

NAUČNI I STRUČNI ČASOPIS MEDICINSKOG FAKULTETA PRIŠTINA
I DRUŠTVA LEKARA KOSOVA I METOHIJE SLD



THE SCIENTIFIC JOURNAL OF FACULTY OF MEDICINE AND DOCTORS SOCIETY OF KOSOVO AND METOHIA OF THE SMS

PRAXIS MEDICA

VOLUME 48
SUPPLEMENT 2
YEAR 2019

YUISSN
0350-8773
UDC 61



“PRVI KONGRES LEKARA KOSOVA I METOHIJE”
29. XI-1. XII 2019., Kosovska Mitrovica

u organizaciji Medicinskog fakulteta Priština - Kosovska Mitrovica,
povodom jubileja - 50 godina od osnivanja Medicinskog fakulteta

THE SCIENTIFIC JOURNAL OF FACULTY OF MEDICINE AND DOCTORS SOCIETY OF KOSOVO AND METOHIA OF THE SMS

PRAXIS MEDICA

NAUČNI I STRUČNI ČASOPIS MEDICINSKOG FAKULTETA PRIŠTINA
I DRUŠTVA LEKARA KOSOVA I METOHIJE SLD

“PRVI KONGRES LEKARA KOSOVA I METOHIJE”
29. XI-1. XII 2019., Kosovska Mitrovica

u organizaciji Medicinskog fakulteta Priština - Kosovska Mitrovica,
povodom jubileja - 50 godina od osnivanja Medicinskog fakulteta

GLAVNI I ODGOVORNI UREDNIK / EDITOR IN CHIEF

Prof. dr Bojana Kisić

ZAMENIK GLAVNOG UREDNIKA / DEPUTY EDITOR

Prof. dr Suzana Matejić

SEKRETAR / EDITORIAL SECRETARY

Dr sci med Boban Biševac

UREĐIVAČKI ODBOR / EDITORIAL BOARD

Prof. dr Dijana Mirić, prof. dr Milan Živković, prof. dr Simon Nikolić,
prof. dr Snežana Marković-Jovanović, prof. dr Snežana Filipović-Danić,
prof. dr Bratislav Lazić, prof. dr Slavica Pajović, prof. dr Jasmina Stevanović,
prof. dr Ljiljana Popović, ass. dr Aleksandra Ilić, ass. dr Mirjana Kostić

TEHNIČKA OBRADA / TECHNICAL EDITOR

Aleksandar Jekić

LEKTOR ZA ENGLJSKI JEZIK / LECTOR FOR ENGLISH

Ivana Stoiljković

IZDAJU / EDITED BY

Medicinski fakultet Priština,
Društvo lekara Kosova i Metohije Srpskog lekarskog društva

GODIŠNJA PRETPLATA / SUBSCRIPTION

Za inostranstvo 50 €
Za ustanove 5000 RSD
Za fizička lica 2000 RSD

ČASOPIS IZLAZI ČETIRI PUTA GODIŠNJE, TIRAŽ: 500

ŽIRO RAČUN

41900-603-1-2799 sa naznakom:
Medicinski fakultet Priština - Kosovska Mitrovica, pretplata za časopis.

Uvodna reč

Poštovane kolegice i kolege, učesnici „Prvog Kongresa lekara Kosova i Metohije“

Pred vama je Zbornik radova Prvog Kongresa lekara Kosova i Metohije, najvećeg medicinskog naučnog skupa u poslednjih tridesetak godina na prostorima Kosova i Metohije. Veliki odziv predavača i zainteresovanih za učešće na Kongresu najviše govori o značaju našeg postojanja na ovim prostorima. Istovremeno daje nam snagu i volju za sve izazove koji su pred nama. Preko 75 eminentnih predavača po pozivu iz zemlje i regiona učestvuje na našem Kongresu. Uz naučne sesije tokom Kongresa, organizovali smo i radionice, okrugle stolove, promocije knjiga i poster prezentacije.

Radni deo kongresa je podeljen u četiri sesije.

Lekari kliničari su u svojoj sesiji odabrali teme iz urgentnih stanja u medicini. Eminentni stručnjaci različitih specijalističkih grana (hirurgije, ortopedije, anesteziologije, kardiologije, pedijatrije, neu-rologije, pulmologije, nefrologije, endokrinologije, urgentne medicine i infektivnih bolesti predstaviće nam kroz dvadesetak interesantnih predavanja urgentna stanja iz oblasti kojima se bave.

Druga sesija pod nazivom „Bazične nauke u savremenoj medicini“ podeljena je u dve celine. Prva se bavi najnovijim saznanjima o aterosklerozi, koja je među vodećim uzročnicima smrti. Kroz savremena saznanja daju se odgovori zašto i kako nastaje ateroskleroza, koji su aspekti patomorfologije atero-sklerotičnog plaka, kako se ona leči i prevenira. Prikazan je i značaj bazičnih istraživanja, pre svega u dijagnostikovanju nekih od najčešćih maligniteta humane populacije. Takođe, bazične nauke su kroz proučavanja slobodnih radikala, kao i matičnih ćelija otvorila vrata kliničkim istraživanjima i mogu-ćnostima savremenog lečenja obolelih pacijenata.

Sesija „Dentalna medicina - danas i sutra“ obrađuje nova istraživanja u stomatologiji kao i novine u stomatološkoj praksi. Upoznaće nas sa najnovijim preporukama Evropske akademije za dečju stoma-tologiju kojima se povećava mogućnost kontrole i prevencije karijesa. Primena medikamentozne terapije, u sklopu konzervativne ili kao dodatak hirurškoj terapiji, može popravi kvalitet potpornog aparata zuba. Drugi deo sesije je posvećen digitalizaciji i kompjuterizaciji u stomatologiji koji su usloveli promenu mnogih procedura u stomatološkoj praksi. U sesiji su obrađene i savremene teme iz implantologije i upotrebe novih protetskih materijala u stomatologiji.

U sesiji „Zdravstvene i ekološke posledice ratnih dejstava NATO na SRJ - kako ih umanjiti i ukloniti“ ukazaće se da je tokom agresije NATO snaga na Srbiju 1999. godine upotrebljeno više vrsta različitih klasičnih projektila, što je uzrokovalo hemijsko zagađenje životne sredine još uvek nepoznatih razmera i intenziteta i kontaminacije živog sveta brojnim supstancama koje su poznate kao toksične, mutagene i kancerogene. Zapažanja dela zdravstvenih radnika da je došlo do porasta učestalosti nekih oboljenja, pre svega malignih kod stanovnika Srbije, nailaze na različite reakcije i čak oprečne stavove.

108 poster prezentacija predstavljenih na Prvom Kongresu lekara Kosova i Metohije su dokumentovane sažecima koji se nalaze na kraju Zbornika.

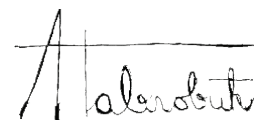
Zahvaljujemo se svim predavačima koji su svojim prisustvom ovaj Kongres učinili velikim i važnim, posebno za medicinske radnike sa prostora Kosova i Metohije.

Kolegice i kolege, zaljubljenici u medicinu i nauku, želimo vam da sa Prvog Kongresa lekara Kosova i Metohije ponese te uspomene ne samo na nova znanja i iskustva, već i na lepa poznanstva i prijateljstva.

A ovaj Zbornik radova neka ostane neizbrisiv pisani trag budućim generacijama.

U Kosovskoj Mitrovici
30. novembra 2019. godine

S poštovanjem,



Prof. dr Aleksandar Pavlović
Predsednik naučnog odbora Kongresa

Zahvaljujemo se Lekarskoj Komori Srbije, koja je obezbedila finansijska sredstva
za štampanje Zbornika radova Prvog kongresa lekara Kosova i Metohija

II SESIJA

BAZIČNE NAUKE U SAVREMENOJ MEDICINI

HISTOMORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE ENDOTELA I ULOGA ENDOTELNE DISFUNKCIJE U PROCESU NASTANKA ATEROSKLEROZE	13-18
Slađana Savić	
DIJABETES I ATEROSKLEROZA-INFLAMACIJA KAO MEHANIZAM POVEZIVANJA	19-22
Tatjana Novaković, Nenad Milošević, Zdravko Vitošević, Jovana Milošević, Ljiljana Jovičević, Zorica Živković, Emilija Novaković, Zlatica Mirković, Roksanda Krivčević, Aleksandra Balović	
RANI SKRINING GOJAZNOSTI U PREVENCIJI ATEROSKLEROZE	23-28
Mitić R. Nebojša	
ZNAČAJ NUTRACEUTIKA U TERAPIJI ATEROSKLEROZE	29-34
Sonja Smiljić	
CHRONIC MESENTERIC ISCHEMIA - AN OVERALL CHALLENGE IN MULTIVISCERAL DISEASE	35-37
Aleksandar Manolev	
OKSIDACIONI STRES I FIZIČKA AKTIVNOST - ISTINE I ZABLUDE	39-47
Popović Ljiljana	
ZNAČAJ I ULOGA SELENA KAO ANTIOKSIDANTA	49-52
Duško Blagojević, Aleksandra Nikolić Kokić, Zorana Oreščanin Dušić, Mihajlo Spasić	
FOSSA PTERYGOPALATINA - CT MORFOMETRIJA I KLINIČKI ZNAČAJ	53-57
Miroslav Radunović, Batrić Vukčević, Marija Abramović, Nemanja Vukčević, Aleksandra Vuksanović-Božarić	
KLINIČKI ZNAČAJ POZNAVANJA VARIJACIJA SPOLJAŠNJE KRUŽNE BUTNE ARTERIJE I NJENIH GRANA	59-65
Prof. dr Aleksandra Vuksanović Božarić, Prof. dr Miroslav Radunović, dr Marija Abramović, dr Batrić Vukčević, dr Nemanja Vukčević	
MATIČNE ĆELIJE I NJIHOVA PRIMENA U TERAPIJI - PROŠLOST, SADAŠNJOST, BUDUĆNOST	67-74
Snežana Leštarević	
PRETKLINIČKE I KLINIČKE STUDIJE PSIHIJATRIJSKIH BOLESTI	75-84
Miroslav Adžić, Željka Brkić, Miloš Mitić, Iva Lukić	
PROGNOSTIČKE I PREDIKTIVNE DETERMINANTE KOLORAKTALNOG KARCINOMA	85-93
Stanković Vesna, Mitrović Slobodanka	

KLINIČKO-PATOLOŠKA I FISH ANALIZA PRIMARNOG DIFUZNOG B KRUPNOĆELIJSKOG LIMFOMA TESTISA	95-101
Maja Peruničić Jovanović, Biljana Mihaljević, Petar Jovanović, Jelena Jeličić, Vesna Čemerikić Martinović, Jelica Jovanović, Marija Denčić Fekete, Milica Čekerevac, Nebojša Bojanić	
ZNAČAJ P16INK4A TESTA U DIJAGNOSTICI PREMALIGNIH I MALIGNIH LEZIJA NA GRLIĆU MATERICE	103-107
Prof.dr Leonida Vitković	
FOKALNA NEUROENDOKRINA DIFERENCIJACIJA U KARCINOMU PROSTATE U KORELACIJI SA DRUGIM PARAMETRIMA OD PREDIKTIVNOG ZNAČAJA	109-118
Milica Mijović	

II SESIJA

BAZIČNE NAUKE U SAVREMENOJ MEDICINI

HISTOMORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE ENDOTELA I ULOGA ENDOTELNE DISFUNKCIJE U PROCESU NASTANKA ATEROSKLEROZE

AUTORI

Sladana Savić

Institut za Histologiju sa embriologijom, Medicinski fakultet Priština, sedište Kosovska Mitrovica, Srbija

SAŽETAK

Vaskularni endotel koga čini jedan sloj ljustastih ćelija oblaže unutrašnjost kardiovaskularnog sistema, formirajući zaravnjeni sloj nalik kaldrmi. Dugo je smatran samo pasivnom barijernom membranom, no savremena istraživanja pokazuju da je to najveći endokrini organ kod čoveka uključen u procese održavanja vaskularne homeostaze.

Morfološke karakteristike endotelne ćelije zavise od njihove lokalizacije. Uopšteno, endotelne ćelije su polarizovane, apikalno su prisutni mikrovili, kaveole, adhezioni molekuli. Lateralni pol ćelije karakteriše povezanost okludentim, adherentnim i malobrojnim komunikantnim spojevima, dok su na bazalnom domenu plazmaleme prisutni hemidezmozomi, fokalni i mioendotelni spojevi. Oko centralno pozicioniranog jedra smeštene su organele. Zastupljeni su svi tipovi transporta. U Weibel-Palade-ovim telašcima je deponovan sijaset bioaktivnih molekula uključenih u procese hemostaze, inflamacije, modulacije vaskularnog tonusa i protoka krvi, angiogeneze i zarastanja rana.

Endotelna disfunkcija, koja je posledica hiperholesterolemije udružene sa povišenim nivoima lipoproteina male gustine (LDL) najvažniji je faktor nastanka ateroskleroze. Bazični proces je inflamacija, na endotelnim ćelijama dolazi do povećavanja ekspresije specifičnih molekula koji su odgovorni za adheziju, puzanje, transendotelnu migraciju, akumulaciju monocita u subendotelno vezivno tkivo i njihovu diferencijaciju u makrofage. Transendotelna migracija monocita omogućena je složenim mehanizmima dominantog, paracelularnog i transcelularnog transporta. Dalja progresija oboljenja je složeni zapaljensko-imunološki proces koji obuhvata učesće endotelne ćelije, aktivisanih makrofaga i dominaciju proinflamatornog (M1) profila ćelija, aktivaciju, migraciju, proliferaciju i fenotipsku modifikaciju glatkih mišićnih ćelija. Morfološki inicijalo se uočava masna mrlja, progresijom nastaje trazitorna lezija i formira se fibrozna kapa, dok komplikovane lezije karakteriše prisustvo fibroznog plaka čija ruptura može dovesti do smrtnog ishoda.

Ključne reči: endotelne ćelije, morfologija, endotelna disfunkcija, ateroskleroza, plak

ENGLISH

HISTOMORPHOLOGICAL ENDOTHELIAL FEATURES AND ROLE OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN ATHEROSCLEROSIS FORMATION PROCESS

SUMMARY

Vascular endothelium, composed of one layer of squamous cells, lines the inside of the cardiovascular system, forming a flattened layer resembling cobblestones. For a long time, it was considered just a passive barrier membrane. However, contemporary research shows it as the biggest human endocrine organ involved in processes sustaining vascular homeostasis.

Morphological characteristics of endothelial cells depend on their localization. In general, endothelial cells are polarized and microvilli, caveolae and adhesion molecules are present on the apical surface. Lateral cell polarity is characterized by the coherence of occluding, adherens and few communicating junctions, while, on the basal membrane domain of plasmalemma, hemidesmosomes, focal and myoendothelial junctions are present. Organelles are placed around the centrally positioned nucleus. All means of transportation are present. In Weibel-Palade bodies, a myriad of bioactive molecules involved in processes of hemostasis, inflammation, modulation of vascular tonus and blood circulation, angiogenesis and wound healing are stored.

Endothelial dysfunction, a result of hypercholesterolemia, joined with higher levels of lipoproteins of very low density (LDL) is the most important factor of atherosclerosis development. Inflammation is the basic process - endothelial cells undergo enlargement of the expression of specific molecules responsible for adhesion, crawling, transendothelial migration and accumulation of monocytes into subendothelial connective tissue and their differentiation into macrophages. Transendothelial migration of monocytes is enabled by complex mechanisms of dominant, paracellular and transcellular transport. Further progression of the disease is a complex inflammation-immunological process, encompassing endothelial cell involvement, activated macrophages and pro-inflammatory (M1) cell profile dominance, activation, migration, proliferation and phenotypic modification of smooth muscle cells. Fatty stain was morphologically initially noticed. With its progression in-transit lesion is made and fibrous cap is formed, while complex lesions are characterized by the presence of fibrous plaque, the rupture of which can lead to mortal outcome.

Key words: endothelial cells, morphology, endothelial dysfunction, atherosclerosis, plaque

UVOD

Vaskularni endotel koga čini jedan red ljustastih ćelija, oblaže unutrašnjost kardiovaskularnog sistema formirajući zaravnjeni sloj nalik kaldrmi na lumenskoj površini zidova krvnih sudova i endokarda srca. Ter-min „endotel“ je prvi put upotrebljen od strane švajcarskog anatoma Wilhelma Hisa 1865 god. Opisan je najpre kod kapilara, kao prosta membrana sačinjena od tankih ćelija sa centralno postavljenim jedrima, koja predstavlja barijeru između cirkulišuće krvi i zida krvnog suda. Savremena istraživanja pokazuju njegovu izvanrednu funkcionalnost. Vaskularni endotel se karakteriše autokrinom, parakrinom i endokrinom sekrecijom i igra glavnu ulogu u održavanju homeostaze vaskularnog korita, tako da je 1995. godine definisan kao posebni endokrini organa. Disfunkcija endotela je ključni korak u razvoju ateroskleroze, a prva saznanja o funkcionalnim promenama endotelnih ćelija (EĆ) u početnim stadijumima ateroskleroze istaknuta su još 1966. godine.

Morfofunkcionalne karakteristike endotelnih ćelija

EĆ su tanke i blago izdužene, dimenzija 50-70 µm, širine 10-30 µm i debljine 0,1-10 µm i u krvnim sudovima su dužno orjentisane tako da pružaju namanji otpor

toku krvi. Zajedno sa bazalnom membranom (BM) i subendotelnim vezivnim tkivom čine vaskularnu intimu, uspostavljajući hemokompatibilnu površinu, za koju je procenjeno da je čini 1-6 triliona ćelija, površine 3000-6000 m². EĆ pokazuju heterogenost koja uključuje varijacije u ćelijskoj morfologiji, u profilu ekspresije gena, proizvodnji komponenti BM, transportu. Aortne EĆ su debljine oko 1 µm, kapilarne oko 0,1 µm i dok su EĆ u venama debljine 0,1-0,2 µm. U kontinuiranom endotelu EĆ su međusobno povezane tesnim vezama i čvrsto „usidrene“ za BM. Ćelije poseduju centralno pozicionirano jedro koje prominira u lumen krvnog suda a oko koga su koncentrisane osrednje izažene organele: grER, Goldži kompleks, mitohondrije, lizozomi kao i brojne pinociozne vezikule. Svi elementi citoskeleta su dobro izraženi, mikrofilamenti imaju orijentaciju paralelnu sa dužom osovinom ćelije i posebnu ulogu u regulaciji paracelularnog transporta, jer se njihovom kontrakcijom vrši privremeno „otvaranje“ međućelijskih spojeva. Intermedijarni filamenti, mahom vimentin i mikrotubuli lokalizovani su perinukleusno. Posebna karakteristika EĆ jeste prisustvo Weibel-Paladeovih telašaca (WPT), granula ovalnog ili oblika cigarete, dijametra 0,1-0,3 µm, dužine 1-5 µm, sa karakterističnom longitudinalnom ispruganošću koja potiče od elektrono gustih paralelno raspoređenih mikrotubula prečnika oko 12 nm, okruženih matriksom manje elektronske gustine.

Dugo nakon otkrića njuhova funkcija nije bila poznata, tek nakon 20-tak godina otkiveno je da se u njima nalazi von Willebrandov factor (VWF), hemostatski protein koji se izlučuje u krv kao odgovor na razne agoniste i pospešuje adheziju trombocita na mestima vaskularnih oštećenja. U WPT-a deponovan je sijaset biološki aktivnih produkata uključenih u procese hemostaze, inflamacije, modulacije vaskularnog tonusa i protoka krvi, angiogeneze i zarastanja rana, uključujući P-selectin, IL-8 (eng. interleukin 8), eotaxin-3, angiopoietin-2, osteoprotegerin, endothelin-1, ECE (eng. endothelin converting enzyme), tPA (eng. tissue-type plasminogen activator), CGRP (eng. calcitonin gene-related peptide) i mnoge druge.

Polarizovanost endotelnih ćelija

Na plazmalemi EĆ razlikuje se apikalni i bazolateralni pol. Na apikalnom polu prisutni su mikroivili, prekriveni gustim slojem glikokaliksa, složenom mrežastom strukturom makromolekula negativnog naelektrisanja, koja ima zaštitnu i barijernu ulogu. Sa ovog dela plazmaleme obavljaju se sve vrste transporta: prosta difuzija, aktivni transport, pinocitoza, receptogena endocitoza, egzocitoza, kao i transcitoza, vid transporta karakterističan za EĆ.

Lateralni odeljak bazolateralnog pola plazmaleme karakteriše prisustvo sva tri tipa međućelijskih veza a njihov raspored i struktura zavise od lokalizacije EĆ. Okludentnim i adherentnim spojevima uspostavlja se veza između elemenata citoskeleta, aktinskih filamenata dve susedne EĆ. Zonule okludentne (ZO) su dobro strukturno organizovane u arterijama, arteriolama i kontinuiranim kapilarima, oskudno u venama, jednostavne ili „pukotinate“ u postkapilarnim venulama. One stvaraju granicu između apikalnog i bazolateralnog pola plazmaleme, uključene su u proces signalne transdukcije, genske ekspresije, u regulaciju ćelijskog rasta i preživljavanja, regulaciju paracelularnog transporta. Ćelijski adhezioni proteini okludin, klaudin tip 5, JAM (eng. junctional adhesion molecules) i ESAM (eng. endothelial cell adhesion molecule) karakteristični su za okludentne veze EĆ-a. Adherentni spojevi forme zonula (ZA), intercelularni prostor promera 15-20 nm premošćuju transmembranskim adhezionim molekulima iz grupe kadherina, imunoglobulinske superfamilije i CD99 molekula. Za homofilnu interakciju između molekula VE-kadherina (eng. vascular endothelial cadherin), karakterističnog za EĆ neophodno je prisustvo Ca^{2+} jona. Fosforilacija VE-kadherin/kateninskog kompleksa jedan je od najvažnijih mehanizama paracelularnog transport ćelija. PECAM-1 (eng. platelet endothelial cell

adhesion molecule-1) član imunoglobulinske superfamilije, homofilnom interakcijom stabilizuju veze EĆ-a, dok heterofilnom vezom koju ostvaruje sa integrinima prisutnim na plazmalemi leukocita pospešuje dijapedezu ćelija kao i širenje metastaza. CD99 molekuli svojom homofilnom interakcijom stabilizuju endotel sa jedne strane, dok su sa druge strane značajan faktor transendotelne migracije ćelija. Osim važne uloge u pozicioniranju ćelija unutar endotela, ZA učestvuju u signalnoj transdukciji vezivanjem za VEGFR2 (eng. vascular endothelial growth factor receptor 2) i indukcijom PI3Ks (eng. phosphoinositide 3-kinases), učestvuju u signalizaciji ćelijskog položaja, kontaktnoj inhibiciji ćelijskog rasta, inhibiciji apoptoze i imaju ključna ulogu u regulaciji paracelularnog transporta materija i inflamatornih ćelija. Za komunikantne veze EĆ-a karakteristično je prisustvo tzv. vaskularnih koneksina (Cx37, Cx40, Cx43, Cx45). Oni grade koneksionske komplekse koji premošćuju pukotinasti prostor između susednih EĆ. Odgovorni za transport cGMP, cAMP, jona, hormona, šećera, aminokiselina, otvaraju se pri visokom pH i niskoj koncentraciji Ca^{2+} . Najbrojnije veze ovog tipa prisutne su između EĆ endokarda srca gde čine funkcionalni sincicijum.

Bazalni odeljak plazmaleme je mesto uspostavljanja kontakta sa BM pomoću transmembranskih proteina iz grupe integrina, putem hemidezmozoma i fokalnih kontakta. Osobnost ovog dela plazmaleme je prisustvo mioendotelnih spojnica (MES) specifične vrsta veza između endotelnih i glatkih mišićnih ćelija (GMĆ) koje doprinose brzom unakrsnoj mikrosignalizaciji. Predstavljaju ćelijske produžetke obložene plazmalemom, dimenzija $0,5 \times 0,5 \mu m$, sadrže aktinske filamente i mikrotubule, kaveole kao i grER. Kod ljudi u 40% slučajeva nastaju od glatkih mišićnih ćelija, dok kod miševa u 100% slučajeva predstavljaju invaginaciju EĆ-a. Prisutne su u malim mišićnim arterijama i arteriolama, sporadično u venama. Veza između ćelija na nivou MES ostvarena je pomoću neksusa izgrađenih iz Cx37, Cx40 i Cx43 i predpostavlja se da je u uskoj sprezi sa finom kontrolom vazomotorne funkcije.

Endotelna disfunkcija i ateroskleroza

U fiziološkim uslovima, endotel iskazuje trombolitički efekat, ima antiinflamatorno antiagregacijsko i aniproliferativno dejstvo a vaskularno korito se nalazi u stanju aktivne vazodilatacije usled prevage vazodilatatornih nad vazokonstriktivnim efektima. U stanjima tzv. endotelne disfunkcije/aktivacije koja može biti uzrokovana mehaničkim, metaboličkim, zapaljenskim i enokrinim faktorima dolazi do disbalansa.

Disfunkcionalnost EĆ podrazumeva ekspresiju brojnih adhezionih molekula, lučenje proinflammatoryh citokina, hemokina, faktora rasta, produkciju ROS (eng. reactive oxygen species) uz razvoj inflamacije i vazokonstrukcije pri čemu površina endotela postaje trombogena. Ovo je razlog zbog koga su morfološki normalne arterije sa funkcionalno izmenjenim endotelom mesto razvoja rane ateroskleroze. Hiperholesterolemija udružena sa povišenim nivoima lipoproteina male gustine (eng. LDL-low-density lipoprotein) najvažniji je faktor njenog nastanka. Patološki supstrat ateroskleroze je aterogeneza, stvaranje ateroma/plaka sačinjenog od lipidnog jezgra okruženog vezivnim tkivom koji dovodi do otvrdnuća zidova krvnih sudova, njihovog sužavanja ili potpune okluzije. U patogenezu ove bolesti uključene su aktivisane EĆ, GMĆ, makrofagi, T limfociti, trombociti koji stupaju u složenu međusobnu interakciju i komunikaciju putem inflamatornih medijatora i adhezionih molekula. Najvažniji korak u razvoju ateroskleroze je pokretanje tzv. adhezione kaskade, koja se odvija u nekoliko faza. Prva je labavo vezivanje i puzanje (kotrljanje) leukocita po površini EĆ-a koje se ostvaruje posredstvom adhezionih molekula iz grupe selektina (selektin-P, E, L) i njihovih liganada, vaskularnih adresina tipa CD34, GlyCAM-1 (eng. glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1), PSGL-1 (eng. p-selectin glycoprotein ligand 1). Druga faza je aktivacija leukocita od strane hemoatraktantnih stimulusa koje luče aktivisane EĆ i makrofagi: IFN- γ (eng. interferon gamma), TNF- α (eng. tumor necrosis factor alpha), MCP-1 (eng. monocyte chemoattractant protein-1) i IL-8, ekspresija beta 2 integrin na EĆ-a, LFA-1 (eng. lymphocyte function-associated antigen 1) i VLA-4 (eng. very late antigen-4 molecule/ α 4B1-integrin) na plazmalemi leukocita. Kotrljanje leukocita se zaustavlja i omogućava se naredni korak, uspostavljanje čvrste veze između leukocita i EĆ-a uz pomoć adhezionih molekula imunoglobulinske superfamilije ICAM-1, 2, 3 (eng. intercellular adhesion molecule) i VCAM-1 (eng. vascular cell adhesion molecule 1) što je preduslov za transendotelnu migraciju ćelija paracelularnim ili transcelularnim putem.

Parcelularni transport je dominantan vid transporta, omogućen privremenim raskidanjem međućelijskih veza, usled kontrakcije aktino/miozinske mreže filamenata, kao i uspostavljanjem veza između inegrina leukocita i adhezionih molekula EĆ-a. ICAM-1 pokreće niz signalnih puteva unutar EĆ, fosforilaciju target proteina, prevashodno VE-kadherin/kateninskog kompleksa, produkciju ROS-a, aktivaciju Rho familije GTP-aza i influks kalcijuma. Svi ovi procesi dovode do disrupcije veza kroz remodeliranje/ kontrakciju aktinske mreže filamenata.

VCAM-1 putem Rac1-posredovane generacije ROS-a indukuje inhibiciju fosfataza i aktivaciju redoks senzitivnih kinaza, dovodi do povećane fosforilacije vezujućih proteina i uz povećanu produkciju MMP-a do disrupcije veza. Ovi procesi praćeni su i reorganizacijom adhezivne platforme i recikliranjem adhezivnih molekula formiranjem specifičnih vezikula, LBRC (eng. endothelial lateral border recycling compartment). Adhezioni molekuli regrutuju se od strane LBRC-a čime se smanjuje njihova gustina na lateranim odeljcima plazmaleme i olakšava paracelularni transport. Vezikule se transportuju duž mikrotubula uz pomoć kinezina i na taj način se omogućava premeštanje adhezionih molekula, koji učestvuju u paracelularnom i transcelularnom transportu. Transcelularna migracija je fascinantan proces transporta leukocita tokom kojeg se stvara transcelularni kanal između apikalne i bazalne membrane EĆ-a, bez oštećenja ćelija. Na ovaj način se uglavnom transportuju neutrofilni leukociti, ređe limfociti. Migracija je zavisna od ICAM-a kao i regrutacije PECAM-1, CD99 i JAM molekula putem LBRC-a. Na mestu transporta leukociti stvaraju protruzije/podozome koji se uvlače u prstenastu invaginaciju plazmaleme EĆ-a bogatamom LFA-1, ICAM-1 i VCAM-1 molekulima, endotelnim kaveolinom 1, mrežom aktinskih filamenata i brojnim vezikula koje su rezerva ćelijske plazmaleme. Složena međusobna interakcija ćelija uz aktivaciju MMP-a pomaže preoblikovanju EĆ i formiranje transcelularnog kanala.

U uslovima perzistentno povećane koncentracije u krvi, višak LDL procesom endocitoze preuzimaju EĆ-e i transportuju ga u subendotelno vezivno tkivo, što je na samom startu zaštitni mehanizam kojim se organizam bori sa hiperlipidemijom. LDL u zidu krvnog suda mogu biti modifikovani oksidacijom, glikozilacijom ili inkorporacijom u imunske komplekse. Oksidisana forma LDL (oxLDL) ispoljava jak proinflammatory efekat i zajedno sa citokinima TNF, IL-1, IL-6 indukuju ekspresiju MCP-1 u endotelnim i GMĆ-a. MCP-1 je hemokin koji se vezuje za receptor CCR2 (eng. C-C chemokine receptor type 2) na membrani monocita, olakšavajući njihovu diapedezu. Monociti u subendotelnom vezivnom tkivu pod uticajem M-CSF (eng. macrophage colony-stimulating factor) sazrevaju u makrofage na čijoj se plazmalemi povećava ekspresija receptora „čistača“ klase A (eng. SRA - scavenger receptors class A) putem kojih se obavlja fagocitoza oxLDL. Ovi receptori ne funkcionišu po principu negativne povratne sprege, pa citoplazma makrofaga vremenom postaje prepunjena lipidnim kapima i oni se transformišu u novi oblik ćelija tzv. penaste ćelije (PĆ). Nakupine PĆ-a u tunici intimi krvnog suda formiraju masne pruge, žućkaste trakaste

lezije promera nekoliko milimetara, koji su incijalni morfološki prepoznatljiv fenomen rane ateroskleroze. Pored makrofaga, u stvaranju PĆ učestvuju i GMĆ, koje stiči karakteristike lipofaga. PĆ postaju izvor faktora rasta, citokina, ROS-a, MMP-a što pojačava inflamaciju i na taj način se zatvara začarani krug ateroskleroze. Vremenom podležu apoptozi. Dalja progresija oboljenja je složeni zapaljensko-imunološki proces koji obuhvata učešće EĆ, aktivisanih makrofaga uz dominaciju proinflatarnog (M1) profila ćelija, aktivaciju, migraciju, proliferaciju i fenotipsku modifikaciju GMĆ-a. Pod uticajem PDGF (eng. platelet-derived growth factor), endotelina-1, TGFβ (eng. transforming growth factor beta), IGF-1 (eng. insulin-like growth factor 1) i angiotenzina II javlja se smanjena genska ekspresija kontraktilnih markera GMĆ, povećava se proliferacija i migracija u intimu. GMĆ i same sekretuju PDGF i VEGF I (eng. vascular endothelial growth factor) koji stimulišu njihovo sopstveno umnožavanje, kao i fenotipsku modifikaciju od kontraktilnog ka sekretornom tipu ćelija, pod kontrolom miokardina. Usled pojačane sinteze komponenti ekstracelularnog matriksa (ECM) dolazi do formiranja fibrozne kape oko lipidnog jezgra ateroskleroznog plaka, koja karakteriše tranzitornu aterosklerotičnu leziju. Fibrozna kapa pokriva površinu plaka okrenutu lumenu krvnog suda i čine je komponente ECM-a, dominantno kolagena vlakna i GMĆ. T limfociti prisutni u leziji proizvode faktore rasta HB-EGF (eng. heparin-binding EGF-like growth factor) i bFGF (eng. basic fibroblast growth factor) koji dodatno podstiču proliferaciju GMĆ i proinflatarnu aktivnost makrofaga. Na ovaj način, složene ćelijske interakcije određuju dalju sudbinu lezije. Sekretornom aktivnošću GMĆ-a u plaku se povećava sadržaj vezivnog tkiva, što je supstrat za razvoj fibroznog plaka, koji predstavlja metabolički veoma dinamičnu tvorevinu i karakteriše uznapredovale stadijume ateroskleroze. Plak može biti stabilan ili nestabilan, a odnos veličine lipidnog jezgra i vezivnog tkiva bitan je za njegovu vulnerabilnost i

prognozu. Veliko lipidno jezgro koje zauzima više od 50% zapremine plaka, prisustvo brojnih makrofaga, tanka fibrozna kapa i napetost zida tzv. „zamor” fibrozne kape kao i krvarenje u plaku su visoko rizični za razvoj komplikacija. Stabilan plak regredira, ostaje statičan ili veoma sporo raste, ne uzrokuje stenozu ili okluziju krvnog suda. Nestabilni plakovi su skloni eroziji i rupturi koja je posledica smanjene sinteze i povećane razgradnje komponenti ECM-a, naročito kolagenih vlakana. Predilekciono mesto za rupturu su rubni delovi plaka, mesto gde je fibrozna kapa najtanja, pritisak lipidnog jezgra najviši a broj penastih ćelija najveći. Aktivirani makrofagi, delom GMĆ-e luče MMP-e koje razgrađuju komponente ECM-a, T limfociti luče citokine, prvenstveno IFNγ, koji inhibiše sintezu kolagena u vulnerabilnom regionu kape a GMĆ podležu apoptozi. Na ovaj način se smanjuje količina kolagenih vlakana koje su faktor stabilnosti fibrozne kape, ona se stanjuje i dolazi do njene rupture. Kad dođe do rupture plaka, sadržaj plaka se izlaže cirkulirajućoj krvi, uzrokujući akutnu trombozu, okluziju krvog suda ili infarkt, što može rezultirati i smrtnim ishodom.

ZAKLJUČAK

Endotel je dugo smatran samo pasivnom membranom čija je najvažnija funkcija bila omogućiti nesmetano laminarno proticanje krvi. Tokom godina utvrđena je široka funkcionalnost ovog organa i učešće u fiziološkim i patofiziološkim procesima i mehanizmima regulacije vaskularne i kardijalne funkcije. Patogeneza ateroskleroze kao najučestalijeg oboljenja nastalog usled endotelne disfunkcije još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Savremena istraživanja svakodnevno pružaju nove podatke o složenosti geneze ove bolesti i rasvetljavaju mehanizme njenog nastanka i progresije, što su neophodni faktori za uspešan tretman i prevenciju ovog oboljenja.

LITERATURA

1. Abu Taha A, Schnittler HJ. Dynamics between actin and the VE-cadherin/catenin complex: novel aspects of the ARP2/3 complex in regulation of endothelial junctions. *Cell Adh Migr.* 2014;8(2):125-35.
2. Anđelković Z, Somer Lj, Avramović V, Milosavljević Z, Tanasković I, Matavulj M, et al. *Histologija*. Impresum, Niš, 2009.
3. Bergheanu SC, Bodde MC, Jukema JW. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis: Current view and future perspective on lipoprotein modification treatment. *Neth Heart J.* 2017;25:231-242.
4. Bobryshev YV, Ivanova EA, Chistiakov DA, Nikiforov NG, Orekhov AN. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *Biomed Res Int.* 2016;2016:9582430.
5. Dorland YL, Huvneers S. Cell-cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(2):279-292.

6. Filippi MD. Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. *Adv Immunol.* 2016;129:25-53.
7. Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr.* 2014;8(2):158-64.
8. Gerhardt T, Ley K. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res.* 2015;107(3):321-30.
9. Huveneers S, Oldenburg J, Spanjaard E, van der Krogt G, Grigoriev I, Akhmanova A, et al. Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. *J Cell Biol.* 2012;196(5):641-52.
10. Kaufman DP, Costanza M. Weibel Palade Bodies. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019-.2019 Aug 13.*
11. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18). pii: E4411. doi: 10.3390/ijms20184411.
12. Liao XH, Wang N, Zhao DW, Zheng DL, Zheng L, Xing WJ, et al. STAT3 Protein Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switch by Interaction with Myocardin. *J Biol Chem.* 2015;290(32):19641-52.
13. McCormack JJ, Lopes da Silva M, Ferraro F, Patella F, Cutler DF. Weibel-Palade bodies at a glance. *J Cell Sci.* 2017;130(21):3611-3617. d
14. Millán J, Cain RJ, Reglero-Real N, Bigarella C, Marcos-Ramiro B, Fernández-Martín L, et al. Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC Biol.* 2010;8:11.
15. Moroni F, Ammirati E, Norata GD, Magnoni M, Camici PG. The Role of Monocytes and Macrophages in Human Atherosclerosis, Plaque Neoangiogenesis, and Atherothrombosis. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:7434376. doi: 10.1155/2019/7434376.
16. Pogoda K, Füller M, Pohl U, Kameritsch P. NO, via its target Cx37, modulates calcium signal propagation selectively at myoendothelial gap junctions. *Cell Commun Signal.* 2014;12:33.
17. Pogoda K, Mannell H, Blodow S, Schneider H, Schubert KM, Qiu J, et al. NO Augments Endothelial Reactivity by Reducing Myoendothelial Calcium Signal Spreading: A Novel Role for Cx37 (Connexin 37) and the Protein Tyrosine Phosphatase SHP-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(12):2280-2290. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309913.
18. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013; 9(10):1057-69. doi: 10.7150/ijbs.7502.
19. Rho SS, Ando K, Fukuhara S. Dynamic Regulation of Vascular Permeability by Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Endothelial Cell-Cell Junctions. *J Nippon Med Sch.* 2017;84(4):148-159. doi: 10.1272/jnms.84.148.
20. Rigor RR, Shen Q, Pivetti CD, Wu MH, Yuan SY. Myosin light chain kinase signaling in endothelial barrier dysfunction. *Med Res Rev.* 2013;33(5):911-335miljić S, Nestorović V, Savić S. Modulatory role of nitric oxide in cardiac performance. *Med Pregl.* 2014;67(9-10):345-52.
21. Straub AC, Zeigler AC, Isakson BE. The myoendothelial junction: connections that deliver the message. *Physiology (Bethesda).* 2014;29(4):242-9..
22. Tsukita S, Katsuno T, Yamazaki Y, Umeda K, Tamura A, Tsukita S. Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1165:44-52.
23. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(11):692-704.
24. Vitković L, Savić S. *Histologija za studente zdravstvene nege.* Sven, Niš, 2016.
25. Vučević D, Radak Đ, Radosavljević T, Mladenović D, Milovanović I. Zapaljenski proces u aterogenezi - nove činjenice o starom plamenu. *Med.pregl.* 2012; 65(9-10):388-395
26. Wittchen ES. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:2522-45.
27. Xia XD, Zhou Z, Yu XH, Zheng XL, Tang CK. Myocardin: A novel player in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2017;257:266-278
28. Xie C, Guo Y, Zhu T, Zhang J, Ma PX, Chen YE. Yap1 protein regulates vascular smooth muscle cell phenotypic switch by interaction with myocardin. *J Biol Chem.* 2012;287(18):14598-605. doi: 10.1074/jbc.M111.329268.
29. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(9):564-80.

DIJABETES I ATEROSKLEROZA-INFLAMACIJA KAO MEHANIZAM POVEZIVANJA

AUTORI

Tatjana Novaković^{1,2}, Nenad Milošević^{1,2}, Zdravko Vitošević¹, Jovana Milošević¹, Ljiljana Jovičević³, Zorica Živković^{1,2}, Emilija Novaković⁴, Zlatica Mirković¹, Roksanda Krivčević¹, Aleksandra Balović¹

¹ Univerzitet u Prištini, Medicinski fakultet u Prištini, Kosovska Mitrovica, Srbija

² Kliničko-bolnički centar Priština, Gračanica

³ Dom Zdravlja Bar, Crna Gora

⁴ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet u Beogradu, Srbija

SAŽETAK

Ateroskleroza je difuzno oboljenje arterijskih krvnih sudova koje zahvata vaskularna korita i karakteriše se zadebljanjem i otvrdnućem arterijskog zida. Klinički se može manifestovati kao koronarna bolest srca, cerebrovaskularna bolest, periferna vaskularna bolest. Diabetes mellitus (DM) izaziva razne mikrovaskularne (poput retinopatije, nefropatije i neuropatije) i makrovaskularne komplikacije (uključujući infarkt miokarda, moždani udar i perifernu arterijsku bolest. Osobe sa dijabetesom imaju povećan rizik za kardiovaskularne bolesti (KVB) zbog delovanja više faktora, uključujući hiperglikemiju, insulinsku rezistenciju ili hiperinsulinemiju, dislipidemije, sistemsku inflamaciju niskog stepena, oksidativni stres, endotelnu disfunkciju, hiperkoagulabilnost, takođe prisustvo kalcifikata na krvnim sudovima, hipertenzija i dislipidemije, smanjena tolerancija na glukozu. U osnovi razvoja KVB stoji ateroskleroza, koja se u osoba sa DM razvija ranije u odnosu na zdrave osobe i ima bržu evoluciju. Kardiovaskularna bolest i dijabetes se po svemu sudeći razvijaju uporedo, udara što potvrđuje činjenica da osobe sa tipom 2 DM već u momentu dijagnoze imaju veću prevalencu koronarne bolesti i moždanog udara.

Novija istraživanja potvrđuju činjenicu da je inflamacija niskog stepena spona između dijabetesa i ateroskleroze. Ona se može pojaviti godinama ranije pre kliničke manifestacije dijabetesa.

Ključne reči: ateroskleroza, faktori rizika, diabetes mellitus, kardiovaskularne bolesti

ENGLISH

INFLAMMATION - LINKING MECHANISAM BETWEEN DIABETES AND ATHEROSCLEROSIS

SUMMARY

Atherosclerosis is a proces of progressive thickening and hardening of the walls of medium sized and large arterias as a result of fat deposits on their inner lining. Clinical manifestations of atherosclerosis are coronary artery disease, cerebrovascular disease, peripheral vascular disease. Diabetes mellitus leads to different microvascular (like retinopathy, nephropathy and neuropathy).and macrovascular complications (including infarctus myocardii, stroke and peripheral artery disease). Persons with diabetes mellitus has higher risk for cardiovascular disease because the impact of many factors like hyperglycaemia, insulin resistance, dyslipidemia, systemic low grade inflammation, oxidative stress, endothelial dysfunction, hypercoaguability, calcification on the inner wall of blood vessals, intolerance of glucosae. The underlying development of cardiovascular disease is atherosclerosis wich appear earlier in persons with diabetes mellitus compare to healthy individuals, although has a faster evolution. Cardiovascular disease and diabetes develop side by side, confirming the fact that persons with diabetes mellitus type II , in the moment of diagnosis, already has a bigger prevalence of cardiovascular disease and stroke. The

latest reseaches shows that low grade inflammation has strong conection between diabetes and atherosclerosis. Low grade inflammation can apear years before the clinical manifastation of diabetes mellitus.

Keywords: atherosclerosis, risk factors, diabetes mellitus, cardiovascular diseases.

UVOD

Prema podacima Međunarodne federacije za dijabetes (engl. International Diabetes Federation-IDF), oko 415 miliona odraslih u dobi između 20 i 79 godina je imalo dijabetes u 2015 godini, a predviđa se porast na 642 miliona 2040 godine. Prema podacima IDF prevalenca DM u svetu 2015.godine je bila 8,8 % u životnom dobu od 20 do 79 godina. Predviđa se da će do 2040. godine biti 10,4% u istoj dobnoj grupi. Podaci potvrđuju činjenicu da je dijabetes pandemija novog veka. Diabetes mellitus (DM) je metabolička bolest sa vaskularnim posledicama usled ubrazane ateroskleroze koja se karakteriše nesposobnošću proizvodnje ili upotrebe insulina, što dovodi do hiperglikemije i nedostatka insulina. Ateroskleroza je difuzno oboljenje arterijskih krvnih sudova koje zahvata vaskularna korita i karakteriše se zadebljanjem i otvrdnućem arterijskog zida. Klinički se može manifestovati kao koronarna bolest srca, cerebrovaskularna bolest, periferna vaskularna bolest. DM izaziva razne mikrovaskularne (poput retinopatije, nefropatije i neuropatije) i makrovaskularne komplikacije (uključujući infarkt miokarda, moždani udar i perifernu arterijsku bolest). Kardiovaskularna bolest (KVB) i dijabetes se po svemu sudeći razvijaju uporedo, što potvrđuje činjenica da osobe sa tipom 2 DM već u momentu dijagnoze imaju veću prevalencu koronarne bolesti i moždanog udara. Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrti pacijenata sa dijabetesom, preko 70 % pacijenata sa dijabetesom tip 2 umire od KVB. Osobe sa dijabetesom imaju povećan rizik za KVB zbog delovanja više faktora, uključujući hiperglikemiju, insulinsku rezistenciju ili hiperinsulinemiju, dislipidemije, sistemsku inflamaciju niskog stepena, oksidativni stres, endotelnu disfunkciju, hiperkoagulabilnost, takođe prisustvo kalcifikata na krvnim sudovima, hipertenzija i dislipidemije, smanjena tolerancija na glukozu. U osnovi razvoja KVB stoji ateroskleroza, koja se u osoba sa DM razvija ranije u odnosu na zdrave osobe i ima bržu evoluciju.

Novija istraživanja potvrđuju činjenicu da je inflamacija niskog stepena spona između dijabetesa i ateroskleroze. Ona se može pojaviti godinama ranije pre kliničke manifestacije dijabetesa.

