). Kardiovaskularne komplikacije koje su povezane sa gojaznošću doprinose visokoj stopi morbiditeta i mortaliteta.

Usled porasta broja gojaznih osoba, kao i prisustva IR i CVD kod ovih osoba, izučavanje masnog

tkiva i njegovog uticaja na razvoj različitih patofizioloških stanja kao što su IR i CVD predstavljaju veoma važno polje biomedicinskih istraživanja, rezultati kojih bi zasigurno omogućili nove terapijske pristupe u lečenju ovih poremećaja. Takođe, u cilju sprečavanja razvoja gojaznosti, a samim tim i oboljenja koja nastaju kao posledica ovog poremećaja, veoma veliki značaj imaju prevencija i edukacija o mogućim aspektima koje prekomerna akumulacija masnog tkiva može imati na normalno funkcionisanje organizma.

**Abstract:** Obesity is defined as abnormal or excessive fat tissue accumulation that may impair health and well-being and also increases death risk. Obesity occurs as a result of physiological responses of the organism in situations when the caloric intake is greater than energy expenditure/consumption over an extended period of time, resulting in energy conservation. According to the World Health Organization (WHO) overweight and obesity are the fifth of the leading risk factors for global deaths and they could be defined as a chronic metabolic disorder associated with cardiovascular diseases (CVD) and increased risk of morbidity and mortality.

Today, it is accepted that obesity is closely related to insulin resistance (IR). Metabolic and hormonal changes occurring first of all with increased visceral obesity which is a characteristic of metabolic syndrome, lead to IR development in adipose, liver and muscle tissue. It is assumed that IR, which occurs due to obesity, represents the first step in CVD development. Partly, IR

increases the risk for CVD development due to the presence of multiple risk factors as hypertension and dyslipidemia, and changes in adipocytokines lead to blood vessel inflammation. Besides that, obesity adversely affects hemodynamic, structure and function of cardiovascular system (CVS). Cardiovascular complications associated with obesity greatly contribute to increased risk of morbidity and mortality.

Due to the rising number of obese patients and also presence of IR and CVD in these patients, the study of adipose tissue and its effects on the development of various pathophysiological states as IR and CVD represents a very important area of biomedical research which would lead to new therapeutic approaches in these conditions. Also, in order to prevent obesity development and associated disorders, prevention and education are of great importance.

## I. Uvod

Koincidencija gojaznosti, rezistencije na insulin (IR; *engl. Insulin Resistance*), kardiovaskularnih oboljenja (CVD; *engl. Cardiovascular Diseases*) i dislipidemije upućuje na „metabolički sindrom”, sindrom zastupljen u 20-40% populacije industrijski razvijenih zemalja sa tendencijom porasta u narednim dekadama [1].

Gojaznost, posebno centralna gojaznost, predstavlja jedan od najuticajnijih, nezavisnih faktora rizika za pojavu CVD. Mnogobrojne studije ukazale su na vezu između mortaliteta nastalog usled CVD i same gojaznosti [2-7]. Danas se gojaznost može definisati kao hroničan poremećaj metabolizma koji je udružen sa CVD kao i sa povećanom stopom morbiditeta i mortaliteta [8], što je pokazano mnogim epidemiološkim studijama [9]. Gojaznost nepovoljno utiče kako na hemodinamiku, tako i na strukturu i funkciju kardiovaskularnog sistema (CVS; *engl. Cardiovascular System*) [10], kako mehanički, tako i metabolički. Mnoge promene u strukturi i funkciji CVS javljaju se kao rezultat prekomerne akumulacije masnog tkiva čak i u odsustvu sistemske hipertenzije ili neke druge bolesti srca [11]. Veza između gojaznosti i CVD je veoma kompleksna, imajući u vidu da su i druga patološka stanja organizma kao što su IR, hiperlipidemija i dijabetes, takođe, povezana sa gojaznošću i mogu doprineti razvoju CVD. Takođe, pokazano je da je gojaznost usko poveza-

na sa pojavom IR, kao i da je visceralna gojaznost veoma bitna u nastanku metaboličkog sindroma [12-14].

Kardiovaskularna oboljenja (CVD) predstavljaju grupu stanja ili bolesti koje nastaju usled poremećaja u radu srca i krvnih sudova. U CVD se ubrajaju: hipertenzija, koronarna bolest srca, cerebrovaskularna bolest, periferna vaskularna bolest, srčana insuficijencija, reumatska bolest srca, kongenitalne bolesti srca i kardiomiopatije [15]. CVD nastaje kao posledica interakcija genotipa i faktora spoljašnje sredine kao što su npr. pušenje i gojaznost [16]. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (WHO; *engl. World Health Organization*), CVD predstavljaju vodeći uzrok mortaliteta i morbiditeta u zemljama u razvoju, međutim, moguća je prevencija nastanka mnogih CVD kontrolom nekih od faktora sredine, kao što su pušenje, ishrana i fizička aktivnost [15].

## II. Gojaznost i kardiovaskularna oboljenja

Gojaznost se definiše kao prekomerno prisustvo masnog tkiva u organizmu koje može dovesti do mnogih zdravstvenih komplikacija koje pogoršavaju kvalitet života i skraćuju životni vek [17]. Gojaznost je rezultat fizioloških odgovora organizma u situaciji kada je kalorijski unos veći od stvarnih energetske potreba organizma u dužem vremenskom periodu, bez adekvatnog utroška energije [18]. Dakle, gojaznost nastaje kada postoji disbalans između unosa energije i njene potrošnje [9], pri čemu se višak skladišti u organizmu u vidu energetske rezerve (glikogen, masti) koja se troši u slučaju povećanih energetske potreba organizma ili u stanjima gladovanja organizma [19, 20]. Prema podacima WHO gojaznost zauzima peto mesto u paleti vodećih uzroka smrti na globalnom nivou [18]. S obzirom na svoje razmere, sama gojaznost predstavlja ozbiljan zdravstveni problem, imajući u vidu da sa sobom povlači povećan rizik od CVD, dijabetesa melitusa tipa 2 (DMT2; *engl. Diabetes Mellitus Type 2*) i maligniteta. Kod gojaznih osoba, prekomerne naslage masnog tkiva mehanički vrše pritisak na krvne sudove što uzrokuje otežan rada srca, dok se, sa druge strane, usled gojaznosti povećava i sama površina organizma te je potrebna i veća količina krvi za njegovo perfundovanje. Da bi organizam sa prekomernim masnim naslagama