Uloga hiperglikemije

Postoje snažni dokazi koji pokazuju veći rizik za razvoj KVB sa porastom nivoa glikemije. Hiperglikemija u dijabetesu povećava oksidativni stres, što doprinosi vaskularnoj disfunkciji. Ona utiče na endotelnu disfunkciju produkcijom slobodnih radikala, akumulacijom sorbitola, neenzimskom glikolizacijom makromolekula, direktnom aktivacijom protein kinaze C. Glikolizacija proteina i lipida odvija se kod svakog bolesnika sa DM i to ireverzibilno dovodi do dugotrajne vaskularne disfunkcije. U inicijalnoj glikooksidaciji proteina nastaju rani glikolizirani produkti. Kasnije nastupa reorganizacija molekula, delimično oksidacijom, i nastaju završni produkti glikozilacije (AGE), koji reaguju sa površinskim receptorima stvarajući slobodne radikale, smanjuju nivo redukovane glutationa i aktiviraju redoks senzitivnu transkripciju nuklearnog faktora NF- κ B. Kod osoba sa dijabetesom se oksidativna modifikacija LDL čestica dešava u cirkulaciji, za razliku od nedijabetičara, kod kojih se to obično dešava u zidu krvnog suda, jer u cirkulaciji ima dovoljno antioksidanasa. Stvorene AGE (advanced glycation end products) LDL čestice dovode do ekspresije VCAM-1 i monocitne-endotelne interakcije sa formiranjem aterosklerotskih lezija. Pacijenti sa DM imaju ekstenzivniju bolest koronarnih arterija i pored savremenih terapija, doživljavaju veću smrtnost u akutnom infarktu. Ove tvrdnje su potkrepljene istraživanjem u jedanaest odvojenih kliničkih registara TIMI studijske grupe kojom je analizirano 62036 pacijenata sa akutnim infarktom miokarda.

Insulinska rezistencija

U etiopatogenezi DM važnu ulogu imaju insulinska rezistencija (IR) i poremećaj u lučenju insulina. Različiti genetski i metabolički defekti u dejstvu insulina i/ili lučenju dovode do zajedničkog fenotipa hiperglikemije u DM. IR je stanje kada postoji prepreka ili poremećaj u ostvarivanju efekta insulina preko insulinskog receptora. Početna i glavna odlika DM tipa 2 je insulinska rezistencija, praćena poremećenom insulinskom sekrecijom, a zatim prekomernom hepatičnom produkcijom glukoze i dislipidemijom. Gojazne osobe su u posebnom riziku jer se smatra da viscelarna goja-

znost dovodi do gomilanja slobodnih masnih kiselina (SMK) u jetri, što dovodi do insulinske rezistencije na nivou jetre, a SMK stimulišu procese glukoneogeneze i sinteze triglicerida, što dovodi do povećanja glikemije i specifične dislipidemije. Nastalu dislipidemiju pored povećanja SMK, triglicerida, karakteriše i povećanje lipoproteina male gustine-LDL i lipoproteina veoma niske gustine - VLDL. Udruženo sa ovim procesom, snižava se nivo lipoproteina visoke gustine - HDL koji imaju protektivni efekat. Aterogeni potencijal ove dislipidemije višestruko povećava kardiovaskularni rizik i doprinosi nastanku i razvoju ateroskleroze.

Sistemska inflamacija niskog stepena

U odnosu na supkutano masno tkivo, visceralno masno tkivo sekretuje više citokina. Ektopično masno tkivo lokalizovano je u predelu epikarda, jetre, omentuma i skeletnih mišića i svojim sekretornim produktima doprinosi razvoju insulinske rezistencije. Adipociti i makrofazi poreklom iz monocita koji se nalaze u masnom tkivu, luče proinflamatorne citokine poput IL - 1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, IL-18, rezistina, visfatina i drugih za koje se zna da nisu samo markeri inflamatornog procesa već njegovi aktivni učesnici i na različite načine doprinose patogenezi insulinske rezistencije, metaboličkog sindroma i DM. Adipocitokini pospešuju proces hronične inflamacije, narušavaju vaskularnu homeostazu, remete fiziološke procese homeostaze povećavajući ukupni kardiovaskularni rizik kod ovih bolesnika u najranijim fazama razvoja DM. U osoba sa dijabetesom pored pojačane sekrecije proinflamatornih citokina postoji i pojačana sekrecija medijatora inflamacije kao što je fibrinogen i C-reaktivni protein (CRP), oni zajedno u dijabetesu dovode do insulinske rezistencije. Povišen nivo markera inflamacije (TNF, IL-6, CRP) je verifikovan kod prividno zdravih osoba kod kojih kasnije dolazi do razvoja DM što ukazuje na hroničnu inflamaciju javlja još u fazi oštećene tolerancije na glukozu, pre dijagnoze DM tip 2. Brojne studije podržavaju tezu da CRP koji nastaje pod dejstvom ekstravaskularnog IL-6 ili iz masnog tkiva, može biti aktivni činilac koji doprinosi inicijaciji, progresiji ili destabilizaciji ateroskleroze.

Oksidativni stres, ateroskleroza, endotelna disfunkcija

Oksidativni stres je biohemijski mehanizam, kojim poremećen mehanizam glukoze i disregulacija ćelijske signalizacije u DM indukuju endotelnu disfunkciju i dovode do razvoja njegovih mikro i makrovaskularnih komplikacija, od kojih je upravo ubrzana ateroskleroza.

Rezultai brojnih studija ukazuju na ulogu oksidativnog stresa u različitim stadijumima razvoja dijabetesa tip 2, počevši od predijabetesa, smanjenja tolerancije glukoze do manifestnog dijabetesa. Centralno mesto u nastanku ateromatozne promene zida krvnog suda pripada modifikovanoj LDL čestici (oxLDL). Mala gusta LDL čestica koja je karakteristična za dijabetes jako je osetljiva na oksidativnu modifikaciju posebno kada je glikolizirana/glikoksilisana u prisustvu patološke hiperglikemije i hiperoksidovanog stresa u DM tipu 2. Prvi korak oksidativne modifikacije LDL čestice je peroksidacija nezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima, kao i esterifikovanih sa glicerolom i holesterolom. Oksidacijom lecitina u LDL čestici nastaje lizolecitin koji ispoljava hemotaksično svojstvo za cirkulišuće monocite i T limfocite. U toku ovog procesa dolazi do promene lizinskih ostataka na apo B, koji su ključni za prepoznavanje LDL, od strane specifičnih receptora. Modifikacija 5-10 % lizinskih ostataka na apo B dovodi do smanjenog afiniteta ka LDL receptorima pa se modifikovane glikolizirane i AGE čestice) i ox LDL iz cirkulacije uklanjaju alternativnim putem, posredstvom tkz. Scavenger receptora i specifičnih receptora na monocitima, makrofagima, Kupferovim i endotelnim ćelijama. Nakon prihvatanja modifikovanih LDL od strane makrofaga i endotelnih ćelija one remete vazodilatatorni odgovor krvnog suda na stres i fiziološke stimulse jer povećavaju koncentraciju endotelina 1 i smanjuju aktivnost NO sintetaze. Smatra se da je endotelna disfunkcija u dijabetesnoj dislipidemiji primarno posledica efekta AGE-LDL i ox LDL partikula na smanjeno stvaranje i oslobađanje NO iz endotelnih ćelija. Ujedno, u uslovima pojačanog oksidativnog stresa u dijabetesu, stvoreni NO pod dejstvom superoksidnih radikala prelazi u peroksintrit, tako da je količina raspoloživog NO u endotelnim ćelijama vrlo mala. Hemotaksično svojstvo oxLDL čestice za monocite i limfocite dovodi do njihovog nagomilavanja u zidu krvnog suda. Citotoksični efekat na ove i susedne ćelije dovodi do povećane sinteze inflamatornih citokina i povećane produkcije slobodnih radikala, koji inteziviraju procese oksidativne modifikacije nativnih LDL partikula u zidu krvnog suda. Nekompatibilno preuzimanje oxLDL putem scavenger receptora dovodi do povećanja količine lipida u citoplazmi makrofaga, koji postaju penušave ćelije. Prepunjene penušave ćelije propadaju i formiraju lipidno jezgro ateromatoznog plaka.

Zaključak

Ateroskleroza se klasično opisivala kao progresivno oboljenje koje karakteriše nakupljanje lipida, fibroznog

materijala i kalcijuma u zidu arterija. Novije studije potvrđuju značaj zapaljenjskog procesa u nastanku ateroma tako i nastanku tromba na ateromu. Zapaljenjski proces prisutan je u najranijim aterosklerotskim lezijama kao i u uznapredovalim lezijama. Uz delovanje ostalih poznatih faktora rizika za nastanak i progresiju

ateroskleroze postaje sve jasnije da upala igra ulogu u aterogenezi. Takođe, novija istraživanja potvrđuju činjenicu da je inflamacija niskog stepena spona između dijabetesa i ateroskleroze. Ona se može pojaviti godinama ranije pre kliničke manifestacije dijabetesa.

LITERATURA

1. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 7th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2015.3.
2. Fan W. Epidemiology in diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Cardiovasc Endocrinol*. 2017; 6:8-16.2.
3. Frasci Z. New European Society of Cardiology Guidelines on diabetes; prediabetes, and cardiovascular diseases - a truly strong base for the major paradigm shift in clinical practice? *Anatol J Cardiol*. 2019 Nov; 22 (5):214-218.
4. Katakami N. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *J Atheroscler Thromb*. 2018; 25(1):27-39. doi:10.5551/jat.RV17014.
5. Rodriguez-Araujo G, Nakagami H. Pathophysiology of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Cardiovasc Endocrinol Metab*. 2018 Feb 14;7(1):4-9.
6. Alharby H, Abdelati T, Rizk M, Youssef E, Moghazy K, Gaber N, Yafei S. Association of lipid peroxidation and interleukin-6 with carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Cardiovasc Endocrinol Metab*. 2019 Sep 10;8(3):73-76.
7. Jenkins A, Januszewski A, O'Neal D. The early detection of atherosclerosis in type 1 diabetes: why, how and what to do about it. *Cardiovasc Endocrinol Metab*. 2019 Feb 13;8(1):14-27.
8. Merino J, Jablonski KA, Mercader JM, Kahn SE, Chen L, Harden M, Delahanty LM, Araneta MRG, Walford GA, Jacobs SBR, Ibebuogu UN, Franks PW, Knowler WC, Florez JC; Diabetes Prevention Program Research Group. Interaction Between Type 2 Diabetes Prevention Strategies and Genetic Determinants of Coronary Artery Disease on Cardiometabolic Risk Factors. *Diabetes*. 2019 Oct 21.
9. Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin Resistance, Hyperglycemia, and Atherosclerosis. *Cell Metab* 2011; 14: 575-585.
10. Cubbon RM, Rajwani A, Wheatcroft SB. The impact of insulin resistance on endothelial function, progenitor cells and repair. *Diab Vasc Dis Res* 2007; 4: 103-111.
11. DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 2010; 53: 1270-1287.
12. Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo EK. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013; 62: 194-204.
13. Matsuzawa Y, Shimomura I, Nakamura T, Keno Y, Kotani K, Tokunaga K. Pathophysiology and Pathogenesis of Visceral Fat Obesity. *Obes Res* 1995; Suppl 2: 187S-194S.
14. Zimmer S, Grebe A, Latz E. Danger signaling in atherosclerosis. *Circ Res* 2015; 116: 323-340.
15. Haidara MA, Yassin HZ, Rateb M, Ammar H, Zorkani MA. Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*. 2006 Jul;4(3):215-27.

RANI SKRINING GOJAZNOSTI U PREVENCIJI ATEROSKLEROZE

AUTORI

Mitić R. Nebojša^{1,2}

¹ Zavod za zaštitu zdravlja studenata, Kosovska Mitrovica, Srbija

² Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini - Kosovska Mitrovica, Srbija

SAŽETAK

Aterosklerotska kardiovaskularna bolest je vodeći uzrok smrtnosti u svetu. Lečenje ateroskleroze usmereno je zapravo na lečenje njenih komplikacija. Od izuzetne važnosti je prevencija koja obuhvata mere smanjivanja faktora rizika kao i organizovani skrining u cilju rane identifikacije i stratifikovanje rizika od nastanka komplikacija uzrokovanih prekomernom uhranjenosti i aterosklerozom. Mere borbe protiv prekomerne uhranjenosti i ateroskleroze moraju biti višestepeni proces. Skriningom na gojaznost je neophodno odrediti nivo relativnog rizika od nastanka komorbiditeta. Izračunavanje indeksa telesne mase i merenje obima struka su metode za procenu prevalencije i kategorizaciju gojaznosti. Rezultati skrininga bi istovremeno bili i alat za trijažu pojedinaca za obuhvat na sledećem nivou. Osobama kod kojih je „primarnim“ skriningom na gojaznost utvrđen povećani stepen relativnog rizika od nastanka i razvoja bolesti povezanih sa prekomernom uhranjenosti potrebno je uraditi „sekundarni“ skrining sa ciljem detekcije markera koji odražavaju štetan uticaj faktora rizika. Merenjem krvnog pritiska, nivoa glukoze, određivanjem lipidnog profila i markera sistemske upale određujemo prisustvo metaboličkog sindroma. Patološki nalaz dve ili više komponenti metaboličkog sindroma bi značio da se osoba nalazi u statusu „apsolutnog rizika“. Idealno bi bilo uvesti obavezni skrining na subkliničku aterosklerozu („tercijarni“) sa ciljem direktne identifikacije promena koje odražavaju štetan uticaj faktora rizika na remodelaciju arterija, pre početka kliničkih događaja. Ovaj skrining je opravdan i neophodan kod asimptomatskih bolesnika sa kardiovaskularnim faktorima rizika („apsolutni rizik“). Preporuka za rutinski skrining na aterosklerozu je ultrasonografska metoda kao neinvazivna metoda sa visokim stepenom osetljivosti i specifičnosti.

Ključne reči: ateroskleroza, gojaznost, skrining

ENGLISH

SUMMARY

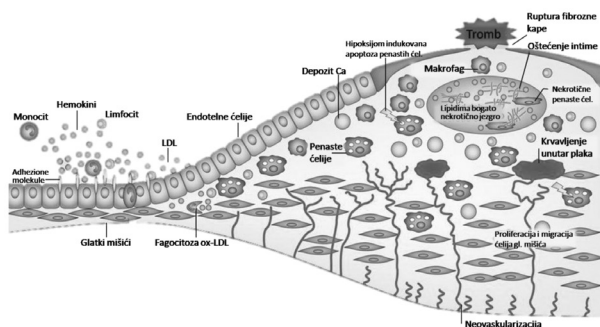
Atherosclerotic cardiovascular disease is the leading cause of mortality in the world. The treatment of atherosclerosis is actually aimed at treating its complications. Prevention, which includes measures to reduce risk factors and organized screening for early identification and stratification of the risk of complications caused by overweight and atherosclerosis, is of largest importance. Prevention methods of overweight and atherosclerosis must be a multi-stage process. Obesity screening requires the determination of the level of relative risk of comorbidity. Calculating body mass index and measuring waist circumference are methods for assessing the prevalence and categorizing obesity. Screening results would also be a tool for triage individuals for next level coverage. Persons who have been diagnosed with „primary“ screening for obesity have an increased degree of relative risk of developing diseases associated with overweight should be screened for „secondary“ screening to detect markers that reflect the adverse impact of risk factors. By measuring blood pressure, glucose levels, determining lipid profile and markers of systemic inflammation we determine the presence of metabolic syndrome. A pathological finding of two or more components of the metabolic syndrome would mean that the person is in „absolute risk“ status. The ideal would be to introduce a required screening subclinical atherosclerosis („tertiary“) to identify

the presence of the direct reflecting the deleterious effect of risk factors on remodeling of the artery, prior to the commencement of clinical events. This screening is justified and necessary in asymptomatic patients with cardiovascular risk factors („absolute risk“). The recommendation for routine screening for atherosclerosis is the ultrasonographic method as a non-invasive method with a high degree of sensitivity and specificity.

Keywords: atherosclerosis, obesity, screening

UVOD

Aterosklerotska kardiovaskularna bolest je vodeći uzrok smrtnosti u svetu. Ateroskleroza je progresivna upalna bolest koja se karakteriše nakupljanjem lipida u zidu velikih i srednjih mišićnih arterija. Počinje rano u životu i progresijom dovodi do stvaranja aterosklerotskih plakova koji sužavaju lumen arterija. Plak se formira u intimi arterija i sastoji od lipida (intracelularni i ekstracelularni holesterol i fosfolipidi), upalnih ćelija (makrofaga, T ćelija), ćelija glatkih mišića, vezivnog tkivo (kolagen, glikozaminoglikani, elastična vlakna), tromba, depozita kalcijuma (slika 1).



Slika 1. Patogenetski mehanizmi aterogeneze (preuzeto i modifikovano prema Sarah Skeoch & Ian N. Bruce)

Aterosklerotski plak može biti stabilan ili nestabilan. Stabilan plak ostaje statičan ili raste sporo decenijama, dok ne izazove stenozu ili okluziju. Nestabilni plakovi su skloni spontanoj eroziji, fisuriranju ili rupturi, čime uzrokuju akutnu trombozu, okluziju ili infarkt, mnogo pre nego da dovedu do stenozе. Sve faze ateroskleroze, od početnog rasta do komplikacija izazvanih plakom, smatraju se upalnim odgovorom na povredu endotela.

Ateroskleroza može zahvatiti sve velike ili srednje velike arterije, uključujući koronarne, karotidne i cerebralne arterije, aortu i njene ogranke, kao i velike arterije ekstremiteta. Kad zbog rasta ili rupturе plaka dođe do opstrukcije krvnog protoka, razvijaju se i simptomi. Oni se razlikuju zavisno od zahvaćenog arterijskog krvnog suda: ishemijska bolest srca, bolest karotidne arterije, bolest perifernih arterija (ruke, noge, karlica) i hronična bolest bubrega. Ateroskleroza

može dovesti do ozbiljnih problema uključujući srčani udar, moždani udar i smrt.

Najrasprostranjenija je inflamacijska teorija aterogeneze koja objašnjava da primarnu ulogu u nastanku ateroskleroze ima povreda endotela i zapaljenski „odgovor na povredu“. Međutim tačan mehanizam ateroskleroze dalje nije u potpunosti poznat.

Kod velikog broja ljudi aterosklerotske promene ostaju nedijagnostikovane sve do nastanka srčanog ili moždanog udara.

Iako uzrok ateroskleroze nije poznat brojne studije koje su sprovedene u svetu su utvrdile brojne faktore rizika za nastanak i razvoj ateroskleroze (tabela 1). Ukoliko je prisutan veći broj faktora rizika utoliko je veća verovatnoća od razvoja ateroskleroze.

Tabela 1. Faktori rizika za nastanak ateroskleroze

Nepromenljivi	Pozitivna porodična anamneza Muški pol Genetske abnormalnosti	
Promenljivi	Utvrđeni Neke dislipidemije (visoki ukupni holesterol ili LDL, nizak HDL.) Pušenje cigareta Šećerna bolest Arterijska hipertenzija	Studije u toku Gojaznost i nepravilna ishrana Sedelački način života Visok CRP Visok nivo malog, gustog LDL-a Visok lipoprotein(a) Hiperhomocisteinemija Hiperinsulinemija Hipertrigliceridemija Polimorfizam 5-lipooksigenaze Protrombotska stanja (hiperfibrinogenemija, visok nivo aktivatora inhibicije plazminogena) Bubrežna insuficijencija

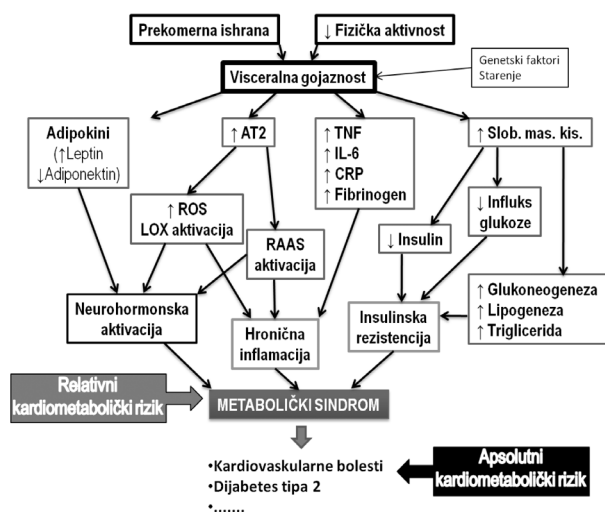
Većina faktora rizika (osim starosti, pola i porodične istorije bolesti KVS) se može kontrolisati i na taj način sprečiti ili odložiti nastanak i razvoj ateroskleroze. Kontrolisanje promenljivih faktora rizika često može umanjiti genetske uticaje i sprečiti aterosklerozu čak i kod starijih osoba.

Veliki broj studija ukazuje da kod sve većeg broja dece i mladih ljudi postoji rizik od nastanka i razvoja ateroskleroze. Jedan od uzroka (faktor rizika) koji se najčešće navodi je gojaznost odnosno rastuća stopa gojaznosti.

Gojaznost je hronična bolest skromnog simptomatskog iskaza i velikog polimorbidnog potencijala predstavlja dobro poznati faktor rizika za aterosklerozu. Gojaznost može ubrzati aterosklerozu mnogim mehanizmima (povećanje krvnog pritiska i nivoa glukoze, nenormalni lipidni profili i sistemska upala). Sve više dokaza upućuje na to da poremećena sekrecija adipokina kod gojaznih osoba direktno posreduje u procesu ateroskleroze uti-

čući na funkciju endotelnih ćelija, ćelija glatkih mišića arterija i makrofaga u zidovima krvnih sudova.

Gojaznost je jedan od ključnih faktora u razvoju metaboličkog sindroma. Metabolički sindrom (MetS) je naziv za grupu patoloških promena koji zajedno povećavaju rizik za razvoj aterosklerotičnih kardiovaskularnih bolesti, insulinske rezistencije, dijabetesa i vaskularnih neuroloških komplikacija kao što je moždani udar. Patogenetski mehanizmi nastanka i razvoja MetS-a su kompleksni i još uvek nedovoljno razjašnjeni. Na slici 2 je prikazana uprošćena shema patofizioloških događanja u metaboličkom sindromu. Insulinska rezistencija, neurohormonska aktivacija i hronična inflamacija su glavni akteri u inicijaciji, progresiji MetS i prelasku u kardiovaskularne i metaboličke bolesti.



Slika 2. Shema patofizioloških događanja u metaboličkom sindromu

(AT2 - receptor angiotenzina II tip 2; CRP - C-reaktivni protein; IL-6 - interleukin 6; LOX - lecitinu sličan oksidovani lipoprotein niske gustine; RAAS - renin-angiotenzin-aldosteronski sistem; ROS, reaktivne vrste kiseonika; TNF - faktor nekroze tumora) (preuzeto i modifikovano prema Rochlani Y. et al.)

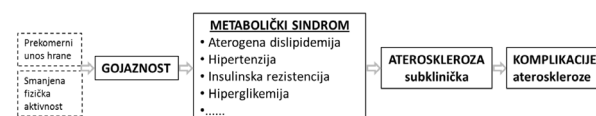
Rezultati istraživanja pokazuju da prekomerna težina i metaboličke disfunkcije predstavljaju značajan zdravstveni problem i u studentskoj populaciji. Dijagnoza metaboličkog sindroma u tom uzrastu predviđau velikom procentu razvoj kardiovaskularnih komplikacija u starijem životnom dobu.

Mogućnosti medikamentoznog pa i hirurškog lečenja stoje nam na raspolaganju u skoro svim etapama razvoja aterosklerotske bolesti. Međutim, najveći problem kod ateroskleroze je taj što se ona najčešće prepoznaje tek kada su aterosklerotske promene već uznapredovale. Idealno bi bilo, pre nego da nastanu komplikacije bolesti, postaviti dijagnozu metaboličkog sindroma (relativni kardiometabolički rizik) ili već razvijenih

subkliničkih aterosklerotskih promena (apsolutni kardiometabolički rizik). Nažalost, na sadašnjem nivou sistema zdravstvene zaštite to je veoma teško i nedostupno većini zdravstvenih ustanova.

Trenutno lečenje ateroskleroze je usmereno na ograničavanje promenljivih faktora rizika sa ciljem da se spreči nastanak i uspori razvoj bolesti. Medikamentoznom terapijom se pokušava da se zaustavi nastanak i razvoj komplikacija bolesti. Međutim, „kazužno“ lečenje usmereno na upalnu prirodu ateroskleroze i dalje je veoma ograničeno. Rizik od aterotrombotskih komplikacija i dalje ostaje visok.

Zajednički imenitelj koji povezuje većinu faktora rizika za nastanak i razvoj ateroskleroze je prekomerna uhranjenost (predgojaznost i gojaznost) kao najčešći uzrok nastanka metaboličkog sindroma. Činjenica da iste promene životnog stila koje se preporučuju za lečenje ateroskleroze takođe pomažu i u sprečavanju gojaznosti izdvaja gojaznost kao „najslabiju“ kariku u patogenetskom lancu događaja koji povezuje gojaznost i aterosklerozu (slika 3). One se uglavnom mogu svesti na: održavanje zdrave težine, povećanje fizičke aktivnosti, jedenje zdrave hrane i prestanak pušenja.



Slika 3. Patogenetska veza gojaznosti i ateroskleroze

Sve ovo napred navedeno ukazuje da bi rana detekcija (skrining) i preduzimanje adekvatnih mera prevencije gojaznosti u krajnjem ishodu imalo zasigurno smanjenje prevalencije oboljevanja od ateroskleroze.

Gojaznost je u skoro celom svetu prepoznata kao bolest koja predstavlja jedan od najvećih problema današnjice. Gojaznost se ponaša prema epidemijskom modelu povećanja prevalencije. Međutim, prekomerna telesna težina je najslabije kontrolisan javnozdravstveni problem u odnosu na neke druge bolesti i poremećaje od velikog javno zdravstvenog značaja (pušenje, zarazne bolesti, kardiovaskularne i metaboličke bolesti, poremećaji metabolizma kostiju i maligne bolesti) kojeposlednjih decenija u nekim delovima sveta čak beleže negativne trendove prevalencije.

Skrining na rane faze asimptomatskog karcinoma (npr. dojke i debelog creva) radi sprečavanja maligniteta u kasnom stadijumu je široko prihvaćen. Međutim, iako aterosklerotska kardiovaskularna bolest (srčani i moždani udar) uzrokuje više smrti i invaliditeta od svih karcinoma zajedno, ne postoje nacionalne smernice za asimptomatsku (subkliničku) aterosklerozu.

Takođe, iako je gojaznost bolest koja se na relativno jednostavan i jeftin način može sprečiti i lečiti još uvek nema organizovanog i obaveznog skrininga koji bi obuhvatio sve dobne grupe sa posebnim akcentom na mlađi uzrast. Utvrđeno je da 60 do 85% gojaznih u periodu adolescencije ostaje gojazno u odraslom dobu (tzv. „tracking“ fenomen). Činjenica je i da preventivne i terapijske mere kod gojaznosti daju iznenađujuće skromne rezultate.

Skrining na gojaznost se ne sme svesti samo na prosto merenje težine, visine i izračunavanje BMI niti rezultat skrining pregleda sme da bude samo šturo saopštenje o tome da li je osoba ima višak kilograma ili nema. Prema novim shvatanjima nije svaka prekomerna težina rizična. Sve je više dokaza koji ukazuju na postojanje pojedinaca sa specifičnim fenotipovima veličine tela. Njihova osnovna karakteristika je da odstupaju od dobro dokazanog linearnog odnosa gde porast BMI povećava rizik od kardiometaboličkih neželjenih kliničkih ishoda. Opisane su podgrupe odraslih osoba koje uz normalnu težinu imaju elementemetaboličkog sindroma kao i grupe gojaznih pojedinaca ali bez prisutnih elemenata metaboličkog sindroma. Njihovo razlikovanje omogućilo bi nam da koncentrišemo intervencije na one koji bi imali najviše koristi što bi predstavljalo važan korak ka personalizovanoj medicini za gojaznost.

Skriningom na gojaznost je neophodno odrediti na kom nivou relativnog rizika od nastanka komorbiditeta se ispitivana osoba nalazi sa tom težinom i rasporedom masnog tkiva. Identifikovanje i stratifikovanje rizika, eventualne dodatne analize za detekciju elemenata koje čine metabolički sindrom i stručno usmeravanje ispitanika promeni životnog stila uz preporukudodatnih mera za regulisanje težine su krajni cilj skrininga. Rezultati skrininga mnogo sigurnije i na bolji način motivišu pojedince za promenu životnog stila u poređenju sa javnim kampanjama.

Mnogobrojni rezultati i utvrđene relacije u praćenju i ispitivanju faktora rizika kod mladih osoba ukazuju na preventabilnost faktora rizika i ateroskleroze, a takođe i postojanje velikog potencijala za prevenciju kardiovaskularnih bolesti.

Da bi se obezbedila masovnost i kontinuitet skrining kampanje neophodno je da skrining alati budu jeftini, jednostavni i bezbedni za korišćenje i dostupni svim zdravstvenim ustanovama nezavisno od nivoa zdravstvenih usuga koje one pružaju.

Izračunavanje indeksa telesne mase (BMI-Body mass index) imerenje obima struka (WC-Waist circumference) su metode preporučene od strane Svetske zdravstvene organizacije za procenu prevalencije i kategorizaciju gojaznosti. To je na prvom mestu veoma korišćeni

indeks telesne mase koji nam omogućava indirektnu procenu ukupnog viška telesnih masti. Dodatno merenje obima struka daje bolji uvid regionalne distribucije masnog tkiva. Određivanje ova dva antropometrijska parametra pruža nam mogućnost da višak telesne težine „prevedemo“ u relativno objektivnu procenu stepena rizika nastanka komorbiditeta i komplikacija kod gojaznih osoba (tabela 2-4). Treba napomenuti da je status rizika prikazan za svaku kategoriju prekomerne uhranjenosti predstavljen kao relativni rizik (u odnosu na rizik kod normalne uhranjenosti). Ne treba ga izjednačavati sa apsolutnim rizikom koji se određuje zbirom faktora rizika (slika 2).

Tabela 2. Klasifikacija prekomerne težine i gojaznosti prema BMI i procena relativnog rizika od pridruženih bolesti

Stepen uhranjenosti	BMI	Relativni rizik
Pothranjeni	< 18.5	Nizak**
Normalno uhranjeni	18.5 - 24.9	Prosečan*
Predgojazni	25.0 - 29.9	Povećan
Gojazni I	30.0 - 34.9	Visok
Gojazni II	35.0 - 39.9	Vrlo visok
Ekstremno gojazni	≥ 40.0	Ekstremno visok

* značajno manji kod normalno uhranjenih osoba

** nizak ali povećan za druge bolesti (osteoporoza, sterilitet, smanjen imunski odgovor i sl.)

Tabela 3. Klasifikacija prekomerne težine i gojaznosti prema WC i procena relativnog rizika od pridruženih bolesti

Stepen uhranjenosti	WC (cm)		Relativni rizik
	Muškarci	Žene	
Normalno uhranjeni	< 94	< 80	Prosečan*
Predgojazni	≥ 94 - 102	≥ 80 - 88	Povećan
Gojazni	> 102	> 88	Znatno povećan

* značajno manji kod osoba sa normalnim obimom struka

Tabela 4. Klasifikacija prekomerne težine i gojaznosti prema BMI, WC i procena relativnog rizika od pridruženih bolesti

Stepen uhranjenosti	BMI	WC (cm)		Relativni rizik
		Muškarci ≤ 102	Muškarci > 102	
Pothranjeni	< 18.5	Žene ≤ 88	Žene > 88	**
Normalno uhranjeni	18.5 - 24.9			*
Predgojazni	25.0 - 29.9	Povećan	Visok	
Gojazni I	30.0 - 34.9	Visok	Vrlo visok	
Gojazni II	35.0 - 39.9	Vrlo visok	Vrlo visok	
Ekstremno gojazni	≥ 40.0	Ekstremno visok	Ekstremno visok	

* značajno manji kod normalno uhranjenih osoba i osoba sa normalnim obimom struka

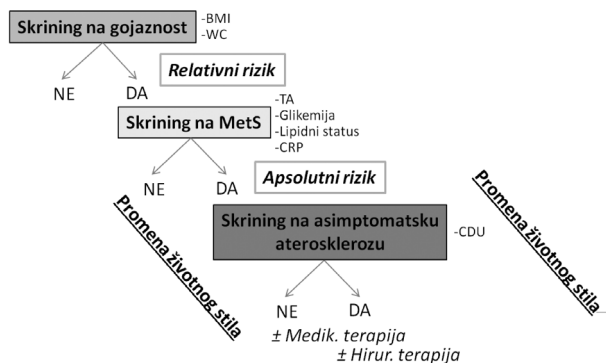
** nizak ali povećan za druge bolesti (osteoporoza, sterilitet, smanjen imunski odgovor i sl.)

Prema preporukama Nacionalnog instituta za zdravlje (NIH) kombinovani kriterijum se predlaže jer je pokazano da čak i u kategoriji normalne težine prema BMI, osobe sa visokim vrednostima WC imaju veći zdrav-

stveni rizik u odnosu na osobe kod kojih je izmeren normalni WC.

Mere borbe protiv prekomerne uhranjenosti i ateroskleroze moraju biti višestepeni proces (slika 4). Samo za prvi nivo skrininga (skrining na gojaznost) je neophodan masovni obuhvat stanovništva. Rezultati skrininga biistovremeno bili i alat za trijažu pojedinaca za obuhvat na sledećem nivou.

Slika 4. Stepenasti model skrininga na aterosklerozu



Osobama kod kojih je „primarnim” skriningom na gojaznost utvrđen povećani stepen relativnog rizika od nastanka i razvoja bolesti povezanih sa prekomernom uhranjenosti potrebno je uraditi „sekundarni” skrining sa ciljem detekcije markera koji odražavaju štetan uticaj faktora rizika. Merenjem krvnog pritiska, nivoa glukoze, određivanjem lipidnog profila i markera sistemske upale određujemo prisustvo metaboličkog sindroma. Patološki nalaz dve ili više komponenti metaboličkog sindroma bi značio da se osoba nalazi u statusu „apsolutnog rizika”.

Kod osoba sa utvrđenim povećanim rizikom neophodno je intenzivirati mere primarne prevencije u smislu trajne promene životnog stila.

Idealno bi bilo uvesti obavezni skrining na subkliničku aterosklerozu („tercijarni”) sa ciljem direktne identifikacije promena koje odražavaju štetan uticaj faktora rizika na remodelaciju arterija, pre početka kliničkih događaja. Ovaj skrining je opravdan i neophodan kod asimptomatskih bolesnika sa kardiovaskularnim faktorima rizika („apsolutni rizik”). Preporuka za rutinski skrining na aterosklerozu je ultrasonografska metoda kao neinvazivna metoda sa visokim stepenom osetljivosti i specifičnosti.

Cilj ovog stepenastog skrininga je poboljšanje tačnosti stratifikacije rizika od nastanka komplikacija uzrokovanih aterosklerozom i primena odgovarajućih metoda lečenja.

Dosadašnja saznanja o velikoj učestalosti faktora rizika kardiovaskularnih bolesti u razvijenim i nerazvijenim zemljama, kao i potvrđena činjenica da ateroskleroza počinje u detinjstvu, ukazuju na potrebu neodložnog preduzimanja preventivnih mera u ovom uzrastu. S obzirom da je većina faktora rizika povezana sa neadekvatnom ishranom i navikama u životu koje se uglavnom stiču u detinjstvu i ustaljuju u adolescenciji prevenciju bi trebalo započeti što ranije.

Snažni dokazi ukazuju na to da gubitak težine kod gojaznih osoba umanjuje važne faktore rizika od nastanka ateroskleroze. Prevencija je i dalje najpovoljnija opcija za kontrolu prekomerne težine i ateroskleroze.

Zdravstveni radnici imaju važnu ulogu u promociji preventivnih mera (zdrava ishrana sa nižom gustinom energije, redovne fizičke aktivnosti i pozitivne promene ponašanja) kao i u identifikovanju i lečenju komorbiditeta povezanih sa gojaznošću.

Skrining pregledi i poznavanje rezultata testiranja mogu pomoći pojačavanju motivacije pojedincu za promenu životnog stila.

LITERATURA

- Castellon X, Bogdanova V. Screening for subclinical atherosclerosis by noninvasive methods in asymptomatic patients with risk factors. *Clin Interv Aging*. 2013;8:573-580.
- Decree on the National Program for Prevention of Obesity in Children and Adults: Official Gazette of the Republic Serbia (No 9 issued on February 2, 2018) [Decree in Serbian]. Available from: <http://www.pravno-informacioni-sistem.rs/SlGlasnikPortal/eli/rep/sgrs/vlada/uredba/2018/9/1/reg> [last accessed October 27, 2019]
- Han TS, van Leer EM, Seidell JC, Lean ME. Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors: prevalence study in a random sample. *Bmj*. 1995;311(7017):1401-5.
- Health N.I. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults—The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes. Res*. 1998;6(Suppl. 2):51s-209s. [last accessed October 23, 2019]
- Kavarić N. Gojaznost kao faktor rizika nastanka kardiovaskularnih poremećaja u dece školskog uzrasta. Doktorska disertacija. Kosovska Mitrovica. 2013.

6. Naghavi M. et al. (2011) From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient - Part III. In: Naghavi M. (eds) Asymptomatic Atherosclerosis. Contemporary Cardiology. Humana Press, Totowa, NJ
7. Olfert MD, Dent A, Wattick RA. Metabolic Syndrome Prevalence in Students Attending West Virginia University. *J Clin Med*. 2018; 7(12).
8. Primeau V, Coderre L, Karelis AD, et al. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35:971-981.
9. Schulze MB: Metabolic health in normal-weight and obese individuals. *Diabetologia*. 2019; 62(4): 558-566.
10. Skeoch S, Bruce IN. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation? *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Jul;11(7):390-400.
11. WHO. Waist Circumference and Waist-Hip Ratio Report of a WHO Expert Consultation Geneva, 2011. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44583/9789241501491_eng.pdf?sequence=1 [last accessed October 27, 2019]
12. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894). Available from: https://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/ [last accessed October 25, 2019]
13. Yoo HJ, Choi KM. Adipokines as a novel link between obesity and atherosclerosis. *World J Diabetes*. 2014;5(3):357-363.

ZNAČAJ NUTRACEUTIKA U TERAPIJI ATEROSKLEROZE

AUTORI

Sonja Smiljić

Institut za fiziologiju, Medicinski fakultet u Kosovskoj Mitrovici, Univerzitet u Prištini, Srbija

SAŽETAK

Nutraceutici su svi oni sastojci prisutni u hrani ili neprehrambenim proizvodima za koje je utvrđeno da imaju uticaja na sprečavanje pojave pojedinih bolesti ili imaju terapijska svojstva. Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti u većini zemalja sveta. Ateroskleroza je hronična inflamatorna bolest arterijskih zidova i primarni je uzrok kardiovaskularnih bolesti. Promena načina ishrane i životnih navika u prevenciji bolesti kardiovaskularnog sistema i ateroskleroze dobila je veću pažnju u posljednjih nekoliko godina. Različiti mehanizmi su predloženi za objašnjenje kardioprotektivnog efekta nutraceutika kao što je stabilizacija ranjivih aterosklerotskih plakova ili smanjenje biomarkera koji se odnose na zapaljenje. Opisan je uticaj omega-3 polinezasićenih masnih kiselina, hidroksitirozola, likopena, polifenola iz žitarica, voća i povrća. Nutraceutici su prirodna jedinjenja koja potiču iz izvora hrane a koja mogu imati pozitivan uticaj na zid krvnog suda. Pokazalo se da brojni nutraceutici imaju potencijalne antiinflamatorne efekte, što ih čini obećavajućim jedinjenjima za istraživanje novih anti-aterogenih terapija. Iako studije ukazuju na značajne efekte nutraceutika, potrebna su velika, ozbiljna klinička ispitivanja kako bi se utvrdila njihova puna efikasnost u prevenciji ateroskleroze i terapiji kardiovaskularnih bolesti.

Ključne reči: nutraceutici, ateroskleroza, polinezasićene masne kiseline, dijetalna vlakna, polifenoli

ENGLISH

INFLUENCE OF NUTRACEUTICALS THERAPIES FOR ATHEROSCLEROSIS

Sonja Smiljic

Department of physiology, Medical faculty, University of Pristina, Kosovska Mitrovica, Serbia

SUMMARY

Nutraceuticals are all those ingredients present in foods or non-food products that have been found to have an effect on preventing the onset of certain diseases or having therapeutic properties. Cardiovascular disease is a leading cause of mortality in most countries of the world. Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the arterial walls and is the primary cause of cardiovascular disease. Changes in diet and lifestyle in the prevention of cardiovascular disease and atherosclerosis have received greater attention in recent years. Various mechanisms have been proposed to explain the cardioprotective effect of nutraceuticals such as stabilization of vulnerable atherosclerotic plaques or reduction of inflammatory biomarkers. The effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids, hydroxytyrosols, lycopene, polyphenols from cereals, fruits and vegetables is described. Nutraceuticals are natural compounds which come from food sources and can have a positive effect on the blood vessel wall. Numerous nutraceuticals have been shown to have potential anti-inflammatory effects, making them promising compounds for exploring novel anti-atherogenic therapies. Although studies indicate significant effects of nutraceuticals, large, serious clinical trials are needed to determine their full effectiveness in the prevention of atherosclerosis and cardiovascular disease therapy.

Key words: Nutraceuticals. Atherosclerosis, Polyunsaturated fatty acids, Fiber, Polyphenols

UVOD

Nutraceutici su svi oni sastojci prisutni u hrani ili neprehrambenim proizvodima za koje je utvrđeno da imaju uticaja na sprečavanje pojave pojedinih bolesti ili imaju terapeutska svojstva. Postoji celi spektar različitih hemijskih jedinjenja koja imaju određeno delovanje na zdravlje ljudi ili pojedine fiziološke funkcije. Ova jedinjenja se svakim danom sve više istražuju i po svom delovanju nisu lekovi ali se ponekad mogu izdvojiti i koristiti kao lek (1). Tako, nutraceutici predstavljaju obećavajuće agense primenljive u prevenciji ateroskleroze ili kao dodatni tretman u terapiji kardiovaskularnih bolesti.

Kardiovaskularne bolesti (KVB) uzimaju živote 17,9 miliona ljudi svake godine, što čini 31% svih globalnih smrtnih slučajeva (2). U Srbiji su 2017. godine, vodeći uzrok smrti bile kardiovaskularne bolesti sa 51,7% (3). Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji, 61% smrtnih slučajeva u svetu može se objasniti sa osam faktora rizika - upotreba alkohola i duvana, visok krvni pritisak, visok indeks telesne mase (BMI), visoka vrednost holesterola i glukoze u krvi, nizak unos voća i povrća i fizička neaktivnost. Smanjenje ovih faktora rizika može povećati očekivani životni vek na globalnom nivou za pet godina. Način ishrane i fizička aktivnost su povezane sa sedam od osam faktora rizika (4). Prema tome, postoje sigurni naučni dokazi da promene u ishrani i životnim navikama mogu sprečiti razvoj (primarna prevencija) ili progresiju (sekundarna prevencija) KVB, smanjujući kardiovaskularni morbiditet i mortalitet (5).

U osnovi većine kardiovaskularnih bolesti leži ateroskleroza. Ateroskleroza se i na današnjem stepenu razvoja medicinske nauke smatra neizbežnim procesom. Poznato je da kod većine ljudi oko 85. godine života 60% koronarne cirkulacije prekriveno aterosklerotičnim plakovima, i to pod uslovom da u toku života nisu bili prisutni faktori rizika. U prisustvu faktora rizika kao što je dislipidemija takve promene na koronarnim krvnim sudovima se dostižu negde u 42. godini života. Ta rana ateroskleroza danas predstavlja globalni problem čovečanstva.

Aterosklerotične promene su opisane i na mumijama faraona koji su živeli pre 3200 godina. Ispitivanje uzoraka tkiva sa mumija pokazala su da su u drevnoj prošlosti osim faktora genetike i starenja na razvoj ateroskleroze usticale i hronične infekcije poput malarije, tuberkuloze, parazita i drugih (6). Takve infekcije mogu bitno da povećaju nivo zapaljenja u organizmu, a što se u potpunosti poklapa sa novijim istraživanjima koja navode endotelnu disfunkciju (7) i inflamaciju kao prvu stepenicu u razvoju ateroskleroze.

Ateroskleroza se karakteriše vaskularnom upalom i akumulacijom lipida u zid krvnog suda. Inicirano je oštećenjem endotelnih ćelija (EĆ) i vezivanjem oksidovanog lipoproteina male gustine (oxLDL) na unutrašnjem zidu arterija (8). Inflamacija endotelnih ćelija dovodi do smanjenja aktivnosti endotelne azotoksid sintaze (eNOS) i sinteze azot oksida (NO), ali indukuje povećanu ekspresiju adhezionih molekula kao što su intercelularni adhezioni molekul 1 (ICAM-1) i vaskularni adhezioni molekul 1 (VCAM-1), što dalje promovira adheziju i migraciju monocita (9,10). Dolazi do preuzimanja oxLDL-a od strane makrofaga, nakon čega sledi njihova diferencijacija u penaste ćelije. Penaste ćelije stimulišu endotelne ćelije da proizvodi citokine i hemokine i dalju migraciju monocita. Ovo dovodi do proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija (VGMĆ) i njihovu migraciju u intimu. Ostale imunske ćelije, uključujući dendritične ćelije i T ćelije, mogu se aktivirati različitim stimulusima, koji promoviraju formiranje plaka i razvoj ateroskleroze. Tokom procesa ateroskleroze, reaktivne vrste kiseonika (ROS) izazivaju oksidativna oštećenja krvnih sudova, koje produbljuje aterosklerozu. Pored toga, ROS su poznati kao drugi glasnik u inicijaciji inflamatorne signalizacije, uključujući proteinske kinaze aktivirane mitogenom (MAPKs) i nuklearni factor kapa B (B=NF-), koji se mogu aktivirati sa nekoliko drugih inflamatornih stimulusa za proizvodnju pro-inflamatornih citokina (8). Postoji nekoliko glavnih koraka koji su uključeni u razvoj ateroskleroze, uključujući LDL oksidaciju, proinflamatornu ekspresiju gena, migraciju monocita, formiranje penastih ćelija i stabilnost plaka. U svaku od ovih faza mogu se uključiti nutraceutici u cilju smanjenja veličine aterosklerotskih promena ili stabilizacije plaka (11,12).

Omega 3 polinezasićene masne kiseline

Ateroskleroza je zapaljensko oboljenje arterijske intime, vođeno lipidima, pri čemu ravnoteža pro-inflamatornih i antiinflamatornih mehanizama diktira konačni klinički ishod. Intimna infiltracija i modifikacija lipoproteina dobijenih iz plazme i njihova apsorpcija uglavnom makrofagima, uz formiranje penastih ćelija, inicira formiranje aterosklerotske lezije, a nedostatak efekta uklanjanja apoptotskih ćelija i penastih ćelija održava progresiju lezija. Defektivna eferocitoza, kao znak neadekvatne rezolucije upale, dovodi do akumulacije nekrotičnih makrofaga i penastih ćelija i formiranja napredne lezije sa nekrotičnim lipidnim jezgrom, što ukazuje na ranjivost plaka (8).