zadovoljio svoje uvećane metaboličke potrebe, volumen krvi koja cirkuliše i minutni volumen srca se povećavaju [11]. Povećanje minutnog volumena srca kod gojaznih osoba uglavnom potiče od količine krvi koja se ispumpava iz srca pri kontrakciji, iako je zbog povećane simpatičke aktivnosti povećan i puls srca [21]. Kod takvih osoba, usled povećanog volumena krvi, dolazi do dilatacije i povećane napregnutosti zida leve komore (LV; *engl. left ventriculum*), što zatim dovodi do njene hipertrofije [22]. Takođe, hipertenzija je tri do pet puta češća kod gojaznih osoba, u poređenju sa osobama koje imaju normalnu telesnu masu [23]. Uz to, pokazano je i postojanje pozitivne korelacije između mase tela i srca [11]. Masne ćelije se nagomilavaju između mišićnih vlakana ili dovode do degeneracije kardiomiocita, što ima za posledicu poremećaje u sprovođenju ćelijskih signala u samom srcu [11]. Gojaznost i prekomerna telesna masa predstavljaju najčešći faktor kardiovaskularnog rizika kod pacijenata koji su pretrpeli infarkt miokarda [24]. Više od dve trećine pacijenata sa koronarnom bolešću srca ima povećanu masu tela ili je gojazno [25, 26]. Gojaznost kod adolescenata i odraslih osoba povezana je i sa učestalom pojavom ranih aterosklerotskih lezija [27]. Ateroskleroza koronarnih krvnih sudova počinje ili je ubrzana različitim mehanizmima koji su karakteristični za stanja gojaznosti, kao što su povećan simpatički tonus, povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji, povećan intravaskularni volumen i napregnutost vaskularnog zida, inflamacija i promene u lipoproteinima koji povećavaju aterogeni potencijal [24]. Osim toga, protrombotsko stanje kod gojaznih osoba verovatno doprinosi nastanku akutnih koronarnih događaja (nefatalni infarkt miokarda i nestabilna angina pectoris) [24, 28].

Gojazne osobe imaju dvostruko veći rizik za nastanak srčane insuficijencije u poređenju sa osobama koje imaju normalan indeks telesne mase (BMI, *engl. Body Mass Index*) [29]. Pacijenti sa uznapredovalom gojaznošću koji imaju srčanu insuficijenciju, bez disfunkcije LV, dijagnostikuju se kao pacijenti sa kardiomiopatijom povezanom sa gojaznošću [30]. Ranije se verovalo da gojaznost može biti uzrok srčane insuficijencije samo preko intermedijarnih mehanizama kao što su hipertenzija ili koronarna bolest srca, ali skorašnje studije su pokazale da i drugi faktori mogu biti uzročnici

kardiomiopatije povezane sa gojaznošću [24], kao što je hipertrofija LV povezana sa gojaznošću, koja ne može biti objašnjena samo povećanim krvnim pritiskom [24].

Kardiovaskularne komplikacije koje su povezane sa gojaznošću doprinose visokoj stopi morbiditeta i mortaliteta [31]. Sve komponente metaboličkog sindroma su nezavisni uzročnici kardiovaskularnih događaja kao što su moždani udar, kardiomiopatija, bolest koronarnih arterija, infarkt miokarda, srčana insuficijencija i iznenadna srčana smrt [32]. Gojazne osobe (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>) imaju dva do tri puta veći rizik od smrti u odnosu na osobe sa normalnom telesnom masom, dok preterano gojazne osobe (BMI > 35 kg/m<sup>2</sup>) imaju kraći životni vek za pet do dvadeset godina u odnosu na osobe sa normalnom telesnom masom istog pola i godina [23, 33]. Međutim, kod pacijenta sa višim BMI i hroničnim bolestima, kao što su koronarne bolesti, zabeležene su veće šanse za preživljavanje nego kod pacijenta sa normalnom težinom. Ovaj fenomen je u medicini poznat kao "paradoks gojaznosti" [31]. Patofiziologija "paradoksa gojaznosti" je nepoznata i neki autori smatraju da se ovaj paradoks može objasniti dodatnim bolestima koje se javljaju kod pacijenata sa niskim BMI [34].

### **III. Gojaznost, rezistencija na insulin i kardiovaskularna oboljenja**

Rezistencija na insulin (IR) predstavlja stanje u kome je poremećen odgovor na insulin tj. insulin nije u mogućnosti da adekvatno ostvari svoje biološke efekte [35-38]. IR je nesposobnost da periferna ciljna tkiva odgovore na odgovarajući način, čak ni na fiziološke koncentracije insulina u cirkulaciji, stoga, po definiciji IR predstavlja defekt u signalnoj transdukciji insulina [39]. Pokazano je da je gojaznost usko povezana sa pojavom IR [12-14] i da metaboličke i hormonske promene, koje su posledica pre svega visceralne gojaznosti karakteristične za metabolički sindrom [14], dovode vremenom do pojave IR u masnom tkivu, jetri i mišićnom tkivu [40]

U početnom stadijumu IR, da bi se postigle fiziološke vrednosti glukoze (Glu), pankreas pojačano luči insulin te dolazi do kompenzacije IR povećanjem koncentracije insulina u cirkulaciji. Međutim, nakon perioda kompenzovane IR ipak



dolazi do poremećaja u transportu Glu, iako se koncentracija insulina povećava sa povećanjem IR. Konačno, dolazi do poremećaja funkcije  $\beta$  ćelija pankreasa i one ne uspeavaju da luče dovoljno insulina [41]. Iako hiperinsulinemija može da kompenzuje IR u nekim slučajevima biološkog delovanja insulina, ona može da dovede i do prekomernog delovanja insulina u tkivima koja zadržavaju normalnu ili imaju minimalno oštećenu senzitivnost na insulin [13].

IR može da se javi na tri nivoa u odnosu na oštećenje usled koga je nastala: pre vezivanja insulina za njegov receptor, na nivou receptora za insulin ili usled poremećaja u signalnom putu insulina tj. posle vezivanja insulina za njegov receptor [38]. U stanjima visoke koncentracije insulina, usled homologije insulina sa insulinu sličnim faktorom rasta-1 (IGF-1; *engl. Insulin-Like Growth Factor-1*), u tkivima CVS kao i u drugim tkivima senzitivnim na insulin kao što su skeletni mišići i masno tkivo [42, 43], može da dođe do njegovog vezivanja za receptor za IGF-1 (IGFR-1; *engl. IGF-1 Receptor*) i stimulacije ovog receptora [42, 43]. IGFR-1 kao i receptor za insulin pripada grupi membranskih receptora koji poseduju tirozin kinaznu aktivnost [39, 44].