U normalnim fiziološkim uslovima, sinteza eikosa-noida, posrednika u reakciji zapaljenja, kao i u regu-

laciji krvnog pritiska i zgrušavanja krvi može biti pod uticajem polinezasićenih masnih kiselina (PMK). Dijetetski unos nekih polinezasićenih masnih kiselina je neophodan jer se ne mogu sintetisati in vivo. Smatra se da omega-3 polinezasićene masne kiseline utiču na razvoj ateroskleroze preko više mehanizama: smanjuju preuzimanje oxLDL, smanjuju oksidativni stres i medijatore inflamacije, popravljaju eferocitozu i blokiraju sintezu leukotriena (13).

Efekat omega-3 kod ispitanika sa povišenim nivoima triglicerida u plazmi je procenjivan u više studija. Jedna od njih je velika međunarodna studija pod nazivom „redukcija kardiovaskularnih bolesti primenom prečišćenog etil estera eikozapentaenske kiseline (EPA) iz ribljeg ulja“ (REDUCE-IT - Reduction of Cardiovascular Events with Icosapent Ethyl-Intervention Trial). Ovo istraživanje je obuhvatilo 8179 osoba starosti 45 godina i više koji su imali kardiovaskularno oboljenje, odnosno starosti 50 i više godina koji su pored dijabetesa imali bar još jedan faktor rizika. Ispitanici su imali vrednosti triglicerida našte u opsegu 1,69 - 5,63 mmol/L, vrednosti LDL-holesterola između 1,06 - 2,59 mmol/L, a da su pritom dobijali statine tokom prethodne 4 nedelje u stabilnoj dozi. Kod nekih pacijenata sa povećanim kardiovaskularnim rizikom, čak i pored primene statina ostaje određeni rezidualni kardiovaskularni rizik. Pacijenti su bili podeljeni u dve grupe; jedna grupa je dobijala EPA etilestar suplemente od 2 g, dva puta dnevno, dok je druga grupa dobijala placebo (mineralno ulje koje oponaša boju i konzistenciju EPA etilestra). Ispitanici su bili na studijskom režimu u proseku 4,9 godina. Etil estar eikozapentaenske kiseline iz ribljeg ulja značajno smanjuje kardiovaskularni rizik kod pacijenata sa hipertrigliceridemijom, pored redovne primene statinske terapije, navodi se u rezultatima REDUCE-IT studije nedavno objavljeni u časopisu *The New England Journal of Medicine* (14).

U pogledu kardiovaskularnog zdravlja, uloge omega-3 i omega-6 polinezasićenih masnih kiselina se generalno smatraju antagonističkim, pri čemu se prvi smatraju kao antiinflamatornim a drugi kao pro-inflamatorni. Idealan odnos omega-6: omega-3 od 4: 1 do 15: 1. Jedan ključni omega-6 za koji se smatra da može ispoljiti anti-aterogeni efekat je dihomo-g-linolenska kiselina (DGLA) koja se može metabolisati nakon konzumacije u prostaglandin E1 (PGE1), moćno anti-aterogeno jedinjenje sa vazodilatatornim efektom (15).

Dijetalna vlakna

Veliki broj studija pokazao je inverznu korelaciju između dijeta sa visokim sadržajem vlakana i kardiova-

skularnim rizikom. Objedinjena analiza 18 kohortnih studija je istraživala ishranu bogatu vlakanima i bi-lo koja potencijalna veza doza - odgovor sa KVB, uključujući 672.408 jedinki i otkrili da je veći unos vlakana imao značajnu inverznu vezu sa rizikom od KVB. Za svakih 10 g/dan povećanja unosa dijetalnih vlakana, postoji smanjenje od 8% svih koronarnih događaja i 24% smanjenje rizika od iznenadne srčane smrti (16). Još jedna meta-analiza koja je obuhvatila 23 studije (uključujući 937.665 učesnika) (17) pokazala smanjeni kardiovaskularni rizik za 16% potrošnje 300 g/dan voća i za 18% sa 400 g/dan potrošnje povrća.

Ipak, broj kliničkih ispitivanja koja su pokazala da unos vlakana ima zaštitnu ulogu na progresiju aterosklotične bolesti i dalje je ograničen. Rezultati PREDIMED (Prevenција mediteranskom ishranom) studija (18) ukazala je da je visok unos vlakana obrnuto povezana sa karotidnom aterosklerozom. Kardioprotektivni efekat vlakana na aterosklerozu mogao bi se objasniti smanjenjem ukupnog holesterola u serumu i koncentracije lipoproteina niske gustine (LDL-c). Nije bilo značajne promena u nivou lipoproteina velike gustine (HDL-c) ili triglicerida (TG). U drugoj studiji kada je prosečan unos prehrambenih vlakana bio veći od 30 g/dan, HDL-c se povećao za 10,1%. Drugi uticaji koji se pripisuju unosu vlakana i kardiovaskularnoj zaštiti ogledaju se u smanjenju krvnog pritiska, poboljšanju insulinske osetljivosti, ili prevencija povećanja telesne težine (19).

Jedna od studija imala je za cilj da istraži povezanost između unosa dijetalnih vlakana i hipertenzije. Podaci Nacionalne ankete American College of Cardiology/American Heart Association Smernice o zdravlju i ishrani za period 2007-2014 korišćeni su u ovoj studiji. Hipertenzija je definisana kao sistolni krvni pritisak (SBP) 130 mmHg ili dijastolni krvni pritisak (DBP) 80 mmHg ili lečenje antihipertenzivnim lekovima. Ukupno 18.433 učesnika u dobi od 18 godina ili stariji su uključeni u analize. Rezultati sugerišu da je unos ukupnih vlakana, vlakana iz žitarica i vlakana iz povrća, ali ne i iz voća, bio povezan sa smanjenim rizikom od hipertenzije kod odraslih u SAD-u (20).

Upala može biti ključni faktor koji povezuje funkciju endotela i ishranu bogatu vlaknima. Unos dijetalnih vlakana inverzno je povezan sa nivoima visoko senzitivnog C reaktivnog protein u serumu. Povećan unos dijetalnih vlakana iz ishrane koja je prirodno bogata vlaknima i suplementima može smanjiti nivo hs-CRP.

Polifenoli

Polifenoli su prisutni u biljnoj hrani kao što je voće, povrće, žitarice, leguminoze, kakao, čaj, kafa i vino. Voće poput jabuke, kruške, grožđa, trešnje i raznog bobičastog voća sadrži do 200-300 mg polifenolana na 100 g mase. Čaša crvenog vina ili šoljica čaja ili kafe sadrži oko 100 mg polifenola. Tako je dnevni unos polifenola veći od unosa bilo kog drugog antioksidansa, oko deset puta veći nego unos vitamina C i 100 puta veći nego dnevni unos vitamina E i karotenoida (21).

Ishrana bogata polifenolima dobijenim iz biljaka kao što su maslinovo ulje (tirozol, hidroksitirozol, oleuropein) i zeleni čaj (katehini) dokazano je da smanjuje učestalost kardiovaskularnih bolesti, potencijalno poboljšavajući funkciju endotela i sprečava aterosklerozu. Endotelna funkcija je procenjivana neinvazivno putem periferne arterijske tonometrije (Endo-PAT®). Nakon 4 meseca primene maslinovog ulja u dozi od 30 ml dnevno značajno se poboljšala endotelna funkcija. Poboljšanje endotelne disfunkcije kod pacijenata sa ranom aterosklerozom povezan je sa redukcijom inflamacije i smanjenjem agregacije trombocita na endotel (22).

Konzumiranje hrane bogate flavonoidima, kao što su kakao i čaj, može smanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti. epikatehin u kakau i čaju i kvercetin u čaju verovatno igraju ulogu smanjenjem disfunkcije endotela i zapaljenja, dve glavne determinante ateroskleroze. Marker endotelne disfunkcije i upale mereni na početku i na kraju svakog interventnog perioda od 4 nedelje bili su značajno niži. Kod hipertenzivnih muškaraca i žena, epikatehin (kakao, čaj) može doprineti kardioprotektivnim efektima kroz poboljšanje endotelne funkcije. I kvercetin ima kardioprotektivni efekat koje takođe ostvaruje poboljšanjem endotelne funkcije i smanjenjem upale (21, 22).

Rezveratrol je neflavonoidni polifenol prisutan u grožđu i crnom vinu. Ateroprotektivni efekat ostvaruje smanjenjem ekspresije adhezionih molekula (ICAM, VCAM) i medijatora inflamacije (IL-8) (23,24).

Likopen

Likopen je karotenoid prisutan u paradajzu i proizvodima od paradajza, grejpfrutu, lubenici i papaji. Neki studija je objavilo da likopen može štiti od razvoja ateroskleroze zbog antioksidativnih efekata. U tom smislu, neki autori su predložili da visoki nivoi karotenoida u serumu mogu usporiti rane faze progresije ateroskleroze. Likopen smanjuje nivo LDLa, oxLDLa, oksidativni i nitro oksidativni stres, proliferaciju i migraciju glatkih mišićnih ćelija. Likopen popravlja endotelnu

disfunkciju i prevenira razvoj KVB kroz povećanu biodostupnost NO (25,26).

Alicin

Allicin (dialil tiosulfinat) je prirodno organsko jedinjenje koje sadrži sumpor i koji se nalazi u belom luku (*Allium sativum*). Alicin je veoma nestabilan i brzo se razlaže na nekoliko manjih polisulfida koji su u stanju da u ćelijama formiraju vodonik sulfid (H₂S). Anti-aterogene i antiinflamatorne zdravstvene koristi belog luka mogu se pripisati ovom formiranju vodonik sulfida.

Prednost i tretman jedinjenjima koja se mogu razgraditi do vodonik sulfida dokazana su u studijama. Tretman lipopolisaharidom stimuliranih mišjih makrofaga sa jedinjenjima koji sadrže sumpor koji potiču od belog luka pokazalo se da ublažava ekspresiju nekoliko pro-inflamatornih citokina, uključujući IL-1b, IL-6 i TNFa. Antiinflamatorne sposobnosti donora H₂S su takođe opažene in vivo korišćenjem mišjih modela, koji pokazuju inhibiciju adhezije leukocita prema endotelu, što ukazuje na smanjenje inflamatornog odgovora. Pored smanjenja početnog zapaljenskog odgovora, H₂S je takođe pokazao da atenuira aktivaciju protein kinaze aktiviranu p38 mitogenom i cepanje kaspaze-3, što dovodi do ubrzane rezolucije upale stimulišući kratkoročno preživljavanje neutrofila (27).

U kliničkim studijama je uočena korist od dodatka belog luka. U studiji koja je obuhvatila 152 učesnika, dodavanje visokih doza belog luka (900 mg/dan) tokom 48 meseci značajno je smanjilo zapreminu lezija za 6-18% (28). Kasnija studija je pokazala da je lečenje statinom i ekstraktom belog luka usporava razvoja ateroskleroze smanjenjem koronarne kalcifikacije u poređenju sa terapijom samo sa statinima (29). Meta-analiza 45 ispitivanja pokazala je da je dodavanje belog luka može da smanji serumske nivoe LDL, triacilglicerola i holesterola nakon 1-3 meseca, ali ne nakon 6 meseci (30).

Začini i ateroskleroza

Vaskularna upala i akumulacija lipida su glavne komponente ateroskleroze. Čili paprike, karanfilić, korijander i šafran potiskuju NF- κ B signalizaciju i inhibiraju oslobađanje pro-inflamatornih citokina u makrofagima. Ruzmarin, kurkuma i korijander inhibiraju inflamatornu reakciju u makrofagima putem blokade mirogenom aktivirane protein kinaze (MAPK). Crni biber, čili paprika, beli luk i kurkuma aktiviraju PPAR i LXR signalizaciju i povećavaju ekspresiju ABCA 1 i efluks holesterola iz makrofaga. U endotelnim ćelijama, zvezdani anis i kine-

ski tun inhibiraju ekspresiju adhezionih molekula, ICAM-1 i VCAM-1, i ekspresija pro-inflamatornih citokina, IL-1 i TNF, preko supresije NF- κ B signalizacije. Crni biber inhibira proliferaciju glatkih mišićnih ćelija preko potiskivanja MAPK signalizacije. Ovi efekti doprinose ateroprotektivnim prednostima ovih začina (31).

Trenutno nema dostupnih epidemioloških podataka koji pokazuju da je konzumacija začina povezan sa smanjenjem kardiovaskularnih događaja kao i sa preporučenim količinama začina. Međutim poznato je da se začini sa potencijalnim kardiovaskularnim zaštitnim efektima mogu dodati dijetama za sprečavanje KVB. Mediteranska dijeta, koja uključuje i upotrebu začina pored maslinovog ulja, je zdravija od drugih dijeta. Crni biber, cimet, čili paprika, beli luk i đumbir se najčešće koriste u različitim prehranbenim navikama u različitim kulturama, a to sprečava aterosklerozu preko različitih signalnih puteva. Iako može biti teško promeniti prehranbene navike, nutricionisti moraju da

se podstaknu da formulišu odgovarajuće smeše hrane koje sadrže više korisnih sastojka i da služe kao sredstvo za promovisanje kardiovaskularnog zdravlja širom sveta (32).

ZAKLJUČAK

Ateroskleroza je hronična inflamatorna bolest arterijskih zidova i primarni je uzrok kardiovaskularnih bolesti. Nutraceutici su prirodna jedinjenja koja potiču iz izvora hrane a koja mogu imati pozitivan uticaj na zid krvnog suda. Pokazalo se da brojni nutraceutici imaju potencijalne antiinflamatorne efekte, što ih čini obećavajućim jedinjenjima za istraživanje novih anti-aterogenih terapija. Iako studije ukazuju na značajne efekte nutraceutika, potrebna su velika, ozbiljna klinička ispitivanja kako bi se utvrdila njihova puna efikasnost u prevenciji ateroskleroze i terapiji kardiovaskularnih bolesti.

LITERATURA

1. Aronson JK. Defining 'nutraceuticals': neither nutritious nor pharmaceutical. *Br J Clin Pharmacol.* 2017 ;83(1):8-19.
2. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve, SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation* 2017; 35: 146-603.
3. European Cardiovascular Disease Statics 2017. Available online: <http://www.ehnheart.org/cvd-statistics/cvd-statistics-2017>.
4. O'Rourke K, Vander Zanden A, Shepard D, Leach-Kemon, K. For the Institute for Health Metrics and Evaluation. Cardiovascular disease worldwide, 1990-2013. *JAMA* 2015; 314: 1905.
5. Smiljić S. Lifestyles as risk for cardiocascular diseases in medical students. *Eur J heart failure* 2019; 21 (1): 144-144.
6. Allam AH, Mandour Ali MA, Wann LS, Thompson RC, Sutherland ML, et all. Atherosclerosis in ancient and modern Egyptians: the Horus study. *Glob Heart.* 2014; 9(2): 197-202.
7. Smiljić S. The clinical significance of Endocardial Endothelial Dysfunction. *Medicina (Kaunas).* 2017; 53 (5): 295-302.
8. Bäck M, Yurdagül A Jr, Tabas I, Öörni K, Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol.* 2019 ;16(7):389-406.
9. Smiljić S, Nestorović V, Savić S. Modulatory role of nitric oxide in cardiac performance. *Med Pregl* 2014; 67 (9-10):345-352.
10. Smiljić S, Mijović M, Savić S. Biomarkers of endothelial dysfunction in disease of the cardiovascular system. *Med Pregl* 2017; 70 (1-2):45-52.
11. Moss WEJ, Ramji PD. Nutraceutical therapies for atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2016; 13(9): 513-532.
12. Casas R, Castro-Barquero S, Ramon Estruch R, Emilio Sacanella. Nutrition and Cardiovascular Health. *Int J Mol Sci* 2018; 19(12): 2-31.
13. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev* 2010; 68:280-289
14. Bhatt DL et al. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med* 2019 3;380 (1):11-22.
15. Takai S, et al. Anti-atherosclerotic effects of dihomo- γ -linolenic acid in ApoE-deficient mice. *J Atheroscler Thromb* 2009; 16:480-489.
16. Wu, H.; Flint, A.J.; Qi, Q.; van Dam, R.M.; Sampson, L.A.; Rimm, E.B.; Holmes, M.D.; Willett, WC.; Hu, FB, Sun, Q. Association between dietary whole grain intake and risk of mortality: Two large prospective studies in US men and women. *JAMA Intern. Med* 2015, 175, 373-384.

17. Gan Y, Tong X, Li L, Cao S, Yin X, et al. Consumption of fruit and vegetable and risk of coronary heart disease: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Int. J. Cardiol* 2015, 183, 129-137.
18. Garcia-Arellano A, Ramallal R, Ruiz-Canela M, Salas-Salvadó J. Dietary Inflammatory Index and Incidence of Cardiovascular Disease in the PREDIMED Study. *Nutrients* 2015; 7(6): 4124-4138.
19. Buil-Cosiales, P, Irimia, P, Ros, E, Riverol, M, Gilabert, R et al. Dietary fibre intake is inversely associated with carotid intima-media thickness: A cross-sectional assessment in the PREDIMED study. *Eur. J. Clin. Nutr* 2009, 63, 1213-1219.
20. Sun B, Shi X, Wang T, Zhang D. Exploration of the Association between Dietary Fiber Intake and Hypertension among U. S. Adults Using 2017 American College of Cardiology/American Heart Association Blood Pressure Guidelines: NHANES 2007-2014. *Nutrients* 2018, 10, 1091.
21. Ostertag LM, O’Kennedy N, Kroon PA, Duthie GG, de Roos, B. Impact of dietary polyphenols on human platelet function. A critical review of controlled dietary intervention studies. *Mol Nutr Food Res* 2010, 54, 60-81.
22. RJ Widmer, MA Freund, AJ Flammer1, J Sexton, R Lennon, A Romani, N Mulinacci, FF Vinceri, LO Lerman, A Lerman. Beneficial effects of polyphenol-rich Olive Oil in patients with early atherosclerosis. *Eur J Nutr* 2013; 52(3): 1223-1231.
23. Shrikanta, A.; Kumar, A.; Govindaswamy, V. Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. *J. Food. Sci. Technol* 2015, 52, 383-390.
24. Catalgol, B.; Batirel, S.; Taga, Y.; Ozer, N.K. Resveratrol: French paradox revisited. *Front. Pharmacol.* 2012; 3: 141
25. Mozos I, Stoian D, Caraba A, Malainer C, Horban JO and Atanasov AG. Lycopene and Vascular Health. *Front Pharmacol* 2018; 9: 521, 1-14.
26. Blum A, Monir M, Khazim K, Peleg A, and Blum N. Tomato-rich (Mediterranean) diet does not modify inflammatory markers. *Clin Invest.Med* 2007, 30, 70-74.
27. Morihara N, Hino A, Yamaguchi T3, Suzuki J. Aged Garlic Extract Suppresses the Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice. *J Nutr* 2016 ;146(2):460S-463S.
28. Budoff M, et al. Inhibiting progression of coronary calcification using Aged Garlic Extract in patients receiving statin therapy: a preliminary study. *Preventative Medicine.* 2004; 39:985-991.
29. Ackermann RT, Mulrow CD, Ramirez G, Gardner CD, Morbidoni L, Lawrence VA. Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors. *Arch Intern Med* 2001 26; 161(6) :813-24.
30. Gardner C, et al. Effect of raw garlic vs commercial garlic supplements on plasma lipid concentrations in adults with moderate hypercholesterolemia: A randomized clinical trial. *Arch Intern Med* 2007; 167:346-353.
31. Tsui PF, Lin CS, Ho LJ, Lai JH. Spices and Atherosclerosis. *Nutrients* 2018; 10(11): 1724: 2-19.
32. Casas R, R, E. Influence of Bioactive Nutrients on the Atherosclerotic Process: A Review. *Nutrients* 2018; 10(11): 2-26.

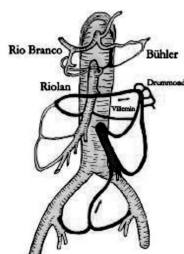
CHRONIC MESENTERIC ISCHEMIA - AN OVERALL CHALLENGE IN MULTIVISCERAL DISEASE

AUTORI

Aleksandar Manolev

PHO „Manolevi“ Polyclinic center, Department of internal medicine, North Macedonia

Definition: CMI most commonly includes significant stenosis or occlusion of at least 2 of the 3 visceral blood vessels: The celiac truncus, Superior mesenteric artery and Inferior mesenteric artery. Single vessel, however, can occasionally cause symptomatic disease. CMI can be presented as symptomatic or asymptomatic.



Incidence and prevalence: Incidence: 1 in 100.000 cases per year, Age: over 60 years, Gender: women/men ratio = 3:1, A population-based survey using duplex ultrasound (US) imaging in asymptomatic patients found that 17.5% of persons over 65 years of age had a critical stenosis of at least one mesenteric vessel, Prevalence: in patients with atherosclerotic disease is 8-70%, The most common cause of mesenteric arterial steno-occlusive disease is atherosclerosis, which accounts for 35%-75% of cases, in 15 % of the cases there is stenosis over 50% on one of the visceral arteries, 50 % of the patients with CMI have coronary artery disease (CAD), In patients with abdominal aortic aneurysms (AAA) and peripheral artery disease:- a significant stenosis of at least one mesenteric artery may be found in around 40%, - or occlusion in around 25-29%, respectively, Significant stenosis on one of the three visceral arteries can occur in: Aneurism of the abdominal aorta - (40%); Aortoiliacal artery disease - (29%); Femoral artery disease - (25%)

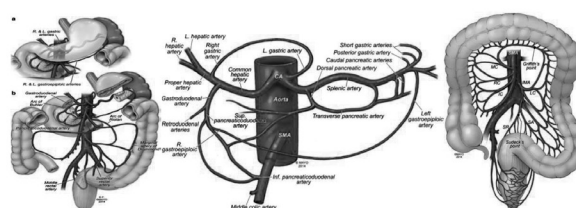
Etiology and predisposing factors: Atherosclerosis is the main cause for CMI provoked by: Smoking, Arterial hypertension, Hyperlipidemia, Diabetes mellitus, Genetic predisposition, Air pollution

Non - atherosclerotic factors for CMI: Fibromuscular dysplasia, Median arcuate ligament syndrome (Danbar Syndrome), Vasculitis, Segmental arterial mediolysis
Clinical presentation of CMI 1. MESENTERIAL (INTESTINAL) ANGINA: Stomach cramps, Abdominal pain- that appears 20-30 minutes after meal and last for 2-3 hours
2. CHRONIC GASTRIC ISHEMIA: Food escape, Diarrhoea, Weight loss, Malabsorption, MESENTERIAL (INTESTINAL) ANGINA Mesenteric (in-testinal) angina will be defined by: severity of stenosis and the number of vessels that are involved.

The more the stenosis is severe the less blood supply in the organ/s will be provided.

The more vessels are involved (both SMA and CT) the severe blood supply is present and the more severe pain will dominate in clinical presentation. The time of presentation of pain correlates with organ that is stenotic e.g. the more the proximal is stenosis the time of presentation after meal will be shorter and close to time of 30 minutes after food consumption.

Abdominal aorta, visceral blood vessels and collateral vessels



CLINICAL PRESENTATION OF CMI - CHRONIC GASTRIC ISHEMIA

Chronic gastric ischemia correlates with: the time needed for stenosis occurring, the lasting of stenosis and the number of vessels that are involved.

In elderly patients stenosis is developing mostly in long (chronic) period in atherosclerotic process that leads to chronic inadequate blood supply in the intestiny. This will result with loss of adequate blood supply that in clinical presentation will be presented

with diarrhea, malabsorption, weight loss and food escape because of pain.

The more the older is the patient the more symptoms from chronic gastric ischemia will be present, in the contrary, in younger patients more fast and quick stenosis will be developed where symptoms of intensive angina after meal will be more dominate instead of chronic symptoms that will be presented in elderly.

Management of chronic mesenteric ischaemia

ESC
European Society of Cardiology

Recommendations	Class	Level
Diagnosis		
In patients with suspected CMI, DUS is recommended as the first line examination.	I	C
In patients with suspected CMI, occlusive disease of a single mesenteric artery makes the diagnosis unlikely, and a careful search for alternative causes should be considered.	IIa	C
Treatment		
In patients with symptomatic multivessel CMI, revascularization is recommended.	I	C
In patients with symptomatic multivessel CMI, it is not recommended to delay revascularization in order to improve the nutritional status.	III	C

www.escardio.org/guidelines 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with ESVS (European Heart Journal 2017; doi:10.1093/eurheartj/ehw095) 57

Overall accuracy in the Doppler laboratory is over 90% in the detection of the stenosis of a. mesenterica sup. that are over 70%, as well as over 80% for detection of stenosis of truncus coeliacus that are over 70%.

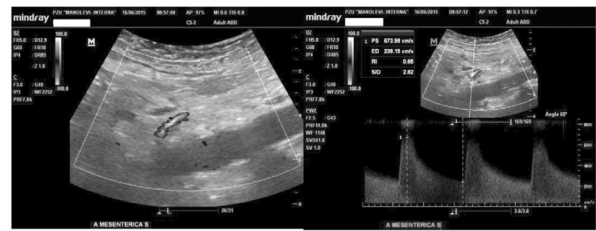
Duplex criteria of mesenteric artery stenosis

First author (publication year)	SMA PSV $\geq 50\%$ stenosis	SMA PSV $\geq 70\%$ stenosis	CA PSV $\geq 50\%$ stenosis	CA PSV $\geq 70\%$ stenosis	SMA EDV $\geq 50\%$ stenosis	SMA EDV $\geq 70\%$ stenosis	CA EDV $\geq 50\%$ stenosis	CA EDV $\geq 70\%$ stenosis
Moneta 1993 (n=100)	275 cm/s	275 cm/s	200 cm/s	200 cm/s	45 cm/s	70 cm/s	40 cm/s	100 cm/s
AbuRahma 2012 (n=150)	sens 87% spec 89%	sens 72% spec 93%	sens 87% spec 83%	sens 80% spec 89%	sens 79% spec 79%	sens 65% spec 95%	sens 84% spec 48%	sens 58% spec 91%
van Petersen 2013 (n=324)	≥ 220 cm/s (expiration) sens 84% spec 76%	≥ 268 cm/s (expiration) sens 75% spec 86%	≥ 268 cm/s (expiration) sens 66% spec 80%	≥ 280 cm/s (expiration) sens 66% spec 77%	≥ 62 cm/s (expiration) sens 75% spec 94%	≥ 101 cm/s (expiration) sens 74% spec 96%	≥ 64 cm/s (expiration) sens 78% spec 65%	≥ 57 cm/s (expiration) sens 83% spec 56%
	≥ 277 cm/s (inspiration) sens 68% spec 93%	≥ 243 cm/s (inspiration) sens 78% spec 84%	≥ 243 cm/s (inspiration) sens 68% spec 71%	≥ 272 cm/s (inspiration) sens 72% spec 77%	≥ 52 cm/s (inspiration) sens 76% spec 93%	≥ 83 cm/s (inspiration) sens 53% spec 93%	≥ 84 cm/s (inspiration) sens 66% spec 81%	≥ 84 cm/s (inspiration) sens 66% spec 81%

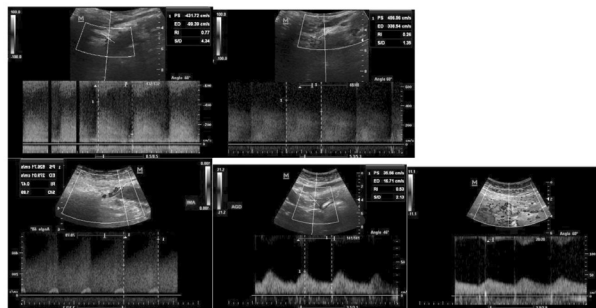
SMA = superior mesenteric artery; CA = coeliac artery; PSV = peak systolic velocity; EDV = end-diastolic velocity; sens = sensitivity; spec = specificity.

1-st CASE REPORT Female patient, 63 years old, Treated for: hypertension, hyperlipidemia, Medical history: breast cancer surgery 10 years ago, Symptoms: - abdominal, epigastric pain after a meal; weight loss, diarrhea (2 weeks before she was hospitalized in the Clinic for infectious diseases for 10 days), food escape, Additional examinations: Gastroduodenal endoscopy, Abdominal ultrasound, X-ray of the thorax.

Color duplex ultrasonography of the truncus coeliacus



2-nd CASE REPORT Female patient, 42 years old, Medical history: hypertension and hyperlipidemia untreated, severe abdominal pain in the epigastrium after a meal; weight loss; food escape; additional examinations: positive H. Pylori test (untreated), Gastroduodenal endoscopy, Abdominal ultrasound, X-ray of the thorax



CT angiography of the aorta, coeliac truncus, lieneal and common hepatic artery



Treatment

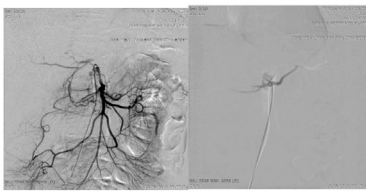
Recommendation 21	Class	Level of evidence	References
In patients with CMI, needing revascularisation, the superior long term results of open surgery must be offset against a possible early benefit of endovascular intervention with regard to peri-procedural mortality and morbidity.	I	B	10,139,141,142
CMI = chronic mesenteric ischaemia.			
Recommendation 22	Class	Level of evidence	References
In patients requiring revascularisation for CMI, the SMA is the main target vessel using either open or endovascular techniques	I	B	156,171,183
Recommendation 23	Class	Level of evidence	References
In patients requiring endovascular treatment of CMI, routine mesenteric stenting should be used, as opposed to plain balloon angioplasty	I	C	101,155–158, 172–179,181,182

CMI = chronic mesenteric ischaemia; SMA = superior mesenteric artery.

Treatment and revascularization

Patient was treated by surgical revascularization; 21 days after surgery graft reocclusion was confirmed and endovascular treatment was performed.

Control CT angiography of the aorta, coeliac truncus, lieneal and common hepatic artery.



Patients with peripheral arterial diseases: best medical therapy		ESC
Recommendations	Class	Level
Smoking cessation is recommended in all patients with PADs.	I	B
Healthy diet and physical activity are recommended for all patients with PADs.	I	C
Statins are recommended in all patients with PADs.	I	A
In patients with PADs, it is recommended to reduce LDL-C to <1.8 mmol/L (70 mg/dL) or decrease it by ≥50% if baseline values are ≥1.8-3.5 mmol/L (70-135 mg/dL).	I	C

Patients with peripheral arterial diseases: best medical therapy (continued)		ESC
Recommendations	Class	Level
In diabetic patients with PADs, strict glycaemic control is recommended.	I	C
Antiplatelet therapy is recommended in patients with symptomatic PADs.	I	C
In patients with PADs and hypertension, it is recommended to control blood pressure at <140/90 mmHg.	I	A
ACEIs or ARBs should be considered as first line therapy in patients with PADs and hypertension.	IIa	B

Results of gene typesation: FV(HR2)haplotype-H1299R(R2)-heterozygous

MTHFR C677T - heterozygous, eNOS - 786 T>C - homozygous, eNOS - G894T- heterozygous, LTA - heterozygous, PAI-5G/5G, HPA1 1a/1a, ACE inser/insert. EPCR A4600G A/A, EPCR G4678C G/G, APO E E3/E4

Anti-beta2GPI IgM antibodies = 239 (<20), Anticardiolipin antibodies = negative, Lupus anticoagulant (LA) = negative: Antiphospholipid syndrome?

LAC test positivity or those with high IgG aCL/anti-beta2GPI titres are considered at higher risk, The clinical value of IgM aCL/anti-beta2GPI antibodies needs further studies

Antithrombotic therapy: 1. ASA 2. ASA+OAK/NOAK

CONCLUSION: Early detection of chronic mesenteric ischemia depends on: Awareness for the disease, carefully analysis and differentiation of the symptoms that can overlap CMI with most frequent gastrointestinal symptomatology, Duplex ultrasound is initial method for diagnosing of the CMI with 90% accuracy in detection of significant stenosis, Doppler laboratory is the right place for the diagnosis and quantification of the CMI, Early detection of CMI increases the chances of less extensive vascular, interventions, reduces the mortality rate and prolongs the 5 year survival, In multivisceral CMI all aspects of medicamentous therapy should be considered.

OKSIDACIONI STRES I FIZIČKA AKTIVNOST - ISTINE I ZABLUDE

AUTORI

Popović Ljiljana
Medicinski fakultet Priština - K. Mitrovica, Srbija

SAŽETAK

Tokom poslednje 4 decenije, naše znanje o biološkim implikacijama oksidacionog stresa izazvanog vežbanjem značajno se uvećalo. Sada je jasno da skeletni mišići tokom kontrakcije stvaraju slobodne radikale i da dugotrajno i intenzivno vežbanje može da dovede do nastanka oksidacionih oštećenja. Potencijalni putevi za formiranje slobodnih radikala nastalih vežbanjem zasnivaju se na povećanoj potrošnji kiseonika, aktiviranju inflamatornih ćelija usled oštećenja tkiva, prolaznim ishemijskim ili hipoksičnim stanjima i auto-oksidaciji kateholamina. Dostupni podaci snažno ukazuju na to da je redovno vežbanje povezano sa brojnim zdravstvenim koristima, uključujući i povećaje mišićne snage kao i adaptivni odgovor mišićnih vlakana posredovan intenzivnom fizičkom aktivnošću. Uključivanje ROS-a u modulaciju ekspresije gena putem redoks-osetljivih transkripcijskih puteva predstavlja važan regulatorni mehanizam uključen u proces vežbanjem posredovane adaptacije. Suplementacija antioksidantima smanjuje mitohondrijsku biogenezu i ekspresiju antioksidacionih enzima u skeletnim mišićima i na taj način smanjuje mišićnu izdržljivost postignutu treningom. Pozitivni efekti mogu se očekivati ako se antioksidaciona suplementacija ne primenjuje pre treninga, već pre takmičenja. Tada se naime može očekivati iscrpljujuća fizička aktivnost i produkcija slobodnih radikala koja prevazilazi odbrambene endogene mehanizme, izazivajući oksidacioni stres.

Ključne reči: vežbanje, slobodni radikali, adaptacija, suplementacija

ENGLISH

SUMMARY

During the past 4 decades our knowledge about the biological implications of exercise induced oxidative stress has expanded rapidly. It is now clear that contracting skeletal muscles generate free radicals and that prolonged and intense exercise can produce oxidative damage. Potential pathways for exercise induced free radicals formation are based on increased oxygen consumption, activation of inflammatory cells due to tissue damage, transient ischemic or hypoxic conditions and auto-oxidation of catecholamine. The available data strongly indicate that regular exercise is associated with numerous health benefits including regulation of muscle force production and contraction induced adaptive response of muscle fibers to extreme training. Involvement of ROS in the modulation of gene expression via redox-sensitive transcription pathways represents an important regulatory mechanism involved in the process of training adaptation. Antioxidant supplementation impairs mitochondrial biogenesis and expression of antioxidant enzymes in the skeletal muscles thereby attenuating the training induced improvement of endurance capacity. Benefit effects could be achieved if antioxidants supplementation takes part not during training period but before competition when exercise is likely to be exhaustive and results in the generation of ROS that overwhelms the endogen defence mechanism causing oxidative stress.

Keywords: exercise, free radicals, adaptation, supplementation

UVOD

Kiseonik se kao hemijski element neophodan za funkcionisanje celokupnog aerobnog sveta pojavio u slobodnom stanju u atmosferi pre oko 2 milijarde godina. U to vreme nastao je kao posledica evolucije fotosintetičkih organizama, pri čemu je njegovo oslobađanje predstavljalo neizbežan sporedni produkt fotosintetičkog procesa i na taj način vršio veliki evolutivni pritisak na postojeće organizme. Pozitivan efekat kiseonika na ljudsko zdravlje nije se dovodio u pitanje sve do otkrića slobodnih radikala i procesa lipidne peroksidacije.

Slobodni radikali nastaju univalentnim transferom elektrona na molekularni kiseonik. Zbog svoje biohemijske prirode i niske energije aktivacije sposobni su da reaguju sa biomolekulama svih ćelijskih struktura, vršeći pri tome njihovu hemijsku i fiziološku modifikaciju. U fiziološkim uslovima formiranje slobodnih radikala predstavlja kontrolisan proces i to delovanjem neenzimskih i enzimskih komponenti antioksidacione zaštite. Ovi antioksidansi svojim mehanizmima omogućavaju prevenciju, limitiranje i ukoliko je došlo do oštećenja, njegovu reparaciju. Najveću osetljivost na dejstvo slobodnih radikala pokazuju nezasićene masne kiseline u biomembranama, nukleinske kiseline i SH grupe proteina.

Sve je veći broj informacija koje ukazuju na značajnu ulogu slobodnih radikala kao medijatora u procesu zapaljenja i oštećenja skeletnih mišića, nastalih tokom i nakon intenzivnog fizičkog napora. Postojanje oksidacionog stresa vidi se u skeletnim mišićima, jetri, krvi, čak i u uzorcima izdahnutog vazduha, kod sportista nakon treninga ili takmičenja. Smatra se da je povećano stvaranje kiseoničkih slobodnih radikala tokom fizičkog napora rezultat povećane potrošnje kiseonika u mitohondrijama i posledične indukcije procesa lipidne peroksidacije. Potrošnja kiseonika takođe je povećana i u periodu oporavka nakon fizičkog opterećenja i u literaturi se ovaj proces opisuje kao „kiseonički dug“. Pri maksimalnom opterećenju kod zdravih neaktivnih osoba taj dug iznosi od 5 do 7,5 litara dok kod vrhunskih sportista može dostići vrednost od 15 do 20 litara kiseonika pa se nameće zaključak da se prilikom intenzivnog fizičkog napora slobodni radikali stvaraju kako u fazi reoksigenacije, tako i u fazi oporavka. Stvaranje slobodnih radikala je intenzivnije ukoliko je kiseonički dug veći.

Bez obzira na podatke o negativnim efektima slobodnoradikalnih procesa, u uslovim in vivo često nije moguće jasno odrediti uzročno-posledičnu vezu u složenom mehanizmu oštećenja ćelije. Još uvek se vode

polemike da li pojava ubrzane lipidne peroksidacije prethodi oštećenju tkiva, ili je samo odraz oštećenja i javlja se kao posledica nastalih metaboličkih disbalansa. Ono što je nesumnjivo jeste da do tih oštećenja dolazi u uslovima nedovoljne zaštite ćelija antioksidacionim elementima. Dostupni podaci ukazuju da svaki antioksidacioni sistem reaguje drugačije na akutna ili hronična opterećenja sve u zavisnosti od svog biohemijskog i molekularnog mehanizma regulacije.

Pored dobro poznate činjenice da pojačana fizička aktivnost povećava stvaranje reaktivnih formi kiseonika i azota (RONS-Reactive Oxygen and Nitrogen Species), takođe je uočeno i da umerena redovna fizička aktivnost dovodi do adaptiranja antioksidacionog sistema i sistema koji popravljaju oksidaciona oštećenja. Zato su najnovija istraživanja u ovoj oblasti stimulirana hipotezom da adaptacija indukovana redovnom fizičkom aktivnošću dovodi do smanjenja nakupljanja oksidacionih oštećenja kako DNA tako i drugih ćelijskih struktura. Mogućnost antioksidacione adaptacije takođe pokreće i pitanje potrebe za dopunskim unosom egzogenih antioksidanata tokom procesa redovnog vežbanja.

Oksidacioni stres i fizička aktivnost

Pojačana fizička aktivnost je postala deo životnog stila savremenog čoveka (rekreacija), a vrlo često se koristi i kao terapijski postupak pri lečenju različitih oboljenja. Prvi rad koji je povezao fizičku aktivnost, slobodne radikale i povećanu lipidnu peroksidaciju objavljen je 1978. godine od strane Dillard-a i sar. koji su u ekspiratornom vazduhu ispitanika (nakon vožnje ergocikla u trajanju od 60 minuta i sa potrošnjom 75% VO₂max) uočili porast nivoa pentana kao indikatora oksidacionog lipidnog oštećenja. Od tada se uvećao broj dokaza koji podržavaju hipotezu da fizička aktivnost može da intenzivira stvaranje slobodnih radikala i vodi ka nastanku oksidacionog stresa. Direktno merenje slobodnih radikala otežano je zbog njihovog kratkog vremena poluživota. Iz tog razloga su se istraživanja, koja su se bavila izučavanjem efekta vežbanja na oksidacioni stres, oslanjala na identifikovanje i merenje markera tkivnih oštećenja izazvanih slobodnim radikalima.

Činjenica da postoje istraživanja u kojima nije dokumentovana povezanost pojačane fizičke aktivnosti sa prisustvom oksidacionog stresa objašnjava se nepostojanjem standardizovane metodologije istraživanja. Nedostaci ispitivanja izvedenih in vivo ogledaju se u tome da se stvaranje slobodnih radikala meri u tkivima nakon pojačane fizičke aktivnosti (vežbanja), dok pravi odnos njihovog stvaranja tokom vežbanja ostaje nepoznat. Sa

druge strane, studije in vitro mere stvaranje slobodnih radikala u neadekvatnim (kontrolisanim) uslovima, tako da imaju ograničenu primenu. Faktori kao što su godine, pol, stanje utreniranosti, različiti protokoli, takođe utiču na kontradiktornost rezultata. Neki produkti oksidacione reakcije mogu da dostignu svoj maksimalni nivo satima ili čak danima nakon završetka vežbanja. Iz tog razloga nepostojanje znakova oksidacionog stresa neposredno nakon vežbanja ne mora da znači da se oksidaciono oštećenje nije i odigralo. Zbog svega navedenog došlo se do zaključka da samo intenzivno ili dugotrajno vežbanje dovode do povećanja stvaranja slobodnih radikala u meri koja prevazilazi postojeću antioksidacionu odbranu.

Oštećenje mišića karakteriše se bolom, razgradnjom mišićnih vlakana, oslobađanjem mišićnih proteina u plazmu i imunim odgovorom u akutnoj fazi, što sve zajedno dovodi do smanjenja mišićnih performansi. Na početku poremećaja javljaju se strukturalne promene miofibrila, sarkoplazmatskog retikuluma i sarkolema. Poremećaj mišićnog citoskeleta javlja se 15 minuta nakon intenzivnog vežbanja. Smatra se da su ovakve promene posledica poremećaja homeostaze kalcijuma. Povećanjem intracelularnog kalcijuma aktiviraju se proteaze i fosfolipaze što prouzrokuje dalje oštećenje organela i ćelija.

Postoji nekoliko potencijalnih izvora u kojima tokom i nakon pojačane fizičke aktivnosti dolazi do stvaranja slobodnih radikala. Važnost izvora varira u zavisnosti od vrste tkiva ili organa, dužine trajanja procesa i tipa fizičke aktivnosti.

Uloga mitohondrija u procesu stvaranja slobodnih radikala tokom i nakon intenzivne fizičke aktivnosti

Intenzivna fizička aktivnost izrazito povećava potrebu organizma za energijom. Da bi se ovo obezbedilo dolazi do povećanja potrošnje kiseonika koja u organizmu može da poraste i 15 puta, a na nivou angažovanih mišića to povećanje može da bude i do 100 puta u odnosu na stanje u mirovanju. Veći deo tog kiseonika se u mitohondrijama koristi u procesu ćelijskog disanja, dok mali deo kiseonika (2-5%) može da se konvertuje univalentno do nekoliko intermedijera (-superoksid anjon radikal, -vodonik peroksid, -hidroksil radikal). Međutim ovom procesu treba pridodati i uticaj povišene telesne temperature kao i sama oštećenja unutrašnje membrane mitohondrija što nivo stvorenih radikala čini većim od onog izračunatog u odnosu na bazalne uslove.

Stvaranje slobodnih radikala u mitohondrijama tokom procesa ćelijskog disanja direktno je vezano

za funkciju NADH-ubihinon reduktaze i ubihinon-citohrom-c-reduktaze. Imajući u vidu da prenos sa dvoelektronskog (NADH) na jednoelektronski nosilac (ubihinon) uključuje stvaranje semiubihinona (QH), ovaj segment elektronskog transportnog lanca postaje primarno mesto stvaranja superoksid anjon radikala. Ovaj radikal se lako redukuje do vodonik peroksida uz pomoć enzima superoksid dismutaze dok metalima katalizovanom Fenton-ovom ili Haber-Weiss-ovom reakcijom između vodonik peroksida i superoksid anjon radikala dolazi do stvaranja izrazito toksičnog hidroksil radikala.

Uloga ksantin oksidaze u procesu stvaranja slobodnih radikala tokom i nakon intenzivne fizičke aktivnosti

Značajan mehanizam pomoću kog intenzivna fizička aktivnost može da doprinese stvaranju slobodnih radikala uključuje i ishemijsko-reperfuzione procese. Intenzivna fizička aktivnost praćena je prolaznom tkivnom hipoksijom u nekoliko organa (bubrezi, splahnična regija) koja nastaje kao rezultat preraspodele krvi u organizmu. Ovim mehanizmom se omogućava zadovoljenje povećanih potreba za kiseonikom skeletnih mišića i kože. Ukoliko povećana koncentracija dopremljenog kiseonika ne odgovara potrebama angažovanih mišića, u njima nastaje stanje relativne hipoksije. Reoksigenacija ovih tkiva se dešava nakon prestanka vežbanja kada i započinje proces stvaranja slobodnih radikala.

Jedan od načina kojim reperfuzija može da dovede do povećanog stvaranja slobodnih radikala je konverzija enzima ksantin dehidrogenaze u prooksidacioni enzim ksantin oksidazu. Tokom ishemije ATP se razgrađuje na ADP i AMP obezbeđujući energiju potrebnu za kontrakciju mišića. Ukoliko je snabdevanje kiseonikom nedovoljno AMP se razgrađuje u hipoksantina koji se zatim konvertuje do ksantina i mokraćne kiseline. Ovaj proces se obavlja uz učesće enzima ksantin oksidaze (XO), pri čemu se vrši jednoelektronska redukcija kiseonika i raste koncentracija superoksid anjon radikala. Da bi se odigrala ova reakcija u tkivu mora da postoji dovoljna količina hipoksantina i ksantina. Dokazano je da nakon intenzivne mišićne kontrakcije dolazi do nakupljanja hipoksantina i mokraćne kiseline u mišićima i plazmi čime se sugeriše da je došlo da aktivacije XO. Uočena je i značajna linearna povezanost između koncentracija mlečne kiseline i nivoa ksantin oksidaze u krvi, što ukazuje da se oksidativni odgovor u anaerobnim uslovima uglavnom bazira na aktivnosti ovog enzima.

Uloga leukocita u procesu stvaranja slobodnih radikala tokom i nakon intenzivne fizičke aktivnosti

Polimorfonuklearni leukociti, cirkulišući monociti i tkivne makrofage predstavljaju važan deo odbrambenog sistema organizma od delovanja mikroorganizama i drugih stranih čestica. Tokom ispoljavanja svoje odbrambene funkcije (fagocitoze) dešavaju se karakteristične promene metabolizma glukoze, kiseonika i lipida, poznate kao „respiratorni prasak“ ili „respiratory burst“. Tom prilikom potrošnja kiseonika povećava se od 2 do 20 puta i udružena je sa odgovarajućim protokom glukoze kroz heksozomonofosfatni šant. Povećana potrošnja kiseonika u neutrofilima i makrofagama tokom procesa fagocitoze postiže se aktivacijom enzimskog kompleksa NADPH oksidaze udružene sa plazma membranom.

Aktivisani kompleks NADPH oksidaze oksiduje citosolni supstrat NADPH u prisustvu kiseonika, koji se zatim univalentno redukuje u superoksid anjon radikal. U fiziološkim uslovima najveći deo stvorenih radikala trebalo bi da bude u formi superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$). Međutim, tokom samog procesa stvara se i velika količina jona koji dovode do pada pH sredine čime se stvaraju povoljni uslovi za generisanje mnogo reaktivnijeg perhidroksil radikala (HO_2^{\cdot}). Superoksid anjon radikal stvoren u oksidaznoj reakciji brzo podleže procesu spontane dismutacije pri čemu se kao krajnji proizvod javlja vodonik peroksid.

Specifični lizozomi neutrofilnih leukocita sadrže poseban oblik peroksidaze poznat kao mijeloperoksidaza. U prisustvu halogenih elemenata (hlor, brom i jod) enzim mijeloperoksidaza katalizuje reakciju njihove oksidacije vodonik peroksidom pri čemu nastaje hipohalogeno kiselina. U uslovima in vivo u neutrofilima ima najviše hlora tako da prilikom ovog procesa dolazi do stvaranja hipohlorne kiseline. I sama hipohlorna kiselina je snažan oksidans i reaguje sa velikim brojem biološki relevantnih molekula (aminokiseline, amini i dr.), a može i da uništava bakterije.

U ispitivanju uloge aktiviranih fagocita u nastanku oksidacionog stresa nakon intenzivne fizičke aktivnosti uočeno je da markeri lipidne peroksidacije u serumu počinju da rastu nakon 45 minuta, vrh dostižu nakon 6-24 sata od prestanka intenzivne fizičke aktivnosti, a nakon 72 sata vraćaju na početnu vrednost. Imajući u vidu vreme potrebno za neutrofilnu infiltraciju, ovaj način ne predstavlja primarni izvor produkcije slobodnih radikala tokom kratkotrajnog vežbanja. On može da posluži kao važan sekundarni izvor stvaranja slobodnih radikala tokom perioda oporavka nakon intenzivne fizičke aktivnosti.

Tokom intenzivne fizičke aktivnosti raste nivo cirkulišućih kateholamina. Oni utiču na oksidacioni metabolizam skeletnih mišića posredstvom aktivacije β -adrenergičnih receptora i aktivacijom mitohondrijalnih mehanizama. Takođe je i proces autooksidacije adrenalina praćen povećanim stvaranjem superoksid anjon radikala. Uočeno je da blokiranje β receptora dovodi do smanjenja koncentracije markera oksidacionog stresa u plazmi kod ljudi koji su izloženi teškom fizičkom naporu. Takođe i autooksidacija mioglobina i hemoglobina može da predstavlja potencijalni izvor stvaranja slobodnih radikala tokom intenzivnog fizičkog napora.

Mišićno oštećenje nastalo kao rezultat pojačane fizičke aktivnosti, razlikuje se i među polovima, što je potvrđeno kako na humanim tako i na životinjskim modelima. Smatra se da su ove razlike posledica delovanja ženskog polnog hormona 17- β -estradiola. Zbog svoje sposobnosti da deluje kao antioksidans i stabilizator membrane, 17- β -estradiol ima pozitivni efekat na snagu mišića i smanjenje oštećenja mišićne membrane.

Mehanizmi oštećenja mišićnih ćelija slobodnim radikalima

Tokom protekle 4 decenije mnoga saznanja vezana za biološke implikacije oksidacionog stresa indukovano pojačanom fizičkom aktivnošću značajno su se dopunila ili izmenila. Danas je široko zastupljeno mišljenje da visok nivo slobodnih radikala može da dovede do oštećenja ćelijskih komponenti, dok nizak i umeren nivo ima regulatorne uloge u ćelijama, kao što je kontrola genske ekspresije, regulacija ćelijskih puteva signalizacije i modulacija skeletne mišićne snage.

Primarni radikali koji se stvaraju u mišićnim ćelijama tokom intenzivne fizičke aktivnosti su superoksid anjon radikal i azotni oksid (NO), pri čemu su oba uključena u aktiviranje različitih ćelijskih mehanizama signalizacije. Glavna mesta stvaranja superoksid anjon radikala u mitohondrijama su kompleksi I i III elektronskog transportnog lanca. Nova otkrića ukazuju da mitohondrije u mišićnim vlaknima tip I (brza) imaju sposobnost da stvaraju veću količinu slobodnih radikala u poređenju sa mitohondrijama iz sporih mišićnih vlakana (tip II). Stvaranje superoksid anjon radikala može da se dešava i na više mesta unutar mišićnih vlakana. Pored mitohondrija u taj proces mogu da budu uključeni i sarkoplazmatski retikulum, sarkoleme i sam citosol. Dismutacijom superoksid anjon radikala nastaje vodonik peroksid, koji je neradikal i slab oksidans sa dugim periodom polu-života što mu omogućava difuziju unutar ćelije kao i preko ćelijskih membrana. Sposobnost vo-

donik peroksida da reaguje sa različitim ćelijskim molekulama omogućava aktiviranje različitih puteva signalizacije i čini ga važnim akterom tog procesa. Azotni oksid (NO) sintetise se iz aminokiseline L-arginina uz pomoć tri različite forme azot-oksidsintetaza (NOS1, NOS2, NOS3). Skeletni mišići sadrže NOS1 i NOS3 dok se NOS2 može naći u skeletnim mišićima tokom njihovog oštećenja ili zapaljenskih stanja. Azotni oksid lako reaguje sa superoksid anjon radikalima pri čemu se stvara jak oksidans peroksnitrat što vodi ka smanjenju koncentracije tiol grupa u ćelijama. Ova modifikacija ćelijskih tiol grupa takođe utiče na promenu velikog broja ćelijskih signalnih procesa.

Lipidna peroksidacija

Kao posledicu svoje hemijske prirode koja se karakteriše nesparenim elektronima u poslednjoj orbitali, slobodni radikali ispoljavaju veliki stepen reaktivnosti. Koji će deo ćelije (proteini, nukleinske kiseline, membranski lipidi, citosolni molekuli) ili ekstracelularne komponente (hijaluronska kiselina, kolagen) reagovati sa slobodnim radikalima, zavisi najpre od prirode samog radikala a zatim i od njegovog izvora i mesta stvaranja. Ćelijska membrana je primarno mesto kontrole ćelijskog rasta, deobe, diferencijacije i smrti ćelije. Masne kiseline u lipidima ćelijskih membrana sadrže različiti broj ugljenikovih atoma (14-24), a prisutne dvogube veze u susedstvu destabilizuju vezu između ugljenika i vodonika metilenske grupe. Oduzimanjem vodonika iz takve metilenske grupe reaktivno sposobnim oksidansom započinje proces oksidacione modifikacije masnih kiselina poznat kao lipidna peroksidacija. Zasićene masne kiseline (ili masne kiseline sa jednom ili dve dvogube veze), otpornije su na oksidaciono oštećenje od polinezasićenih masnih kiselina. Fluidnost ćelijske membrane je u velikoj meri određena prisustvom nezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina koje se nalaze u hidrofobnoj unutrašnjosti lipidnog dvosloja. Proces peroksidacije lipida smanjuje hidrofobnost lipidnog dvosloja, što menja afinitet i interakciju proteina sa lipidima i utiče na procese neophodne za odvijanje velikog broja funkcija membranskih proteina kao što su: deljenje, diferencijacija, fagocitoza, prijem i prenos signala, transport jona i materija i dr. Otvaranjem ovog hidrofobnog prostora ćelijske membrane omogućava se lakše dejstvo fosfolipaze na lipide i proteaze na proteine što dalje ubrzava razgradnju biomolekulskih kompleksa ćelijskih membrana. Ciklus autokatalitičke oksidacije susednih molekula nezasićenih masnih kiselina nastavlja se sve dok se ne desi kolizija dva radikala iz čije reakcije nastaju ne-radikalni produkti. Međutim proizvodi lipi-

dne peroksidacije nagomilani u prethodnom ciklusu mogu da obezbede i bočno grananje radikalskog procesa. Tokom procesa lipidne peroksidacije nastaju različiti proizvodi među kojima je i malondialdehid - MDA. Svoje štetno dejstvo malondialdehid ispoljava reagovanjem sa tiolnim i amino grupama enzima i tako ih potpuno inhibiše.

Oksidaciona modifikacija proteina

Proteini su izuzetno osetljivi na delovanje slobodnih radikala. Promena strukture proteina pod dejstvom slobodnih radikala odvija se u in vivo uslovima i odgovorna je za fiziološki proces starenja, degradaciju i obnavljanje proteina kao i za regulaciju aerobnog i anaerobnog metabolizma. Suština oksidacione modifikacije proteina najbolje je proučena na enzimima jer je moguće pratiti procese njihove inaktivacije (gubitak enzimske aktivnosti) i degradacije. Za razliku od lipidne peroksidacije, modifikacija proteina je brza i linearna (vremenski i koncentraciono), pa predstavlja osetljiviji parametar oksidacione modifikacije biomolekula nego lipidna peroksidacija. Gvožđe predstavlja bitan faktor u oksidacionoj modifikaciji proteina. Smatra se da upravo povećana koncentracija gvožđa stimuliše formiranje slobodnih radikala i posledično dovodi do oštećenja tkiva.

Sistem zaštite aerobnih organizama od toksičnih oblika kiseonika

Iako se slobodni radikali kiseonika stvaraju kao prirodni produkti tokom mnogih bioloških procesa, ozbiljna ćelijska ili tkivna oštećenja se u fiziološkim uslovima retko viđaju. Izuzetak predstavlja proces starenja gde sporo ali kontinuirano delovanje slobodnih radikala vodi organizam ka različitim funkcionalnim poremećajima i neminovnoj smrti. Proces oksidacione modifikacije belančevina, masti i ugljenih hidrata ima opšte biološki karakter, a ukoliko dođe do njegovog značajnijeg intenziviranja predstavlja i univerzalni mehanizam oštećenja ćelija, posebno na nivou membrana. Da bi se u uslovima neposrednog i kontinuiranog delovanja kiseonika ćelije zaštitile od njegovih štetnih posledica, bilo je neophodno da tokom procesa svoje evolucije razviju i sopstveni odbrambeni ili antioksidacioni sistem.

Pod antioksidantima podrazumevamo grupu supstanci koje prisutne u manjoj koncentraciji u odnosu na supstrate koji se oksidišu mogu da spreče ili značajno smanje njihovu oksidaciju. Sa funkcionalnog aspekta antioksidaciona zaštita organizma obuhvata tri nivoa delovanja:

1. prvi nivo obuhvata sisteme antioksidacione zaštite koji, ukoliko je to moguće, u potpunosti sprečavaju endogeno stvaranje slobodnih radikala (transferin, hemoglobin, feritin);
2. drugi nivo odbrane podrazumeva angažovanje sistema u uslovima normalnog i pojačanog stvaranja slobodnih radikala. Prema prirodi i načinu delovanja ovi antioksidanti se mogu podeliti na enzimске i neenzimске. Enzimi (superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza, glutathion reduktaza, glutathion-S-transferaza) čine takozvanu prvu liniju antioksidacione zaštite dok neenzimski antioksidanti predstavljaju sekundarnu liniju odbrane. Prema afinitetu i rastvorljivosti u lipidima neenzimski antioksidanti se dele na lipo i hidro solubilne, čime se istovremeno određuje i mesto njihovog delovanja. Liposolubilni deluju u lipidnoj fazi ćelijske membrane, membranama subcelularnih organela kao i unutar serumskih lipoproteina. Hidrosolubilni deluju u vodenoj fazi, ostvarujući interakciju sa liposolubilnim antioksidantima na graničnoj površini membrane. U neenzimске antioksidante ubrajamo vitamin E, vitamin C, beta karoten, tiolova jedinjenja (glutathion, metionin, cistein), albumine, bilirubin, mokraćnu kiselinu, farmakološki aktivne supstance (nesteroidni antiinflamatorni lekovi, blokatori kalcijuma, ACE inhibitori) i dr.;
3. treći nivo antioksidacione zaštite ostvaruju enzimski antioksidanti koji učestvuju u reparaciji nastalog oksidacionog oštećenja lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina (klasična i fosfolipid-zavisna glutathion peroksidaza, fosfolipaza A-2, glikozilaza, endo i egzozimski nukleaza i dr.)

Mišićna vlakna sadrže i enzimске i neenzimске antioksidanse, čije je delovanje međusobno usaglašeno u cilju regulacije količine slobodnih radikala. Unutar mišićnih vlakana ovi antioksidansi su strateški grupisani u citoplazmi i unutar različitih organela. Takođe se enzimski i neenzimski antioksidansi mogu naći i ekstracelularno kao i u vaskularnom prostoru. Kao glavni antioksidantni enzimi smatraju se superoksid dismutaza, glutathion peroksidaza i katalaza dok dominantne neenzimске antioksidante čine vitamin E, vitamin C i glutathion.

Osetljivost neke ćelije ili tkiva na delovanje slobodnih radikala prvenstveno zavisi od prisustva polinezasićenih masnih kiselina u njima kao i od sopstvenih energetskih potreba. Hidroksilni radikal, koji je u isto vreme i jako reaktivan, nije osetljiv na delovanje nijednog do sada poznatog enzima. Međutim imajući u vidu da je njegov poluživot jako kratak to u isto

vreme predstavlja i prirodni mehanizam zaštite tkiva od njegovog oksidacionog delovanja. Obzirom da u nastajanju ovog radikala bitnu ulogu ima gvožđe, logično je i da proteini koji su uključeni u heliranje gvožđa (transferin i celulozoplazmin) značajno doprinose antioksidacionoj zaštiti organizma.

Uticaj redovne fizičke aktivnosti na adaptaciju antioksidacionog sistema

Redovna fizička aktivnost (vežbanje, trening) dovodi do pojave širokog spektra opštih i specifičnih promena u različitim organima. U tom smislu primećeno je povećanje mišićne mase, snage, poboljšanje funkcije kardiovaskularnog sistema, bolji proces zapažanja, pamćenja i sl. Takođe je utvrđeno da redovno vežbanje smanjuje zastupljenost širokog spektra bolesti povezanih sa povećanom aktivnošću slobodnih radikala, uključujući dijabetes tip II, reumatoidni artritis, Alchajmerovu i Parkinsonovu bolest.

Dobro je poznato da pojačana fizička aktivnost povećava stvaranje reaktivnih formi kiseonika i azota (RONS), ali je takođe uočeno da umerena redovna fizička aktivnost dovodi do adaptiranja antioksidacionog sistema i sistema koji popravljaju oksidaciona oštećenja. Iz tog razloga veliki broj istraživanja stimulisan je hipotezom da adaptacija indukovana redovnom fizičkom aktivnošću dovodi do smanjenja nakupljanja oksidacionih oštećenja kao DNA tako i drugih ćelijskih struktura. Mogućnost antioksidacione adaptacije takođe pokreće i pitanje potrebe za dopunskim unosom egzogenih antioksidanata tokom procesa redovne fizičke aktivnosti.

Positivan efekt treninga na antioksidacioni odbrambeni mehanizam različitih tkiva primećen je kod utreniranih kako životinja tako i ljudi. Poboljšani antioksidacioni status uočen je kod pacova utreniranih plivanjem, zatim na tredmilu i to kako kod onih koji su zdravi tako i kod onih koji su imali dijabetes. Ispitivanjem uticaja starenja i redovnog treninga na antioksidacionu enzimsku aktivnost u skeletnim mišićima pacova primećeno je da stariji pacovi pokazuju značajno nižu aktivnost glutathion peroksidaze. Nakon intenzivnog treninga na tredmilu aktivnost enzima koji metabolišu vodonik-peroksid porasla je do tačke kada je čak bila veća nego kod mladih neutreniranih pacova. Zaključeno je da iako se sa starenjem smanjuje antioksidacioni potencijal u skeletnim mišićima, redovno vežbanje može da sačuva ovu protektivnu funkciju.

I kod sportista je uočeno da redovni trening smanjuje oksidacioni stres nakon vežbanja tako da oni (u odnosu na stepen opterećenja) imaju manje pokazatelje lipidne peroksidacije i pojačan odbrambeni sistem

u odnosu na neutrenirane osobe. Utvrđeno je da je nakon treninga nivo MDA u krvi bio niži od onog nakon akutnog vežbanja, a veći od nivoa MDA u krvi u periodu mirovanja. Ispitivanjem antioksidacionog statusa jako utreniranih trkača (od 80-147 milja nedeljno), srednje utreniranih trkača (od 16-43 milja nedeljno) i neaktivnih osoba utvrđeno je da je antioksidacioni kapacitet značajno povećan kod trkača. Trkači su imali povišenu vrednost vitamina E, GSH i katalaze pri čemu je postojala značajna pozitivna korelacija između nedeljno pređene distance i aktivnosti antioksidacionih enzima. I fudbaleri koji su sprovodili redovni trening su pokazivali poboljšani antioksidacioni status u poređenju sa neaktivnim osobama.

Postoji nekoliko teorija kojima je pokušano da se da objašnjenje adaptacije organizma na oksidacioni stres tokom redovnog vežbanja. Po jednoj teoriji intermedijarni metabolizam se adaptira na povećani zahtev za stvaranjem energije pomoću veće koncentracije relevantnih enzima. Smatra se da količina mitohondrija u mišićima raste ali da raspored enzima u tim ćelijama ostaje konstantan. Međutim, metabolička adaptacija je spor proces. Poluživot citohroma C i citohrom oksidaze je nedelju dana i ima slabo objašnjenu kompleksnu regulaciju koja može da utiče na različite procese tokom faze adaptacije. Malo je verovatno da se brzi antioksidacioni efekt postiže mitohondrijalnom adaptacijom. Pozitivan efekt vežbanja pre se ogleda kroz to da svaka mitohondrija ima relativno smanjen oksidacioni protok čime se i smanjuje stvaranje slobodnih radikala. Neki rezultati ukazuju da regularno vežbanje smanjuje koncentraciju slabo vezanog gvožđa u mišićima, što omogućava zaštitu od mogućeg oštećenja izazvanog Haber-Weiss-ovom reakcijom tokom vežbanja.

Redovna fizička aktivnost ima veliki uticaj i na imuni sistem. Iako utrenirane osobe imaju istu koncentraciju neutrofila kao i neutrenirane, fizičko vežbanje dovodi do smanjenja neutrofilne baktericidne aktivnosti samo kod utreniranih osoba. Ovi rezultati ukazuju da je za utrenirane osobe manje verovatno da će patiti od lokalnog zapaljenja u mišiću koji vežba, ali je mnogo verovatnije da će patiti od običnih infekcija. Smanjeni neutrofilni odgovor može da bude sekundarni efekt koji redukuje tkivno oštećenje tokom vežbanja dok trening ojačava mišićna vlakna i smanjuje mišićno oštećenje.

Jedno od možda najvažnijih otkrića iz oblasti oksidacionog stresa je to da geni koji šifriraju stvaranje antioksidacionih enzima i enzima koji učestvuju u procesu reparacije, reaguju na promenu koncentracije kiseonika u okruženju. Mi danas znamo da organizmi, od jednostavnih bakterija do kompleksnih ćelija sisara, mogu uspešno da se adaptiraju na oksidacioni stres

brzim povećanjem stvaranja antioksidacionih enzima i onih koji utiču na proces reparacije. Skup od nekih 30-40 gena u bakterijama, kvascu i kod sisara uključuje se u brzi i visoko koordinisani odgovor na oksidaciju čime se omogućava ćelijama da prežive oksidacioni atak koji bi u suprotnom bio letalan.

Sve je veći broj dokaza koji ukazuju na činjenicu da povećana produkcija ROS ima ključnu ulogu u regulaciji signalnih puteva neophodnih za adaptivni odgovor skeletnih mišića kako na pojačanu aktivnost tako i na stanja neaktivnosti (imobilizacija). Smatra se da se slobodni radikali ponašaju kao signali u modifikovanju genske ekspresije. Pomoću njih dolazi do aktiviranja ili menjanja aktivnosti brojnih redoks-senzitivnih transkripcionih faktora, kao što je nuklearni faktor-kB (NF-kB), metal-reagujući-vezujuć faktor-1, aktivator protein-1 i heat-shock faktor. Važnu vezu između nivoa slobodnih radikala u ćelijama i skeletne mišićne adaptacije imaju MAPK (mitogen-activated-protein-kinase). Njihova ključna uloga u procesu ćelijske signalizacije ogleda se u konverziji ćelijskih signala u ćelijski odgovor. Sledeća važna veza između slobodnih radikala i remodeliranja skeletnih mišića uključuje redoks regulaciju NF-kB grupe aktivatora transkripcije. Aktivacija ovog mehanizma je neophodna za adaptaciju kako aktivnih mišića tako i atrofičnih, pri čemu se reguliše ekspresija preko 150 gena. Fizička aktivnost pokreće signalni odgovor u skeletnim mišićima utičući na menjanje sinteze proteina i mišićnog fenotipa.

Reid i saradnici prvi su razvili teoretski model kojim su opisali odnos između slobodnih radikala i snage mišićne kontrakcije. Ovaj model polazi od pretpostavke da je mišićni redoks status fiziološki regulisana varijabla koja se održava uz pomoć prilagođavanja nivoa stvaranja slobodnih radikala i ćelijskog antioksidacionog puferskog kapaciteta. Nizak nivo slobodnih radikala prisutnih u mišićima u bazalnim uslovima je neophodan radi održavanja mišićne snage. Uočeno je da je smanjenje koncentracije slobodnih radikala nastalo nakon suplementacije antioksidantima dovelo do smanjenja mišićne snage iako mišić nije bio izložen metaboličkim i mehaničkim izazovima. Skromno povećanje koncentracije slobodnih radikala u skeletnim mišićnim vlaknima dovelo je do pojačanja snage mišića dok je veća koncentracija slobodnih radikala smanjivala mišićnu snagu i to u pozitivnoj korelaciji kako vremenski tako i dozna.

Kao dodatno pitanje razmatra se i činjenica da različiti antioksidacioni enzimi pokazuju i različitu adaptaciju na trening. Odgovori su multifaktorijski i zasnivaju se na specifičnom načinu genske ekspresije za svaki enzim, različitom nivou potrebnom za njihovu indukciju i njihovu interakciju. Nova sinteza enzima

je relativno spora i zahteva energiju pa se verovatno i čuva kao poslednje sredstvo u borbi sa oksidacionim stresom. Glutation peroksidaza uništava krajnje produkte tokom procesa stvaranja slobodnih radikala, njena aktivnost je obično niska, pa je to razlog zašto ovaj enzim obično pokazuje veću trening adaptaciju u odnosu na superoksid dismutazu i katalazu. Utrenirane osobe takođe pokazuju veći protok krvi kroz jetru pa u tome verovatno i leži objašnjenje za veće oslobađanje glutatona iz tog organa.

Poznavanje posebnih karakteristika i regulatornih mehanizama različitih antioksidanata vodi nas ka razvoju adekvatne strategije koja pojačava ćelijski antioksidacioni kapacitet korišćenjem fizioloških i nutricionih metoda i sredstava.

Antioksidaciona suplementacija

Antioksidaciona suplementacija predstavlja uobičajenu naviku kako profesionalnih sportista tako i amatera. Sportisti vrše suplementaciju vitaminima i mineralima da bi poboljšali sportske rezultate, korigovali neadekvatan unos ili ubrzali oporavak. Imajući u vidu prihvaćeno stanovište da oksidacioni stres nastaje kada se naruši ravnoteža između ROS i antioksidanata u korist ROS, logično je očekivati da ravnoteža može biti narušena i ako nivo antioksidanata premaši produkciju ROS. Za

ovu vrstu disbalansa u literaturi je u upotrebi termin antioksidacioni stres.

Antioksidanti u prisustvu ROS mogu da gube ili prime elektrone, postaju nestabilni i reaktivni, pokazuju prooksidacione efekte i postaju štetni. Zato se dobrim antioksidantima smatraju oni koji imaju malu oksidacionu reaktivnost i nizak kapacitet za pokretanje peroksidacije. Potencijalno štetno dejstvo antioksidanata zavisi od njihove koncentracije, redoks potencijala, prisustva drugih antioksidanata, prisustva metala sa promenljivom valencom i aktivnosti endogenih antioksidanata.

U istraživanjima in vivo i in vitro je dokazano da vitamin C, vitamin E, SOD, glutation i karoten imaju potencijal da prouzrokuju antioksidacioni stres. Antioksidantna suplementacija se ne preporučuje pre treninga zbog mogućnosti da negativno utiče na adaptacione procese u mišićima, ali je njihova primena moguća neposredno pre takmičenja imajući u vidu da predstoji fizička aktivnost do iscrpljenosti tokom koje se posledično stvaraju velike količine slobodnih radikala sa mogućnošću nastanka oksidacionog stresa.

Preporuka je da antioksidante treba unositi hranom (voće i povrće) umesto suplementima, dok je najbolji način za povećanje endogene antioksidacione zaštite praktikovanje umerenog vežbanja kao svakodnevne rutine.

LITERATURA

- [1] Astrand PO, Rodahl K, Dahl HA, Textbook of Work Physiology: Physiological Bases of Exercise, Publisher Human Kinetics, 2003.
- [2] Braakhuis AJ, Hopkins WG. Impact of Dietary Antioxidants on Sport Performance: A Review. *Sports Med.* 2015; 45:939-955.
- [3] Cadenas E, Packer L, Traber GM. Antioxidants, oxidants, and redox impacts on cell function - A tribute to Helmut Sies. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2016; 595:94-99.
- [4] Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology.* 2013; 51:15-25.
- [5] Di Meo S, Napolitano G, Venditti P. Mediators of Physical Activity Protection against ROS-Linked Skeletal Muscle Damage. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20: 3024.
- [6] Fisher-Wellman K, Bloomer RJ, Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine,* 2009, 8:1.
- [7] Gebicki JM. Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2016; 595:33-39.
- [8] Gomes MJ, Martinez PF, Pagan LU, Damatto RL, Cezar MDM, Lima ARR, Okoshi K and Okoshi MP. Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget.* 2017; 8(12): 20428-20440.
- [9] Halliwell B, Gutteridge J, *Free radicals in biology and medicine,* Oxford Press, Oxford, 2007
- [10] He F, Li J, Liu Z, Chuang C-C, Yang W and Zuo L. Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise. *Frontiers in Physiology.* 2016; 7:486
- [11] Jackson MJ, Vasilaki A, McArdle A. Cellular mechanisms underlying oxidative stress in human exercise. *Free Radical Biology and Medicine.* 2016; 98:13-17.

- [12] Kawamura T, Muraoka I. Exercise-Induced Oxidative Stress and the Effects of Antioxidant Intake from a Physiological Viewpoint. *Antioxidants*. 2018; 7:119.
- [13] Lichtenberg D, Pinchuk I. Oxidative stress, the term and the concept. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015; 461(3):441-444.
- [14] Nikolaidis MG, Kerksick CM, Lamprecht M and McAnulty SR. Does Vitamin C and E Supplementation Impair the Favorable Adaptations of Regular Exercise? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012; 2012:707941-11.
- [15] Peakea JM, Suzuki K, Coombes JS: The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and the relationship to oxidative stress after exercise. *J Nutr Biochem*, 2007, 18: 357-371.
- [16] Pingitore A, Pereira Lima GP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. 2015; 31(7-8):916-922.
- [17] Poljsak B and Milisav I. The Neglected Significance of "Antioxidative Stress". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012; 2012:480895-12.
- [18] Powers SK, Radak Z, and Ji LL. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. *J Physiol*. 2016; 594.18:5081-5092.
- [19] Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011; 51(5): 942-950.
- [20] Powers S, Duarte J, Kavasis AN, Talbert EE, Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol*, 2009, 95:1-9.
- [21] Powers SK, JacksonMJ, Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev*, 2008, 88:1243-1276.
- [22] Reid MB, Khawil FA, Moddy MR, Reactive oxygen in skeletal muscle: contractility of unfatigue muscle. *J Appl Physiol*, 1992, 75:1797-1804.
- [23] Roy B. Physiology of stress and the involvement of reactive oxidative species: A mini-review. *Quest International Journal of Medical and Health Sciences [Online]*. 2018; 1(1):19-24.
- [24] Slattery K, Bentley D, Coutts AJ. The Role of Oxidative, Inflammatory and Neuroendocrinological Systems During Exercise Stress in Athletes: Implications of Antioxidant Supplementation on Physiological Adaptation During Intensified Physical Training. *Sports Med*. 2015; 45:453-471.
- [25] Steinbacher P, Eckl P. Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle. *Biomolecules*. 2015; 5:356-377.
- [26] Villanueva C. Kross RD. Antioxidant-Induced Stress. *Int. J. Mol. Sci*. 2012; 13, 2091-2109.
- [27] Yavari A, Javadi M, Mirmiran P, Bahadoran Z. Exercise-Induced Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. *Asian J Sports Med*. 2015 March; 6(1): e24898

ZNAČAJ I ULOGA SELENA KAO ANTIOKSIDANTA

AUTORI

Duško Blagojević, Aleksandra Nikolić Kokić, Zorana Oreščanin Dušić, Mihajlo Spasić
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ - Institut od nacionalnog značaja, Univerzitet u Beogradu,
Odeljenje za fiziologiju, Bulevar despota Stefana 142, Beograd, Srbija

SAŽETAK

Značaj seleno kao antioksidanta u organizmima potiče od njegove uloge u strukturiranju i funkcionalnosti enzima glutathion peroksidaze i samim tim u obezbeđivanju ćelijske redoks homeostaze i zaštiti od oksidativnih oštećenja. Selen nije antioksidant per se, ali je neizbežan činilac egzogene antioksidativne odbrane jer 1) nedostatak seleno u ishrani vodi ka ozbiljnim endogenim antioksidativnim disbalansima koji stvaraju uslove za razvoj više tipova patologija i 2) suplementacijom se mogu postići zdravstveni i terapijski učinci. Dosta podataka pokazuje disbalans seleno u različitim oboljenjima, ali svaka suplementacija ne mora po pravilu biti korisna: učinak zavisi od selenskog statusa u organizmu i mestu koje u patologiji i/ili terapiji seleno enzimi zauzimaju. Tako su pokazani pozitivni učinci suplementacije kod bolesnika od ALS, ali u kombinaciji sa drugim aktivnim agensima. Poseban značaj uloge glutathion peroksidaze, a time i seleno je nedavno ukazano u procesima ferroptoze, još jednog oblika strukturirane ćelijske smrti.

Ključne reči: selen, glutathion peroksidaza, suplementacija, ferroptoz

ENGLISH

SUMMARY

Significance of selenium as antioxidant in organisms comes from its role in structure and functionality of enzyme glutathione peroxidase and thus maintaining of cellular redox homeostasis and the protection from oxidative damages. Selenium is not an antioxidant per se but is unavoidable constituent of exogenous antioxidant defense because 1) selenium deficiency in nutrition lead to serious endogenous antioxidant disbalance that made conditions for several types of pathologies, and 2) supplementation can improve health and therapeutic protocols. Many data showed selenium disbalance in different diseases, but every supplementation cannot be beneficial by a rule: effect depends on selenium state in organism and the place that selenium containing enzymes take in pathology and/or therapy. In such a way, positive effects of supplementation in ALS patients were shown, but in a combination with other different agents. Special importance of the role of glutathione peroxidase, and thus selenium has been shown recently in process of ferroptosis, another way of structured form of cellular death.

Istraživanja značaja i uloge selena u životnoj sredini, živom i u zdravlju ljudi su u Srbiji permanentno prisutne. U biologiji i medicini doživljavaju ekspanziju paralelno sa istraživanjima slobodno-radikalnih procesa u organizmima, i činjenicom da je selen integralni deo enzima glutathion peroksidaze (GPx) i samim tim sistema antioksidativne zaštite. Ozbiljnost tih istraživanja potvrđuju i tri simpozijuma o selenu održana 90-ih pod okriljem SANU. Prva, održana 1991. prizvala je i grupu tada vrhunskih inostranih istraživača i u diskusiji sa njima jasno pokazala aktuelnost rezultata i visok stepen dostignutog saznanja naučnika iz Srbije. Prvi simpozijum je kroz multidisciplinarni pristup ukazao da je zemljište u Srbiji deficitarno u sadržaju selena, da ga stoga biljke manje sadrže i da je generalno slabo prisutan u ishrani životinja i ljudi. Rezultati merenja aktivnosti GPx u krvi ljudi različite dobi i zanimanja su pokazala nisku vrednost, što je ukazivalo da je stanovništvo u Srbiji generalno takođe selen deficitarno. U tom periodu se pojavljuju i prvi suplementi sa selenom i počinju istraživanja vezana za ulogu selena u raznim oboljenjima, kao i prve studije efekata tretmana sa njima. Moj rad vezan za ulogu selena u organizmu iniciran je upravo u tom momentu i u samom početku mog naučno-istraživačkog rada, a razvijao se ranih devedesetih godina prošlog veka (od 1991) u Odeljenju za Endokrinologiju i metabolizam Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, pod rukovodstvom pok. Akademika Vojislava Petrovića, potonjeg Odeljenja za fiziologiju kojim je rukovodio Prof. Mihajlo Spasić. Interesovanje za selen u našim istraživanjima bilo je prvenstveno vezano upravo za činjenicu da je neophodan za aktivnost glutathion-peroksidaze, enzima koji uklanja lipidne perokside a predstavlja ključnu komponentu enzimskog sistema antioksidativne zaštite aerobnih organizama. Iako su prvi radovi išli ka istraživanjima regulacije nastanka/uklanjanja reaktivnih vrsta kiseonika u metaboličkom miljeu termogeneze i adaptacije na hladnoću, paralelno su svoj odraz nalazila i u primenjenim istraživanjima uloge antioksidativne odbrane u različitim patologijama ljudi. U tom periodu počela je i naša saradnja sa lekarima vezana za specifična oboljenja kod kojih bi deficitacija selena mogla da ima patofiziološki značaj. Jedno od takvih oboljenja je i amiotrofična lateralna skleroza. (Slajd 2). Imajući u vidu da su prethodna istraživanja pokazala umerenu selen deficitaciju u populaciji Srbije mi smo formulisali preparate za suplementaciju obolelih od ALS (Alsamin, kasnije Alsamet) koji su sadržali i organski vezan Se i koji su pokazali pozitivne efekte kod obolelih od ALS. (Slajd 3). Nekako se progres ovih istraživanja poklopio i sa trećim

naučnim skupom o selenu u SANU. Izabrani radovi sa treće konferencije publikovani su u časopisu *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* (1998), čime je, među prvima razbijena blokada i sankcije na publikovanje radova iz Srbije u inostranim časopisima koja je tih godina još uvek bila aktuelna. Ova konferencija je i jasno pokazala razvoj istraživanja značaja selena u Srbiji i sve više otkrivala ulogu koju ima u zdravlju ljudi, ali i fundamentalnu ulogu i značaj selena kao antioksidanta.

Selen nije antioksidant per se. On je sastavni deo proteina enzima iz 3 familije: glutathion peroksidaza (GPx), tioredoksin reduktaza (TrxR) i jodotironin dehidrogenaza (DIO), kao i različitih klasa seleno proteina koji imaju ulogu u formiranju, sklapanju i sekreciji glikoproteina, regulaciji stresa endoplazmatičnog retikuluma (ER), svojstva vezivanja za DNK i, konačno, i same regulacije transporta i veživanja selena. Stoga, posmatrati selen kao antioksidans ima samo posredan smisao, ali je značaj veliki, jer jedinstvenost selena leži u sposobnosti GPx da uklanja lipidne perokside i time stvara oksidovano redoks stanje u ćeliji, kao potrošač redukovano glutathiona i, s druge strane, održavanja optimalnog redoks redukcionog stanja (preko aktivnosti TrxR). Stoga je njegova suplementacija jasno indicirana kao protektivna i terapijska. Međutim, s obzirom na hemijski potencijal selena, reduktivna stanja i jedinjenja koja gradi ili u kojima se u hrani nalazi, uvek se postavljalo pitanje u kojoj formi. Sa aspekta apsorpcije, još je prvi simpozijum u SANU ukazao, a drugi potvrdio da je organski vezan (za cistin ili metionin) selen adekvatniji, zbog direktne apsorpcije, mada se i selen u formi selenita ili selenata apsorbuje, ali drugim putevima koji uključuju nekoliko metaboličkih koraka i sa manjom stopom apsorpcije. U sistemsku distribuciju se uključuje vezan u proteine plazme, pri čemu je najzastupljeniji kao Se-albumin.

Svi seleno-proteini su osetljivi na unos selena ishranom koja generalno zavisi od prosečnog unosa hrane, oblika koji se nalazi u njoj, a potom i zdravstvenog stanja, starosti, životnog stila i genetičke polimorfnosti Se-proteina same jedinice. Međutim, distribucija selena u organizmu prati hijerarhiju koja je postavljena prema zahtevima dominantnog tkiva i biološkoj funkciji seleno-proteina. To znači da postoje dominantna tkiva koja u prvom stepenu apsorbuju selen zbog regularnosti razvoja i esencijalne funkcije (mozak i endokrini organi) i preferencijalna biosinteza potrebnih seleno proteina da bi se održala esencijalna fiziološka aktivnost. Iz prethodna dva principa je jasno da je distribucija selena polno specifična, jer je polno specifična i ekspresija seleno proteina, a medicinski efekti polno dimorfni (u

većini tkiva žena efektivnije se zadržava selen, izuzev gonada). Rezultati različitih studija suplementacije selenom jasno potvrđuju ne samo razlike tokom same i u samoj suplementaciji, već i u učinku suplementacije selenom u više oboljenja koja su prisutna i kod žene i kod muškaraca.

Jasno je da će sami efekti selena biti zavisni od samog stanja u kome se suplementacija preduzima i doze koja se unosi. Dosta rezultata govori u prilog suplementaciji selenom, ali je sve više i onih koji upozoravaju da prekomeran unos nije adekvatan. Za potpunu sliku nedostaju ciljne studije, mada su neke ukazale na nekoliko principa kojise svi mogu sažeti u adekvatnost pristupa. Studija procene suplementacije selenom i vitaminom C u prevenciji kancera (SELECT) je pokazala klasičnu U krivu odnosa između količine Se u organizmu (Se statusa) i stepena oštećenja DNK i učestalosti raka prostate u Holandiji. Suplementacija je adekvatna u slučaju nedostatka selena u organizmu: efikasnost joj se povećava, a učestalost kancera smanjuje, ali samo do optimalne koncentracije selena u organizmu u okvirima fiziološke homeostaze. Dalja suplementacija i povećanje koncentracije u organizmu ne dovode do boljitka neminovno, već se incidenca kancera može i povećati. Pristup treba da je individualan, a deficijenciju selenom treba utvrditi kao činjenicu. Vreme suplementacije je određeno krajnjom tačkom postizanja maksimalne optimalne koncentracije. Inače, status selena se može pratiti određivanjem aktivnosti Se-enzima ili količinom prisutnom u eritrocitima ili ćelijama dlake, npr. I nadalje, uloga selena strogo zavisi od dominantnog procesa u patogenezi i mesta koje u odnosu na metaboličke i regulatorne procese imaju Se zavisni proteini ili enzimi.

Najnoviji rezultati pokazuju da je u nedavno definisanoj formi ćelijske smrti-feroptoziključni enzim selen zavistan (GPx4) i izgleda da je u ranim stadijumima ALS-a dominantno forma smrti motornih neurona upravo feroptoza. Izloženi povećanom prisustvu gvožđa, motoni neuroni štite sebe oksidujući fero jone (Fe^{2+}) uferi jone (Fe^{3+}) u ekstracelularnom prostoru i deponujući ih u sivu materiju precentralnog girusa. Fe^{3+} može biti redukovano do Fe^{2+} askorbatom. EPR spektroskopija je

identifikovala askorбил radikale u CSF uzetim od ALS pacijenata ali ne i kod ne ALS kontrola. Dodatak H_2O_2 u CSF od ALS pacijenata provocirao je dalju produkciju askorбил radikalai građenje $\bullet OH$ radikala ex vivo. Nasuprot tome dodatak mokračne kiseline (endogeni antioksidant) u CSFALS pacijenata ex vivouklonio je produkciju $\bullet OH$ radikala. Gvožđe u fero obliku može učestvovati u Fentonovoj reakciji ekstracelularno u CSF od ALS pacijenata jer se H_2O_2 kontinuirano otpušta iz neurona. Ta reakcija generise $\bullet OH$ radikale koji uzrokuju lipidnu peroksidaciju ćelijskih membrana. Imuno-histohemijska ispitivanja su identifikovala produkte peroksidacije ω -6-polinezasićenih masnih kiselina u motornim neuronima kičmene moždine sporadičnih ALS pacijenata. Fero jone iz CSF mogu apsorbovati motorni neuroni preko transferin receptora (TFR1) i redukovati do Fe^{2+} uz učešće dvo-valentnog metal (jon) transportera 1 (DMT1). Tako Fe^{2+} može promovisati Fentonovu reakciju unutar ćelija motor neurona indukujući unutar ćelijsku lipidnu peroksidaciju. Pod uslovima nedovoljne količine glutationa i niske GPx4 aktivnosti, može se desiti indukcija ćelijske smrti feroptozom. Povećana produkcija gvožđe vezujućeg proteina lakto-transferina čija je količina povećana u korteksu ALS pacijenata ukazuje da je feroptoza možda dominantna forma ćelijske smrti u ranim stadijumima ALS-a. Ipak, ukupan mehanizam neurodegeneracije kod ALS-a ni danas nije potpuno razjašnjen. Danas ubedljivi dokazi govore o tome da je ALS multi-sistemska bolest. Nedavni rezultati potvrđuju da je kombinovani pristup koji cilja različite patogene mehanizme korisna terapijska strategija u ALS-u, koja u izvesnom stepenu uključuje selen, što smo i mi pokazali krajem devedesetih godina.

Iako je selen dosta izučavan, postoji i dalje potreba za sagledavanjem njegovog značaja u čitavom spektru fizioloških procesa i regulaciji redoks ravnoteže. Osim toga, i dalje su otvorena pitanja učinaka suplementacije, posebno u kontekstu nepoznanica kojim putem se redoks ravnoteža uspostavlja i u kojim i čime izazvanim patološkim stanjima. Rezultati ukazuju da selen može poboljšati stanje, ali da je potreban u širem terapijskom kontekstu i u kombinaciji sa drugim agensima.

LITERATURA

1. Vujic I., Demajo M., Mandic M., Spasic M. and Saicic, Z.S. (1991). Influence of pretreatment with selenous yeast on radiation sensitivity. In: Anticarcinogenesis and Radiation Protection 2, eds. O.F. Nygaard and A.C. Upton, Plenum Press, New York and London, pp.323-326.
2. Spasic M. and Petrovic V.M. (1991). GSH-Px, antioxidants and adaptations to environmental conditions. International Symposium on Selenium, Belgrade, May 12-15, Book of abstracts, p. 22.

3. Spasic M.B., Buzadzic B., Saicic Z.S., Korac B., Blagojevic D. and Petrovic V.M. (1991). GSH-Px activity in blood of the human populations from eastern and southern Serbia - relation to other antioxidative enzymes. Int. Symp. on Selenium, Belgrade, May 12-15, Book of Abstracts, p.69.
4. Simovic M., Spasic M.B., Saicic Z.S., Stanimirovic D., Buzadzic B., Korac B. and Markovic M. (1993). The activities of glutathione-dependent antioxidative enzymes in the brain tissue of the rat subjected to combined radiation injury. Conf. on Selenium, Belgrade, Yugoslavia, June 22-23, Book of abstracts, p. 79.
5. Griesser-Aleksic N., Nikolic V., Bogdanovic G., Baltic V., Spasic M. (1994). Prevencija kardiotsicnosti doxorubicin-a selenom. Onk.arhiv 2, 195-197.
6. Spasic M., Korac B., Blagojevic D., Buzadzic B., Saicic Z.S. and Nikolic V. (1995). The role of selenium supplementation on attenuation of toxic doxorubicin effects. In: Scientific meetings LXXVIII, Book 6, Conference on Selenium, pp.119-130. SANU, Beograd.
7. Petrovic V.M., Buzadzic B., Saicic Z.S. and Spasic M.B. (1995). Selenium metabolism with the special interest in Se-dependent glutathione peroxidase. In: Scientific meetings LXXVIII, Book 6 Conference on Selenium, pp. 3-12. SANU, Beograd.
8. Jovanovic A., Grubor-Lajsic G., Djukic N., Telesmanic M., Gardinovacki G. and Spasic M.B. (1995). Effect of selenium supplementation on GSH-Px activity in tissues of carp (*Cyprinus carpio* L.). In: Scientific meetings LXXVIII, Book 6, Conference on Selenium, pp.99-104. SANU, Beograd.
9. Jovic M., Korac B., Buzadzic B., Saicic Z.S., Spasic M.B. and Petrovic V.M. (1995). The activity of Se-dependent GSH-Px in the patients with schizophrenia. In: Scientific meetings LXXVIII, Book 6, Conference on Selenium, pp.195-203. SANU, Beograd.
10. Petrovic J., Vucetic J., Vrvic M.M., Spasic M.B. and Vujic I. (1996). Lung cancer: radiotherapy and selenium concentration in blood. Third Int. Symp.: Selenium in Geochemistry and Medicine, November 3-5, Belgrade, Book of Abstracts, p.74.
11. Apostolski S., Marinkovic Z., Nikolic A., Blagojevic D., Spasic M.B. and Michelson A.M. (1998). Glutathione peroxidase in Amyotrophic Lateral Sclerosis - the Effect of Selenium Supplementation, Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology 17, 325-329.
12. Blagojevic D., Buzadzic B., Korac B., Saicic Z.S., Spasic M.B., Petrovic V.M. (1998). Seasonal changes in selenium dependent GSH-Px activity in ground squirrels (*Citellus citellus*). Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology. 17, 241-250.
13. Buzadzic B., Blagojevic D., Korac B., Saicic Z.S., Spasic M.B., Petrovic V.M. (1998). Seasonal changes in dependent GSH-Px activity in the kidney of euthermic ground squirrels (*Citellus citellus*). Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology 17, 271-276.
14. Stevic Z., Nikolic A., Blagojevic D., Saičić Z., Kocev N., Apostolski S, Spasić M. A controlled trial of combination of methionine and antioxidants in ALS patients. *Jugoslov. Med. Biochem.* 2001; 20, 223-228.
15. Nikolić A., Blagojević D., Stević Z., Saičić Z., Spasić M and Niketić V. Activities of AD enzymes in the blood of ALS patients-base for use of antioxidants in the treatment of ALS. *Proceeding of the 11 Bient Meeting of the Society for Free Radical Research Internentional* 2002; 321-326.
16. Nikolic AL, Stevic Z, Blagojevic D, Saicic ZS, Spasic MB. Activities of antioxidant defense enzymes in the blood of individuals with Leu144Phe Mutation. *Jugoslov. Med. Biochem.* 2005; 24: 111- 114.
17. Nikolić-Kokić A, Stević Z, Stojanović S, Blagojević D P, Jones DR, Pavlović S, Niketić V, Apostolski S, Spasić M B. Biotransformation of nitric oxide in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Redox Report.* 2005; 10, 265-270.
18. Nikolić-Kokić A, Stević Z, Blagojević DP, Davidović B, Jones DR, Spasić MB. Alterations in the antioxidant defence enzymes in SALS and FALS (Leu144Phe) patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2006; 44, 589-593.
19. Spasojević I, Stevic Z, Nikolić-Kokić A, Jones DR, Blagojević D, Spasić MB. Different roles of radical scavengers - ascorbate and urate in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Redox Report.* 2010; 15(2):81-86.
20. Ignjatović A, Stević Z, Lavrić A, Nikolić-Kokić A, Blagojević D, Spasić MB, Spasojević I. Inappropriately chelated iron in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotrophic Lateral Sclerosis.* 2012, 13(4):357-62.