Pretpostavlja se da IR koja se javlja usled gojaznosti predstavlja prvi korak u razvoju CVD [45-48]. Delimično, IR povećava rizik za nastanak nekih CVD zbog hipertenzije i dislipidemije, kao i promena u adipocitokinima, koje vode inflamaciji krvnih sudova [49, 50]. Kardiomiociti genetski gojaznih (*ob/ob*) miševa pokazuju IR kao i da imaju poremećaje u delovanju insulina [51]. Oslabljena senzitivnost na insulin u skeletnim mišićima i jetri direktno je odgovorna za razvoj DMT2 kod čoveka [49]. Iako IR u drugim organima kao što je srce, ne dovodi do bolesti *per se*, postoje dokazi koji ukazuju na uticaj IR na patogenezu CVD [52].

Kod pacijenata sa poremećajem u radu srca česta je prisutna i IR [53], što, takođe, ukazuje na mogućnost da sistemska IR i/ili specifičan poremećaj u signalnom putu insulina u miokardijumu, može da doprinese poremećajima u radu srca. Dokazi za ovu tvrdnju su dobijeni u eksperimentima sa gojaznim pacovima sa IR [54] i miševima sa specifičnom delecijom gena za recep-

tor za insulin u srcu [55, 56]. Kod gojaznih pacova sa IR pokazana je akumulacija lipida u srcu, disfunkcija u kontraktilnosti LV i poremećena aktivacija signalnog puta receptora za insulin i fosfatidilinozitol 3-kinazu (PI3-K; *engl. Phosphoinositide 3-Kinase*) i protein kinazu B (PKB; Akt; *engl. Protein Kinase B*) [54].

#### IV. Zaključak

Gojaznost se može definisati kao hroničan poremećaj metabolizma koji je povezan sa mnogim poremećajima i oboljenjima, među kojima su i IR i CVD. Iako se nekada gojaznost smatrala problemom samo razvijenih zemalja, danas je visok stepen razvoja gojaznosti prisutan širom sveta sa tendencijom sve većeg porasta u narednim dekadama. Gojaznost predstavlja jedan od najuticajnijih, nezavisnih faktora rizika za pojavu CVD i mnogim epidemiološkim studijama pokazana je veza između mortaliteta nastalog usled CVD i same gojaznosti [2-7].

Usled postojećeg trenda porasta populacije gojaznih osoba, koji polako poprima razmere pandemije, kao i prisustva IR i CVD kod ovih osoba, izučavanje masnog tkiva i njegovog uticaja na razvoj različitih patofizioloških stanja kao što su IR i CVD predstavlja veoma važno polje molekularnih i biomedicinskih istraživanja. Izučavanja koja bi dovela do otkrivanja detalja u molekularnim mehanizmima delovanja metabolita i hormona masnog tkiva na razvoj IR i CVD bi zasigurno omogućila nove terapijske pristupe u lečenju ovih poremećaja i upravo zato su neophodna dalja istraživanja u tom smeru. Takođe, u cilju sprečavanja razvoja gojaznosti, a samim tim i oboljenja koja nastaju kao posledica ovog poremećaja, veoma veliki značaj imaju prevencija i pravovremena edukacija o mogućim aspektima koje prekomerna akumulacija masnog tkiva može imati na normalno funkcionisanje organizma.

#### V. Zahvalnica

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

## Reference

1. Laaksonen, D.E., et al., *Epidemiology and treatment of the metabolic syndrome*. *Ann Med*, 2004. **36**(5): p. 332-46.
2. Wilson, P.W., et al., *Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience*. *Arch Intern Med*, 2002. **162**(16): p. 1867-72.
3. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. *Lancet*, 2004. **364**(9438): p. 937-52.
4. McGee, D.L., *Body mass index and mortality: a meta-analysis based on person-level data from twenty-six observational studies*. *Ann Epidemiol*, 2005. **15**(2): p. 87-97.
5. Frayn, K.N., *Obesity and metabolic disease: is adipose tissue the culprit?* *Proc Nutr Soc*, 2005. **64**(1): p. 7-13.
6. Flint, A.J. and E.B. Rimm, *Commentary: Obesity and cardiovascular disease risk among the young and old--is BMI the wrong benchmark?* *Int J Epidemiol*, 2006. **35**(1): p. 187-9.
7. Valavanis, I.K., et al., *A multifactorial analysis of obesity as CVD risk factor: use of neural network based methods in a nutrigenetics context*. *BMC Bioinformatics*, 2010. **11**: p. 453.
8. Xavier Pi-Sunyer, F., et al. *Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report*. National Institutes of Health. in *Obes Res*. 1998.
9. Krauss, R.M., et al., *Obesity : impact on cardiovascular disease*. *Circulation*, 1998. **98**(14): p. 1472-6.
10. Alpert, M.A., *Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome*. *Am J Med Sci*, 2001. **321**(4): p. 225-36.
11. Poirier, P., et al., *Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism*. *Circulation*, 2006. **113**(6): p. 898-918.
12. Bonadonna, R.C., et al., *Obesity and insulin resistance in humans: a dose-response study*. *Metabolism*, 1990. **39**(5): p. 452-9.
13. McFarlane, S.I., M. Banerji, and J.R. Sowers, *Insulin resistance and cardiovascular disease*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(2): p. 713-8.
14. Reaven, G., *Syndrome X*. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2001. **3**(4): p. 323-332.
15. [www.who.int/cardiovascular\\_diseases](http://www.who.int/cardiovascular_diseases).
16. Sing, C.F., J.H. Stengard, and S.L. Kardia, *Genes, environment, and cardiovascular disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(7): p. 1190-6.
17. [www.who.int/topics/obesity](http://www.who.int/topics/obesity). Available from: [www.who.int/topics/obesity](http://www.who.int/topics/obesity).
18. [www.who.int/mediacentre/factsheets](http://www.who.int/mediacentre/factsheets). Available from: [www.who.int/mediacentre/factsheets](http://www.who.int/mediacentre/factsheets).
19. Dulloo, A.G., *Adipose tissue plasticity in catch-up-growth trajectories to metabolic syndrome: hyperplastic versus hypertrophic catch-up fat*. *Diabetes*, 2009. **58**(5): p. 1037-9.
20. [www.zcza.org.rs/s023.htm](http://www.zcza.org.rs/s023.htm). *Gojaznost dece i adolescenata*. Available from: [www.zcza.org.rs/s023.htm](http://www.zcza.org.rs/s023.htm).
21. Messerli, F.H., et al., *Overweight and sudden death. Increased ventricular ectopy in cardiopathy of obesity*. *Arch Intern Med*, 1987. **147**(10): p. 1725-8.
22. Vasan, R.S., *Cardiac function and obesity*. *Heart*, 2003. **89**(10): p. 1127-9.
23. Cannon, C.P., *Obesity-related cardiometabolic complications*. *Clin Cornerstone*, 2008. **9**(1): p. 11-9; discussion 20-2.
24. Lopez-Jimenez, F. and M. Cortes-Bergoderi, *Update: systemic diseases and the cardiovascular system (i): obesity and the heart*. *Rev Esp Cardiol*, 2011. **64**(2): p. 140-9.
25. Romero-Corral, A., et al., *Association of body-weight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies*. *Lancet*, 2006. **368**(9536): p. 666-78.
26. Lopez-Jimenez, F., et al., *Weight change after myocardial infarction--the Enhancing Recovery in Coronary Heart Disease patients (ENRICH) experience*. *Am Heart J*, 2008. **155**(3): p. 478-84.
27. McGill, H.C., Jr., et al., *Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men*. *Circulation*, 2002. **105**(23): p. 2712-8.
28. Scarabin, P.Y., et al., *Population correlates of coagulation factor VII. Importance of age, sex, and menopausal status as determinants of activated factor VII*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(9): p. 1170-6.
29. Krum, H. and W.T. Abraham, *Heart failure*. *Lancet*, 2009. **373**(9667): p. 941-55.