FOSSA PTERYGOPALATINA - CT MORFOMETRIJA I KLINIČKI ZNAČAJ

AUTORI

Miroslav Radunović, Batrić Vukčević, Marija Abramović, Nemanja Vukčević, Aleksandra Vuksanović-Božarić
Katedra za Anatomiju, Medicinski fakultet, Univerzitet Crne Gore; Podgorica, Crna Gora

SAŽETAK

Pterigopalatinska jama je duboki prostor u viscerokranijumu koji sadrži maksilarnu arteriju i nerv, pterigopalatinski ganglion, kao i živac pterigoidnog kanala. Endoskopski pristup ovoj jami se zasniva na adekvatnoj preoperativnoj dijagnostici (poput kompjuterizovane tomografije). Cilj rada je bio utvrditi morfometrijske karakteristike pterigopalatinske jame i njenih komunikacija, kao i nekoliko prethodno neobjavljenih morfometrijskih tačaka. 100 CT skenova (56 ispitanika muškog i 44 ženskog pola) je analizirano u aksijalnim, koronalnim i sagitalnim presjecima, kao i u 3D rekonstrukcijama. Rezultati su pokazali da muškarci imaju veći centralni promjer i dužinu okruglog otvora, kao i dužinu pterigoidnog kanala. Centralni dijametar okruglog otvora i pterigoidnog kanala su bili značajno manji od njihovih prednjih i zadnjih dijametara. Dužina pterigoidnog kanala od 12.1 mm je indikator za prisustvo tipa 3 pterigoidnog kanala (sa senzitivnošću od 83% i specifičnošću od 85%). Nove mjere prezentovane u ovom radu (npr. ugao između sfenopalatinskog otvora i pterigoidnog kanala, novi aspekt razumijevanja okruglog otvora, udaljenost između zadnjeg zida maksilarnog sinusa i okruglog otvora/pterigoidnog kanala itd.) mogu biti od značaja u kliničkoj anatomiji pterigopalatinske jame.

Ključne reči: kompjuterizovana tomografija; pterigoidni kanal; pterigopalatinska jama

ENGLISH

SUMMARY

The pterygopalatine fossa is a deep viscerocranial space containing the maxillary artery and nerve, the pterygopalatine ganglion, and the nerve of the pterygoid canal. The endoscopic approach to this area relies on adequate preoperative imaging, such as computed tomography (CT). The aim was to determine the morphometric characteristics of the pterygopalatine fossa and its communications, including several previously unpublished measurements. 100 CT scans (56 male and 44 female patients; axial, coronal and sagittal slices as well as 3D reconstructions) were analyzed. The central diameter and the length of the foramen rotundum, as well as the length of the pterygoid canal were significantly larger in men. The central diameters of the foramen rotundum and the vidian canal were significantly smaller than their anterior and posterior transverse diameters. The vidian canal length of 12.1 mm indicates the presence of the type 3 VC with a sensitivity of 83% and a specificity of 85%. Several new descriptions of the pterygopalatine fossa are presented here (such as the angle between the sphenopalatine foramen and the vidian canal, a new aspect in the understanding of the FR, and the distance between the posterior wall of the maxillary sinus to the vidian canal and the foramen rotundum), which might prove useful in the clinical anatomy of pterygopalatine fossa.

Key words: computerized tomography; pterygoid canal; pterygopalatine fossa

UVOD

Pterigopalatinska jama (fossa pterygopalatina, FPP) je duboki prostor viscerokranijuma lociran ispred pterigoidnog nastavka sfenoidalne kosti, lateralno od uspravnog lista nepčane kosti i iza maksile. Lateralno, pterigopalatinska jama komunicira sa infratemporalnom jamom kroz pterigomaksilarnu fisuru (PMF). Nosna duplja i FPP komuniciraju kroz sfenopalatinski otvor (foramen sphenopalatinum, FSP). Donja orbitalna fisura spaja FPP i orbitu. Pozadi, FPP komunicira sa srednjom lobanjskom jamom kroz okrugli otvor (foramen rotundum, FR), kao i sa proderanim otvorom kroz pterigoidni Vidijev kanal (canalis pterygoideus, CP). Acar i saradnici su predložili klasifikaciju CP na osnovu njegove lokalizacije: tip 1 (CP u krovu FPP), tip 2 (parcijalna protruzija CP u sfenoidalni sinus), tip 3 (totalna protruzija). Palatovaginalni kanal je komunikacija FPP i nazofarinksa, dok palatinalni otvori predstavljaju komunikaciju FPP i usne duplje.

Chen i saradnici su prezentovali topografsku podjelu FPP na 5 djelova: prvi - veliki palatinalni kanal (od tvrdog nepca do FPP), drugi - infrapterigopalatinski (od PMF do pterigopalatinskog gangliona), treći - ganglionski (u nivou gangliona), četvrti (iznad gangliona) i peti segment (krov FPP).

Klinički značaj FPP se nalazi u brojnim komunikacijama sa okolnim prostorima, kao i strukturama koje se u njoj nalaze: maksilarna arterija i nerv, pterigopalatinski ganglion, kao i živac pterigoidnog kanala. Normalna anatomija FPP se može izmijeniti usljed ekspanzivnih ili inflamatornih lezija. Koštane strukture se koriste kao anatomske parametri u dijagnostici i liječenju patoloških procesa viscerokranijuma. Stoga, preoperativni pristup u hirurškom liječenju ovih oboljenja mora uključivati savremenu radiološku dijagnostiku poput kompjuterizovane tomografije (CT).

CILJ RADA

Cilj rada je bio utvrđivanje morfometrijskih karakteristika FPP i njenih komunikacija, kao i izvještavanje o nekoliko mjerenja koja ranije nisu objavljivana. Rezultati ove studije mogu uticati na hirurgiju FPP, posebno na endoskopske pristupe.

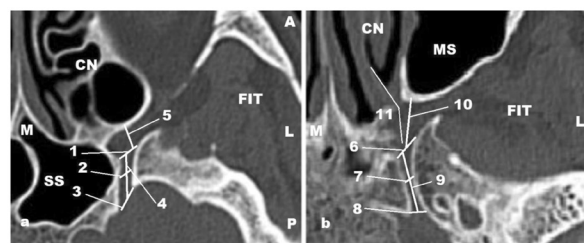
METODE RADA

Sprovedena je retrospektivna studija na 100 ispitanika (56 muškog i 44 ženskog pola, starosti 33-62 godine). U studiju nisu uključeni slučajevi preloma kostiju lica, skeletnih disrupcija, kao ni pacijenti sa sinonazalnim tumorima, inflamatornim lezijama ili prethodnim opera-

cijama ove regije. Takođe, isključeni su slučajevi sa pneumatizovanim pterigoidnim nastavkom ili zadnjim zidom maksilarnog sinusa. Svi slučajevi su skenirani na SOMATOM Sensation 64 MSCT skeneru. Za analizu snimaka je upotrijebljen syngo fastView softver, sa analizom nativnih skenova, kao i multiplanarnih rekonstrukcija.

Aksijalni snimci su korišteni za analizu supragangli-onarnog segmenta (po Chen i saradnicima - Slika 1). Upotrijebljen je snimak sa prikazanim najvećim dijametrom i ukupnom dužinom FR, CP i FSP. Mjerali smo:

1. poprečni dijametar FR i CP na tri mjesta: prednji i zadnji otvor i centralni segment
2. dužina FR i CP
3. direktno rastojanje između zadnjeg zida maksilarnog sinusa i prednjeg otvora FR i CP
4. ugao između osovine FSP i osovine CP



Slika 1. Aksijalni presjek lijeve FPP korišten za mjerenje CP, FR i FSP. A - anteriorno; P - posteriorno; M - medijalno, L - lateralno. MS - maksilarni sinus. FIT - fossa infratemporalis. SS - sfenoidalni sinus. CN - cavitas nasi. a - nivo FR (1, 2 i 3 - poprečni dijametar prednjeg, centralnog i zadnjeg segmenta FR). 4 - dužina FR. 5 - udaljenost zadnjeg zida MS od FR. b - nivo CP (6, 7 i 8 - poprečni dijametar prednjeg, centralnog i zadnjeg segmenta CP). 9 - dužina CP. 10 - udaljenost zadnjeg zida MS i CP. 11 - ugao između osovine FSP i CP.

Koronalni snimci su korišteni za analizu tipa CP po Acar i saradnicima.



Slika 2. Tri tipa CP. a - tip 1. b - tip 2. c - tip 3. Strelica pokazuje CP. S - superiorno. I - inferiorno. SS - sfenoidalni sinus.

Korišten je standardni protokol deskriptivne statistike, uključujući i Shapiro-Wilk i Kolmogorov-Smirnov test distribucije, Levene test homogenosti, Studentov t-test, ANOVA i Hi-kvadrat test. ROC krivulja je korištena za izračunavanje cut-off vrijednosti dužine CP za predikciju tipa 3 kanala. $p < 0.05$ je smatrano statistički značajnom vrijednošću.

REZULTATI

Sve izmjerene vrijednosti na desnoj i lijevoj strani se nisu značajno razlikovale. Ovaj zaključak je postignut i kada su u pitanju muški i ženski ispitanici.

U Tabeli 1. su rezultati mjerenja komunikacija FPP. Nađeno je da je centralni dijametar FR veći kod muškaraca ($p < 0.01$ na desnoj i $p = 0.012$ na lijevoj strani). Isti zaključak je postignut prilikom upoređivanja dužine FR muškaraca i žena ($p = 0.039$ na desnoj i 0.015 na lijevoj strani). Takođe, muškarci su imali duži CP ($p < 0.01$). ANOVA je pokazao značajnu razliku između poprečnih dijametara FR bilateralno u oba pola - najveći je bio zadnji otvor, zatim prednji i na kraju centralni segment ($p < 0.01$).

Tabela 1. Rezultati mjerenja promjera komunikacija FPP. Dat je raspon između minimalne i maksimalne vrijednosti (u zagradama srednja vrijednost \pm standardna devijacija). Sve mjere su date u milimetrima.

		Muškarci		Žene	
		Desno	Lijevo	Desno	Lijevo
Poprečni dijametar FR	anteriorno	3.8 – 6.7 (4.5 \pm 0.6)	3.6 – 6.6 (4.3 \pm 0.6)	3.7 – 6.3 (4.6 \pm 0.6)	3.3 – 6.6 (4.5 \pm 0.7)
	centralno	1.3 – 2.5 (1.6 \pm 0.3)	1.2 – 2.5 (1.6 \pm 0.3)	1 – 2.2 (1.4 \pm 0.3)	1.1 – 2 (1.5 \pm 0.2)
	posteriorno	4.0 – 6.9 (5.3 \pm 0.6)	4.2 – 7 (5.3 \pm 0.6)	4 – 6.8 (5.2 \pm 0.6)	4.1 – 6.3 (5.1 \pm 0.5)
Dužina FR		9 – 17.5 (12.2 \pm 2.2)	7.5 – 1.6 (11.2 \pm 2.1)	8 – 17.5 (12.1 \pm 2.3)	7.5 – 17 (11 \pm 2.1)
Poprečni dijametar CP	Anteriorno	2.4 – 4.9 (3.6 \pm 0.5)	2 – 3.9 (3.6 \pm 0.6)	1.9 – 4.8 (3.6 \pm 0.5)	1.9 – 4.7 (3.5 \pm 0.5)
	centralno	1.1 – 3.1 (2 \pm 0.4)	1.1 – 3 (2 \pm 0.4)	1.3 – 3 (2 \pm 0.5)	2.3 – 2.9 (2 \pm 0.4)
	posteriorno	2.1 – 5.6 (3.6 \pm 0.7)	2.1 – 5.5 (3.6 \pm 0.7)	2.0 – 5.4 (3.6 \pm 0.6)	2 – 5.4 (3.6 \pm 0.7)
Dužina CP		9 – 13 (11.9 \pm 0.9)	9.2 – 13.6 (12 \pm 1)	8.7 – 12.5 (11.1 \pm 1)	8.9 – 12.4 (10.7 \pm 0.8)

Tabela 2. sadrži rezultate mjerenja udaljenosti maksilarnog sinusa od prednjeg otvora CP i FR, kao i vrijednosti ugla između osovine FSP i CP. Muškarci su imali veći ugao između FSP i CP ($p = 0.014$ desno i 0.02 lijevo). Udaljenost maksilarnog sinusa od CP je bila veća nego udaljenost sinusa od FR ($p < 0.01$ u oba pola bilateralno).

Tabela 2. Rezultati mjerenja različitih udaljenosti unutar FPP.

		Muškarci		Žene	
		Desno	Lijevo	Desno	Lijevo
Udaljenost MS i CP (mm)		6.1 – 9.2 (8.3 \pm 0.6)	6 – 9 (8.3 \pm 0.6)	6.2 – 9 (8.3 \pm 0.7)	6.2 – 9 (8.2 \pm 0.6)
Udaljenost MS i FR (mm)		4.4 – 8.3 (6.3 \pm 0.8)	4.4 – 8.5 (6.3 \pm 0.7)	4.5 – 8.3 (6.4 \pm 0.8)	4.8 – 8 (6.3 \pm 0.6)
Ugao FSP i CP (stepeni)		125.3 – 163.3 (148.4 \pm 6.7)	122 – 162 (147.1 \pm 7.3)	120 – 162 (144.2 \pm 10.1)	119 – 162 (143 \pm 9.8)

U Tabeli 3. je prikazana zastupljenost različitih tipova CP na analiziranom materijalu. Hi-kvadrat test nije pokazao značajnu razliku upoređujući lijevu i desnu stranu, kao i dva pola. Slika 4 pokazuje različite tipove CP.

Tabela 3. Tri tipa CP na osnovu podjele po Acar i saradnicima.

		Muškarci		Žene	
		Desno	Lijevo	Desno	Lijevo
Tip CP (%)	Tip 1	61	60	59	60
	Tip 2	32	34	35	33
	Tip 3	7	6	6	7
Total (%)		100	100	100	100

ROC krivulja je pokazala da dužina CP od 12.1 mm ili više sa senzitivnošću od 83% i specifičnošću od 85% ukazuje na prisustvo tipa 3 kanala (AUC = 0.74).

DISKUSIJA

Nekoliko prethodno neobjavljenih mjerenja je prikazano u ovom radu (ugao između FSP i CP, kao i udaljenost između maksilarnog sinusa i CP i FR). Ugao između FSP i CP (prosječno 145.7°) može inspirisati nov endoskopski pristup FPP kroz FSP. Razlika između udaljenosti maksilarnog sinusa od CP i od FR pokazuje da se FPP medijalno širi. Hipotetički, transmaksilarni pristup FPP bi bio efikasniji u pristupu FR nego u pristupu CP. Takođe, u prevenciji jatrogenih lezija maksilarnog nerva, mora se uzeti u obzir blizina FR maksilarnom sinusu.

Acar i saradnici su prijavili učestaost tipa 1 CP od 55.6%, tipa 2 u 34.8% i tipa 3 u 9.6% (u studiji na 250 ispitanika), što je podudarno ovdje prezentovanim rezultatima. Mohebbi i saradnici opisuju protruziju CP u 28% slučajeva, dok je 48% slučajeva imalo parcijalnu protruziju, a 24% je pokazalo CP u potpunosti unutar krova FPP. Međutim, u njihovoj studiji je 54% pacijenata imalo pneumatizovan pterigoidni nastavak što je možda uticalo na rezultate. Neophodno je ispitati uticaj pneumatizacije okolnih kostiju na anatomiju komunikacija FPP. Prosječna dužina CP od 11.4 mm je podudarna dužini koju su objavili Acar i saradnici (12.9 mm). Cut-off vrijednost od 12.1 mm značajno predviđa prisustvo tipa 3 CP. Ovaj rezultat može biti koristan u transsfenoidalnom pristupu CP sa zaključkom da su kanali koji potrudiraju u sinus najčešće duži od 12.1 mm. Podrazumijeva se da je danas, u eri moderne CT dijagnostike, sve manje potrebno predviđanje tipa CP - ali ovaj rezultat može biti inspiracija za buduća istraživanja dužine živca pterigoidnog kanala u različitim tipovima CP, kao i mogućim kliničkim konsekvencama.

Daniels i saradnici opisuju FR kao „sagitalno orijentisan kanal“, što je jedan od prvih opisa FR kao kanala, za razliku od klasične anatomije koja razumije FR kao otvor. Ovdje prezentovana mjerenja FR prikazuju ga kao kanal prosječne dužine 11.6 mm sa uskim centralnim segmentom. Stoga, dekompresija maksilarnog nerva unutar FR mora uzeti u obzir otvaranje centralnog segmenta FR.

Komunikacije FPP omogućavaju širenje inflamatornih i neoplastičnih procesa u druge prostore viscerokranijuma i baze lobanje (kavernozni sinus kroz FR, mastikatorni prostor kroz PFM, proderani otvor kroz CP, nosna i usna duplja). Opisano je širenje primarnih tumora FPP (poput juvenilnog nazofaringealnog angiofibroma, pleksiformnog neurofibroma ili švanoma) kroz komunikacije u druge prostore lobanje. Takođe, okolne duplje mogu dati patološke procese sa širenjem u FPP. Poseban vid širenja koji često zahvata FPP je perineuralno širenje granama trigeminalnog živca; karakteristično za mukozne ili kožne planocelularne karcinome, adenoidcistični karcinom, limfom i rabdomiosarkom. Činjenica da je perineuralno širenje asocirano sa većom incidencijom lokalnog recidiva čini široku resekciju primarnog tumora hirurškim imperativom. CT dijagnostika može postaviti sumnju na perineuralno širenje tumora prikazujući eroziju koštanih zidova FPP, uvećanje same duplje ili njenih komunikacija. S druge strane, magnetna rezonanca može prikazati redukciju masnog tkiva FPP na račun zadebljanja nervnih vlakana, kao i denervacionu atrofiju muskulature.

Hirurške intervencije na FPP se vrše zbog benignih i malignih tumora, inflamatornih pseudotumora, trigeminalne neuralgije, kao i autonomnih poremećaja glave i vrata. Tabela 4 sadrži najčešće patološke lezije FPP. Endonazalni endoskopski pristup predstavlja pouzdanu alternativu otvorenoj hirurgiji (kraniotomija ili maksilarna osteotomija) sa manjim morbiditetom. Aplikacija vazokonstriktora i lokalnog anestetika u FPP značajno olakšava hirurgiju paranazalnih sinusa, omogućavajući

bolju vizuelizaciju operativnog polja i redukujući postoperativni bol. Anatomske putevi endoskopskih pristupa FPP su FSP i zadnji zid maksilarnog sinusa, sa mogućnošću resekcije donje nosne školjke. S druge strane, ključne anatomske tačke u transpterigidnom pristupu bazi lobanje su CP, FSP i FR.

Tabela 4. Najčešće patološke lezije u FPP.

	Dječjadob	Adulnadob
Neurogenitumori	Neurofibrom Švanom Meningeom	Meningeom Neurofibrom Švanom (imaligna forma)
Mioigenitumori	Rabdomiom (isarkom)	Lejomiom (isarkom)
Tumorkostihrskačevice	Fibroznadiplazija Osteosarkom Juingovsarkom	Hondrom (isarkom) Osteosarkom
Limfo-hematopoetskitumori	Non-Hodgkinovlimfom Granulocitnisarkom Langerhansovahistiocitoza	Non-Hodgkinovlimfom Plazmocitom Granulocitnisarkom
Epitelitumori	Skvamocelularnikarcinom Adenokarcinom	Skvamocelularnikarcinom Bazocelularnikarcinom Melanom Adenokarcinom
Vazogenitumori	Juvenilnazofaringealniangiofibrom Vaskularnmalformacija Hemangiom	Angiosarkom Hemangiopericitom Kaposi sarkom
Inflamatornastanja	Inflamatornipseudotumor Limfoproliferativniporemećaji	Inflamatornipseudotumor Limfoproliferativniporemećaji Wegenerovagranulomatoza Sarkoidoza
Fibrozniiadipoznitumori	Lipom Lipoblastom Fibrosarkom Sinovijalnisarkom	Lipom Fibrom Liposarkom Fibrosarkom Miksom Malignifibroznihistiocitom Sinovijalnisarkom

ZAKLJUČAK

Ovaj rad sadrži nekoliko novih aspekata anatomije FPP (ugao FSP i CP, novi način razumijevanja FR, kao i mjerenje udaljenosti FR i CP od zadnjeg zida maksilarnog sinusa), što može biti od koristi u kliničkoj anatomiji FPP. Takođe, prediktivna vrijednost dužine CP u vezi sa tipom 3 CP ima potencijalni značaj u endoskopskom pristupu sfenoidalnom sinusu i CP.

LITERATURA

1. Derinkuyu BE, Boyunaga O, Oztunali C, Alimli AG, Ucar M. Pterygopalatine fossa: not a mystery! Can Assoc Radiol J. 2017; 68(2):122-130.
2. Craiu C, Rusu MC, Hostiu S, Sandulescu M, Derjac-Arama AI. Anatomic variation in the pterygopalatine angle of the maxillary sinus and the maxillary bulla. Anat Sci Int. 2017; 92:98-106.
3. Falcon RT, Rivera-Serrano CM, Miranda JF, Prevedello DM, Snyderman CH, Kassam AB, Carrau RL. Endoscopic endonasal dissection of the infratemporal fossa: anatomic relationships and importance of Eustachian tube in endoscopic skull base surgery. Laryngoscope. 2011; 121:31-41.
4. Acar G, Cicekcibasi AE, Cukurova I, Ozen KE, Seker M, Guler I. The anatomic analysis of the vidian canal and the surrounding structures concerning vidian neurectomy using computed tomography scans. Braz J Otorhinolaryngol. 2017; S1808-8694(17)30215-X.
5. Bryant L, Goodmurphy CW, Han JK. Endoscopic and three-dimensional radiographic imaging of the pterygopalatine and infratemporal fossae: improving surgical landmarks. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2014; 123(2):111-116.
6. Chen CC, Chen ZX, Yang XD, Zheng JW, Li ZP, Huang F, Kong FZ, Zhang C. Comparative research of the thin transverse sectional anatomy and the multislice spiral CT on the pterygopalatine fossa. Turk Neurosurg. 2010; 20(2):151-158.
7. Elhadi AM, Zaidi HA, Yagmurlu K, Ahmed S, Rhoton AL Jr, Nakaji P, Preul MC, Little AS. Infraorbital nerve: a surgically relevant landmark for the pterygopalatine fossa, cavernous sinus, and anterolateral skull base in endoscopic transmaxillary approaches. J Neurosurg. 2016; 125(6):1460-1468.

7. Erdogan N, Unur E, Baykara M. CT anatomy of the pterygopalatine fossa and its communications: a pictorial review. *Comput Med Imaging Graph.* 2003; 27(6):481-487.
8. Gu Y, Yu Y, Zhang X, Hu F, Wang X, Xu W, Xie T. Endoscopic endonasal transmaxillary transpterygoid approach to Meckel cave: anatomical study and preliminary clinical results. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg.* 2015; 76(3):205-210.
9. Kantola VE, McGarry GW, Rea PM. Endonasal, transmaxillary, transpterygoid approach to the foramen ovale: radio-anatomical study of surgical feasibility. *J Laryngol Otol.* 2013; 127:1093-1102.
10. Hwang SH, Joo YH, Seo JH, Kim SW, Cho JH, Kang JM. Three-dimensional computed tomography analysis to help define an endoscopic endonasal approach of the pterygopalatine fossa. *Am J Rhinol Allergy.* 2011; 25:346-250.
11. Fortes FSG, Sennes LU, Carrau RL, Brito R, Ribas GC, Yasuda A, Rodrigues AJ Jr, Snyderman CH, Kassam AB. Endoscopic anatomy of the pterygopalatine fossa and the transpterygoid approach: development of surgical instruction model. *Laryngoscope.* 2008; 118:44-49.
12. Grewal SS, Kurbanov A, Anaizi A, Keller JT, Theodosopoulos PV, Zimmer LA. Endoscopic endonasal approach to the maxillary strut: anatomical review and case series. *Laryngoscope.* 2014; 124:1739-1743.
13. Guo J, Huang D, Chen S, Zhu S, Rong Q. Treatment of a subtype of trigeminal neuralgia with descending palatine neurotomy in the pterygopalatine fossa via the greater palatine foramen - pterygopalatine canal approach. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015; 43:97-101.
14. Khonsary SA, Ma Q, Villablanca P, Emerson J, Malkasian D. Clinical functional anatomy of the pterygopalatine ganglion, cephalgia and related dysautonomias: a review. *Surg Neurol Int.* 2013; 4:S422-428.
15. Mohebbi A, Rajaeih S, Safdarian M, Omidian P. The sphenoid sinus, foramen rotundum and vidian canal: a radiological study of anatomical relationships. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2017; 83(4):381-387.
16. Tomaszewska IM, Kmiotek EK, Pena IZ, Sredniawa M, Czyzowska K, Chrzan R, Nowakowski M, Walocha JA. Computed tomography morphometric analysis of the greater palatine canal: a study of 1,500 head CT scans and a systematic review of literature. *Anat Sci Int.* 2015; 90(4):287-297.
17. Oyama K, Tahara S, Hirohata T, Ishii Y, Prevedello DM, Carrau RL, Froelich S, Teramoto A, Morita A, Matsuno A. Surgical anatomy for the endoscopic endonasal approach to the ventrolateral skull base. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2017; 57:534-541.
18. Rusu MC. Microanatomy of the neural scaffold of the pterygopalatine fossa in humans: trigeminovascular projections and trigeminal-autonomic plexuses. *Folia Morphol.* 2010; 69(2):84-91.
19. Sharma NA, Garud RS. Morphometric evaluation and a report on the aberrations of the foramina in the intermediate region of the human cranial base: a study of an indian population. *Eur J Anat.* 2011; 15(3):140-149.
20. Rusu MC, Didilescu AC, Jianu AM, Paduraru D. 3D CBCT anatomy of the pterygopalatine fossa. *Surg Radiol Anat.* 2013; 35:143-159.
21. Rusu MC, Pop F, Curca GC, Podoleanu L, Voinea LM. The pterygopalatine ganglion in humans: a morphological study. *Ann Anat.* 2009; 191:196-202.
22. Tashi S, Purohit BS, Becker M, Mundada P. The pterygopalatine fossa: imaging anatomy, communications, and pathology revisited. *Insights Imaging.* 2016; 7(4):589-599.
23. Xu F, Sun X, Hu L, Wang J, Wang D, Pasic TR, Kern RC. Endoscopic surgical treatment of neurogenic tumor in pterygopalatine and infratemporal fossae via extended medial maxillectomy. *Acta Otolaryngol.* 2016; 131:161-165.
24. Uehara M, Tominaga K, Asahina I. Surgical approach to the pterygopalatine fossa - comparison between anterior approach and lateral approach. *J Craniofac Surg.* 2013; 24:536-539.

KLINIČKI ZNAČAJ POZNAVANJA VARIJACIJA SPOLJAŠNJE KRUŽNE BUTNE ARTERIJE I NJENIH GRANA

AUTORI

Prof. dr Aleksandra Vuksanović Božarić, Prof. dr Miroslav Radunović, dr Marija Abramović, dr Batrić Vukčević, dr Nemanja Vukčević

Katedra za Anatomiju, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, Podgorica, Crna Gora

SAŽETAK

Spoljašnja cirkumfleksna femoralna arterija (ACFL) je u najvećem broju slučajeva grana duboke femoralne arterije (APF) iako je opisan veliki broj varijacija njenog porijekla i grananja. Njena terminalna ushodna grana je glavni dovodni sud vaskularne peteljke mišića zatezača butne fascije (MTFL), i daje različit broj završnih grana koje ulaze u MTFL na različit način.

U svrhu studije učinili smo mikrodisekcije donjih ekstremiteta na 30 fetusa različite gestacijske dobi. Naši rezultati pokazuju da je u najvećem broju slučajeva ACFL grana APF, u 83,3%, dok je u 11,7% grana AF (u 6,7% proksimalno od otklona APF). U 1 slučaju imala je zajedničko porijeklo sa APF, u jednom sa ACFM. U 3,3% ACFL nije postojala. U 66,7% obje cirkumfleksne arterije su se odvajale od APF, u 15% jedna je bila porijekla APF a druga od AF, a u 5% slučajeva obje su bile porijekla AF. U 80% slučajeva kada je bila prisutna ACFL je dala dvije završne grane, u preostalim 3. Ushodna završna je davala od 0 do 6 završnih arterija, najčešće 3, koje su prilazile MTFL sa medijalne strane. Naši rezultati su u korelacije sa jednim dijelom dostupne objavljenije literature, dok pokazuju značajne razlike u odnosu na drugi dio, što samo dokazuje kompleksnost pomenutih varijacija. Što bolje poznavanje različitih varijacija značajno doprinosi prevenciji komplikacija tokom endovaskularnih, ali i različitih hirurških i ortopedskih zahvata.

ENGLISH

SUMMARY

Lateral circumflex femoral artery (LCFA) in most cases is the branch of deep femoral artery, although large number of different variation in its origin and termination has been described. Its terminal ascending branch is the main arterial blood vessel for the tensor fasciae latae muscle (TFLM), and it gives different number of branches and enters the TFLM in different manner. We performed microdisectomy on lower limbs of 30 foetuses of different gestational age. Our results have shown that in most cases LCFA originate from DFA, in 83,3% of examined cases, in 11,7% from FA (in 6,7% proximal to origin of DFA). In 1 case it had a common trunk with DFA, and in one case with MCFA. In 3,3% of cases LCFA was missing. In 66,7 % of cases, both circumflex arteries separated from DFA, in 15% of cases one originated from DFA and the other from FA, and in 5% of cases both originated from FA. When present, LCFA had two terminal branches in 80%, in rest it had 3. The ascending terminal branch gave of from 0 to 6 branches, most commonly 3, which entered in TFLM on its medial side. Our results correspond to some published studies but also differ from other, which only shows complexity of these variations. More comprehensive knowledge of different variation types helps in prevention of complications during endovascular and different surgical and orthopedic interventions.

Key words: lateral circumflex femoral artery, anatomical variations, tensor fasciae latae muscle, reconstructive surgery, muscle flap, preventing flap necrosis

UVOD

...“Najčešći neuspjesi hiruškog rada nisu uzrokovani pogrešnim izvođenjem, već pogrešnim planiranjem operativnog zahvata”. John Conley

Jedan od problema u plastičnoj hirurgiji je rekonstrukcija velikih defekata mekih tkiva, koji najčešće nastaju posle operacija tumora, povreda ili nakon dugotrajne imobilizacije pacijenta što dovodi do formiranja dekubitusa.

U svrhu rekonstrukcije defekata bilo koje etiologije koriste se različite vrste režnjeva. Režnjevi su zavisno od vrste segmenti kože i potkožnog tkiva, fascije, mišića ili kosti koji imaju svoju vaskularnu mrežu na određenoj vaskularnoj peteljci, a koriste se za rekonstrukciju jednostavnih ili složenih defekata različite lokalizacije, forme i veličine. Da bi režanj „preživio“, odnosno uspješno se koristio neophodno je besprekorno poznavanje njegove vaskularne mreže, a za muskulutane ili kutane režnjeve i površina kože koju vaskularizuje peteljka režnja.

Režanj mišića zatezača butne fascije se koristi u različite svrhe u rekonstruktivnoj hirurgiji. prvi put je opisan kao lokalni rotacioni režanj 1934.god, a prvi put upotrijebljen kao slobodni režanj 1978.god. Koristi se kao miokutani režanj - sadrži m.tensor fasciae latae (MTFL), butnu fasciju i naliježuću kožu. može da se upotrijebi kao lokalni rotacioni režanj za defekte prepona, perineuma i donjeg abdomena do nivoa umbilika, a za defekte iznad umbilica kao slobodni režanj.

Vaskularizacija MTFL u najvećem broju opisanih slučajeva potiče od ushodne grane spoljašnje polukružne butne arterije (a.circumflexa femoris lateralis - ACFL) koja je grana duboke butne arterije (a. profunda femoris APF), a ona grana butne arterije (a. femoralis - AF), prema klasičnim udžbenicima anatomije. ACFL prolazi između prednjih i zadnjih završnih grana n.femoralisa, iza m.sartoriusa i m.rectus femoris, i završava se podjelom na ushodnu (ascendentnu), poprečnu i nishodnu (descendentnu) granu. Ascendentna grana se anastomozuje sa gornjom sjedalnom arterijom (a.glutea superior) koja vaskularizuje proksimalni dio mišića, kao i dubokim kružnom ilijačnom arterijom (a.circumflexa ilium profunda). Pomenuta grana vaskularizuje i veliki trohanter, glavu i vrat femura, i u literaturi je opisana kao glavni dovodni arterijski krvni sud za MTFL, dok su za vaskularizaciju naliježuće kože zaduženi perforantni krvni sudovi. djelimično vaskularizuje i gornja sjedalna arterija, dok kožnu teritoriju spoljašnjeg predjela buta, kao i kožu iznad mišića vaskularizuju perforantni krvni sudovi od mišića zatezača butne fascije.

U literaturi su opisane kako varijacije otklona LCFA tako i njenog terminalnog grananja, ali i načina vaskularizacije samog režnja. Opisani su slučajevi odvajanja od APF, direktno od AF (proksimalno ili distalno od odvajanja APF), kao zasebna grana ili zajedničkim stablom sa unutrašnjom polukružnom arterijom buta (a.circumflaxa femoris medialis - ACFM), slučajevi izostanka ili duplikacije ACFL.

Poznavanje karakteristika vaskularne peteljke režnja MTFL, a posebno anatomskih varijacija ima veliki značaj u planiranju procedure, odabira adekvatne veličine režnja, i sprečavanje nastanka postoperativnih varijacija u formi nekroze i destrukcije režnja. Osim toga, poznavanje varijacija ACFL je značajno prilikom aplikacije anestezije tokom procedure blokade femoralnog živca, kao i operacija u femoralnoj regiji ili zglobovima. Takođe, nishodna grana spoljašnje kružne butne arterije se koristi kao novi arterijski graft u slučajevima koronarne aterosklerotske bolesti i potrebe za kardiohirurškom intervencijom postavljanjem koronarnih bypass graftova.

Klasična angiografija kao dopunska metoda u medicini omogućava uvid u anatomske promjene na krvnim sudovima, daje podatak o broju i promjeru arterijskih sudova i eventualnom postojanju patološkog supstrata. Međutim, ovom dijagnostičkom metodom nije moguće vizuelizovati pravac pružanja, kao ni topografske odnose krvnih sudova sa ostalim strukturama, ili postojanje varijacija. Pouzdana je dijagnostička metoda pod uslovom zdravog anatomskeg sistema, ali kod arterijskih bolesti nije suverena. Danas je u slučajevima anatomskeg odnosa zamijenila MSCT angiografija, ali ostaje limitacija nemogućnosti kontrastnog prikaza aterosklerotski izmijenjenih krvnih sudova.

Stoga najpouzdaniji metod koji u potpunosti omogućava izučavanje anatomskeg sistema i struktura, koji omogućava direktno ekspaniranje vizuelno praćenje anatomskeg-topografskeg odnosa, toka stabla krvnih sudova, bočnih, kao i završnih grana, moguće varijacije su anatomske studije na kadaverima metodama makro i mikro disekcije.

CILJ RADA

Prikazati postojanje vrsta varijacija načina nastanka ACFL i njenog terminalnog grananja, i vaskularizacije MTFL.

MATERIJAL I METODE

Mikrodisekcija je urađena na 30 fetusa, oba donja ekstremiteta (60 donjih ekstremiteta). Fetusi su gesta-

cijske starosti od VI do X l.m, a dio su kolekcije Katedre za Anatomiju Medicinskog fakulteta. Fetusi su razvrstani prema polu 20 muških i 10 ženskih i u okviru njih je posmatrana lijeva i desna strana.

Gestacijska starost fetusa je određena na osnovu tjemeno trtične dužine koja se kretala od 17-28cm, i upoređivanjem njihovih vrijednosti sa istim u tabela-ma gestacijske starosti navedenim u udžbeniku perinatologije (Kurijak 1989). Fetusi su čuvani u 10 % rastvoru formaldehida.

Mikrodisekcija oba donja ekstremiteta fetusa je urađena na sledeći način:

Prije disekcije medijalnog i prednjeg kompartmenta potrebno je palpatorno identifikovati gornju prednju bedrenu bodlju i pubičnu kvrgu. Učini se kosi rez ispod ingvinalnog ligamenta. Pod lupom (uvećanje 5 puta) uklanjena je koža, potkožno tkivo, i na kraju duboka facija nakon čega se prikaže prednji kompartment mišića. Pri uklanjanju potkožnog sloja mora se obratiti pažnja na veliku safensku venu koja prelazi sa unutrašnje strane na prednju. Nakon toga pažljivo razdvojiti femoralnu venu od arterije. Preparisana je butna arterija i evidentiran njen odnos sa butnom venom i butnim živcem u Skarpovom trouglu. Zatim je ispreparisana duboka butna arterija, medijalna i lateralna kružna butna arterija do MTFL.

REZULTATI RADA

Naši rezultati pokazuju da je ACFL u 83,3% ispitivanih slučajeva vodila porijeklo od APF, pri čemu se u tim slučajevima APF odvajala od AF visoko u Skarpovom trouglu. U 11,7% slučajeva ACFL se odvajala od AF, i to u 6,7 % proksimalno od odvajanja APF i u tim slučajevima primijećen je mali kalibar i nisko odvajanje APF u Skarpovom trouglu. U jednom slučaju imala je zajedničko stablo sa APF, a u jednom sa ACFM i to zajedničko stablo se odvajalo proksimalno od otklona APF. U 3,3% slučajeva ACFL je nedostajala a njene grane, u ovom slučaju su to bile ushodna, poprečna i nishodna, su se odvajale direktno od od APF. Kod jednog fetusa evidentirana je dupla LCFA kada je uočeno da se jedna odvajala od PFA, a druga od AF, a po odvajanju se obje spajaju u jedinstveno stablo.

Tabela 1. Mjesto odvajanja ACFL

Kao grana	AFC*		APF		AFS**		Odsutna	Duplikacija		
	Zajedničkoš tablosa APF	Zajedničkoš tablosa ACFM	Samostalno	Zbir	Samostalno	Zbir				
ACFL	1,7% (1)	1,7% (1)	6,7% (4)	10% (6)	66,7% (40)	16,7% (10)	83,3% (50)	1,7% (1)	3,3% (2)	1,7% (1)

ACFL - a. circumflexa femoris lateralis, ACFM - a. circumflexa femoris medialis, APF - a. profunda femoris

* AFC - a. femoralis communis - femoralna arterija proksimalno otklona APF

** SFA - a. femoralis superficialis - femoralna arterija distalno otklona APF

U svojoj studiji objavljenj 2007. godine, Vasquez i saradnici su predložili novu, jednostavniju klasifikaciju načina odvajanja ACFL i ACFM, pri čemu su opisali tri obrasca:

Tip 1: obje arterije se odvajaju od APF, tip Ia - ACFM se odvajala proksimalnije, tip Ib - ACFL se odvajala proksimalnije, I tip Ic - obje arterije se odvajaju zajedničkim stablom.

Tip 2: jedna od arterija se odvajala od AF, a druga od APF, tip IIa - ACFM se, tip IIb - ACFL se odvajala od AF.

Tip 3: obje arterije se odvajaju od AF.

U tabeli broj 2. smo prikazali naše rezultate na osnovu opisa neklasifikacije.

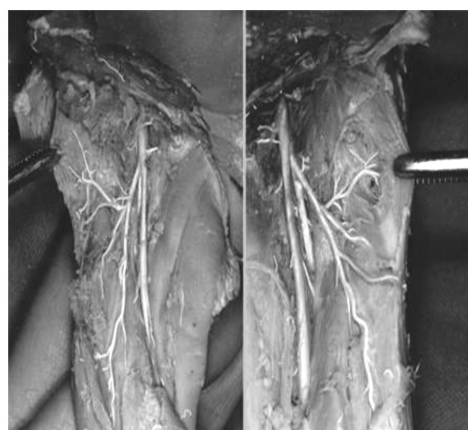
Tabela 2. Tip grananja prema klasifikaciji Vasquez et al.

Tip grananja prema klasifikaciji Vasquez et al.	Procenat/Broj slučajeva
Tip I	66,7% (40)
Tip Ia	45% (27)
Tip Ib	13,3% (8)
Tip Ic	8,3% (6)
Tip II	15% (9)
Tip IIa	10% (6)
Tip IIb	5% (3)
Tip III	5% (3)

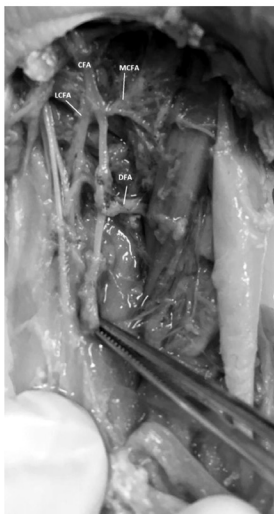
Što se tiče završnog grananja, kada je ACFL bila prisutna, u 80% slučajeva se završila pomoću dvije završne grane - ushodnom i nishodnom, a u preostalim slučajevima pomoću 3 završne grane - ushodnom, nishodnom i poprečnom.

Prilikom analize broja i načina ulaska terminalnih grana ascendentne grane u MTFL dobijeni su sljedeći rezultati: u 14% slučajeva je ascendentna grana bez naknadnog grananja bila jedini dovodni sud za MTFL, u 31% slučajeva došlo je do bifurkacije ascendentne grane i obje grane su prišle mišiću sa medijalne strane, u 40% slučajeva došlo je do trifurkacije, u 10% slučajeva ascendentna grana se podijelila na više od 3 terminalne grane, a u 5% ascendentna grana je prišla MTFL formirajući arterijsku mrežu tako što se podijelila na veći broj sitnih grana na medijalnoj strani mišića.

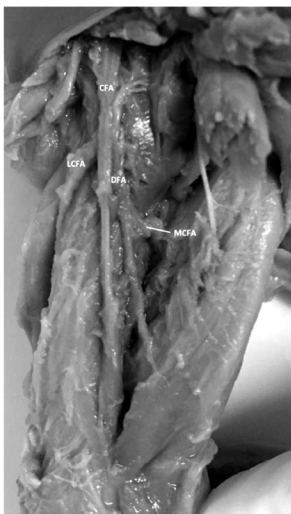
Slika 1. ACFL i ACFM se odvajaju od APF



Slika 2. ACFL i ACFM se odvajaju od AF, proksimalno od otklona APF



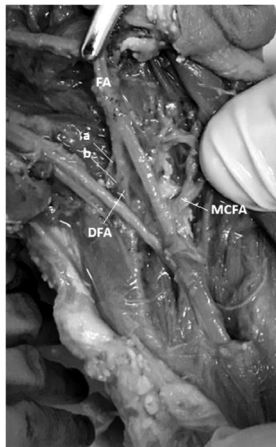
Slika 3. ACFL se odvaja od AF, a ACFM od APF koje s distalnije



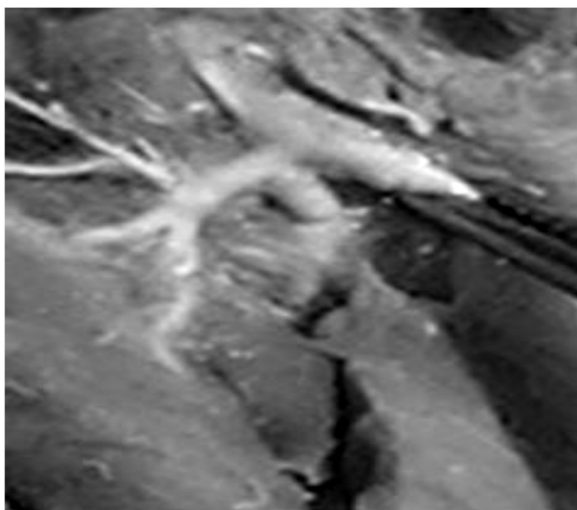
Slika 4. Duplikacija ACFL, i njihovo distalno spajanje



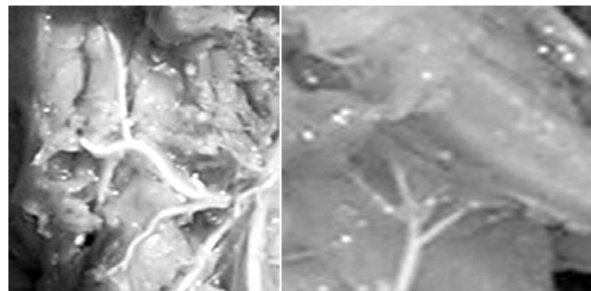
Slika 5. ACFL nedostaje, a njene grane se odvajaju difrektno od APF, dok se ACFM odvaja distalnije od AF.



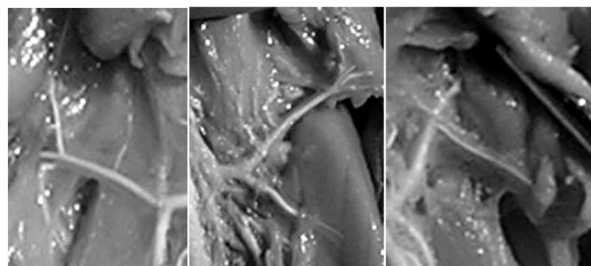
Slika 6. Zajednički početno stablo ACFL i APF.



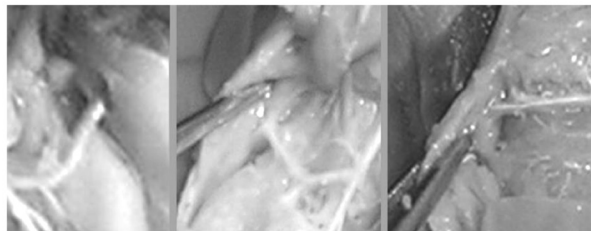
Slika 7. Ascendentna grana ACFL koja se završava pomoću tri terminalne grane koje ulaze u MTFL



Slika 8. Ascendentna grana ACFL koja se završava pomoću 2 terminalne grane koje ulaze u MTFL



Slika 9. Ascendentna grana ACFL koja se ne daje završne grane pri ulasku u MTFL



DISKUSIJA

Varijacije porijekla lateralne kružne butne arterije embriološki su determinisane. Donji ekstremitet se razvija iz lateralnog aspekta L2-S2 segmenata trupa tokom pete nedelje gestacije. krvni sudovi se razvijaju u toku naredna tri mjeseca. Tokom razvoja, primarna „axijalna“ arterija, je vitalna za vaskularizaciju i diferencijaciju samog ekstremiteta. Ona je grana umbilikalne arterije (koja u kasnijem toku razvoja postaje femoralna arterija) ili pete lumbalne/intersegmentne arterije. Njen proksimalni dio se naziva ishijadična arterija, srednji poplitealna, a distalni primitivna intraosealna arterija, dok se završni segment naziva plantarnim kapilarnim pleksusom. Istovremeno spoljašnja ilijačna arterija se takođe razvija od umbilikalne arterije, i od nje se razvija proksimalni dio femoralne arterije. Srednji dio se razvija iz „rete femorale“, a distalni iz komunikantne grane porijekla ishijadične arterije, koji prolazi kroz hiatus tendineus i spaja se sa „rete

femorale“. Uvećanje protoka krvi kroz kapilare rete femorale - femoralne mreže, tokom organogeneze se smatra glavnim mehanizmom nastanka i definitivnog obrazovanja arterijskog obrasca ove regije, jer dovo-di do razvoja APF, njenih grana i ostalih grana AF. Isto-vremeno dio ishijadične arterije iznad novonastale ko-munikacije regredira.

Tokom procesa razvoja neki od arterijskih kanala prolaze kroz proces regresije a neki se proširuju i for-miraju definitivni arterijski obrazac vaskularizacije određenog područja. Perzistiranja kanala za koje je predviđeno da obliterišu ili u potpunosti nestanu do-vodi do različitih vaskularnih varijacija i anomalija koje komplikuju arterektomije, embolektomije i tromben-daterektomije u slučajevima ateroskleroze, kao i pret-hodno pomenute operacije transplantacije kutanih i miokutanih graftova.

Obzirom na nedostatak podataka o arterijskim vari-jacijama na fetalnom materijalu u dostupnoj literaturi, mi smo naše rezultate uporedili sa dostupnim studijama na angiografskom materijalu i adultnim kadaverima - tabela broj 3. Osim toga postoji razlika u nomenklaturi koju koriste anatomici, i one koju koriste hirurzi i radio-lozi. Anatomici, završna grana a.iliace externe (AIE) je AF, koja nosi taj naziv cijelim tokom, dok je AFP njena bočna grana. U radovima hirurga ili radiologa proksimalni dio AF se označava kao zajednička odnosno a. femoralis communis - AFC, koja se onda dijeli na AFP i a.femoralis superficialis (AFS).

Iz ovih razloga postoje značajne varijacije u rezulta-tima. ACFL je najčešće grana APF (u literaturi od 56,67% do 100%), a to je slučaj i u našoj studiji. U preostalom broju slučajeva, ACFL je najčešće grana AF, proksimalno od otklona APF tj od AFC, pri čemu procenti varijaraju od 0 do 43,33%, dok se od distalnog segmenta, tj AFS, odvaja do u 15% slučajeva.

Najčešće se odvaja kao samostalan krvni sud, iako pojedine studije navode da se u većem procentu odvaja zajedničkim stablom sa APF. Mogu se naći opisani i slu-čajevi zajedničkog odvajanja sa ACFM, ili ACFM i APF, kao i da se odvaja kao grana AIE: U nekim studijama bila je odsutna čak i do 7% i u tim slučajevima grane su se odvaja od AF i APF. U dostupnoj literaturi pronašli smo samo još jedan opis duplikacije ACFL.

Naša studija je potvrdila da je glavni dovodni arterijski krvni sud za MFTL porijekla ascendentne grane ACFL, što je u korelaciji sa dostupnim literaturnim podacima. Broj terminalnih graničica ascendentne arterije je varirao od 0-6, pri čemu je najčešći slučaj bio tri, što se donekle ne slaže sa dostupnim podacima koji pokazuju da je taj broj 2. Lokacija ulaska terminalnih grana ascendentne arterije u MFTL je na različitoj udaljenosti od gornje prednje bedrene bodlje (što svakako zavisi i od uzrasta fetusa koji je analiziran), ali je najčešće negdje oko polovine rastojanja do mjesta prelaska mišićnih vlakana u iliotibijalni trakt.

ZAKLJUČAK

Pregledom literature može se zaključiti da postoji veliki broj varijacija AF, AFP koa i ACFL i njenih grana. Poznavanje anatomskih varijacija porijekla krvnih su-dova ima veliki značaj u prevenciji krvarenja prili-kom izvođenja endovaskularnih intervencija, ali i u plastičnoj i rekonstruktivnoj hirurgiji i ortopedskim intervencijama.

Tabela 3. Porijeklo ACFL prikazano u procentima u rezultatimarazličitihstudija

	AIE		AFC		Zbir	AFP	AFS	O
	Samostalno	Sa AFP	Sa ACFM	Sa AFP i ACFM				
Siddharth et al 1985**	16		5	5	26	67		7
Massoud et al 1997	4		1		5	80	15	
Fukuda et al 2005***					11,8	81,7	5,3	1,1
Vasquez et al 2005	3,2		0,2		3,4	94,8	1,8	
Tansatt et al 2008					43,33	36,67		
Uzel et al 2008	19,1	0,9		0,9	20,9	77,3	1,8	
Prakash et al 2010					18,75	81,25		
Dixit et al 2011****	0,4	5,3	16,2		21,5	75	2,6	0,4
Peera et al 2013*	15	5			20	80		
Anjankar et al 2014	8,3	17,5			25,8	68,3	5,8	
Chitra et al 2015*					16	83		
Mukhia et al 2015	3,3	3,3			6,6	90	3,3	
Rathnakar et al 2016*					13,7	86,3		
Swetha et al 2016*					100			
Našastudija****	6,7	1,7	1,7		10	83,3	1,7	3,3

AIE - a.iliaca externa, ACFL - a. circumflexafemorislateralis, ACFM - a. circumflexafemorismedialis, APF - a. profundafemoris, AFC - a. femoraliscommunis - femoralnaarterijaproksimalnoodotklona APF, SFA - a. femoralissuperficialis - femoralnaarterijadistalnoodotklona APF, O - odsutna
 ** graneodsutne ACFL porijeklasu AFC i APF u 3%, a u 4% samo od APF
 *** graneodsutne ACFL porijeklasu AFC i APF
 **** graneodsutne ACFL porijeklasu APF
 ***** graneodsutne ACFL porijeklasu APF, u jednomslučaju je biladuplikacija ACFL

LITERATURA

1. Aghera BR, Karunakar P, Sujatha K et al. Morphological study of medial circumflex femoral artery in human cadavers. 2014; 2(4):636-39.
2. Agarwal AK, Gupta S, Bhattacharya N, Guha G, Agarwal A. Tensor fascia lata flap reconstruction in groin malignancy. Singapore Med J. 2009; 50: 781-784.
3. Al-Talalwah W. The medial circumflex femoral artery origin variability and its radiological and surgical intervention significance. Springerplus. 2015; 28(4):149.
4. Anjankar VP, Panshewdikar PN, Thakre G et al. Morphological study on branching pattern of femoral artery: a cadaveric study. Asian journal of biomedical and pharmaceutical sciences. 2014; 4(28):34-38.
5. Asharani SK, Kuberappa V. Variation in the origin of Lateral circumflex femoral artery. International Journal of recent trends in science and technology. 2014;12(3):420-22
6. Chitra R, Prasad KSN. A study on the patterns of circumflex femoral arteries. Int J Anat Res. 2015; 3(3):1326-30.
7. Ciftcioglu E, Kale A, Kopuz C et al. Medial circumflex femoral artery with different origin and course: a case report and review of the literature. Folia Morphol. 2009;68:188-91.
8. Clarke SM, Colborn GL. The medial femoral circumflex artery: its clinical anatomy and nomenclature. Clinical anatomy 1993; 6:94-105. DOI: 10.1002/ca.98006020
9. Contedini F, Negosanti L, Pinto V, Tavaniello B, Fabbri E, Sgarzani R, Tassone D, Cipriani R. Tensor fascia latae perforator flap: an alternative reconstructive choice for anterolateral thigh flap when no sizable skin perforatoris available. Indian J Plast Surg. 2013; 46: 55-58.
10. Demirseren E, Gokrem S, Ozdemir OM, Can Z, Serel S. Hatched shaped tensor fascia lata musculocutaneous flap for the coverage of trochanteric pressure sores:a new modification. Ann PlastSurg, 2003; 51: 419-422.
11. Dixit D, Kubavat DM, Rathod SP et al. A study of variations in the origin of profundafemoris artery and its circumflex branches. Int J Biol Med Res. 2011;2(4):1084-89
12. Fukuda H, Ashida M, Ishii R et al. Anatomical variants of the lateral femoral circumflex artery: an angiographic study. SurgRadiolAnat, 2005; 27:260-264.
13. Gautier E, Ganz K, Krügel N et al. Anatomy of the medial femoral circumflex artery and its surgical implications. J Bone Joint Surg Br. 2000; 82(5):679-683.
14. Gruen R, Morrison W, Vellar I. The tensor fasciae lataemyocutaneous flap closure of major chest and abdominal wall defects. Aust N Z J Surg. 1998; 68: 666-669.
15. Gurunluoglu R. The ascending branch of the lateral circumflex femoral vessels: review of the anatomy and its utilization as recipient vessel for free-flap reconstruction of the hip region. J ReconstrMicrosurg. 2010; 26: 359-366.
16. Kimura N, Saito M, Itoh Y, Sumiya N. Giant combined microdissected thin thigh perforator flap. J PlastReconstrAesthetSurg 2006; 59: 1325-1329.
17. Luo S, Raffoul W, Piaget F, Egloff DV. Anterolateral thigh fasciocutaneous flap in the difficult perineogenital reconstruction. PlastReconstr Surg. 2000; 105: 171-173.
18. Massoud TF, Fletcher EW. Anatomical variants of the profundafemoris artery: an angiographic study. SurgRadiolAnat, 1997; 19: 99-103.
19. Mescher AL. Junqueira's basic histology - text and atlas. New York: McGraw Hill education; 2013.
20. Mukhia R., Pasad P. Variations in the Origin of ProfundaFemoris Artery and its Circumflex Branches. International journal of scientific research. 2015; 4(7):737-738.
21. Peera SA, Sugavasi R. Morphological study of branches of femoral artery in the femoral triangle - a human cadaveric study. IJSHR. 2013; 3(12);14-19.
22. Prakash, Kumar J, Kumar BA et al. Variations in the origins of the profundafemoris, medial and lateral femoral Circumflex arteries: a cadaver study In the Indian population. Rom J MorpholEmbryol. 2010; 51(1):167-70.
23. Rathnakar P, Kumar VV, Vinod R et al. Variations in branching pattern of profundafemoris artery and its circumflex branches. Int J Anat Res 2016; 4(1):1922-26.
24. Shiny Vinila BH, Suseelamma D, Sridevi NS et al. A study on the origins of medial circumflex femoral artery. IOSR Jurnal of Dental and Medical Sciences. 2013; 4 (5): 28-31.
25. Siddharth P, Smith NL, Mason RA et al. Variational anatomy of the deep femoral artery. Anat Rec 1985; 212: 206-20.
26. Susan Standring, Gray's Anatomy; The anatomical Basis of Clinical practice, 40th edition, Elsevier Churchill Livingstone; 2005:1480.

27. Swetha B, Nagalika A. Study of profundafemoris branching pattern in human cadavers. *Int J Anat Res* 2016; 4(3):2822-27.
28. Tansatit T, Wanidchaphloi S, Sanguansit P. The anatomy of the lateral circumflex femoral artery in anterolateral thigh flap. *J Med Assoc Thai.* 2008; 91(9): 1404-9.
29. Tanyeli E, Uzel M, Yildirim M et al. An anatomical study of the origins of the medial circumflex femoral artery in the Turkish population. *Folia Morphol.* 2006; 65(3):209-212.
30. Tomaszewski KA, Henry BM, Vikse J et al. The origin of the medial circumflex femoral artery: a meta -analysis and proposal of new classification system. *Peer J.* 2016; 4:e 1726.
31. Tomaszewski KA, Vikse J, Henry BM et al. The variable origin of the lateral circumflex femoral artery: a meta -analysis and proposal for a new classification system. *Folia Morphol.* 2017;76(2):157-167.
32. Uzel M, Tanyeli E, Yildirim M. An anatomical study of the origins of the lateral circumflex femoral artery in the Turkish population. *Folia Morphol.* 2008; 67(4):226-230.
33. Vazquez MT, Murillo J, Maranillo E et al. Patterns of the circumflex femoral arteries revisited. *ClinAnat* 2007; 20(2): 180-5.
34. Vegas MR, Martin-Hervas C. The superolateral thigh flap: cadaver and computed tomographic angiography studies with a clinical series. *PlastReonstr Surg.* 2013; 131:310-322.
35. Vuksanovic A, Ugrenovic S, Jovanovic I. Vascular stalk analysis of the tensor fasciae latae flap. *FactaUniversitatis, Series Medicine and Biology.* 2006; 13: 1-5

MATIČNE ĆELIJE I NJIHOVA PRIMENA U TERAPIJI - PROŠLOST, SADAŠNJOST, BUDUĆNOST

AUTORI

Snežana Leštarević

Institut za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Prištini, Kosovska Mitrovica, Srbija

SAŽETAK

Matične (stem) ćelije su nespecializovane ćelije u vrlo ranom stadijumu razvika, koje u fiziološkim uslovima mogu da se diferenciraju u više različitih tipova ćelija od kojih mogu da nastanu sva naša tkiva i organi. Biologija matičnih ćelija postaje veoma važno polje za razumevanje regeneracije tkiva. Generalno, koncept matičnih ćelija definisan je na osnovu njihove dve osnovne karakteristike. Kao prvo, one imaju potencijalsamoobnavljanja. Drugo, nakon ćelijske deobe, pojedinačne ćerke ćelije mogu ili da zadrže karakteristike matičnih ćelija, ili da budu indukovane da se diferenciraju. Zbog mogućnosti izolovanja i umnožavanja u uslovima in vitro, s jedne strane, i pluripotentnosti, s druge strane, matične ćelije predstavljaju važan izvor ćelija i tkiva za praktičnu kliničku primenu u tzv. „regenerativnoj medicini“ ili „tkivnom inženjeringu“. U ovom trenutku, svedoci smo velikog napretka u proučavanju stem ćelija i njihovoj potencijalnoj primeni u terapiji.

Ključne reči: matične ćelije, stem ćelije, regenerativna medicina, tkivni inženjering, terapija

ENGLISH

SUMMARY

Stem cells are non-specialized cells at a very early stage of development. In physiological conditions, stem cells can differentiate into a number of different cell types, which can further form all of our tissues and organs. Stem cell biology is becoming a very important field for understanding tissue regeneration. In general, the concept of stem cells is defined based on their two basic characteristics. Firstly, they have self-renewal potential. Secondly, following cellular division, individual daughter cells can either retain stem cell characteristics or be induced to differentiate. Due to the possibility of isolation and multiplication in vitro on one hand, and pluripotency on the other, stem cells are an important source of cells and tissues for practical clinical application in so-called „regenerative medicine“ or „tissue engineering“. At this point, we are witnessing great progress in stem cells research and their potential application in therapy.

Key words: stem cells, regenerative medicine, tissue engineering, therapy

UVOD

Matične (stem) ćelije su nespecijalizovane ćelije u vrlo ranom stadijumu razvića, koje pod normalnim uslovima mogu da se diferenciraju u više različitih tipova ćelija od kojih mogu da nastanu sva naša tkiva i organi.

Pojam matične ćelije prvi je uveo nemački biolog Ernst Haeckel, dok je August Weismann bio prvi koji je ćelije u organizmu podelio na polne i telesne (soma-tske). Nešto kasnije Theodor Boveri i Valentin Hacker su pokazali da se kod oplođenih jajnih ćelija i polnih ćelija javljaju asimetrične ćelijske deobe. Ipak, zbog izuzetno male brojčane zastupljenosti matičnih ćelija, kao i činjenice da se morfološki ne razlikuju od tkivno-specifičnih ćelija, matične ćelije kao posebni ćelijski entiteti identifikovane su tek početkom šezdesetih godina dvadesetog veka.

OSOBI NE MATIČNIH ĆELIJA

Matične (stem) ćelije predstavljaju jedinice biološke organizacije uključene u razvoj i regeneraciju tkiva i organa. Njihovom deobom, ćerke ćelije mogu da budu usmerene ka formiranju specijalizovanih tipova ćelija ili ka samoobnovi (tzv. asimetrična deoba koja predstavlja fiziološki mehanizam održavanja populacija matičnih ćelija u tkivima i organima). Iako predstavljaju malu ćelijsku populaciju u tkivima, ove ćelije imaju visok klonogeni kapacitet, koji omogućava da od malobrojne populacije primitivnih matičnih ćelija nastane niz tranzitnih kategorija ćelija od kojih diferenciranjem nastaju zrele ćelije.

Četiri glavne osobine definišu matične ćelije: neograničena sposobnost samoobnavljanja, pluripotentnost, velika mogućnost migracije i sposobnost imunološke tolerancije - ne dovode do odbacivanja kalemata (odnosi se na humane embrionalne stem ćelije).

S obzirom na neograničenu sposobnost deobe, matične ćelije se označavaju kao „besmrtna“ (imortalna), a njihov ontogenetski razvoj obuhvata nekolikoni-voa razvoja i zrelosti, na osnovu različitog potencijala diferenciranja. Totipotentne matične ćelije su blastomere imogu se diferencirati u bilo koji tip ćelija. Od njih nastaju sve ćelije embriona i placentne, odnosno sva tkiva živog organizma. Pluripotentne matične ćelije su potomci totipotentnih ćelija koje mogu da se diferenciraju u ćelije sva tri klicina lista (ektoderm, mezoderm i endoderm), a nalaze se u unutrašnjoj masi blastociste (humane embrionalne matične ćelije su prvi put izolovane 1998. godine). Kasnije je pokazano da blastocista nije jedini izvor pluripotentnih matičnih

ćelija i da se embrionalne matične ćelije mogu dobiti iz primordijalnih germinativnih ćelija. Multipotentne matične ćelije nalaze se u mnogim adultnim i fetalnim tkivima i organima; mogu da daju različite tipove ćelija, ali samo u okviru jednog klicinog lista, a najviše izučavane multipotentne matične ćelije su hematopoetske matične ćelije (HMĆ). Unipotentne matične ćelije se mogu diferencirati u samo jedan tip ćelija, pri čemu zadržavaju sposobnost samobnove (primer spermatogonija).

Zbog mogućnosti izolovanja i umnožavanja u uslovima in vitro, s jedne strane, i pluripotentnosti, s druge strane, matične ćelije predstavljaju važan izvor ćelija i tkiva za praktičnu kliničku primenu u tzv. „regenerativnoj medicini“ ili „tkivnom inženjeringu“. U ovom trenutku, svedoci smo velikog napretka u proučavanju stem ćelija. Ipak, treba podsetiti da su celokupna današnja istraživanja matičnih ćelija prvenstveno zasnovana na prvobitnim saznanjima o hematopoetskim matičnim ćelijama (HMĆ).

TIPOVI MATIČNIH ĆELIJA

Na osnovu mogućnosti izolovanja iz različitih tkiva organizma čoveka u embrionalnom, fetalnom i adultnom periodu razvića, koristi se klasifikacija stem ćelija na: humane embrionalne stem ćelije (hESC), fetalne stem ćelije (hFSC) i adultne stem ćelije (hASC).

Humane embrionalne stem ćelije

Humane embrionalne stem ćelije (hESC) su najprimitivnija populacija matičnih ćelija u organizmu čoveka, koja se dobija od unutrašnje ćelijske mase blastociste pre implantacije. To su totipotentne ćelije sa neograničenim potencijalom održavanja u nediferenciranom stanju. Mogu da se diferenciraju u uslovima in vivo i in vitro, stvarajući derivate sva tri klicina lista.

Humane ESC u uslovima in vitro imaju sposobnost diferencijacije u neurone, oligodendrocite, glija ćelije, ćelije nadbubrežne žlezde, keratinocite, hematopoetske progenitore, osteoblaste, hondrocite, endotelne ćelije, skeletne mišićne ćelije, srčane mišićne ćelije, pankreatocite, hepatocite, pneumocite tipa II. Diferenciranje ESC u germinativne ćelije takođe je predmet brojnih proučavanja.

Izdvajanje linija hESC je veoma komplikovan proces, a značajni su i problemi kultivisanja hESC (animalni sastojci iz medijuma za kultivisanje koji mogu da dovedu do genetskih modifikacija), produžen rast ćelija u uslovima in vitro (može da dovede do hromozomskih aberacija), kao i rizik od nekontrolisanog rasta i dife-

rencijacije tj. pojave tumora. Kao i kod uvođenja bilo koje nove zdravstvene tehnologije i kod matičnih ćelija treba razmotriti pitanja prihvatljivosti sa etičkog aspekta, a osnovnu etičku prepreku u korišćenju embrionalnih matičnih ćelija predstavlja činjenica da se one moraju izdvojiti iz ljudskog zametka u stadijumu blastociste koji ovim postupkom biva uništen.

Međutim, veliki preokret u perspektivi terapije embrionalnim matičnim ćelijama započeo je 2006. dobijanjem indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija (iPS, engl. induced pluripotent stem cells) iz miša, a već 2007. i iz čoveka. Nastale iPS mogu se poput embrionalnih matičnih ćelija dalje diferencirati in vitro i in vivo. In vitro se diferenciraju u razne vrste ćelija koje odgovaraju derivatima sva tri klicina lista, a in vivo mogu da kolonizuju polne žlezde i stvore polne ćelije od kojih može nastati nova jedinka (prenos polnim ćelijama) što potvrđuje da su te ćelije, poput embrionalnih matičnih ćelija, takođe totipotentne.

Humane fetalne stem ćelije

Fetalne stem ćelije se izoluju iz krvi pupčanika, tkiva pupčane vrpce i placente, tesu lako dostupne za tkivni inženjering. Za njihovo izolovanje ne postoje medicinske i etičke prepreke, a same imaju relativno visoku multipotentnost koja je manja od hESC, ali daleko veća od hASC (imaju duže telomere, izrazitiju telomeraznu aktivnost i manju učestalost lezija DNK uzrokovanih ćelijskom replikacijom i deobom). Fetalne stem ćelije u uslovima in vitromogu da se diferenciraju u osteoblaste, hondrocyte, adipocite, mišićne ćelije, neurone, astrocite, oligodendrocite. U budućnosti postoji mogućnost da se kod svakog novorođenčeta sačuvaju radi eventualne autologe primene u kasnijem životu.

Eksperimenti in vitro su pokazali povoljan efekat u primeni ovih ćelija u terapiji moždanog udara i infarkta miokarda.

Humane adultne stem ćelije

Humane adultne stem ćelije izolovane su iz mnogih tkiva odraslih jedinki, kao što su koštana srž, jetra, masno tkivo, periost, koža, sinovija, crevo, srce, pluća, bubreg, zubna pulpa, skeletni mišići, retina, mozak i pankreas. Smatra se da su sve matične ćelije koje naseljavaju različite organe adultnog organizma multipotentne, te stoga mogu biti idealan izvor autologih stem ćelija za tkivnu regeneraciju.

Ćelije u stromi koštane srži imaju sposobnost da se diferenciraju u pravcu nastanka nehematopetskih

ćelija. To su mezenhimalne stem ćelije (MSC) koštane srži koje se označavaju i kao stromalne ćelije koštane srži ili multipotentne adultne progenitorne ćelije (MAPC). Ove ćelije su uspešno prečišćene i propagirane na klonalni način u uslovima in vitro. Dokazano je da ulaze u cirkulaciju i da mogu da naseljavaju druga mesta u organizmu gde se diferenciraju radi reparacije oštećenog tkiva. Multipotentne adultne mezenhimalne ćelije iz koštane srži eksprimuju neke markere karakteristične za hESC (Oct4 i Rex 1) i imaju sposobnost da se diferenciraju u ćelije različite od ćelija tkiva odakle potiču (imaju osteogeni, neurogeni, miogeni i hondrogeni i proangiogenetski potencijal, kao i potencijal diferencijacije u hepatocite i B-ćelije pankreasa).

Ohrabruju rezultati kliničke primene ovih ćelija u terapiji infarkta miokarda, regeneraciji hepatocita i B-ćelija pankreasa kod insulin-zavisnog dijabetesa, kao i u terapiji degenerativnih oboljenja koštanog sistema i hrskavice i regeneracije povređene kičme.

Iako se smatraju multipotentnim, ASC se daleko više primenjuju u regenerativnoj terapiji u odnosu na ESC, pre svega zbog relativno lake izolacije, činjenice da nemaju onkogeni potencijal i da njihova primena nema etičkih ograničenja. Regenerativni potencijal MSC zasniva se na sposobnosti diferencijacije u različita mezenhimska tkiva kao što su kost, hrskavica, mišići, ligamenti, masno tkivo i druga vezivna tkiva. Pored toga, MSC proizvode brojne bioaktivne molekule koji imaju imunoregulatornu ulogu, ali i učestvuju u brojnim procesima u okviru specifične mikrosredine prilikom povrede tkivne strukture i/ili funkcije ćelija. Parakrina funkcija, kao i sposobnost migracije MSC na mesta gde su nastala oštećenja tkiva gde MSC ubrzavaju procese reparacije tkiva, čine MSC važnim trofičkim faktorima. Sve ove osobine čine MSC dobrim kandidatima za lečenje bolesti jetre, bubrega, kostiju, srca i imunskih oboljenja. Međutim, i pored ogromnog napretka u razumevanju biologije MSC i intenzivnih ispitivanja usmerenih ka novim terapijskim pristupima, jasno je i da su za njihovu konačnu primenu u terapiji neophodna još mnogobrojna istraživanja.

Pored aktivne uloge u procesima reparacije i regeneracije tkiva, gde učestvuju i kao modulatori imunskog odgovora, MSC imaju uticaj i na razvoj tumorskog tkiva. Tokom obnavljanja oštećenih tkiva, MSC učestvuju u aktivaciji angiogeneze, koja može da dovede i do progresije tumorskog tkiva. Kada se nađu u inflamatornoj tumorskoj mikrosredini, MSC ispoljavaju slične faktore rasta i hemokine kao i u slučaju popravke oštećenog normalnog tkiva, ali u ovom slučaju, parakrini faktori MSC, ali i ćelijski kontakti sa tumorskim ćelijama mogu da podržavaju razvoj tumora. Naime, MSC mogu

da omoguće proliferaciju tumorskih ćelija i inhibiciju njihove apoptoze, supresiju imunskog odgovora organizma na nastalo tumorsko tkivo, angiogenezu i progresiju tumora, i konačno metastazu.

Indukovane pluripotentne matične ćelije

Veliku pažnju javnosti privukao je japanski naučnik Shinya Yamanaka sa Univerziteta u Kjotu, kada je otkrio da je moguće već diferenciranu ćeliju vratiti u stanje pluripotentne matične ćelije (indukovane pluripotentne matične ćelije). Za ovo otkriće dobio je Nobelovu nagradu za medicinu zajedno sa Sir John Gurdonom 2012. godine. Rad ovog naučnika otvorio je mogućnost upotrebe dobijenih ćelija kao nanosistema za isporuku lekova, pa je danas ovo jedna od značajnih istraživačkih oblasti. Uspех metode povezan je sa mogućnošću da se indukuje ekspresija činilaca pluripotentnosti u adultnim somatskim ćelijama, što dovodi do njihovog reprogramiranja i vraća ih u stadijum pluripotentnosti. Značaj ovih ćelija ogleda se u mogućnosti iskorišćavanja njihovog regenerativnog i reparativnog potencijala u lečenju raznih bolesti, među kojima su dijabetes melitus, bolesti srca i živaca, makularna degeneracija, opekotine, osteoartritis, reumatoidni artritis i mnoge druge. Zbog korišćenja sopstvenih ćelija, pri transplantaciji kultivisanih iPSC ne dolazi do reakcije odbacivanja organa posredovane imunološkim mehanizmima. Ove ćelije se u bazičnim naučnim disciplinama primenjuju u cilju istraživanja patogeneze različitih bolesti, kao i ispitivanja mehanizma terapijskih i neželjenih dejstava novih lekova. Pored toga, iPSC se koriste u proučavanju normalnog rasta i razvoja i za identifikovanje uzroka urođenih anomalija.

Tumorske matične ćelije

Nedavna istraživanja dovela su do novih saznanja o nastanku tumora i do otkrića tumorskih matičnih ćelija (engl. CSC - cancer stem cell). To je mala subpopulacija ćelija unutar tumora koja poseduje osobine slične normalnim matičnim ćelijama, kao što je sposobnost samoobnavljanja i diferenciranja, ali i tumorigeneze. Signalni putevi za samoobnavljanje poput Bmi1 i Wnt/ β -katenin imaju slične efekte i u normalnim i u tumorskim matičnim ćelijama, što upućuje na zaključak da isti molekularni putevi regulišu obe populacije ćelija.

Tumorske matične ćelije mogu uzrokovati relapse tumora i udaljene metastaze. Najčešće se nalaze u stanju tumorskog mirovanja, zahvaljujući genetskim i epigenetskim promenama kao i prilagođavanju imunskom sistemu (teško ih je otkriti). Svojstva tih ćelija su

metastaziranje, povećana invazivnost, rezistencija na apoptozu, mogućnost popravke tumorske DNA, amplifikacija signalnih puteva i činilaca koji regulišu cikluse hipoksije i oksigenacije kao i prilagođavanje mikro-sredini, imunološka nevidljivost i otpornost na terapiju zračenjem i na hemoterapiju. Tumorske matične ćelije i njihovi markeri predstavljaju važnu metuu razvoju novih protitumorskih lekova.

AKTUELNA ISTRAŽIVANJA PRIMENE MATIČNIH ĆELIJA U TERAPIJI

Istraživanja terapijske primene matičnih ćelija evidentiraju se nekoliko decenija unazad. Zasnivaju se na očekivanjima da će nam pomoći kako u razumevanju, tako i u lečenju mnogih oboljenja i traumatskih oštećenja različitih tkiva. Njihov terapijski potencijal je očigledan, a do sada je posebno iskazan u primeni matičnih ćelija krvi u lečenju bolesti krvi, bolesti ili povrede kostiju, kože i površine oka. Ipak, međunarodna asocijacija za istraživanja stem ćelija (International Society for Stem Cell Research) savetuje oprez svima koji bi mogli biti zainteresovani za lečenje matičnim ćelijama zbog nekritičnih komercijalnih ponuda koje nisu jednake kliničkim istraživanjima, a zahtevaju nadoknadu od učesnika projekta uz neizvestan ishod.

Trenutno je u toku veliki broj kliničkih studija sa ciljem ispitivanja njihove primene u brojnim medikopatoškim stanjima.

Neuropsihijatrijski sindromi

Nosioci neurogeneze u adultnom CNS su matične ćelije (MĆ) - neuralne progenitorske ćelije, koje imaju sposobnost samoobnavljanja, ali i diferencijacije ka ćelijama neuronskog ili glijalnog tipa. Broj ovih ćelija relativno je mali i ograničen na dve regije adultnog CNS - hipokampus, odnosno subgranularnu zonu, gyrus dentatus i subventrikularnu zonu lateralnih komora. Brojnost MĆ, kao i brzina neurogeneze u adultnom CNS nisu dovoljni za reparaciju i regeneraciju oštećenja koja postoje kod neuroloških oboljenja, iako je dokazano da neurogenezu stimuliše oštećenje moždanog tkiva, kao i pojedini hormoni i neurotransmiteri, ali i da u krvi postoji cirkulišuća populacija MĆ koja bi mogla da vrši dopunu neuralnih progenitorskih ćelija adultnog CNS.

U periodu od 1999. do 2018. godine rađeno je više od 200 kliničkih studija (201) koje su istraživale primenu stem ćelija u neuropsihijatrijskim sindromima. Više od polovine studija odnosi se na lečenje multiple skleroze, moždanog udara i povrede kičmene moždine. Ostale studije se uglavnom odnose na cerebralnu

paralizu, amiotrofičnu lateralnu sklerozu, hipoksičnu ishemijsku encefalopatiju, autizam, Parkinsonovu bolest, Alzhajmerovu bolest, ataksiju i dr. Indikacije sa manje od 5 registrovanih kliničkih studija obuhvataju tumore mozga, atrofiju više sistema nervnog tkiva, dijabetičku neuropatiju, cerebralnu adrenoleukodistrofiju, epilepsiju, mentalnu retardaciju, progresivnu supranuklearnu paralizu i fibromijalgiju. Terapijska primena matičnih ćelija zasniva se na njihovoj sposobnosti oslobađanja neurotrofičnih faktora i diferencijaciji u neurone i glijalne ćelije, čime se promovise neurogeneza i zamena bolesnih ili povredom oštećenih delova mozga. Međutim, postoje studije koje ukazuju i na negativne efekte. U njima se ističe neuspešnost dostizanja postavljenih osnovnih ciljeva, kao i pojava oštećenja organizma koja se mogu povezati sa nedovoljno definisanim indikacijama za primenu terapije stem ćelijama.

Morfološka oštećenja srca

Matične ćelije se mogu koristiti ne samo za zamenu oštećenog srčanog tkiva i zalistaka, nego i celog srca, kao i za uspostavljanje novih krvnih sudova u zonama oštećenja. Najnovija istraživanja podrazumevaju višestruki pristup istovremenog obnavljanja srčanih mišićnih ćelija i vaskularnog sistema srca, korišćenjem dve vrste matičnih ćelija koje se aplikuju na dva različita načina. Indukovane pluripotentne matične ćelije, derivati kardiomiocita se intramiokardijalno ubrizgavaju direktno u graničnu zonu srca pacova, dok se flaster impregniran hMSC postavlja na područje infarkta, poput zavoja. Rezultati opravdavaju nadu da bi lečenje srca oštećenog infarktomiokarda moglo biti pristupačnija alternativa transplantaciji srca. Isti princip bi se mogao primeniti i u lečenju drugih organa: mozga, jetre i pankreasa, u kojima postoji više vrsta matičnih ćelija.

Funkcionalni poremećaji srčane akcije

Sindrom produženog QT intervala je potencijalno teški aritmogeni poremećaj, povezan sa produženim QT intervalom i iznenadnom smrću. Aktuelna istraživanja tragaju za mestom humanih indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija u terapiji ove forme aritmije.

Makularna degeneracija

Makularna degeneracija je takođe značajni izazov za istraživače. Na osnovu animalnih eksperimenata, autori saopštavaju da postoje uslovi za početak ispitivanja na ljudima.

Autoimunski sindromi (Reumatoidni artritis)

Terapija matičnim ćelijama namenjena lečenju autoimunskih stanja je relativno novo područje istraživanja. Reumatoidni artritis (RA) kao najčešća autoimunska bolest zglobova predmet je posebne pažnje. Pokazano je da se mezenhimalne matične ćelije mogu razviti u hrskavicu i kosti i da su sposobne da suprimiraju imunski sistem i smanje upalni odgovor organizma, što terapiju mezenhimalnim matičnim ćelijama čini obećavajućom opcijom lečenja za autoimunske bolesti poput RA. Terapija uključuje ubrizgavanje ovih ćelija direktno u tkiva koja okružuju zahvaćene zglobove. Međutim, postoje i kritički osvrti i upozorenja o neželjenim efektima primene stem ćelijske terapije u lečenju RA. Oni obeshrabruju primenu ovakvih terapijskih tehnika i ukazuju na besmislenost terapije zbog manjkavosti metodologije, rizika i izostanka efekta, a na drugoj strani ekonomskog iscrpljivanja korisnika zbog intervencije za koju se ne može garantovati uspeh.

Dijabetes tip II

Tokom 2017. godine, analizirano je 13 studija publikovanih od 2006. do 2016. sa rezultatima koji još uvek nedovoljno preporučuju ovaj tretman. Međutim, rezultati brazilske studija lečenjadijabetesatipa I (21 bolesnik) ukazali su na mogućnost smanjenja ili prekida insulinske terapije tokom nekoliko godina kod jednog broja bolesnika.

Terapija kancera

Odnos matičnih ćelija i tumorogeneze fascinira istraživače decenijama. Matične ćelije stvaraju ili regenerišu tkiva i organe umnožavanjem i diferencijacijom u više specijalizovanih tipova ćelija putem visoko regulisane ćelijske deobe. Ona je pod strogom kontrolom specifičnih gena. Kada oni mutiraju, ćelije se mogu deliti van kontrole. Razumevanje procesa normalnog ćelijskog razvoja može pomoći u identifikovanju novih efikasnih ciljeva za terapiju raka.

Da li rak može nastati iz matičnih ćelija? Tragom ovog pitanja, utvrđeno je da su matične ćelije kože i creva podložnije stvaranju tumora od ostalih ćelija u tim organima. Tumorske ćelijekoriste gene, koji su obično uključeni u razvoj i deobu matičnih ćelija, da iniciraju aberantni rast. U nedavnom istraživanju koje je sprovedeno u dečjoj bolnici u Bostonu praćen je proces transformacije melanocita u ćeliju malignog melanoma usled reaktivacije gena specifičnih za rani razvoj embriona. Uvid u najranije faze nastanka

maligniteta omogućava istraživačima da definišu nove lekove koji bi mogli imati preventivni značaj. Premda je veza između matičnih ćelija i tumorogeneze prilično evidentna, potrebno je još istraživanja u toj oblasti u cilju razvoja specifičnih dijagnostičkih i terapijskih tehnika.

ZAKLJUČAK

Budućnost ćelijske terapije u lečenju mnogih bolesti već sada jesusvim izvesna. Ostaju važna pitanja na koje odgovore mogu dati ozbiljna istraživanja utemeljena na sadašnjim saznanjima i bazičnim naučnim postavkama, a koja se tiču pitanja vrste ćelija, njihove optimalne kultivacije, načina umnožavanja, aplikacije, kao i optimalnog vremenskog okvira za ovakvu vrstu lečenja.

Iako je iz embrionalne matične ćelije moguće dobiti bilo koju ćeliju organizma, postoji rizik da iz nje nastane i tumorska ćelija. Zato trenutna zamisao lečenja matičnim ćelijama obuhvata izolaciju iPS iz obolelog, njihovu diferencijaciju, kao i lečenje presađivanjem diferenciranih ćelija. Obzirom da upotreba iPS zaobi-

lazi kontroverznu primenu zametaka, a omogućava uspostavljanje totipotencije i kod odraslih ćelija, čini se da su mogućnosti za upotrebu takve vrste ćelija, koje odgovaraju embrionalnim matičnim ćelijama, u regenerativnoj i reparativnoj terapiji ćelijama sve bliže.

Pored značajnih rezultata u korist tretmana različitih bolesti matičnim ćelijama, postoje i problemizirovani njihovom terapijskom primenom. Naime, uvek postoji mogućnost da transplantirane ćelije ne pokažu željeni efekat u organizmu ili budu odbačene posredstvom imunskog sistema. Takođe je važno razmotriti pitanja prihvatljivosti sa etičkog aspekta s obzirom da izolovanje embrionalnih matičnih ćelija podrazumeva i smrt samog embriona, što umnogome ograničava njihovo istraživanje. Potrebno je ispitati etička pitanja i u vezi sa njihovom primenom za radikalno produženje života.

Neophodno je definisati i profesionalne standarde saglasnosti pacijenata za intervencije matičnim ćelijama. Uvođenje standarda adekvatnog informisanog pristanka obezbedilo bi nezavisnu osnovu za odgovornost i veću pravnu sigurnost korisnika.

LITERATURA

1. Abd-Elhalem SS, Haggag NZ, El-Shinnawy NA. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress IL-9 in adjuvant-induced arthritis. *Autoimmunity* 2018; 51 (1):25-34.
2. Alessandrini MO, et al. Stem cell therapy for neurological disorders. *S Afr Med J* 2019;109 (8 Suppl 1): S71-S78.
3. Atkinson-Dell R, Mohamet L. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Astroglia: A New Tool for Research Towards the Treatment of Alzheimer's Disease. *Adv Exp Med Biol* 2019;1175:383-405.
4. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008; 10; 2 (4):313-9.
5. Boveri T. *Sitzungsber d Gesellschaft f Morphologie und Physiologie*. 1892b; 114-225.
6. Burt RK, Balabanov R, Burman J, Sharrack B, Snowden JA, Oliveira MC, Fagius J, Rose J, Nelson F, Barreira AA, Carlson K, Han X, Moraes D, Morgan A, Quigley K, Yaung K, Buckley R, Alldredge C, Clendenan A, Calvario MA, Henry J, Jovanovic B, Helenowski IB. Effect of Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation vs Continued Disease-Modifying Therapy on Disease Progression in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2019; 321(2):165-174.
7. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007; 213(2):341-7.
8. Chez M, Lepage C, Parise C, Dang-Chu A, Hankins A, Carroll M. Safety and Observations from a Placebo-Controlled, Crossover Study to Assess Use of Autologous Umbilical Cord Blood Stem Cells to Improve Symptoms in Children with Autism. *Stem Cells Transl Med* 2018; 7 (4):333-341.
9. Cyranoski D. Japan's approval of stem-cell treatment for spinal-cord injury concerns scientists. *Nature* 2019; 565 (7741):544-545.
10. Cyranoski D. The potent effects of Japan's stem-cell policies. *Nature* 2019; 573 (7775): 482-485.
11. Dittmer J, Leyh B. Paracrine effects of stem cells in wound healing and cancer progression (Review). *Int J Oncol* 2014; 44(6):1789-98.
12. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol* 2013; 4:201.
13. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2011; 20(1):5-14.

14. De Miguel MP, Arnalich Montiel F, Lopez Iglesias P, Blazquez Martinez A, Nistal M. Epiblastderived stem cells in embryonic and adult tissues. *Int J Dev Biol* 2009; 53(8-10):1529-40.
15. Di Matteo B, Vandenbulcke F, Vitale ND, Iacono F, Ashmore K, Marcacci M, Kon E. Minimally Manipulated Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review of Clinical Evidence. *Stem Cells Int* 2019; 1735242.
16. Eridani S. Types of Human Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem Cell Discovery*. 2014; 13-26.
17. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. *Nature*.1981; 292: 154-156.
18. Haeckel E. *Natürliche Schöpfungsgeschichte*. Berlin: Georg Reimer, 1868.
19. Häcker V. *Archiv f mikr Anat* 1892; 39: 556-581.
20. Hass R, Otte A. Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment. *Cell Commun Signal* 2012; 10 (1):26.
21. Kaufman CK, Mosimann C, Fan ZP, Yang S, Thomas AJ, Ablain J, Tan JL, Fogley RD, van Rooijen E, Hagedorn EJ, Ciarlo C, White RM, Matos DA, Puller AC, Santoriello C, Liao EC, Young RA, Zon LI. A zebrafish melanoma model reveals emergence of neural crest identity during melanoma initiation. *Science* 2016;351 (6272): aad 2197.
22. Krstić M. Zdrava porodica i uspešno roditeljstvo: antropološka analiza internet medija o čuvanju matičnih ćelija u Srbiji. *Antropologija* 2012; 12(3): 139-70.
23. Laskowitz DT, Bennett ER, Durham RJ, Volpi JJ, Wiese JR, Frankel M, Shpall E, Wilson JM, Troy J, Kurtzberg J. Allogeneic Umbilical Cord Blood Infusion for Adults with Ischemic Stroke: Clinical Outcomes from a Phase I Safety Study. *Stem Cells Transl Med* 2018; 7 (7):521-529.
24. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The Biology of Cancer Stem Cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 675-699.
25. Malmegrim KC, de Azevedo JT, Arruda LC, Abreu JR, Couri CE, de Oliveira GL, Palma PV, Scortegagna GT, Stracieri AB, Moraes DA, Dias JB, Pieroni F, Cunha R, Guilherme L, Santos NM, Foss MC, Covas DT, Burt RK, Simões BP, Voltarelli JC, Roep BO, Oliveira MC. Immunological Balance Is Associated with Clinical Outcome after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Type 1 Diabetes. *Front Immunol* 2017;8:167.
26. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* 2013;15(45):e54.
27. Nikolić I. *Embriologija čoveka : tekst i atlas*. Data status 2010.
28. Obradović D, Balint B, Dinčić E, Raičević R, Obradović S, Tončev G, Kostić V. Primena matičnih ćelija u lečenju neuroloških oboljenja - da li je budućnost već stigla? *Vojnosanit Pregl* 2008; 65 (6): 473-480.
29. Okita K, Yamanaka S. Induction of pluripotency by defined factors. *Experimental Cell Research* 2010; 316: 2565-2570.
30. Park SJ, Kim RY, Park BW, Lee S, Choi SW, Park JH, Choi JJ, Kim SW, Jang J, Cho DW, Chung HM, Moon SH, Ban K, Park HJ. Dual stem cell therapy synergistically improves cardiac function and vascular regeneration following myocardial infarction. *Nat Commun* 2019; 10 (1):3123.
31. Patel DM, Shah J, Srivastava AS. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int* 2013 (3): 496218.
32. Patel P, Chen EI. Cancer stem cells, tumor dormancy, and metastasis. *Front Endocrin* 2012; 3:125.
33. Pistoia V, Raffaghello L. Mesenchymal stromal cells and autoimmunity. *Int Immunol* 2017; 29(2):49-58.
34. Potdar P, Lotey N. Stem cells- A promise to elixir. *Enliven: J Stem Cells Regen Med* 2014; 1(1):003.
35. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Wan W, Ratajczak J, Wojakowski W, Kucia M. Hunt for pluripotent stem cell -- regenerative medicine search for almighty cell. *J Autoimmun* 2008; 30 (3):151-62.
36. Rodgerson DO, Harris AG. A Comparison of Stem Cells for Therapeutic Use. *Stem Cell Rev and Rep* 2011; 7:782-796.
37. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term „stem cell“. *Cell Stem Cell* 2007; 1(1):35-8.
38. Sala L, Gneccchi M, Schwartz PJ. Long QT Syndrome Modelling with Cardiomyocytes Derived from Human-induced Pluripotent Stem Cells. *Arrhythmia & Electrophysiology Review* 2019; 8(2):105-10.
39. Simons BD, Clevers H. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell* 2011; 145 (6):851-62.
40. Sharma R, Khristov V, Rising A, Jha BS, Dejene R, Hotaling N, Li Y, Stoddard J, Stankewicz C, Wan Q, Zhang C, Campos MM, Miyagishima KJ, McGaughey D, Villasmil R, Mattapallil M, Stanzel B, Qian H, Wong W, Chase L, Charles S, McGill T, Miller S, Maminishkis A, Amaral J, Bharti K. Clinical-grade stem cell-derived retinal pigment epithelium patch rescues retinal degeneration in rodents and pigs. *Sci Transl Med* 2019; 11(475).
41. Shinya Yamanaka- Facts [Internet] 2014; http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/yamanaka-facts.html

42. Singh MS, Park SS, Albin TA, Canto-Soler MV, Klassen H, MacLaren RE, Takahashi M, Nagiel A, Schwartz SD, Bharti K. Retinal stem cell transplantation: Balancing safety and potential. *Prog Retin Eye Res* 2019; 100779.
43. Sun Z, Wang S, Zhao RC. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol* 2014; 7:14.
44. Sugarman J, Barker RA, Charo RA. A Professional Standard for Informed Consent for Stem Cell Therapies. *JAMA* 2019. doi: 10.1001/jama.2019.11290. [Epub ahead of print]
45. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.
46. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic Stem Cells Derived from Human Blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
47. Trivanović D. et al. Mesenchymal Stem Cells Isolated from Peripheral Blood and Umbilical Cord Wharton's Jelly. *Srp Arh Celok Lek* 2013;141(3-4):178-186.
48. van Megen KM, van 't Wout ET, Forman SJ, Roep BO. A Future for Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Type 1 Diabetes. *Front Immunol* 2018; 6:9:690.
49. Woodworth CF, Jenkins G, Barron J, Hache N. Intramedullary cervical spinal mass after stem cell transplantation using an olfactory mucosal cell autograft. *CMAJ* 2019;191(27):E761-E764.
50. Wobus A, Boheler K. Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol Rev* 2005; 85: 635-78.
51. Weismann A. Die Continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung. Jena: Gustav Fischer, 1885.
52. Yang X, Hou J, Han Z, Wang Y, Hao C, Wei L, Shi Y. One cell, multiple roles: contribution of mesenchymal stem cells to tumor development in tumor microenvironment. *Cell Biosci* 2013; 3 (1):5.
53. Yasuhara T, Kawauchi S, Kin K, Morimoto J, Kameda M, Sasaki T, Bonsack B, Kingsbury C, Tajiri N, Borlongan CV, Date I. Cell therapy for central nervous system disorders: Current obstacles to progress. *CNS Neurosci Ther* 2019; 00: 1-8.
54. Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng F, Zhou Q. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation *Nature* 2009; 461:86-90.
55. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4:381-384.