30. Wong, C.Y., et al., Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation*, 2004. 110(19): p. 3081-7.
31. Barbosa, J.A., et al., Cardiovascular dysfunction in obesity and new diagnostic imaging techniques: the role of noninvasive image methods. *Vasc Health Risk Manag*, 2011. 7: p. 287-95.
32. Knudson, J.D., et al., Mechanisms of coronary dysfunction in obesity and insulin resistance. *Microcirculation*, 2007. 14(4-5): p. 317-38.
33. Cannon, C.P., Cardiovascular disease and modifiable cardiometabolic risk factors. *Clin Cornerstone*, 2008. 9(2): p. 24-38; discussion 39-41.
34. Galal, W., et al., The obesity paradox in patients with peripheral arterial disease. *Chest*, 2008. 134(5): p. 925-30.
35. Sowers, J.R., P.S. Sowers, and J.D. Peuler, Role of insulin resistance and hyperinsulinemia in development of hypertension and atherosclerosis. *J Lab Clin Med*, 1994. 123(5): p. 647-52.
36. Reaven, G.M., H. Lithell, and L. Landsberg, Hypertension and associated metabolic abnormalities--the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl J Med*, 1996. 334(6): p. 374-81.
37. Nolan, J.J., et al., Mechanisms of the kinetic defect in insulin action in obesity and NIDDM. *Diabetes*, 1997. 46(6): p. 994-1000.
38. Hunter, S.J. and W.T. Garvey, Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med*, 1998. 105(4): p. 331-45.
39. Pessin, J.E. and A.R. Saltiel, Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*, 2000. 106(2): p. 165-9.
40. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 2006. 444(7121): p. 840-6.
41. Petersen, K.F. and G.I. Shulman, Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*, 2002. 90(5A): p. 11G-18G.
42. Sowers, J.R., Insulin and insulin-like growth factor in normal and pathological cardiovascular physiology. *Hypertension*, 1997. 29(3): p. 691-9.
43. Ren, J., W.K. Samson, and J.R. Sowers, Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. 31(11): p. 2049-61.
44. LeRoith, D., et al., Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev*, 1995. 16(2): p. 143-63.
45. Kolterman, O.G., et al., Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1981. 68(4): p. 957-69.
46. Bogardus, C., et al., Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man. *Am J Physiol*, 1985. 248(3 Pt 1): p. E286-91.
47. Godfrey, K.M. and D.J. Barker, Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr*, 2000. 71(5 Suppl): p. 1344S-52S.
48. Morisco, C., G. Lembo, and B. Trimarco, Insulin resistance and cardiovascular risk: New insights from molecular and cellular biology. *Trends Cardiovasc Med*, 2006. 16(6): p. 183-8.
49. Shulman, G.I., Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 2000. 106(2): p. 171-6.
50. Rask-Madsen, C. and G.L. King, Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007. 3(1): p. 46-56.
51. Mazumder, P.K., et al., Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes*, 2004. 53(9): p. 2366-74.
52. Young, L.H., Diet-induced obesity obstructs insulin signaling in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. 298(2): p. H306-7.
53. Witteles, R.M. and M.B. Fowler, Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options. *J Am Coll Cardiol*, 2008. 51(2): p. 93-102.
54. Boudina, S., et al., Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation*, 2005. 112(17): p. 2686-95.
55. Belke, D.D., et al., Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest*, 2002. 109(5): p. 629-39.
56. Boudina, S., et al., Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. *Circulation*, 2009. 119(9): p. 1272-83

## SAVREMENOST ASORTIMANA ANTIPSIHOTIKA U TERAPIJI SHIZOFRENIJE U REPUBLICI SRBIJI

### MODERN ASSORTMENT OF ANTIPSYCHOTICS FOLOWING THE THERAPY OF SCHIZOPHRENIA IN THE SERBIA REPUBLIC

Marija Mileković

#### **Abstrakt:**

**Uvod:** Shizofrenija je hronično duševno oboljenje, tipa psihoze, kod koga postoji gubitak kontakta sa realnošću. Uzroci nastanka shizofrenije nisu dovoljno poznati te se lečenje fokusira na eliminisanje simptoma bolesti. Terapija se zasniva na različitim psihosocijalnim tretmanima i farmakoterapiji. Osnovni lekovi koji se primenjuju u lečenju shizofrenije su antipsihotici. Lekovi koji su prvi uvedeni u praksu 50-tih godina prošlog veka nazivaju se „tipični antipsihotici“, a od 90-tih su razvijeni novi lekovi u terapiji shizofrenije, tzv. „atipični antipsihotici“. U Republici Srbiji registrovani su i tipični i atipični antipsihotici, ukupno 12. **CILJ RADA:** Procena savremenosti asortimana antipsihotika registrovanih u Republici Srbiji poredjenjem sa asortimanom antipsihotika registrovanih u SAD i Velikoj Britaniji (kao zemljama sa najrazvijenijom farmakoterapijom u svetu) i Martindale (sveobuhvatnom terapijskom vodiču gde je sadržano 97% svetskih lekova).

**Metode:** U metodološkom pogledu izvršeni su izbor materijala (Registar lekova Republike Srbije 2011, registri lekova Velike Britanije i SAD 2011, Martindale 2011, PubMed), obrada podataka i njihova uporedna analiza.