PRETKLINIČKE I KLINIČKE STUDIJE PSIHIJATRIJSKIH BOLESTI

AUTORI

Miroslav Adžić, Željka Brkić, Miloš Mitić, Iva Lukić
Institut za nuklearne nauke Vinča

SAŽETAK

Mentalni poremećaji su glavni uzročnici morbiditeta i mortaliteta i značajno opterećuju društvo bolestima. Prema podacima SZO (2017), 4,4% svetske populacije pati od depresivnih (350 miliona) i 3,6% od anksioznih poremećaja. Više od jedne decenije istraživači iz Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ koristeći translacioni pristup u animalnim i humanim studijama ispituju fundamentalne biološke procese koji su u osnovi ovih poremećaja kao i različite farmakološke tretmane. Naši glavni rezultati ukazuju na to da fosforilacija glukokortikoidnog receptora značajno doprinosi rezistenciji na glukokortikoide i da su transkripcioni pro-oksidativni faktori odgovorni za regulaciju pro-oksidativnog i -inflatornog stanja u depresiji. Rezultati naših istraživanja ističu da inflamatorni procesi doprinose depresiji utičući na neurotransmisiju, neuroplastičnost i neuroendokrine procese, ukazujući na povoljne efekte antiinflamatorne terapije kod ove bolesti. Da bi se razotkrili mehanizmi koji su uzročnici mentalnih bolesti i dizajnirali novi tretmani, neophodna su sveobuhvatnija istraživanja molekula, ćelija i nervnih struktura i njihova asocijacija sa tipičnim i atipičnim oblicima ponašanja.

Ključne reči: HPA osa, glukokortikoidni receptor, stress, fluoxetin, depresija

ENGLISH

PRECLINICAL AND PATIENT STUDIES OF PSYCHIATRIC DISORDERS

SUMMARY

Mental disorders cause considerable morbidity and mortality, and they present leading contributor to the global burden of disease. According to WHO data (2017) 4.4% of the global population suffer from depressive (350 mil.) and 3.6% from anxiety disorders. More than a decade, researchers from the Vinca Institute of Nuclear Sciences using „bench-to-bedside“ human-animal studies examined fundamental biological processes underlying susceptibility to these disorders and pharmacological treatments. Our major results emphasised that the phosphorylation to the glucocorticoid receptor, is a major contributor to the glucocorticoid resistance and that redox-sensitive transcription factors are involved in pro-oxidative and -inflammatory states in major depression (MD). Our research suggested that inflammation contributed to the MD by altering neurotransmission, neuroplasticity, and neuroendocrine processes, emphasising a beneficial effect of anti-inflammatory add-on therapy in depression. To unravel the mechanisms that lead to mental illnesses and to target novel treatments, more comprehensive descriptions of the molecules, cells, and circuits associated with typical and atypical behavior are necessary.

Key words: HPA axis, glucocorticoid receptor, stress, fluoxetine, depression

UVOD

Istraživanja u oblasti biomarkera doživela su ogroman uspeh u različitim oblastima medicine ali njihovo korišćenje u dijagnozi i predviđanju odgovora na lečenje psihijatrijskih poremećaja je daleko od realne primene. Trenutno, klinička primena biomarkera u psihijatriji je još uvek u početnim fazama, iako na njihovoj identifikaciji istraživači širom sveta rade skoro dve decenije. Osim dijagnostičiranja specifičnih stanja, biomarkeri takođe mogu da se koristi za predviđanje kliničkog toka bolesti, praćenja efekata tretmana i identifikovanje specifičnih podskupova unutar dijagnostičkih sindroma S obzirom na veliki broj psihijatrijskih dijagnoza kao i na osnovu različite etiologije nastanka mentalnih bolesti, veoma je teško identifikovati biomarker koji bi imao veliki značaj u postavljanju dijagnoze.

Skoro sve psihijatrijske bolesti u svojoj osnovi imaju promene na neurotransmiterskom sistemu, aktivnosti hipotalamo-hipofizna-adrenalna (HPA) ose i neuroinflamaciji. S obzirom da istraživanja u biološkoj psihijatriji u poslednje vreme imaju veliki značaj za razumevanje biološke osnove psihijatrijskih poremećaja u ovom radu se osvrćemo na naše rezultate dobijene na životinjskim modelima psihijatrijskih bolesti i pacijentima sa različitim dijagnozama tokom poslednjih godina.

CILJ RADA

Predmet ovog rada je sumiranje rezultata efekata stresa, neuroinflamacije i dejstva antidepresiva na fosforilaciju i funkciju glavnog regulatora HPA ose, glukokortikoidnog receptora (GR) u moždanim strukturama pacova oba pola. Pored ovoga, cilj rada je i validacija dobijenih rezultata na eksperimentalnim životinjama kod pacijenata sa depresijom.

METODE RADA

U eksperimentima korišćene su ženke i mužjaci pacova Wistar soja, odgajani u prostorijama vivarijuma za eksperimentalne životinje Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta „Vinča“. Životinje korišćene u eksperimentu odgajane su u standardnim laboratorijskim uslovima, na temperaturi od $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Pacovi su držani u kavezima standardne veličine (425 x 266 x 185 mm), sa slobodnim pristupom komercijalnoj hrani (Veterinarski zavod Subotica) i vodi. Svetlo je bilo uključeno u periodu 07:00-19:00 h. Rad sa eksperimentalnim životinjama bio je odobren od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama, Insti-

tuta za nuklearne nauke „Vinča“, koji je u skladu sa pravilima i nacrtima Srpskog udruženja za korišćenje životinja u nauci i obrazovanju. Sve životinje su prošle bateriju testova ponašanja i merena im je koncentracija serumskog kortikosterona. Metodom Western blota merena je nivo praćenih proteina a metodom RealTime PCR merena je ekspresija gena regulisanih GR.

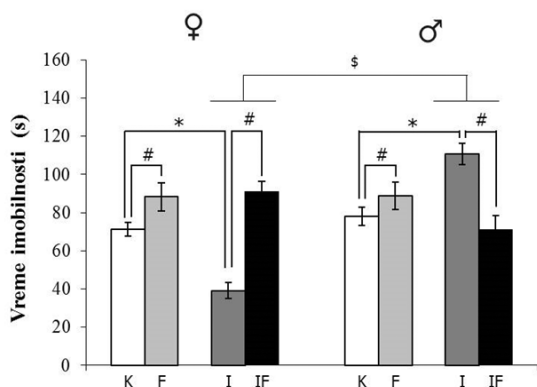
U uzorcima krvi pacijenata sa depresijom i zdravih subjekata regrutovanih na Klinici za psihijatriju Kliničkog centra Srbije, mereni su hormone i molekularni parametri GR signalizacije

Ova studija je odobrena od Medicinskog etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije. Svi učesnici u studiji, pacijenti sa depresivnim poremećajem i kontrolni ispitanici, pre ulaska u studiju su bili upoznati sa procedurom i ciljem istraživanja i dali su svoj pismeni pristanak da učestvuju u istoj. U analizi rezultata, u zavisnosti od studije korišćene su odgovarajuće statističke metode uključujući jednofaktorijalnu, dvofaktorijalnu i trifaktorijalnu ANOVU, Mann Whitney test, korelacione analize i linearnu regresiju.

REZULTATI

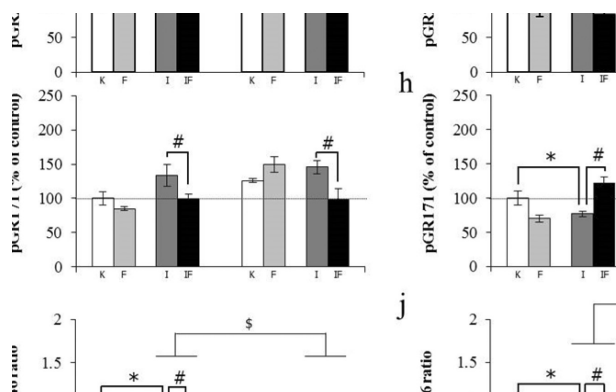
Efekat fluoksetina na ponašanje životinja izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije u u testu prinudnog plivanja i na koncentraciju kortikosterona

Kod kontrolnih nestresiranih životinja hronični tretman fluoksetinom značajno je povećao vreme imobilnosti u odnosu na tretman vijaklom kod oba pola/u odnosu na odgovarajuće grupe (grupe F vs K) (za ženke $F=53.76$, $p<0.05$; za mužjake $F=2.19$, $p<0.05$) (Slika 1). Dalje, kod stresiranih ženki hronični tretman fluoksetinom je uspeo da normalizuje ponašanje odnosno da vrati vreme imobilnosti na kontrolni nivo koji je prethodno značajno smanjen pod uticajem hronične socijalne izolacije ($F=12.52$, $p<0.05$). Kod mužjaka tretman fluoksetinom je takođe normalizovao ponašanje ali na drugačiji način u odnosu na ženke. Naime, fluoksetin je značajno smanjio vreme imobilnosti kod stresiranih mužjaka ($F=26.54$, $p<0.05$), kod kojih je prethodno hronična socijalna izolacija značajno smanjila vreme imobilnosti.



Slika 1. Promene u dužini trajanja imobilnosti (izražene u broju intervala od po 5 sekundi u roku od 5 minuta) u FST-u u kontrolnim i stresiranim ženjkama i mužjacima Wistar pacova tretiranih vijaklom ili fluoksetinom. Grupe: K - kontrolne nestresirane životinje + vijakl; F - nestresirane životinje + fluoksetin; I - stresirane životinje + vijakl; IF - stresirane životinje + fluoksetin. Vrednosti su prikazani kao srednja vrednost merenja \pm SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p < 0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, \$ ženke vs mužjaci).

U kontrolnim grupama životinja koncentracija KORT-a je iznosila za ženke 136.8 ± 44.5 i za mužjake 136.8 ± 44.5 ng/ml (Slika 18). Međutim, u serumu životinja izlaganih hroničnoj socijalnoj izolaciji izmerena koncentracija iznosila je za ženke 64.7 ± 28.3 ng/ml, a za mužjake 64.7 ± 28.3 ng/ml i statistički je bila značajno smanjena u odnosu na koncentraciju izmerenu u kontrolama oba pola (* $p < 0.05$), Slika 2.



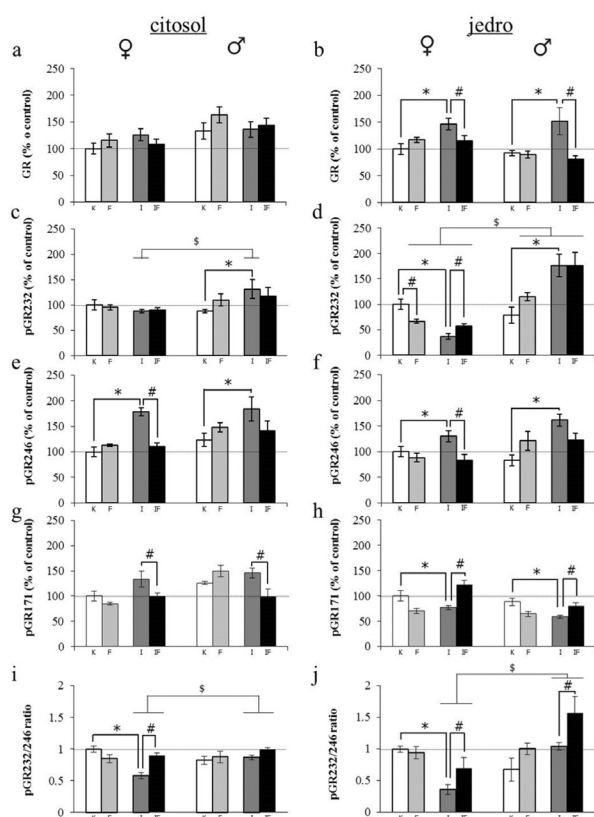
Slika 2. Koncentracija kortikosterona (ng/ml) u serumu kontrolnih i stresiranih ženki (♀) i mužjaka (♂) Wistar pacova tretiranih vijaklom i fluoksetinom. Grupe: K - kontrolne nestresirane životinje + vijakl; F - nestresirane životinje + fluoksetin; I - stresirane životinje + vijakl; IF - stresirane životinje + fluoksetin. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost merenja \pm SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p < 0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, \$ ženke vs mužjaci).

Efekat fluoksetina na GR i njegov fosforilacioni status (pGR) u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije

Hronični stres nije doveo do bilo kakvih promena na nivou totalnog GR-a u citosolu hipokampusa bilo kod ženki bilo kod mužjaka (Slika 3). Za razliku od citosola, u jedru je hronična izolacija značajno povećala nivoe totalnog GR-a kod oba pola (ženke $F=8.70$, $p < 0.05$; mužjaci $F=6.40$, $p < 0.05$) (Slika 3). Statistička analiza trofaktorijskom ANOVOM nije pokazala polno-specifične razlike ni u citosolu ni u jedru kod životinja izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije (Slika 3). Dalje, hroničan tretman fluoksetinom nije značajno uticao na nivo GR-a u citosolu hipokampusa kako kontrolnih tako i hronično stresiranih životinja oba pola. Statistička analiza trofaktorijskom ANOVOM je potvrdila odsustvo bilo kakvog polno-specifičnog efekta fluoksetina na nivo GR-a u citosolu kako kod kontrolnih tako i kod životinja izloženih hroničnom stresu izolacije (Slika 3). Poput citosola, i u jedarnom ekstraktu pojedinačni tretman fluoksetinom nije pokazao nikakav efekat na nivo GR-a kod kontrolnih životinja oba pola (Slika 3). Međutim kod hronično stresiranih ženki i mužjaka tretman fluoksetinom je značajno smanjio nivo GR-a u jedarnoj frakciji (ženke $F=9.99$, $p < 0.05$; mužjaci $F=9.61$, $p < 0.05$), koji je prethodno pod uticajem hronične izolacije značajno povećan kod oba pola u odnosu na kontrolne životinje (ženke $F=8.70$, $p < 0.05$; mužjaci $F=6.40$, $p < 0.05$). Tačnije fluoksetin je uspeo da vrati nivo GR-a u jedru stresiranih životinja na nivo odgovarajućih kontrola.

U citosolu jedina statistički značajna promena na nivou fosfo-GR232 izoforme uočena je kod stresiranih mužjaka gde je uočeno povećanje u odnosu na kontrolne nestresirane mužjake ($F=4.61$, $p < 0.05$). Trofaktorijska ANOVA je pokazala prisustvo polno-specifičnih promena pod uticajem stresa na nivo pGR232 izoforme (interakcija pol \times stres, $F=9.62$, $p < 0.05$). U jedru hronični stres je značajno smanjio nivo pGR232 izoforme kod ženki ($F=85.40$, $p < 0.05$), dok je kod mužjaka imao suprotan efekat i značajno je povećao nivo ovog proteina ($F=24.27$, $p < 0.05$) (Slika 3). Dalje, ni stres ni fluoksetin nisu pokazali polno-specifičan efekat na nivou pGR171 izoforme ni u citosolu ni u jedru. Stres je povećao nivo pGR171 izoforme u citosolu hipokampusa kod oba pola, s tim što je to povećanje imalo odlike trenda, dok je u jedru imao suprotan efekat i statistički značajno smanjio nivo pGR171 kod oba pola (ženke: $F=9.538$, $p < 0.05$, mužjaci $F=7.564$, $p < 0.05$) (Slika 3). Hronični tretman

fluoksetinom jeuspeo da normalizuje promene izazvane stresom u oba ćelijska kompartmana koja smo ispitivali.

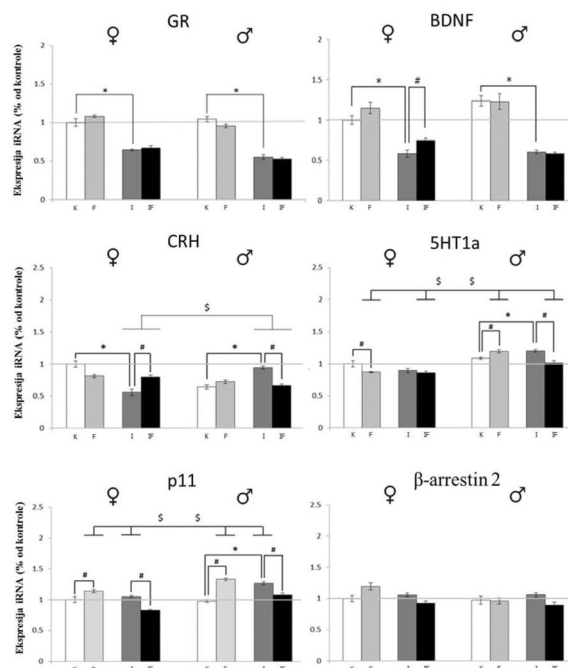


Slika 3. Relativna kvantifikacija nivoa ukupnog GR-a i njegovih fosfo-izoforni (pGR232, pGR246 i pGR171), kao i njihovog odnosa (pGR232/246) u citosolu (a, c, e, g, i) i jedru (b, d, f, h, j) hipokampusu kontrolnih i stresiranih ženki i mužjaka pacova tretiranih vijaklom i fluoksetinom. Grupe: K - kontrolne nestresirane životinje + vijakl; F - nestresirane životinje + fluoksetin; I - stresirane životinje + vijakl; P - nestresirane životinje + fluoksetin. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na kontrolne nestresirane ženke. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost merenja ± SEM.

Efekat fluoksetina na ekspresiju gena za GR, BDNF, CRH, 5HT1a, p11 i β-arrestin 2 u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije

Kod ženki izloženih hroničnoj izolaciji nađena je smanjena ekspresija gena za GR, BDNF i CRH (GR: $F=1423.800$; $p<0,05$; BDNF: $F=116.451$, $p<0,05$; CRH: $F=59,273$, $p<0,05$), dok kod gena za 5HT1a, p11 i β-arrestin nisu uočene značajne promene u ekspresiji u odnosu na kontrolne nestresirane životinje. Kod mužjaka stres je isto kao i kod ženki doveo do smanjenja ekspresije gena za GR i BDNF u odnosu na kontrole (GR: $F=367.723$; $p<0,05$; BDNF: $F=155.800$, $p<0,05$), dok je sa druge strane doveo do povećanja ekspresija gena za CRH, 5HT1a i p11 (CRH: $F=24,085$; $p<0,05$; 5HT1a: $F=15,537$, $p<0,05$; p11: $F=12,578$, $p<0,05$). Isto kao i kod

ženki nisu uočene promene na nivou ekspresije gena za β-arrestin 2 kod stresiranih mužjaka. Trofaktorijska ANOVA je pokazala prisustvo polno-specifičnog efekta na nivou CRH i p11 iRNA nivoa pod uticajem hroničnog stresa (pol x stres interakcija CRH: $F=32,579$, $p<0,05$; p11: $F=12,265$, $p<0,05$), Slika 4.



Slika 4. Ekspresije gena za GR i GR-regulisane gene, BDNF, CRH, 5HT1a, p11 i β-arrestin 2 u hipokampusu kontrolnih i stresiranih ženki i mužjaka pacova tretiranih vijaklom i fluoksetinom. Grupe: K - kontrolne nestresirane životinje + vijakl; F - nestresirane životinje + fluoksetin; I - stresirane životinje + vijakl; P - stresirane životinje + fluoksetin. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost merenja ± SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p<0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, \$ ženke vs mužjaci).

Uticaj tretmana lipopolisaharidom na komponente ponašanja i koncentraciju kortikosterona

Što se tiče nivoa kortikosterona, ANOVA je pokazala glavni efekat LPS-a na nivoe ovog hormona ($F=54.58$, $p<0.05$), koji su bili značajno povišeni kod ženki i mužjaka tretiranih LPS-om u odnosu na njihove kontrole, Tabela 1.

Tabela 1 - Fiziološki parametri, testovi ponašanja i novo kortikosterona. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja ± SEM i obradjeni su i One way ANOVA i post hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $p<0.05$ životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu; # $p<0.05$ mužjaci u odnosu na ženke.

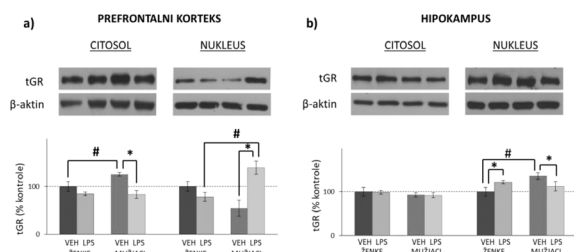
FIZIOLOŠKI PARAMETRI	VEH	ŽENKE		MUŽJACI	
		LPS	LPS	VEH	LPS
BW	5074±1.54	-6.49±1.32*	+9.82±0.73	-4.34±1.73*	
FCT	21.03±1.68	15.33±1.45*	25.38±1.21	18.25±1.50*	
FST	23.21±4.46	58.05±0.64*	35.21±3.03	51.39±2.58*	
Plivanje (fr/5min)	34.04±5.01	1.33±0.51*	21.28±3.37	6.22±1.96*	
Penjanje (fr/5min)	2.69±0.81	0.62±0.22	3.42±0.89	2.39±0.94	
SPT	81.76±6.09	49.31±4.17*	83.94±1.71	38.10±1.45*	
Unos vode (ml)	8.94±2.42	17.67±3.03*	9.42±1.78	22.50±5.86*	
OFT	56.07±4.45	33.74±5.03*	60.74±5.54	30.30±3.72*	
Vertikalna aktivnost	18.35±4.45	9.06±5.03*	24.76±5.54	10.91±1.26*	
Proiznojanje uz zidove	15.67±1.19	7.71±1.49*	15.58±1.38	8.58±0.99*	
Propinjanje u vazduhu	2.68±0.59	1.35±0.74	9.18±2.49*	2.33±0.84*	
Ulaz u centralne kvadrate (%)	3.69±0.60	4.73±0.94	4.46±0.79	2.97±0.94	
Vreme u centralnim kv. (%)	2.38±0.68	2.09±0.42	2.17±0.42	0.83±0.27	
Defekacija	0.60±0.43	1.17±0.42	1.26±0.41	1.09±0.81	
Čišćenje	2.55±0.63	2.76±0.35	3.21±0.54	2.91±0.50	
EPMT	11.40±1.05	5.79±0.67*	7.45±0.91	4.00±0.56*	
Ulasci u otvorene krake (%)	34.06±2.42	37.60±4.49	33.44±5.01	33.49±8.17	
Vreme u otvorenim kracima (%)	16.58±2.05	17.22±2.49	11.93±3.08	10.25±4.19	
Nivo serumskog kortikosterona (µg/ml)	189.00±16.27	395.50±40.81*	153.12±15.50	322.50±19.11*	

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SEM i analizirane two-way ANOVA testom, preračunati post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $p<0.05$ životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu; # $p<0.05$ mužjaci u odnosu na ženke. Legenda: BW - telesna težina; FCT - Test uzimanja hrane; Test; FST - Test forstiranja; plivanje; SPT - Test opredeljenja za saharozu; OFT - Test otvorenog polja; EPMT - Test uzidnog plus laviranta

Tretman LPS je značajno promenio depresivnu komponentu ponašanja kod oba pola i nije imao uticaj na anksioznost životinja (Tabela 1).

Uticaj LPS tretmana na nivoe glukokortikoidnog receptora i njegovih fosfoformi u citosolu i nukleusu PFC-a i hipokampusu

U PFC-u, uočen je značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivo GR-a u citosolu ($F=6.03$, $p<0.05$) i nukleusu ($F=24.94$, $p<0.05$). Nivo ovog proteina je bio značajno niži u citosolu i značajno viši u nukleusu mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom. Takođe je uočen i značajno viši nivo ovog proteina u citosolu mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženjkama, kao i u ćelijskom jedru PFC mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa ženjkama tretiranim LPS-om (Slika 5). Sa druge strane, u hipokampusu je uočen efekat interakcije pola i LPS-a na nivo GR-a samo u nukleusu ($F=5.63$, $p<0.05$). U ovom kompartmentu, uočen je povišen nivo GR-a kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na ženke tretirane fiziološkim rastvorom, dok kod mužjaka uočen je suprotan efekat. Takođe je zabeležen i značajno viši nivo ovog proteina kod kontrolnih mužjaka u odnosu na kontrolne ženke (Slika 5).



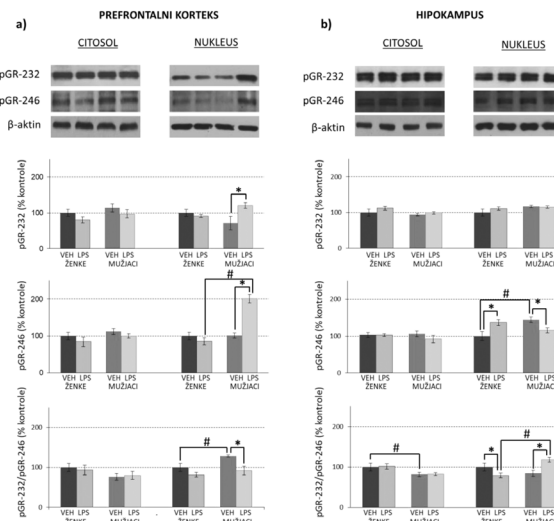
Slika 5. Nivoi glukokortikoidnog receptora u citosolu i nukleusu mužjaka i ženki Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u PFC-u (a) i hipokampusu (b). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM i obrađeni su i two-way ANOVA i post hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $p<0.05$ životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i # $p<0.05$ mužjaci u odnosu na ženke.

Analiza fosforilacije glukokortikoidnog receptora u PFC-u i hipokampusu

U PFC-u je uočen efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe obe fosfoforme samo u nukleusu ($F=15.78$ za pGR-232 i $F=40.00$ za pGR-246; $p<0.05$). U ovom kompartmentu, uočeno je značajno povećanje nivoa obe fosfoforme kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom. Uočen i značajno viši nivo pGR-246 kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženjkama (Slika 6). Takođe, uočen je značajan efekat interakcije na odnos pGR-232/pGR-246 u nukleusu ($F=13.14$; $p<0.05$). Ovaj odnos je značajno smanjen kod mužjaka

tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom, i značajno povišen kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke (Slika 6).

Kada je u pitanju hipokampus, uočen je efekat interakcije pola i LPS-a samo na nivoe pGR-246 u nukleusu ($F=18.38$, $p<0.05$), gde je došlo do povećanja nivoa ovog proteina kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na kontrolne jedinice, kao i do njegovog smanjenja kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom. Takođe je uočeno da je nivo ovog proteina značajno viši kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženjkama (Slika 6). Što se tiče odnosa ove dve fosfoforme, u citosolu je uočen značajan efekat pola ($F=19.26$, $p<0.05$), a u nukleusu interakcija pola i LPS-a ($F=31.51$, $p<0.05$). Dalja post hoc analiza je pokazala da je odnos pGR-232/pGR-246 bio značajno snižen u citosolu mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženjkama. Dalje, u nukleusu je uočen značajan pad ovog odnosa kod ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim ženjkama, kao i porast kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom i ženjkama tretiranim LPS-om (Slika 6).



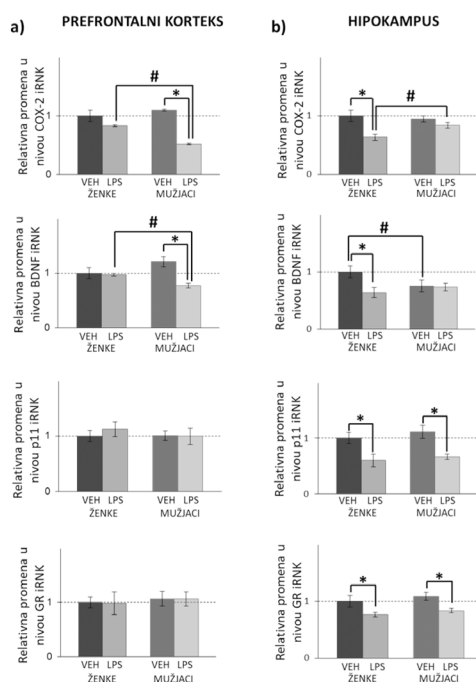
Slika 6. Nivo pGR-232 i pGR-246, kao i odnos pGR232/pGR-246 u citosolu i nukleusu ženki i mužjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u PFC-u (a) i hipokampusu (b). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM i obrađeni su i One way ANOVA i post hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $p<0.05$ životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i # $p<0.05$ mužjaci u odnosu na ženke.

Analiza ekspresije jedarnih gena regulisanih GR-om u PFC-u i hipokampusu

U PFC-u, najznačajniji i polno specifični efekti tretmana su uočeni na nivoe iRNK COX-2 i BDNF gena. Naime, uočen je efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe iRNK ova dva gena ($F=38.07$ za COX-2 i $F=25.03$

za BDNF; $p < 0.05$). Dalje, post hoc analiza je pokazala da su nivoi iRNK ova dva gena bili značajno sniženi kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom i sa ženkama tretiranim LPS-om (Slika 7). Sa druge strane, nisu uočeni efekti ni pojedinačnih faktora ni njihove interakcije na nivo p11 i GR iRNK.

I u hipokampusu je uočen efekat interakcije pola i LPS-a na nivo COX-2 ($F = 4.94$, $p < 0.05$) i BDNF iRNK ($F = 12.13$; $p < 0.05$), koji su bili značajno sniženi kod ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim životinjama. Pored toga, uočen je i značajno viši nivo COX-2 iRNK kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa ženkama podvrgnutim istom tretmanu, kao i značajno niži nivo BDNF iRNK kod kontrolnih mužjaka u odnosu na kontrolne ženke (Slika 7). Sa druge strane, uočen je značajan efekat LPS-a na nivo p11 i GR iRNK ($F = 1.97$ za p11 i $F = 31.12$ za GR; $p < 0.05$), koji su bili značajno sniženi i kod mužjaka i kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na njihove kontrole tretirane fiziološkim rastvorom (Slika 7).



Slika 7 - Eksprerija GR-reguliranih gena kod ženki i mužjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u PFC-u (a) i hipokampusu (b). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM i obradeni su i One way ANOVA i post hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $p < 0.05$ životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i # $p < 0.05$ mužjaci u odnosu na ženke.

Demografske i kliničke karakteristike kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom

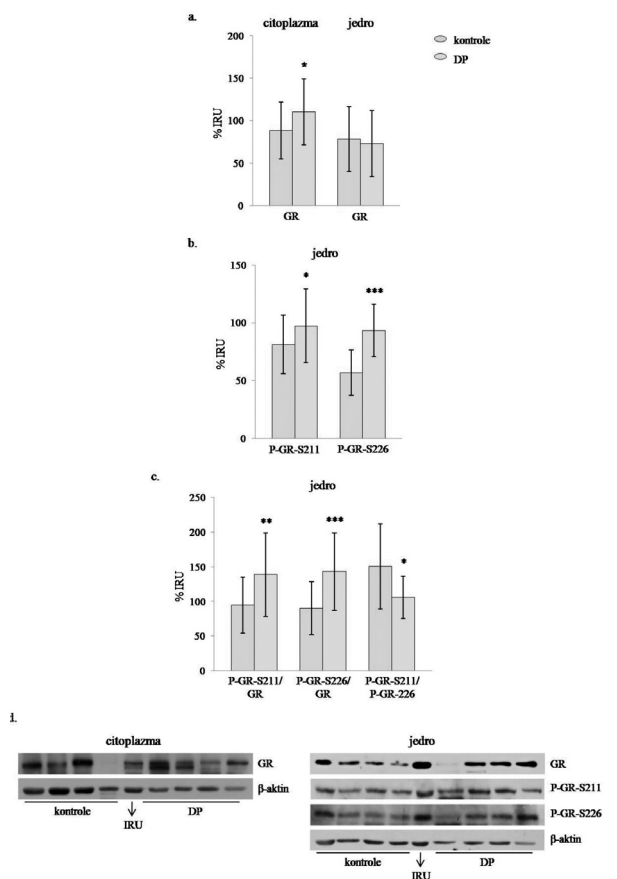
Karakteristike	Kontrole	DP	Vrednosti testa
Starost (godine)	39.49 \pm 9.64	44.77 \pm 7.58	$t = -2.423$; $p = 0.018$
Pol (muškarci/žene)	16/19	13/17	$\chi^2 = 0.037$; $p = 0.847$
DASS - depresija	6.17 \pm 6.63	26.67 \pm 10.88	$t = -9.507$; $p < 0.001$
DASS - anksioznost	5.83 \pm 6.06	20.47 \pm 10.72	$t = -7.478$; $p < 0.001$
DASS - stres	10.97 \pm 5.76	25.10 \pm 11.16	$t = -7.354$; $p < 0.001$
HAM-D	-	23.83 \pm 7.14	-
kortizol (nmol/l)	348 \pm 144	469 \pm 157	$t = -1.921$; $p = 0.059$
pušaње (% pušača)	31.40 %	70.00 %	$\chi^2 = 9.615$; $p = 0.002$

Tabela 1. Demografske i kliničke karakteristike subjekata.

Pacijenti su pokazali značajno više skorove na skalam depresije, anksioznosti i stresa u poređenju sa zdravim kontrolama, Tabela 1. Takođe, koncentracija kortizola u krvi je bila viša kod pacijenata sa depresivnim poremećajem u odnosu na kontrole, mada samo kao trend. Kod pacijenata je takođe bio veći procenat pušača nego u kontrolnoj grupi. Zbog ovih razlika u koncentraciji kortizola i procentu pušača između grupa kontrola i pacijenata, ove varijable su uzete kao kovarijati u daljem istraživanju.

Analiza glukokortikoidnog receptora i njegovih fosfo-izoforni u limfocitima kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom

Pokazano je da su pacijenti imali značajno viši nivo citosolnog GR-a ($t = -2.551$; $p < 0.05$), dok nije bilo razlika u nivou jedarnog GR-a. Rezultati t-testa su pokazali da su pacijenti imali više nivoa kako fosfo-GR-S211 ($t = -2.468$; $p < 0.05$) i fosfo-GR-S226 ($t = -6.955$; $p < 0.001$), tako i fosfo-GR-S211/GR ($t = -3.265$; $p < 0.01$) i fosfo-GR-S226/GR ($t = -4.038$; $p < 0.001$) u odnosu na kontrole. Takođe je računat i odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u cilju poređenja fosforilacije GR-a na ova dva epitopa. Pokazano je da su pacijenti imali niži nivo fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u odnosu na kontrole ($t = 3.533$; $p < 0.01$), Slika 8.



Slika 8. Nivoi ukupnog GR-a u citoplazmi i jedru, kao i njegovih fosfo-izoforni u jedru limfocita kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresivnom epizodom. (a.) Relativni nivoi ukupnog GR-a (GR) u citoplazmi i jedru; (b.) nivo jedarnih fosfo-GR-S211 (P-GR-S211) i fosfo-GR-S226 (P-GR-S226) normalizovanih u odnosu na β -aktin; (c.) nivoi fosforilisanog jedarnog GR-a na S211 i S226 (P-GR-S211/GR i P-GR-S226/GR), kao i odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 (P-GR-S211/P-GR-S226); (d.) reprezentativan Western blot. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Kontrole - kontrolna grupa, DP - grupa pacijenata sa akutnom epizodom depresije. Statistička značajnost iz t-testa: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja uzorka na gel. IRU - interni referentni uzorak.

U daljoj statističkoj analizi upotreбили smo generalnu linearni model (GLM) koji omogućava ispitivanje potencijalnog uticaja kovarijata na dobijene razlike u nivoima različitih formi GR-a između kontrola i pacijenata (Tabela 2). Nakon uzimanja u obzir kovarijata (pol, starost, koncentracija kortizola u krvi i pušenje), razlike u različitim formama GR-a između kontrolnog uzorka i pacijenata sa DP-om su ostale vrlo slične onima dobijenim korišćenjem t-testa. Koverijati pol, starost, kortizol i pušenje nisu pokazali statistički značajan uticaj ni na jednu od analiziranih vrednosti. Posmatranjem vrednosti η^2 , može se uočiti da je uticaj bolesti bio najveći na fosforilaciju GR-a na S226, a nešto manji na fosforilaciju GR-a na S211, odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226, kao i na nivo ukupnog GR-a u citoplazmi ($\eta^2 > 0.138$ - veliki uticaj; $0.06 < \eta^2 < 0.138$ - srednji uticaj) (Cohen, 1988).

Uticaj DP-a	citoplazma		jedro				
	GR	GR	P-GR-S211	P-GR-S266	P-GR-S211/GR	P-GR-S226/GR	P-GR-S211/P-GR-S266
Model 1 (bez kovarijata)	F=7.583 $p=0.009$ $\eta^2=0.159$	F=0.046 $p=0.831$ $\eta^2=0.001$	F=5.862 $p=0.020$ $\eta^2=0.128$	F=29.792 $p<0.001$ $\eta^2=0.427$	F=6.835 $p=0.013$ $\eta^2=0.146$	F=13.477 $p=0.001$ $\eta^2=0.252$	F=9.326 $p=0.004$ $\eta^2=0.189$
Model 2 (kovarijati: pol i starost)	F=10.641 $p=0.002$ $\eta^2=0.219$	F=0.013 $p=0.912$ $\eta^2=0.065$	F=5.247 $p=0.028$ $\eta^2=0.121$	F=30.524 $p<0.001$ $\eta^2=0.396$	F=6.865 $p=0.013$ $\eta^2=0.153$	F=10.095 $p=0.003$ $\eta^2=0.241$	F=8.614 $p=0.006$ $\eta^2=0.185$
Model 3 (kovarijati: pol, starost i kortizol)	F=11.006 $p=0.002$ $\eta^2=0.229$	F=0.076 $p=0.785$ $\eta^2=0.002$	F=5.105 $p=0.030$ $\eta^2=0.121$	F=20.471 $p<0.001$ $\eta^2=0.356$	F=5.765 $p=0.021$ $\eta^2=0.135$	F=10.682 $p=0.002$ $\eta^2=0.224$	F=6.396 $p=0.016$ $\eta^2=0.147$
Model 4 (kovarijati: pol, starost i pušenje)	F=8.928 $p=0.005$ $\eta^2=0.194$	F=0.160 $p=0.692$ $\eta^2=0.004$	F=4.531 $p=0.040$ $\eta^2=0.109$	F=18.048 $p<0.001$ $\eta^2=0.328$	F=4.872 $p=0.034$ $\eta^2=0.116$	F=8.308 $p=0.007$ $\eta^2=0.183$	F=4.980 $p=0.032$ $\eta^2=0.116$

Tabela 2. Rezultati GLM-a. Uticaj DP-a na nivo ukupnog GR-a (GR) u citoplazmi i jedru limfocita, kao i nivo jedarnih izoforni fosfo-GR-S211 (P-GR-S211), fosfo-GR-S226 (P-GR-S226) i odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 (P-GR-S211/P-GR-S226), kontrolisano za uticaj pola, starosti, kortizola i pušenja. Predstavljene su vrednosti testa (F), statistička značajnost (p) i veličina efekta (η^2).

DISKUSIJA

Uspesna adaptacija na stres podrazumeva zajedničku akciju hormona simpatoadrenalnog sistema i HPA ose na nekoliko nivoa u CNS-u, između ostalog i hipokampusu, dela limbičkog mozga koji je najosetljiviji na stres. Upravo kao jedan od najkonzistentnijih nalaza kod depresivnih pacijenata javlja se narušena funkcija HPA ose koja je, bar delimično, posredovana narušenom signalizacijom preko GR-a. Imajući u vidu gore navedeno, kao i važnost fosforilacije za funkciju GR sasvim je logično da je GR isplivao kao jedna od glavnih meta novih antidepresivnih lekova.

Rezultati dobijeni u FST-u u ovoj studiji potvrdili su prethodno dobijene rezultate u našoj laboratoriji ukazujući da tronedeljna hronična socijalna izolacija povećava ponašanje nalik-depresivnom kod mužjaka. Dalje, tretman fluoksetinom je uspeo da normalizuje vreme imobilnosti kod stresiranih mužjaka što je takođe u saglasnosti sa prethodno publikovanim rezultatima. Polne-specifične razlike uočene na nivou ponašanja u odgovoru na hronični stres i tretman fluoksetinom su u saglasnosti sa prethodno publikovanim rezultatima, i smatra se da suposledica različite hormonske osnove među polovima i različite strategije kada su izložene istom bihevioralnom izazovu/stimulusu (FST).

Iako je nivo KORT-a u serumu stresiranih životinja bio značajno bio smanjen kod oba pola, u jedrima hipokampusu ovih životinja uočeno je povećanja ukupnog nivoa GR-a. Nađeni rezultati ukazuju da ovo nagomilavanje GR-a u jedru nije izgleda posledica jednodnačne regulacije samim hormonom, već najverovatnije specifičnih promena na nivou proteina koji interaguju sa samim GR-om, poput šaperona i Hsp70 i/i 90. Dodatno, kod stresiranih životinja oba pola tretman

fluoksetinom je normalizovao nivo GR-a na nivo kontrola odnosno uspeo je neutrališe efekat hronične izolacije. U skladu sa našim dosadašnjim saznanjima ne postoji trenutno dostupna literatura koja govore o efektu hroničnog tretmana fluoksetinom na unutarćelijsku distribuciju GR-a i njegove nivoe u jedru hipokampusa pacova izloženih uticaju hronične socijalne izolacije. U uslovima hroničnog stresa uočili smo polno-specifične razlike na nivou čitave pGR232 signalne kaskade u jedru (p25/p35/CDK5/pGR232). Naime, dok je kod ženki stres smanjio aktivaciju (down-regulisao) čitave pGR232 signalizacije, kod mužjaka je uspeo da poveća aktivaciju. Rezultati nađeni kod mužjaka su u saglasnosti sa našim prethodnim rezultatima i potvrđuju da u uslovima hronične socijalne izolacije dolazi do povećanja nivoa pGR232 izoforme i u jedru i u citosolu hipokampusa koja je praćeno porastom nivoa CDK5 kinaze i njenih aktivatora, p35 i p25. Za razliku od mužjaka, kod ženki smo uočili suprotan efekat hroničnog stresora i pad nivoa jedarne pGR232 izoforme praćene smanjenjem p35 i p25 proteina i trendom smanjenja CDK5 kinaze. Naše dalje istraživanje je pokazalo da pored stresa i naknadni tretman fluoksetinom dovodi do polno-specifičnih promena na nivou pGR232 signalizacije u hipokampusu stresiranih životinja. Naime, fluoksetin je uspeo da neutrališe efekat stresa kod ženki na nivou čitavog signalnog puta pGR232, dok kod mužjaka nije imao efekta. Ovi rezultati ukazuju na postojanje polno-specifičnog mehanizma u hipokampusu, predominantno u jedru, preko koga fluoksetin utiče na regulaciju pGR232 signalizacije kod stresiranih pacova. Za razliku od pGR232 izoforme, na nivou pGR246 fosforilacije nismo uočili polno-specifične promene ni pod uticajem stresa ni pod dejstvom fluoksetina. Da bismo ispitali efekte hroničnog stresa i fluoksetina na GR transkripcionu aktivnost, kao i da li analizirane fosforilacije GR-a u jedru, pGR232, pGR246 i pGR171, utiču na istu, merili smo ekspresiju GR-reguliranih gena: GR-a, BDNF-a, CRH-a, 5HT1a, p11 i β-arestina 2 u hipokampusu ženki i mužjaka pacova. Geni koji su izabrani osim što su regulirani GR-om su geni koji važe za biomarkere glavnih neuralnih mreža/puteva koji su ključni u regulaciji odgovora na stres, kao i u mehanizmu dejstva antidepresiva. Polno-specifičan efekat fluoksetina na funkciju GR-a se jasno vidi i kroz promene u ekspresiji drugih GR-reguliranih gena koje smo analizirali. Sposobnost fluoksetina da neutrališe uticaj stresa na CRH kod ženki se može povezati sa normalizacijom signalizacije preko pGR232 izoforme u jedru, dok se sa druge strane povoljni efekat fluoksetina na nivou ekspresije ovih gena kod mužjaka objašnjava promenama na nivou totalnog GR-a u jedru i normalizacije signalizacije preko pGR171 izoforme

posredovane GSK-3β kinazom. Sposobnost fluoksetina da neutrališe uticaj stresa na CRH kod ženki se može povezati sa normalizacijom signalizacije preko pGR232 izoforme u jedru, dok se sa druge strane povoljni efekat fluoksetina na nivou ekspresije ovih gena kod mužjaka objašnjava promenama na nivou totalnog GR-a u jedru i normalizacije signalizacije preko pGR171 izoforme posredovane GSK-3β kinazom. Sve zajedno naši rezultati pružaju informacije o potencijalnom polno-specifičnom molekularnom mehanizmu/signalizaciji unutar moždane strukture hipokampusa koji može biti odgovoran za terapeutsko dejstvo fluoksetina, SSRI antidepresiva, u normalizaciji ponašanja prethodno narušenog izlaganjem hroničnom stresoru. Kod stresiranih ženki terapijski efekat fluoksetina pretpostavlja modulaciju GR funkcije, prvenstveno preko izmene fosforilacionog statusa GR-a na S232 u jedru i kompletne aktivacije ushodnih kinaznih signala, CDK5 i MAPK, što za posledicu ima promenu transkripcione aktivnosti GR-a koja se ogleda u izmenjenoj ekspresiji GR-reguliranih gena, pre svega BDNF-a i CRH-a. Kod stresiranih mužjaka naši rezultati ukazuju da je normalizacija ponašanja pod dejstvom fluoksetina više vezana za normalizaciju ukupnog jedarnog GR-a i njegovu fosforilaciju na S246, nezavisno od ispitivanih kinaza, kao i normalizaciju ekspresije gena za CRH, 5HT1a i p11. Takođe naši rezultati pružaju dodatne informacije u cilju dizajniranja efikasnije i polno-specifične terapije u poremećajima raspoloženja izazvanih stresom, sa glavnim fokusom na depresiju.