**Rezultati i diskusija:** Rezultati ove analize podeljeni su u dva dela: 1) tabelarni pregled registrovanih antipsihotika u svetu, Velikoj Britaniji, SAD i Republici Srbiji; 2) grafički prikazan numerički odnos između generičkih antipsihotika registrovanih u Republici Srbiji u poredjenju sa Velikom Britanijom i SAD. U svetu je ukupno registrovan 61 antipsihotik, u Velikoj Britaniji 22, u SAD 19, a u Republici Srbiji 12. Svi antipsihotici koji su registrovani u našoj zemlji nalaze se i u nacionalnim

registrima zemalja sa najrazvijenijom farmakoterapijom kao što su Velika Britanija i SAD, što je dobro, jer znači da u našoj zemlji nema opsolentnih antipsihotika. U našoj zemlji nije registrovano ukupno 5 antipsihotika koji su registrirani i u Velikoj Britaniji i u SAD. To su: aripiprazol, perfenazin, pimozid, prochlorperazin i trifluperazin. Aripiprazol je u kontrolisanim randomiziranim kliničkim studijama pokazao određene prednosti u odnosu na ostale atipične antipsihotike, dok za ostala četiri leka koji pripadaju tipičnim antipsihoticima nije uočen jasan benefit kroz randomizirane kliničke studije koje su do sada radjene u svetu.

**Zaključak:** Mogućnosti u lečenju shizofrenije u Republici Srbiji su zadovoljavajuće i pored nešto manjeg broja registrovanih lekova nego u USA i Velikoj Britaniji, zahvaljujući dobrom odabiru, sa napomenom da bi trebalo uvesti i aripiprazol, kako bi paleta bila potpuno sveobuhvatna.

#### **Summary:**

**Introduction:** Schizophrenia is a chronic mental illness, type of psychosis, where there is loss of contact with reality. Causes are not still well known, so the healing is focused on elimination of the illness symptoms. Therapy is based on different psychosocial treatments and pharmacotherapy. Basic medications used in the treatment of schizophrenia are antipsychotics. First adopted medications in praxis during the 50s were so called „Typical antipsychotics“. Since 90s were developed new medications in therapy of schizophrenia called „Atypical antipsychotics“. In Serbia we have registered both, typical and atypical, in total 12. **Objective:** Assessment of assortment moderni-

ty of antypsichotics registered in Serbia Republic compare to assortment of medications registered in USA and Great Britain (countries with most developed pharmacotherapy in the world) and to Martindale (general comprehensive therapy guideline, where are contained 97% of all world medications).

**Methods:** Methodologically have been performed choice of materials (Serbian drug register 2011, USA and Great Britain registers 2011, Martindale 2011, PubMed), data processing and their comparative analysis.

**Results and discussion:** Results of this analysis are divided in two parts: 1) tabular review of registered antypsichotics in the world, Great Britain, USA and Serbia Republic. 2) graphically showed numeric correlation between generic antypsichotics registered in Serbia compare to Great Britain and USA. In the world are registered 61 antypsichotics at all, in Great Britain 22, in USA 19, in Serbia 12. All registered medications in Serbia exists in Drug registers of Great Britain and USA (countries with best developed pharmacotherapy), which is good and means that there are not opsolent antypsichotics in our country. In our country are not registered 5 antypsichotics which are registered in both countries, Great Britain and USA. This medications are: aripiprazole, perphenazine, pimozide, prochlorperazine, trifluoperazine. Aripiprazole in control randomized studies showed certain advantages compare to other atypical antypsichotics. Other four, which are in the „typical antypsichotics“ group did not shown clear benefit compare to others according to control randomized studies performed all over the world till now.

**Conclusion:** Possibilities in healing of schizophrenia in Serbia Republic are satisfactory, despite the somewhat smaller number of registered medications compare to USA and Great Britain, thanks to a good selection, with a note that aripiprazole should be registered. On that way the range will be totally comprehensive.

## Uvod

Shizofrenija je hronično duševno oboljenje, tipa psihoze, kod koga postoji gubitak kontakta sa realnošću. Uzroci shizofrenije još uvek nisu dovoljno poznati. Prevalenca bolesti je oko 1% u celom svetu(2). Shizofrenija podrazumeva poremećaj

mnogih psihičkih funkcija: pre svega emocija, mišljenja, opažanja, voljne delatnosti. Simptomi shizofrenije se mogu podeliti u dve grupe: pozitivni i negativni. U pozitivne simptome spadaju: halucinacije, deluzije, poremećaj mišljenja i pokreta. Negativni simptomima su: nedostatak zadovoljstva u svakodnevnom životu, povlačenje u sebe, siromaštvo govora, apatija, izraz lica bez osećanja, nesposobnost da se započne i održi planirana aktivnost(4).

Problemi koji utiču na kvalitet života ovih pacijenata su najviše vezani za zadovoljstvo pacijenata socijalnom integracijom, tj. prihvatanjem pacijenata obolelih od shizofrenije od uže sredine. Zatim pacijenti se susreću sa ličnim problemima vezanim za nuspojave lekova, prisustvo simptoma bolesti, kao i teškoće u pronalaženju posla i odražavanje partnerskih i porodičnih odnosa.(3). S obzirom na to da je shizofrenija bolest hroničnog, progresivnog toka, ljudi oboleli od shizofrenije terapiju moraju da primenjuju čitavog života. Lečenje pomaže da se simptomi bolesti otklone, ali većina ljudi sa shizofrenijom će se nositi sa simptomima tokom čitavog života (5).

Terapija se zasniva na različitim psihosocijalnim tretmanima i farmakoterapiji. Osnovni lekovi koji se primenjuju u lečenju shizofrenije su antipsihotici. Antipsihotici su lekovi za lečenje simptoma shizofrenije, kao i drugih oblika psihoza(1). Dostupni su od 50-ih godina prošlog veka. Stariji lekovi se nazivaju „tipični antipsihotici“, a od 90-ih godina prošlog veka su razvijeni novi lekovi u terapiji šizofrenije, takozvani „atipični antipsihotici“. Tipični predominantno utiču na pozitivne, a atipični na negativne simptome shizofrenije. U republici Srbiji registrovani su i tipični i atipični antipsihotici, ukupno 12.

## Cilj rada

Cilj rada je da se proceni savremenost asortimana antipsihotika registrovanih u Republici Srbiji kroz međusobni odnos asortimana antipsihotika registrovanih u SAD i Velikoj Britaniji, kao zemljama sa najrazvijenijom farmakoterapijom u svetu. Sa druge strane Martindale je kao sveobuhvatni terapijski vodič 97% svetske proizvodnje lekova u kome ima i dosta opsolentnih lekova poslužio u ovom radu za poređenje sa registrovanim antipsihoticima u našoj zemlji, kao i sa onima u Velikoj Britaniji i SAD.

**Metode**

U metodološkom pogledu izvršeni su izbor materijala (Registar lekova Republike Srbije 2011, Martindale 2011, registri lekova Velike Britanije i SAD 2011, PubMed), obrada podataka i njihova uporedna analiza.

**Rezultati**

Rezultati ove analize podeljeni su u dva dela: 1) pregled registrovanih antipsihotika u Republici Srbiji, Velikoj Britaniji i SAD u odnosu na Martindale; 2) numerički odnos između antipsihotika registrovanih u Republici Srbiji u poređenju sa Velikom Britanijom i SAD.

**1) Pregled registrovanih antipsihotika u Republici Srbiji, Velikoj Britaniji i SAD u odnosu na Martindale**

*Tabela 1. Antipsihotici registrovani u svetu, Velikoj Britaniji, SAD i Republici Srbiji*

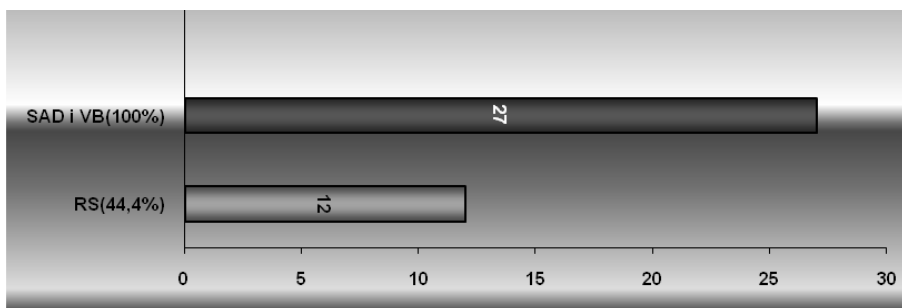
REDNI BROJ	MARTINDALE Generički naziv	VELIKA BRITANIJA	SAD	SRBIJA
1.	Amisulpiride	+	-	-
2.	Aripiprazole	+	+	-
3.	Asenapine maleate	-	-	-
4.	Benperidol	+	-	-
5.	Blonanserin	-	-	-
6.	Bromperidol	-	-	-
7.	Capipramine hydrochloride	-	-	-
8.	Chlorpromazine	+	+	+
9.	Chlorprothixene	-	-	-
10.	Clocapramine hydrochloride	-	-	-
11.	Clotiapine	-	-	-
12.	Clozapine	+	+	+
13.	Cyamemazine	-	-	-
14.	Dixyrazine	-	-	-
15.	Droperidol	-	-	-
16.	Fluanisone	-	-	-
17.	Flupentixol	+	-	-
18.	Fluphenazine	+	+	+
19.	Fluspirilene	-	-	-
20.	Haloperidol	+	+	+
21.	Iloperidone	-	-	-
22.	Levomepromazine	+	-	-
23.	Loxapine	-	+	-
24.	Melperone hydrochloride	-	-	-
25.	Mesoridezine	-	-	-
26.	Molindone hydrochloride	-	+	-
27.	Moperone hydrochloride	-	-	-
28.	Mosapramine	-	-	-
29.	Nemonapride	-	-	-
30.	Olanzapine	+	+	+
31.	Paliperidone	+	+	+
32.	Penfluridol	-	-	-
33.	Perazine dimalonate	-	-	-
34.	Pericyazine	+	-	-
35.	Perospirone hydrochloride	-	-	-

36.	Perphenazine	+	+	-
37.	Pimozide	+	+	-
38.	Pipamperone	-	-	-
39.	Pipotiazine	+	-	-
40.	Prochlorperazine	+	+	-
41.	Promazine	+	-	-
42.	Propionylpromazine	-	-	-
43.	Prothipendyl	-	-	-
44.	Qetiapine fumarate	+	+	+
45.	Raclopride	-	-	-
46.	Risperidone	+	+	+
47.	Ritanserin	-	-	-
48.	Sertindole	-	-	-
49.	Sulpiride	+	-	+
50.	Sutopride hydrochloride	-	-	-
51.	Thioproperazine mesilate	-	-	-
52.	Thioridazine	-	+	+
53.	Tiapride hydrochloride	-	-	-
54.	Timiperone	-	-	-
55.	Tiotixene	-	+	-
56.	Trifluperazine hydrochloride	+	+	-
57.	Trifluperidol	-	-	-
58.	Triflupromazine	-	-	-
59.	Ziprasidone	-	+	+
60.	Zotepine	-	-	-
61.	Zuclopenthixol	+	-	+
UKUPNO	<b>61</b>	<b>22</b>	<b>19</b>	<b>12</b>
%	<b>100</b>	<b>36,06</b>	<b>31,15</b>	<b>19,67</b>

Tabela 1. Pokazuje da je u svetu registrovan 61 antipsihotik (prikazano kao 100%), u Velikoj Britaniji 22 (36,1%), u SAD 19(31,2%), a u Republici Srbiji 12 lekova te grupe(19,67%).

Istovremeno se može uočiti da kod nas nisu registrovani neki antipsihotici koji su registrovani za primenu u Velikoj Britaniji i SAD. To su: aripiprazol, perfenazin, pimozid, prochlorperazin i trifluperazin.

**2) Numerički odnos između registrovanih antipsihotika u Republici Srbiji u poređenju sa Velikom Britanijom i SAD**



Slika1.Odnos generičkih antipsihotika registrovanih u Republici Srbiji(RS) i antipsihotika registrovanih u Velikoj Britaniji(VB) i Sjedinjenim Američkim Državama(SAD).

Slika 1. pokazuje da je od 27 antipsihotika registrovanih u Velikoj Britaniji i SAD prikazanih kao 100%, u našoj zemlji registrovano 12 lekova te grupe, što čini 44,4% u odnosu na asortiman ovih dveju zemalja.

## Diskusija

Izbor antipsihotika u terapiji shizofrenije zavisi od njegovih farmakoloških karakteristika i procene mogućnosti neželjenih efekata u odnosu na efikasnost. Za izbor leka vrlo je bitan podatak o prethodnom lečenju nekim od ovih lekova(10). Izbor antipsihotika svakako treba da bude individualizovan. U prvih 7 dana terapije očekivano je smanjenje agresije, anksioznosti, tenzije, agitacije i normalizacija spavanja. Preporuka je da se terapija započinje titriranjem doze(11). U periodu od 6-12 nedelja od početka lečenja trebalo bi da dodje do povlačenja pozitivnih i negativnih simptoma shizofrenije. Oko 60 % pacijenata u akutnoj epizodi nakon 6 nedelja terapije prvom generacijom antipsihotika ulazi u potpunu remisiju ili sa veoma malo rezidualnih simptoma.

Dugotrajna terapija antipsihoticima ima za cilj prevenciju relapsa, poboljšanje kvaliteta života pacijenata i njihovu socijalizaciju. Odgovor pacijenata na terapiju i podnošljivost su različiti. Pacijenti koji ne reaguju na jedan lek, ili imaju previše neželjenih efekata, mogu biti uspešno lečeni drugom grupom antipsihotika. Oko 10-15% pacijenata nakon oporavka od prve psihotične epizode nemaju više psihotičnih epizoda. Dok 10-15% pacijenata imaju hronično izražene psihotične smetnje(8).

Američka asocijacija psihijatarata(APA) svrstava većinu atipičnih antipsihotika u prvu liniju terapije akutne faze shizofrenije (uključujući i prvu psihotičnu epizodu), najviše zbog smanjenog rizika od nastanka ekstrapiramidalnog sindroma i tardivne diskinezije(8). Neželjeni efekti mnogih antipsihotika su: pospanost, vrtoglavica, zamućenje vida, ubrzan rad srca, osetljivost na sunce, osip, menstrualni problemi. Tipični antipsihotici mogu da izazovu neželjene efekte koji se odnose na fizičko kretanje, kao što su: rigidnost, mišićni spazmi, tremor, nemir, a usled dugotrajne upotrebe leka može doći i do tardivne diskinezije. Atipični antipsihotici mogu da dovedu do povećanja telesne težine, promene lipidnog statusa, povećanja glukoze u krvi i rizika od nastanka dijabetesa(12). Svoje terapijske i neželjene efekte antipsihotici ostvaruju dejstvom na dopaminergičku transmisiju u mozgu blokadom D2 receptora, kao i dejstvom na holinergičke, alfa-adrenergičke, histaminergičke i serotonininske receptore(7).

Svi antipsihotici koji su registrovani u našoj zemlji nalaze se i u nacionalnim registrima zemalja sa najrazvijenijom farmakoterapijom kao što su Velika Britanija i SAD, što je dobro, jer znači da u našoj zemlji nema opsolentnih antipsihotika. Sa druge strane postoji još 5 antipsihotika koji su registrovani u SAD i Velikoj Britaniji, a nisu registrovani u Republici Srbiji, a to su: aripiprazol (atipični antipsihotik), pimozid, perfenazin, proklorperazin i trifluperazin (tipični antipsihotici). Da li je ova razlika samo kvantitativna, ili u našoj zemlji nedostaje i kvalitetna terapija?

Aripiprazol je relativno nov atipični antipsihotik tzv. dopamin-serotonin stabilizator. Obradjeno je 3122 pacijenta kroz 9 randomiziranih studija koje su poredile efikasnost aripiprazola u odnosu na ostale tipične antipsihotike i pokazano je da postoji značajnost u korist aripiprazola u sledećem: bolje postizanje mentalne globalne stabilnosti, značajno slabiji ekstrapiramidalni simptomi, značajno manji broj pacijenata je ravijao hiperprolaktinemiju što ima značaj pre svega za potencijalno kancerogeno dejstvo kada su u pitanju tumori dojke, manji rizik od sinusne tahikardije, manji broj neželjenih efekata kao što su zamućen vid, mučnine. Neželjeni efekti poput vrtoglavice i osipa bili su podjednaki u obe grupe(13). Utvrđeno je u celini da pacijenti bolje podnose aripiprazol. Kada je u pitanju komparacija aripiprazola sa netipičnim antipsihoticima 24 nedeljna dvostruko slepa, randomizirana, placebo studija koja je poredila aripiprazol sa klozapinom pokazala je da je aripiprazol kod značajnog broja pacijenata pokazao pozitivan efekat kod onih koji su na terapiju klozapinom bili rezistentni. Takodje poboljšana je opšta psihopatološka simptomatologija. Nisu uočene prednosti u odnosu na kognitivne funkcije. Zaključak je da je aripiprazol koristan kao stabilizator postojeće terapije, a pre svega kod jednog broja rezistentnih pacijenata čiji broj nije zanemarljiv(14). U Americi je aripiprazol jedan od najpropisivanijih atipičnih antipsihotika i današnja terapija shizofrenije je sve više orijentisana ka kombinovanju više lekova. S druge strane pokazao je odredjen broj prednosti u odnosu na postojeće antipsihotike koji su registrovani kod nas, kao što su reaktivnost jednog broja rezistentnih pacijenata i manji broj nus efekata koji svakako utiču na kvalitet života pacijenata sa shizofrenijom. Parcijalni je agonista D2 receptora za koje se



sve više smatra da su ključni u lečenju shizofrenije (15).

Pimozid se u svetu tradicionalno koristi najčešće za lečenje Tureovog sindroma, posebno kod dece, za tikove. Prednosti su pokazane kroz 6 randomiziranih kontrolisanih studija koje su uradjene do sada(16).Kada je pitanju mesto pimozida u lečenju shizofrenije najozbiljnije kliničke studije do sada radjene, koje su poredile pimozid sa flufenazinom i hlorpromazinom pokazale su sledeće: -Kada se poredi sa flufenazinom pokazao je određene prednosti po pitanju aspekata socijalnosti, komunikacije sa drugima, kućnim zadacima i odnosu sa decom. U drugim aspektima kao i neželjenim dejstvima nije bilo razlike(17).

-U odnosu na hlorpromazin nije bilo razlike u odnosu na terapijske efekte, ali je bilo značajno manje nusfekata: vrtoglavica, mučnina i ekstrapiramidalnog sindroma(18).

Ono što nije dobro u vezi sa pimozidom je to da je pokazao određenu kancerogenost pituitarne žlezde u eksperimentima na miševima, tako da se vrlo oprezno razmatra njegovo mesto u lečenju mladih kao i davanje u dugom vremenskom periodu(8).

Imajući sve ovo u vidu treba sačekati sa uvodjenjem pimozida u našu zemlju i pored nekih prednosti koje su pokazane kroz studije (manje nusfekata u lečenju nekih oblika shizofrenije u odnosu na najkorišćenije lekove kod nas tog tipa, lek izbora kod Tureovog sindroma u lečenju tikova), dok god ne budu sprovedene studije koje će definitivno potvrditi ili odbaciti potencijalnu kancerogenost.

Perfenazin, prochlorperazin i trifluperazin spadaju u grupu derivata fenotiazina.Kod nas su iz te grupe lekova registrovani flufenazin, hlorpromazin i tioridazin.

Prochlorperazin se prvenstveno koristi kao dopuna dugoročnoj stabilizaciji simptoma shizofrenije, kao i prevenciji rekurentnih napada i u lečenju nekih teških oblika migrene. Dovodi do izraženijih ekstrapiramidalnih efekata, te se ne savetuje kod dece i hospitalizovanih pacijenata(8).Takodje zabeleženi su slučajevi pojave neuroleptičkog malignog sindroma pri upotrebi ovog leka(19).

Osnovni farmakološki efekti perfenazina i trifluperazina su jako slični efektima hlorpromazina , s tim što imaju nešto slabiji sedativni efekat i dovode do intenzivnijih ekstrapiramidalnih efekata. Imaju veoma jako antiemetičko dejstvo.Takodje je utvrđeno da nema razlike u poboljšanju lečenja depresije kod shizofrenije u odnosu na druge slične tipične antipsihotike(20). Nema posebnosti zbog kojih bi bilo poželjno uvesti ove lekove u lečenje shizofrenije s obzirom da lekovi iz iste grupe antipsihotika, koji su registrovani kod nas sasvim zadovoljavaju u tom smislu.

### **Zaključak**

U našoj zemlji je napravljen adekvatan izbor lekova u terapiji shizofrenije i delimično sveobuhvatan. Od postojećih 5 lekova koji su registrovani i u USA i Velikoj Britaniji, a nisu kod nas samo aripiprazol zaslužuje svakako da bude na listama naših lekara. Možemo reći u jednoj rečenici da su mogućnosti u lečenju shizofrenije kod nas zadovoljavajuće i pored nešto manjeg broja registrovanih lekova nego u USA i Velikoj Britaniji, zahvaljujući dobrom odabiru, sa napomenom da bi trebalo uvesti i aripiprazol kako bi paleta bila pooptpuno sveobuhvatna

## LITERATURA

1. Goodman & Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11, New York, McGraw-Hill, 417-451
2. Regier DA, et al, *The de facto US mental and addictive disorders service system*, *Archives of General Psychiatry*, 1993 Feb; 50(2):85-94
3. Opalić P, Femić N, *Research of the quality of life of schizophrenic patients in Belgrade*, *Med Pregl* 2008; LXI(11-21):625-631
4. World Health Organization (WHO), *Catatonic Schizophrenia, The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical descriptions and diagnostic guidelines*, 1992, Geneva, Switzerland
5. National Institute of Mental Health, [www.nimh.nih.gov](http://www.nimh.nih.gov)
6. Martindale *The Complete Drug Reference*, 37, Pharmaceutical Press, 2011
7. *British National Formulary*, 61, March 2011
8. AHFS *Drug Information*, 2011
9. *Registar lekova*, 2011, BB-Soft, Beograd
10. Varagić V., Milošević M., *Farmakologija*, XXXIII izdanje, ELIT MEDICA, Beograd, 2009, 108-117
11. DiPiro J, et al, *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*, Seventh Edition, Medical, 2008, 1099-1120
12. Lieberman JA, et al, *Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE). Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia*, *New England Journal of Medicine*, 2005 Sep 22; 353(12):1209-1223
13. Bhattacharjee J, et al, *Arpiprazole versus typical antipsychotic drugs for schizophrenia*, *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Jul 16; (3):CD006617
14. DeLeon A, et al, *Arpiprazole: a comprehensive review of its pharmacology, clinical efficacy, and tolerability*, *Clin Ther*. 2004 May; 26(5):649-66
15. Mailman R, Murthy V, *Third generation antipsychotic drugs: partial agonism or receptor functional selectivity?*, *Curr Pharm Des*. 2010; 16(5):488-501
16. Pringsheim T, Marras C, *Pimozide for tics in Tourette's syndrome*, *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Apr 15; (2):CD006996
17. Anumonye A, et al, *Clinical trial of pimozide*, *West Afr J Pharmacol Drug Res*. 1976 Jun; 3(1):17-24
18. Fallon I, et al, *The social outcome of patients in a trial of long-term continuation therapy in schizophrenia: pimozide vs. fluphenazine*, *Psychol Med*. 1978 May; 8 (2):265-74
19. Musselman ME, et al, *Neuroleptic malignant syndrome associated with the use of prochlorperazine in a patient with a recent history of antipsychotic-induced malignant syndrome*, *Ann Pharmacother* 2011 Nov; 45(11):e61
20. Addington DE, et al, *Impact of second-generation antipsychotics and perphenazine on depressive symptoms in a randomized trial of treatment for chronic schizophrenia*, *J Clin Psychiatry* 2011 Jan; 72(1):75-80



## Uputstvo našim saradnicima

“Medicinska istraživanja” je naučni časopis Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Časopis se u obliku sveske publikuje tri puta godišnje. U sveskama se štampaju originalni radovi i opšti pregledi, po pozivu Redakcije i originalni radovi koji su predhodno referisani na redovnim godišnjim simpozijumima Medicinskog fakulteta “Stremljenja i novine u medicini” u okviru “DANA ŠKOLE”, a koje odabere Uređivački odbor.

Budući da prvenstveno odražava naučnu aktivnost članova Medicinskog fakulteta i širokog kruga njihovih saradnika i drugih naučnih radnika časopis “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 2cm (gornja i donja) odnosno 2,5cm (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 36.000 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 skraćenica. 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 ispitati 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), 10, [1 0]). Na posebnom listu 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 i prezime i početno slovo imena autora, skraćen (internacionalni) 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 priložene 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 poleđini 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 posebnom listu 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 CD-u.

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 the 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 36000 characters). It should be neatly typed in one of the text processors (Word or Windows, Word Perfect for Windows, or similar). Margins should be 2cm (upper and lower), 2.5cm (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, then the title of the article, under the title the author's full name and surname, as well as the names of the associates, (without academic or other titles).

The text of the article (especially captions and names of the authors) should be connected to the references by corresponding superscript numerals (10, (10), 10, [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 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 the 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 RADAČ

*Urednik - editor:*  
Doc. dr ALEKSANDAR LJUBIĆ

*Sekretar - Secretary:*  
Prof. dr ZVEZDANA KOJIĆ

*Tehnički sekretar:*  
MILANKA ĆIRIĆ

*Izdavač i vlasnik:*  
MEDICINSKI FAKULTET UNIVERZITETA U BEOGRADU

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

*Realizacija:*  
“Paral”, Beograd

*Tiraž:*  
1000 primeraka