Dok uvid u uticaj citokina na glukokortikoidnu rezistenciju raste, efekti interakcije citokina i pola na GR i odgovore na inflamaciju, kao i njihov združen doprinos poremećajima raspoloženja, ostaju da bude razjašnjeni. Stoga bi razumevanje patofizioloških mehanizama koji povezuju inflamaciju i depresiju svakako moglo da dovede do boljeg razumevanja ove bolesti i doprinese efektivnijoj terapiji, a opisivanje neuroimunoloških procesa u odnosu na pol bi moglo da bude korisno oruđe za razumevanje nastanka, toka i ishoda bolesti. Rezultati ove studije su po prvi put pokazali da bi značajnu ulogu u posredovanju polno-specifičnih efekata inflamacije na mehanizme koji dovode do nastanka depresije mogao da ima GR. Ova studija je pokazala da je efekat LPS a na ponašanje i na nivo serumskog kortikosteroona bio isti kod mužjaka i kod ženki - LPS je kod oba pola aktivirao HPA osu i doveo do nastanka depresivnog ponašanja, dok nije uticao na parametre koji mere anksiozno ponašanje. Iako bi istovremeno prisustvo anksioznosti i depresije moglo doprineti validnosti ovog modela, odsustvo anksioznog ponašanja kod životinja tretiranih LPS-om olakšava prepoznavanje i karakterizaciju depresivnog

ponašanja kod ovih životinja, budući da je nemoguće povući jasnu granicu između ova dva tipa ponašanja.

Analize fosforilacije jedarnog GR-a u limfocitima periferne krvi pokazale su da je GR kod depresivnih pacijenata bio više fosforilisan na S226, kao i na S211, ali u manjoj meri, što je rezultiralo manjim odnosom fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u poređenju sa kontrolama. Ove razlike u fosfo-GR-u su ostale stabilne i nakon korekcija za pol, starost, kortizol i pušenje. Povećanje fosforilacije GR-a na S226, a naročito smanjen odnos fosforilacije na S211 u odnosu na S226, sugeriše na smanjenu transkripcionu aktivnost GR-a u limfocitima periferne krvi pacijenata sa depresijom. Naime, mnoge in vitro studije na kulturama ćelija pokazale su da fosforilacija GR-a na S226 smanjuje maksimalnu transkripcionu aktivnost receptora na promotoru sa GRE. Taj efekat je bar delimično posredovan stimulacijom eksporta fosfo-GR-S226 iz jedra u citoplazmu. S druge strane, izmenjena fosforilacija GR-a na S211 i S226 utiče i na različitu interakciju GR-a sa drugim transkripcionim faktorima, koaktivatorima, korepreso-

rima i osnovnom transkripcionom mašinerijom, što konačno vodi drugačijoj ekspresiji gena i odgovoru ćelije na glukokortikode. Takođe, pokazano je da fosforilacija GR-a kako na S211 tako i na S226 smanjuje efikasnost GR-a u transrepresiji, tj. ove fosforilacije mogu da inbiraju interakcije GR-a sa AP-1 i NFκB, glavnim transkripcionim faktorima uključenim u regulaciju ekspresije pro-inflamatornih gena. Na ovaj način izmanjana fosforilacija GR-a bi mogla doprineti i povećanoj ekspresiji pro-inflamatornih citokina, uočenoj u depresiji. Dakle, naši rezultati sugerišu da izmenjena fosforilacija GR-a može bar delimično doprinosti narušenoj glukokortikoidnoj signalizaciji u limfocitima periferne krvi depresivnih pacijenata.

ZAKLJUČAK

Dobijeni rezultati u pretkliničkim i kliničkim studijama, sugerišu da fosforilacioni status GR bi mogao biti biomarker poremećaja raspoloženja, posebno kod kliničke depresije i pokazatelj efekata terapije.

LITERATURA

1. Scarr E, Millan MJ, Bahn S, Bertolino A, Turck CW, et al. Biomarkers for psychiatry: the journey from fantasy to fact, a report of the 2013 CINP Think Tank. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015; 18: 42.
2. Cohen, J., 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.
3. B McEwen. Understanding the potency of stressful early life experiences on brain and body function. *Metabolism*. 2008 Oct; 57(Suppl 2): S11-S15.
4. Anacker, C., Zunszain, P. A., Cattaneo, A., Carvalho, L. A., Garabedian, M. J., Thuret, S., Price, J., Pariante, C. M., 2011. Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. *Mol Psychiatry* 16, 738-750.
5. Djordjevic, A., Adzic, M., Djordjevic, J., Radojicic, M. B., 2009a. Chronic social isolation is related to both upregulation of plasticity genes and initiation of proapoptotic signaling in Wistar rat hippocampus. *J Neural Transm (Vienna)* 116, 1579-1589.
6. Becker, C., Zeau, B., Rivat, C., Blugeot, A., Hamon, M., Benoliel, J. J., 2008. Repeated social defeat-induced depression-like behavioral and biological alterations in rats: involvement of cholecystokinin. *Mol Psychiatry* 13, 1079-1092.
7. Kokras, N., Dalla, C., Papadopoulou-Daifoti, Z., 2011. Sex differences in pharmacokinetics of antidepressants. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7, 213-226.
8. Palanza, P., 2001. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev* 25, 219-233.
9. Adzic, M., Djordjevic, A., Demonacos, C., Krstic-Demonacos, M., Radojicic, M. B., 2009a. The role of phosphorylated glucocorticoid receptor in mitochondrial functions and apoptotic signalling in brain tissue of stressed Wistar rats. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2181-2188.
10. Herman, J. P., Prewitt, C. M., Cullinan, W. E., 1996. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit Rev Neurobiol* 10, 371-394.
11. ZBOZINEK, T. D., ROSE, R. D., WOLITZKY-TAYLOR, K. B., SHERBOURNE, C., SULLIVAN, G., STEIN, M. B., ROY-BYRNE, P. P. & CRASKE, M. G. 2012. Diagnostic overlap of generalized anxiety disorder and major depressive disorder in a primary care sample. *Depress Anxiety*, 29, 1065-71.

12. Chen, W., Dang, T., Blind, R.D., Wang, Z., Cavasotto, C.N., Hittelman, A.B., Rogatsky, I., Logan, S.K., Garabedian, M.J., 2008. Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *MolEndocrinol* 22, 1754-1766.
13. Itoh, M., Adachi, M., Yasui, H., Takekawa, M., Tanaka, H., Imai, K., 2002. Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *MolEndocrinol* 16, 2382-2392.
14. Kino, T., Ichijo, T., Amin, N.D., Kesavapany, S., Wang, Y., Kim, N., Rao, S., Player, A., Zheng, Y.L., Garabedian, M.J., Kawasaki, E., Pant, H.C., Chrousos, G.P., 2007. Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress. *MolEndocrinol* 21, 1552-1568.
15. Avenant, C., Ronacher, K., Stubrud, E., Louw, A., Hapgood, J.P., 2010. Role of ligand-dependent GR phosphorylation and half-life in determination of ligand-specific transcriptional activity. *Mol Cell Endocrinol* 327, 72-88.
16. Schmidt, H.D., Shelton, R.C., Duman, R.S., 2011. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Neuropsychopharmacology* 36, 2375-2394.

PROGNOSTIČKE I PREDIKTIVNE DETERMINANTE KOLORAKTALNOG KARCINOMA

AUTORI

Stanković Vesna, Mitrović Slobodanka
Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

SAŽETAK

Kolorektalni karcinom je četvrti najčešći uzrok smrti pacijenata sa malignim bolestima. CRC je "hirurško oboljenje" sa resekcijom kolona i rektuma. Cilj hirurške intervencije je kompletna ekscizija ("kurativna resekcija") u skoro svim slučajevima, a resecirani segment je ključni izvor podataka relevantnih za postoperativno praćenje i tretman bolesnika kao i ishod bolesti. Izveštaj mikroskopske analize reseciranih karcinoma kolona i rektuma treba da sadrži informacije o histološkom tipu tumora, lokalnom stadijumu bolesti, histopatološku potvrdu prisustva regionalnih i udaljenih metastaza ukoliko postoje kao i parametre koji omogućavaju kontrolu kvaliteta učinjene hirurške intervencije. Pored standardnih parametara, patohistološki izveštaj trebalo da sadrži i druge prognostičke i prediktivne parametre (povezane sa verovatnoćom preživljavanja pacijenata ili odgovora na primenjenu terapiju) kao i one informacije koje će omogućiti kliničko-patološku korelaciju za postoperativno praćenje, tretman bolesnika i ishod bolesti. Patohistološke karakteristike reseciranog tumora uz kvalitet hirurške resekcije ostaju najsnažniji prediktori postoperativnog ishoda kod ovih pacijenata.

Napredak u području molekularne medicine doveo je do novih saznanja o mehanizmima nastanka tumora, što je omogućilo nove pristupe u istraživanju potencijalnih lekova i dijagnostičkih procedura za prevenciju i lečenje ovog tumora. Enormna molekularna različitost tumora nameće planiranje terapije na osnovu različitosti. Zbog toga se danas traga i za novim, preciznijim prognostičkim parametrima baziranim na molekularnim poremećajima. Lista ovih potencijalnih prognostičkih parametara uključuje poremećaje u proliferativnoj fazi, angiogenezi, izmenjenoj ekspresiji ćelijskih adhezionih molekula i brojne genske alteracije, kao što su: mutacija K-ras gena, Adenoma polyposis coli gena, EGFR, VEGF ekspresija, gubitak heterozigotnosti za različita hromozomska mesta (17p, 18q,) mikrosatelitnu nestabilnost i druge.

Ključne reči: kolorektalni karcinom, prognostički i prediktivni faktori, biomolekuli.

ENGLISH

SUMMARY

Colorectal cancer is the fourth most common cause of death for patients with malignant disease. CRC is a „surgical disease“ with resection of the colon and rectum. The goal of the surgery is the complete excision (“curative resection”) in almost all cases, and the resected segment is a key source of data relevant to postoperative monitoring and treatment of patients as well as the outcome of the disease. The report of microscopic analysis of resected colon and rectal cancers should include information on histologic type of tumor, local stage of the disease, histopathological confirmation of the presence of regional and distant metastases, if any, as well as parameters that enable quality control of the performed surgery. In addition to standard parameters, the pathohistological report should include other prognostic and predictive parameters (related to patients’ survival probability or response to therapy) as well as information that will allow clinicopathological correlation for postoperative monitoring, patient treatment, and disease outcome. The pathohistological characteristics of the resected tumor with the quality of surgical resection remain the strongest predictors of the postoperative outcome in these patients.

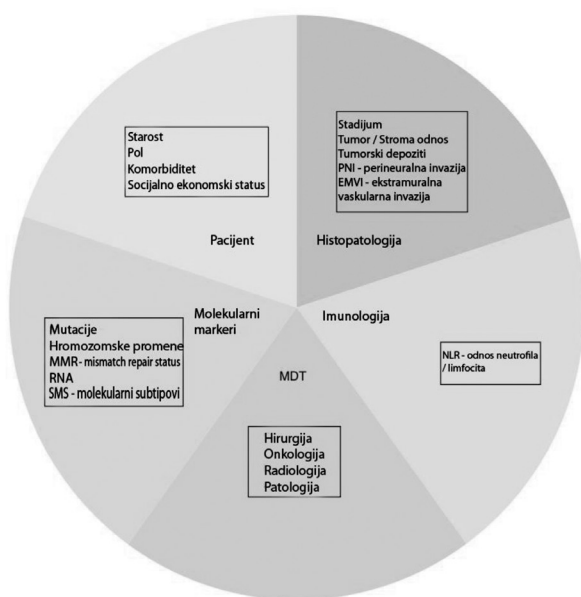
The progress in molecular medicine has led to new insights into the mechanisms of tumor formation, which has allowed new approaches for the investigation of potential drugs and diagnostic procedures for the prevention and treatment of this tumor. The enormous molecular diversity of tumors imposes diversity-based therapy planning. Therefore, new, more accurate prognostic parameters based on molecular disorders are also being sought today. The list of these potential prognostic parameters includes disorders in the proliferative phase, angiogenesis, altered expression of cell adhesion molecules, and numerous gene alterations such as: mutation of the K-ras gene, Adenoma polyposis coli gene, EGFR, VEGF expression, loss of heterozygosity for different chromosomal sites (17p, 18q,) microsatellite instability and others.

Key words: colorectal cancer, prognostic and predictive factors, biomolecules.

UVOD

Kolorektalni karcinom je drugi kod muškaraca, treći kod žena i četvrti najčešći uzrok smrti obolelih od malignih bolesti [1]. Kolorektalni karcinom je u pravom smislu reči „hirurško oboljenje“ sa resekcijom kolona i rektuma. Cilj hirurške intervencije je kompletna ekscizija („kurativna resekcija“) u skoro svim slučajevima, a resecirani segment je ključni izvor podataka relevantnih za postoperativno praćenje i tretman bolesnika kao i ishod bolesti.

Visok i stalan porast morbiditeta CRC-a predstavlja ključni klinički problem koji sugerše potrebu za opsežnim multidisciplinarnim istraživanjima karcinogeneze i osnove metastatskog procesa. Razvoj kolorektalnog karcinoma rezultat je istovremenih, višestrukih, biohemijskih procesa posredovanih genetskim mutacijama, epigenetskim promenama i faktorima okoline.



Slika 1. Model prognostičkih faktora kod CRC-a. (Preuzeto: Clinico-pathological, genomic and immunological factors in colorectal cancer prognosis. Published online in Wiley Online Library (www.bjcs.co.uk). DOI: 10.1002/bjcs.10756)

Histopatološki izveštaj o izvršenoj mikroskopskoj analizi reseciranih karcinoma kolona i rektuma sadrži informacije o histološkom tipu tumora, lokalnom stadijumu bolesti, histopatološku potvrdu prisustva limfnodalnih i udaljenih metastaza ukoliko postoje kao i parametre koji omogućavaju kontrolu kvaliteta učinjene hirurške intervencije.

Pored standardnih parametara sadrži i druge prognostičke i prediktivne parametre (povezane sa verovatnoćom preživljavanja pacijenata ili sa verovatnoćom odgovora na primenjenu terapiju) kao i one informacije koje će omogućiti kliničko-patološku korelaciju i poređenje pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u različitim kliničkim studijama.

Da bi se postigla uniformnost i konzistentnost u patohistološkim izveštajima preporučuje se histološka klasifikacija Svetske zdravstvene organizacije (WHO klasifikacija). Gotovo svi kolorektalni karcinomi su adenokarcinomi. Histološki tip tumora nema nezavisni prognostički značaj. Izuzetak čini medularni karcinom, povezan sa mikrosatelitnom nestabilnošću, koji ima povoljniju prognozu i mucinozni adenokarcinomi (koloidni karcinom i karcinom ćelija „pečatnog prstena“), kao i sitnoćelijski karcinomi, koji su prognostički nepovoljniji i nezavisni od stadijuma bolesti. Međutim, noviji radovi su pokazali da mucinozni adenokarcinomi, povezani sa mikrosatelitnom nestabilnošću, imaju, takođe povoljnu prognozu [2,3].

Histološki gradus je u velikoj meri subjektivna kategorija. Uprkos brojnim sistemima gradiranja histološke diferentovanosti tumora, još uvek ne postoje opšte prihvaćeni standardi. Većina sistema, bez obzira na kriterijume koje koriste u određivanju stepena diferencijacije tumora, deli kolorektalne karcinome:

1. dobro diferentovane (low grade) adenokarcinome (raniji histološki gradus dobro i umereno diferentovanih tumora) i
2. slabo diferentovane (high grade) tumore (raniji histološki gradus slabo diferentovanih i nediferentovanih karcinoma).

Prema ovoj preporuci, gradiranje se vrši na osnovu procenta zastupljenosti glandularnih formacija u tumoru (više ili manje od 50% glandularnih formacija). Većina studija potvrđuje bolju diferencijaciju kao povoljan prognostički faktor.

Prvi i najvažniji, korak u histopatološkom ispitivanju postoperativnog (nekada i intraoperativnog) hirurškog resekcionog materijala je određivanje R statusa, odnosno utvrđivanje ili isključivanje prisustva rezidualnog tumorskog tkiva posebno u okolini resekcionih linija.

Najznačajnije je postići kompletnu tumorsku resekciju bez rezidualnog tumora (R0 kategorija). Distinkcija ovih slučajeva od slučaja sa makroskopskim ili mikroskopskim rezidualnim tumorom (R1 kategorija) predstavlja visoko rangirani nezavisni prognostički faktor.

Određivanje R statusa počinje nekada preoperativno ili intraoperativno isključivanjem udaljenih metastaza i ispitivanjem suspektnih loko - regionalnih infiltrata koji su izvan operativnog polja. Najčešće radi se o postoperativnom ispitivanju R statusa koji se definitivno određuje nalazom ili odsustvom tumorskih ćelija unutar 1mm od bilo koje resekcione margine (ne odnosi se na površinu seroze).

Novi protokoli u ispitivanju hirurške resekcije podrazumevaju precizno isključivanje R1 statusa, kod koga je procenat recidiva karcinoma oko 25 - 30 % za razliku od R0 kategorije sa distancom od 10mm gde se recidivi javljaju u 3% pacijenata.

Koncept minimalne rezidualne bolesti je pokušaj boljeg objašnjenja učestalih relapsa tumorske bolesti koji su u oko 50% pacijenata registrovani nakon evidentno kurativne hirurgije. Relaps je saopšten i kod 40% pacijenata sa histološki negativnim limfonodalnim statusom.

Za odlučivanje o uvođenju adjuvantne hemioterapije potrebno je identifikovati pacijente sa visokim rizikom za relaps tumorske bolesti što je navelo na istraživanja detekcije minimalnih ostataka tumora u resekcionom području ili limfnim nodusima.

Nalaz tzv. okultnih mikrometastaza uključuje detaljna serijska i dopunska imunohistohemijska ispitivanja ne samo limfnih nodusa već i ekstramuralnog - vezivnog, masnog tkiva, kostne srži i krvi. Mikrometastazama se podrazumevaju svi depoziti karcinoma koji su od 0,2 do 2 mm i koji pokazuju odsustvo dezmoplastične stromalne reakcije, a manji od 0,2 kao izolovane ćelije tumora. Detekcija mikrometastaza podrazumeva zapravo promenu stadijuma tumorske bolesti („stage migration“, Will Rogers-ov fenomen) što s pravom implicira drugačiju prognozu i terapijski pristup prvenstveno za tumore II i III stadijuma [4,5].

U praksi onkološki timovi imaju različiti pristup prema detekciji mikrometastaza, a usled nedokazanog nezavisnog prognostičkog značaja danas TNM sistem ne dovodi do automatske promene stadijuma bolesti.

Nalaz R1 kategorije (mikroinfiltracija resekcionih margina) po pravilu dovodi do promene terapijskog pristupa usled dokazanog prognostičkog značaja.

Nagomilana iskustva i naučna istraživanja posebno u kliničkoj onkologiji rezultirala su revizijama TNM sistema tako da se neki parametri širenja tumora danas drugačije interpretiraju.

Najveći broj promena vezan je za interpretaciju limfonodalnih metastaza. Eliminirana je pN3 kategorija, što znači da se metastaze tumora u spoljašnje ili jačne ili zajedničke ili jačne limfne noduse danas interpretiraju kao rM1 kategorija.

Iregularni depoziti i oni koji su promera manjeg od 2mm interpretiraju se kao tzv. diskontinualno lokalno širenje tumora, tj. kao pT3 kategorija, eventualno i kao venska invazija (pV1 kategorija).

Veliki je značaj broja izolovanih limfnih nodusa posebno ukoliko su bez elemenata tumora. Preporučeni zadovoljavajući broj u TNM sistemu je 12 limfnih nodusa, ali se ne insistira na pNx kategoriji ukoliko je taj broj manji.

Vaskularna invazija ekstramuralnih venskih sudova i intramuralnih krvnih sudova mukoze i submukoze je važan prognostički faktor uz perineuralnu invaziju [6,7,8].

Tumorski depoziti u perirektalnom i perikoličnom masnom tkivu na putu limfne drenaže primarnog tumora bez vaskularne, perineuralne i invazije nodalnih struktura su nepovoljan prognostički indikator [9,10].

Histopatološka karakteristika koja trenutno nije deo TNM klasifikacije je „budding“ tumora. Odnosi se na pojedinačne ili grupe ćelija tumora (manje od 5) prisutnih na invazivnoj ivici. Njegov osnovni mehanizam nije u potpunosti shvaćen, ali se smatra da predstavlja epitelno-mezenhimski prelaz gde se gubi adhezija ćelija, postoji otpornost na apoptozu i ćelije dobijaju invazivni fenotip [11]. Tumor „pupoljci“ su povezani sa nizom loših prognostičkih

histopatoloških faktora, uključujući viši gradus tumora, limfovaskularnu invaziju, limfnodalne i udaljene metastaze. U brojnim studijama je dokazano kao nezavisni prognostički faktor [12,13].

Pojedine studije su potvrdile značaj odnosa tumorskih ćelija i strome kao nezavisnog prognostičkog indikatora koji se povećava sa stadijumom. Smatra se kao rezultat unakrsnog uticaja ćelija strome i tumora, preko brojnih faktora rasta i imunoloških reakcija [14,15].

Mnogi terapijski postupci sami po sebi pokazuju prognostičku vrednost kao što je izbor i metoda hirurške procedure (onkološki kvalitet hirurgije) ili uvođenje preoperativne radio terapije rektalnog karcinoma, sa ili bez prateće hemoterapije (regresioni status ili regresioni gradus tumorske bolesti).

Budući da je prognoza kod kolorektalnog karcinoma očigledno multifaktorijalna, razrađeni su i usavršavani mnogi kumulativni ili multiparametarski prognostički sistemi.

Petersen i sar. (Gloucestershire Royal Hospital, England) su razvili kumulativni prognostički indeks za evaluaciju pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u Dukes B stadijumu, što bi moglo pomoći u identifikaciji pacijenata sa lošom prognozom unutar grupe i zahtevati agresivniju terapiju. Parametri su: peritonealno zahvatanje (sa ili bez ulceracije), venska invazija (ekstramuralna ili submukozna), zahvatanje resekcione margine (margina zahvaćena ili inflamirana) i tumorska perforacija (perforacija kroz tumor).

Stepen histološkog maligniteta („grading“) i prognostički sistem za kolorektalni karcinom prema Ja-sso uključuje parametre za gradiranje histološkog maligniteta (tubularnu konfiguraciju, tip tumorskog rasta i limfocitnu infiltraciju) i parametre za patološke prognostičke kategorije limfocitnu infiltraciju-grading, infiltraciju limfnih nodusa-staging, dubinu tumorske invazije-staging.

Prognoza pacijenata sa invazivnim kolorektalnim adenokarcinomom u stadijumu B i C (Dukes ili Aster - Coller), tj. bez udaljenih metastaza i bez mikroskopski rezidualnog tumora (R0 kategorija) može se predvideti upotrebom sistema bodovanja koji se bazira na histopatološkim karakteristikama. Parametri: dubina tumorske invazije, odbrambena limfocitna reakcija na tumor - peritumorska limfocitna („Crohn-like“) infiltracija, broj tumorskih infiltrisanih limfnih nodusa i postojanje vaskularne invazije (u odsustvu limfonodalnih metastaza).

Molekularni i genetski aspekti ispitivanja otkrili su mutacije koje su u osnovi patogeneze naslednih i sporadičnih oblika tumora. Istraživački naponi usmereni su za identifikovanje molekularnih markera kao merljivih pokazatelja prognoze i predviđanja ishoda i odgovora pojedinih terapijskih modaliteta. Razumevanje molekularnih signalnih puteva koji utiču na metastatski fenotip sa determinacijom molekula koji su ključni u tim putevima sa ciljem dizajniranja direktnih terapijskih meta sprečavanja ili kontrole napredovanja bolesti [16].

Napredak u otkrivanju signalnih puteva kancerogeneze pruža mogućnosti izbora personalizovane strategije lečenja sa potencijalom za poboljšanje ishoda lečenja [17,18].

MSI označava promene u kodirajućim i nekodirajućim ponovljenim sekvencama DNK. Mutatorput karakteriše inaktivacija oba alela jednog od DNA mismatch repair - MMR gena, što rezultira promenom dužine i posledičnoj nestabilnosti kratke DNA sekvence-mikrosatelita-MSI. Ovo dovodi do nemogućnosti ispravljanja DNK grešaka tokom replikacije. Geni su inaktivirani stečenim mutacijama i sporadičnom hipermetilacijom promotora MLH1 ili germ-line mutacijom MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 gena-hereditarni nonpolipoza karcinom kolona (HNPCC) [19,20]. U zavisnosti od procenta lokusa sa MSI karakteristikama razlikujemo MSI-H i MSI-L a gde nedostaju tumorske ćelije su MSS statusa [21]. MSI-H ukazuje na dobru prognozu, MSI-L i MSS na loš ishod. Ovom putu se pridružuje sekundarna mutacija gena značajnih za kontrolu ćelijskog rasta i apoptozu. Tumori nastali ovim putem čine 15% CRC i imaju bolju ukupnu prognozu u odnosu na tumore nastale mutacijom inaktivacijom tumor-supresor gena. Visoko frekventna MSI je nezavistan prediktor preživljavanja i nižeg patološkog stadijuma. Tumori su lokalizovani proksimalno, slabo diferentovani, sa mucinoznom diferencijacijom i limfocitnom infiltracijom.

Preporučuje se određivanje statusa MSI kod svih novodijagnostikovanih tumora. Prognostički je značajan za CRC II stadijuma, kao skrining marker za identifikaciju Lynch sindroma i predikciju odgovora kod pacijenata IV stadijuma [22]. MSI je prediktivni indikator odgovora na anti PD-1 terapiju [23].

Konsenzusom su definisana 4 molekularna subtipa CMS kao rezultat objedinjavanja otkrića molekularnih procesa nastanka CRC.

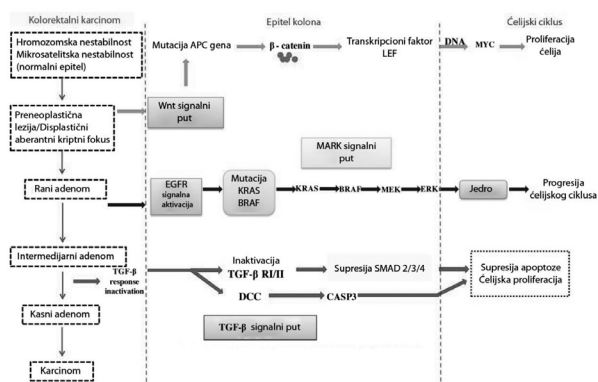
CMS1-MSI, hipermutirani, sa imunoaktivacijom i povećanjem TH1 i citotoksičnih T limfocita.

CMS2-epitelni sa potenciranjem Wnt i Myc signalnog puta, povećanom hromozomskom nestabilnošću, ekspresijom onkogeni i inaktivacijom tumor supresor gena.

CMS3-metaboličke disregulacije i KRAS mutacije

CMS4-mezenhimalni subtip sa aktivacijom TGF-beta, stromalnom invazijom, komplementom posredovanom zapaljenskom reakcijom i neoangiogeneza [24,25].

Povezujući sa kliničkim ishodom CMS klasifikacija pruža važne informacije o kliničkom ponašanju, prognozi i odgovoru na lečenje pojedinih subtipova. Rasvetljavanje procesa koji su uključeni u kancerogenezu ovih podtipova olakšava identifikaciju biomarkera i dizajniranje ciljane terapije za svaki podtip.



Slika 2. Signalni put genetskih alteracija u progresiji CRC-a. (Preuzeto: Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017;87:8-19)

KRAS protoonkogen enkodira GTPaza protein

KRAS koji uključuje efektorne molekule za ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju nishodno od EGFR-a u molekularnoj stazi nastanka CRC-a. 15% ovih tumora nosi tačkaste mutacije u egzonima 2, 3 i 4 gena KRAS. Mutacija povećava rizik od recidiva i kraćeg preživljavanja uz moduliranje odgovora na EGFR inhibitore. 4,3 Nedavne studije su potvrdile da i NRAS mutacije koje su prisutne u 3-5% tumora određuju negativan odgovor na anti EGFR terapiju [26].

Na signalnom Ras putu BRAF je direktni nishodni cilj KRAS-a. BRAF V600E mutacija naglo aktivira MAPK signalni put sa indukcijom proliferacije i inhibicije apoptoze. Prisutna je u oko 15% bolesnika sa CRC-om, češće kod osoba ženskog pola, starijeg uzrasta, desnostranih tumora, lošije diferencijacije sa mucinoznom komponentom i MSI-H statusom [27,28]. Kod MSI-L tumora prisustvo mutacije je povezano sa kraćim preživljavanjem. Suprotno prediktivnoj ulozi mutiranog BRAF-a, njegova prognostička uloga je dobro definisana i određuje lošu prognozu. BRAF mutacija može predstavljati terapijski cilj kod metastatskog tumora uz blokadu drugih puteva EGFR, MEK, PI3K.

Na hromozomu 18q nalaze se tri gena: Smad2, Smad4 i DCC implementirana u nastanak CRC. Gubitak jednog alela je gubitak heterozigotnosti - LOH i njihove uloge tumor supresor gena. U 70% CRC-a je asociran sa lošom prognozom. U sindromu juvenilne polipoze dokazana je germ line mutacija Smad4 i povećanje rizika za nastanak CRC. Ovaj onkosupresorski protein je uključen u intraćelijski put TGF-beta. Njegova inaktivacija dovodi do izmene signalizacije ovog puta što rezultira invazijom tumora, metastaziranjem i lošim terapijskim odgovorom [29, 30]

Prognostička signifikantnost LOH je dokazana u studijama kod tumora II i III stadijuma i korelira sa kraćim preživljavanjem [31,32].

Deleted in Colorectal cancer-DCC je tumor supresor gen na dugom kraku hromozoma 18 i kodira transmembranski protein koji zaustavlja rast ćelije u odsustvu Netrina i njegovog liganda. Njegova mutacija sprečava vezu sa Netrin-1 i rezultira nenormalnim preživljavanjem. Gubitak heterozigotnosti (LOH) hromozoma 18q detektovan je u više od 70% uznapredovalog CRC [33, 34,35].

Tumor - supresorski put, poznati kao put hromozomske nestabilnosti, broji aproksimativno oko 80% svih kolorektalnih karcinoma i većinu sporadičnih kolorektalnih karcinoma. Karakteriše se velikom frekvencom alelske neuravnoteženosti kao što su alelske delecije, hromozomske amplifikacije i translokacije. Ove genetske promene rezultiraju u mutacionoj aktivaciji onkogene, udruženo sa mutacionom inaktivacijom tumor - supresorskih gena.

p53 je najčešće mutirani gen u humanim solidnim tumorima. Divlji tip p53 se nalazi na hromozomu 17p i produkuje protein koji održava genetski integritet indukcijom usporavanja ćelijskog ciklusa i apoptoze.

Inaktivacija p53 nastaje gubitkom alela, genskom mutacijom ili proteinskom sekvencijom što dovodi do povećane genetske nestabilnosti i preživljavanja ćelija sa oštećenom DNA. Većina studija koja je analizirala p53 protein u tumorima dokazala je činjenicu da divlji p53 nije imunohistohemijski detektibilan s obzirom na njegov kraći poluživot. Veruje se da mutacije unutar p53 produžavaju proteinski poluživot i tada proteini postaju detektibilni.

Mutacija p53 je verovatno inicijacija karcinogeneze povezane sa ulceroznim kolitisom. Štaviše mutacija p53 u paru sa gubitkom heterozigotnosti podudara se sa pojavom karcinoma u adenoma što dokazuje njegovu ulogu u modulaciji do maligne alteracije [36,37,38,39,40]. Postoji jednak broj studija koje pokazuju kraće preživljavanje u p53 pozitivnih bolesnika i onih koje pokazuju da ne postoji asocijacija između p53 overekspresije i finalnog ishoda.

Rezultati sugerišu da se ekspresija p53 u smislu prognoze razvoja bolesti, može tumačiti jedino ako je koekspimirana sa drugim tumorskim markerima.

Direktna korelacija ekspresije p53 i prognoze je zapažena u kasnom stadijumu bolesti, kada je pitanje uspeha primene bilo kakve terapije, tj. kada i nema značaja određivati nivo njegove ekspresije [41,42].

Adenomatous Polyposis Coli-APC gen je tumor supresor gen na hromozomu 5. Germ line mutacije APC predstavljaju genetsku osnovu familijarne adenomatozne polipoze -FAP-a. Više od 60% sporadičnih CRC-a

ima alteracije ovog gena što dovodi do stimulacije Wnt/beta-catenin puta sa inicijacijom tumora ili recidiviranjem [43]. Hipermetilacija APC promotora je takođe prepoznata kao uzrok funkcionalne inhibicije gena [44].

Fosfataza i tensin homolog protein-PTEN je tumor supresor gen uključen u regulaciju ćelijskog ciklusa, procese proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Inaktivacija izaziva deregulaciju PI3K puta. Gubitak ekspresije asocira sa agresivnim tumorom i izostankom odgovora na EGFR ciljanu terapiju [45,46].

EGFR- receptor epidermalnog faktora rasta koji se aktivira vezivanjem epidermalnog faktora rasta je transmembranski receptor sa aktivnošću tirozin kinaze i transdukcijom signala u citoplazmu [47]. Prekomerna ekspresija je prisutna u mnogim solidnim tumorima i u oko 80% CRC udružena sa kraćim preživljavanjem [48]. Cetukimab i Panitumumab antitelima inhibira se signalizacija posredovana EGFR-om što predstavlja obećavajuću terapijsku alternativu.

Vaskularni endotelni faktor rasta-VEGF je angiogenetski faktor uključen u CRC i posredno odgovoran za rast tumora i metastaze. Produkcija VEGF je inicirana tumorom, onkogenom ekspresijom, tumorskom hipoksijom i nekrozom. Njegove mutacije su povezane sa većom agresivnošću, lošom prognozom i mogu biti u osnovi otpornosti na anti-EGFR tretman [49,50].

VEGF ima centralnu ulogu u tumorskoj angiogenezi, pod uticajem je i utiče na druge pro-angiogenetske faktore, a njegova inhibicija dovodi do suspenzije rasta tumora. Četiri izoforme VEGF - su identifikovane. Analize različitih izoformi u bolesnika sa karcinomom kolona pokazuju da pacijenti sa metastazama jetre imaju tumorsku ekspresiju VEGF121, VEGF165 i VEGF189, signifikantno višu u odnosu na one bez metastaza jetre. U bolesnika sa kolorektalnim karcinomom stadijuma I-IV, VEGF - pozitivni tumori su pokazali signifikantno lošiju prognozu u odnosu na VEGF - negativne tumore. Buduće studije treba da definišu prognostičku signifikantnost VEGF i njegove potencijalne terapijske implikacije.

Fosfoinozid-3-kinaza-PIK3CA je enzim AKT signalnog puta. Alteracija dovodi do aberantne aktivacije ovog puta i ćelijske proliferacije. Mutacija u egzonu 20 je značajno povezana sa smanjenim terapijskim učinkom anti-EGFR terapije i lošom prognozom u poređenju sa pacijentima nosiocima wild-typa [51,52].

Insulin-Like Growth Factor II mRNA-Binding Protein 3-IMP3 je protein eksprimiran tokom embriogeneze i kod neoplastičnih ćelija, a skoro nedetektibilan kod adultnog tkiva. Njegova ekspresija korelira sa agresivnim tumorskim fenotipom. Prognostički je i prediktivni marker nastanka metastatskih depozita [53,54].

RNA uključuje nekodirajuće mikro (mi) i duge (long) ncRNA. miRNA igraju važnu ulogu u genetskoj kontroli razvoja, progresije i metastatskog potencijala CRC-a. Ekspresija pojedinih članova ove familije korelira sa lošijom prognozom i kraćim preživljavanjem [55]. Studije ističu potencijalnu korist miRNA kao biomarkera krvi ili tkiva prediktora odgovora na terapiju 5-fluorouracila i EGFR inhibitora i prognostičkog faktora sa mogućnošću personalizovanog terapijskog pristupa [56,57]. Otkriće novih panela miRNA pruža mogućnost definisanja novih terapijskih ciljeva i prevazilaženje rezistencije na lekove. Klinička upotreba kao biomarkera je i dalje ograničena tako da je neophodno fokusirati se na eksperimentalni dijagnozu, metode izolacije i detekcije uz uvažavanje promenljivosti karakteristika pacijenata.

ZAKLJUČAK

Za mnogo pouzdaniji i reproducibilniji sistem ispitivanja koji bi bio komparabilan u studijama potrebno je sačiniti nove protokole koji bi osim standardnih kliničko patoloških parametara uveli nove biomolekularne faktore i testirali njihovu senzitivnost za kliničku upotrebu.

CRC je heterogeni klinički entitet. Napredak u otkrivanju molekularnih abnormalnosti, kontrolnih tačaka za proces klonskog razvoja, reakcija na terapiju i razvoja rezistencije tokom lečenja glavne su strategije ispitivanja. Među brojnim molekularnim faktorima prognoze, mali broj je sa dokazanim prognostičkim ili kliničkim značajem. Ipak, neki imaju sasvim jasan nezavistan prognostički značaj i mogu služiti za ispitivanje navedenih rizika ili promenu stadijuma bolesti („molecular up-staging“), a čak i za distinkciju posebnih oblika tumora. Ciljevi budućeg istraživanja su potvrda najboljeg prognostičkog panela biomarkera i definisanje prediktivnih markera za dostupnu terapiju.

LITERATURA

1. Ferlay J, Soerjomatoran J, Evik M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: 359-86.
2. Chew MH, Yeo SA, Ng ZP, et al. Critical analysis of mucin and signet ring cell as prognostic factors in an Asian population of 2,764 sporadic colorectal cancers. *Int J Colorectal Dis.* 2010; 25: 1221-9.
3. Purdie CA, Piris J. Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology.* 2000; 36: 121-6.
4. Rahbari NN, Bork U, Motschall E, Thorlund K, Büchler MW, Koch M et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2012; 30:60-70.
5. Sloothaak DAM, Sahami S, van der Zaag-Loonen HJ, van der Zaag ES, Tanis PJ, BemelmanWA et al. The prognostic value of micrometastases and isolated tumour cells in histologically negative lymph nodes of patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2014; 40: 263-269.
6. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol.* 2003; 16: 376-388.
7. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 5131-5137.
8. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer. *Cancer.* 2012; 118: 628-638.
9. Nagtegaal ID, Quirke P. Colorectal tumour deposits in the mesorectum and pericolon; a critical review. *Histopathology.* 2007; 51: 141-149.
10. Nagtegaal ID, Tot T, Jayne DG, McShane P, Nihlberg A, Marshall HC et al. Lymph nodes, tumor deposits, and TNM: are we getting better? *J Clin Oncol.* 2011; 29: 2487-2492.
11. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol.* 2012; 25: 1315-1325.
12. Schneider NI, Langner C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives. *Cancer Manag Res.* 2014; 6: 291-300.
13. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017; 30: 1299-1311.
14. Hutchins GGA, Treanor D, Wright A, Handley K, Magill L, Tinkler-Hundal E et al.; QUASAR trial collaborators and the UK National Cancer Research Institute Colorectal Cancer Clinical Studies Group. Intra-tumoural stromal morphometry predicts disease recurrence but not response to 5-fluorouracil - results from the QUASAR trial of colorectal cancer. *Histopathology.* 2017; [Epub ahead of print].
15. Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I et al. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 2082-2090.
16. H. Yamagishi, H. Kuroda, Y. Imai, H. Hiraishi, Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers, *Chin. J. Cancer* 35 (1) (2016) 4, doi:http://dx.doi.org/10.1186/s40880-015-0066-y.
17. Coppedè F, Lopomo A, Spisni R and Migliore L: Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 943-956.
18. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L and Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015; 21: 1350-1356.
19. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, Hawkins N. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut.* 2001; 48: 821-829.
20. H. T. Lynch and A. de la Chapelle. "Hereditary colorectal cancer," *The New England Journal of Medicine.* 2003; 348:919-932.
21. Baba Y, Noshio K, Shima K, Irahara N, Kure S, Toyoda S, Kirkner GJ, Goel A, Fuchs CS, Ogino S. Aurora-A expression is independently associated with chromosomal instability in colorectal cancer. *Neoplasia* 2009; 11: 418-425.

22. Zarkavelis G, Boussios S, Papadaki A, Katsanos K.H, Christodoulou D.K, Pentheroudakis G. Current and future biomarkers in colorectal cancer. *Ann. Gastroenterol.* 2017; 30:613-621.
23. Liu S, Gönen M, Stadler Z.K, Weiser M.R, Hechtman J.F, Vakiani E, Wang T, Vyas M, Joneja U, Al-Bayati M et al. Cellular localization of PD-L1 expression in mismatch-repair-deficient and proficient colorectal carcinomas. *Mod. Pathol.* 2019; 32:110-121.
24. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350e6.
25. Jones RP, Kokudo N, Folprecht G, Mise Y, Unno M, Malik HZ, et al. Colorectal liver metastases: a critical review of state of the art. *Liver Canc.* 2017;6(1): 66e71.
26. M. Gonzalez-Pons and M. Cruz-Correa. "Colorectal cancer biomarkers:where are we now?" *BioMed Research International.* 2015; 14. Article ID 149014
27. Roth A.D, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, Dietrich D, Biesmans B, Bodoky G, Barone C et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: Results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 466-474.
28. Regulation of RAF protein kinases in ERK signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. [cited 2019 May 21].
29. YDu, X Zhou, ZHuang et al. "Meta-analysis of the prognostic value of Smad4 immunohistochemistry in various cancers," *PLoS ONE.* 2014; 9:(10) article e110182.
30. P. W. Voorneveld, R. J. Jacobs, L. L. Kodach, and J. C. H. Hardwick. "Ameta-analysis of SMAD4 immunohistochemistry as a prognostic marker in colorectal cance." *Translational Oncology.* 2015; 8(1): 18-24.
31. S. Popat and R. S. Houlston. "A systematic review and metaanalysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis." *European Journal of Cancer.* 2005; 41:(14) 2060-2070.
32. J. Jen, H. Kim, S. Piantadosi et al. "Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer" *The New England Journal of Medicine.* 1994; 331:(4) 213-221.
33. T. Armaghany, J. D. Wilson, Q. Chu, and G. Mills. "Genetic alterations in colorectal cancer." *Gastrointestinal Cancer Research.* 2012; 5:(1)19-27.
34. D. Shibata, M. A. Reale, P. Lavin et al. "The DCC protein and prognosis in colorectal cancer." *The New England Journal of Medicine.* 1996; 335:(23) 1727-1732.
35. M. Saito, A. Yamaguchi, T. Goi et al. "Expression of DCC protein in colorectal tumors and its relationship to tumor progression and metastasis" *Oncology.* 1999; 56:(2) 134 141.
36. T.A. Brentnall, D.A. Crispin, P.S. Rabinovitch, R.C. Haggitt, C.E. Rubin, A.C. Stevens, G.C. Burmer. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1994; 107: (2)b369-378.
37. S. Thorsteinsdottir, T. Gudjonsson, O.H. Nielsen, B. Vainer, J.B. Seidelin. Pathogenesis and biomarkers of carcinogenesis in ulcerative colitis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011; 8: (7) 395-404.
38. M. Gonzalez-Pons, M. Cruz-Correa. Colorectal cancer biomarkers: where are we now? *BioMed Res. Int.* 2015; 149014.
39. R. Hamelin, P. Laurent-Puig, S. Olschwang, N. Jego, B. Asselain, Y. Remvikos, G. Thomas. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 1994; 106: (1) 42-48.
40. U. Kressner, M. Inganas, S. Byding, I. Blikstad, L. Pahlman, B. Glimelius, G. Lindmark. Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: (2) 593-599.
41. R. Hamelin, P. Laurent-Puig, S. Olschwang et al. "Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer." *Gastroenterology.* 1994;106:(1) 42-48.
42. Rokavec M, Öner M.G, Li H, Jackstadt R, Jiang L, Lodygin D, Kaller M, Horst D, Ziegler P.K, Schwitalla S et al. IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J. Clin. Investig.* 2014; 124:1853-1867.
43. Fearon E.R, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61: 759-767.
44. Narayan S, Sharma R. Molecular mechanism of adenomatous polyposis coli-induced blockade of baseexcision repair pathway in colorectal carcinogenesis. *Life Sci.* 2015; 139: 145-152.
45. Sood A, McClain D, Maitra R, Basu-Mallick A, Seetharam R, Kaubisch A, Rajdev L, Mariadason JM, Tanaka K, Goel S. PTEN gene expression and mutations in the PIK3CA gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2012; 11: 143-150.
46. Grady WM, Pritchard CC. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol Pathol* 2014; 42: 124-139.

47. Mayer, M, Takimoto, E, Fritz, G, Schellander, K, Kofler, H, Ludwig, H. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993;71: 2454-2460.
48. D. Vallbohmer, H.J. Lenz. Epidermal growth factor receptor as a target for chemotherapy. *Clin. Colorectal Cancer* 2005; 5:19-27.
49. M. Berretta, L.Alessandrini, C.DeDivitiis et al. "Serum and tissue markers in colorectal cancer: State of art," *Critical Review in Oncology/Hematology*. 2017;111:103-116.
50. G. S. Falchook and R. Kurzrock. "VEGF and dual-EGFR inhibition in colorectal cancer." *Cell Cycle*. 2015; 14:(8)1129- 1130.
51. M. Gonzalez-Pons and M. Cruz-Correa. "Colorectal cancer biomarkers: where are we now?" *BioMed Research International*. 2015; 2015:14. Article ID 149014
52. D. Roock, B. Claes, D. Bernasconi et al. "Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis." *Lancet Oncology*. 2010;11(8)753-762.
53. D. Li, D. Yan, H. Tang et al. "IMP3 is a novel prognostic marker that correlates with colon cancer progression and pathogenesis." *Annals of Surgical Oncology*. 2009; 16: (12) 3499-3506.
54. D. Li, D. Yan, H. Tang, C. Zhou, J. Fan, S. Li, Z. Peng. IMP3 is a novel prognostic marker that correlates with colon cancer progression and pathogenesis. *Ann. Surg. Oncol*. 2009;16: (12) 3499-3506.
55. Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012;487: 330-337.
56. Weng M, Wu D, Yang C, Peng H, Wang G, Wang T et al. Noncoding RNAs in the development, diagnosis, and prognosis of colorectal cancer. *Transl Res*. 2017; 181:108-120.
57. Kita Y, Yonemori K, Osako Y, Baba K, Mori S, Maemura K et al. Noncoding RNA and colorectal cancer: its epigenetic role. *J Hum Genet*. 2017; 62: 41-47.

KLINIČKO-PATOLOŠKA I FISH ANALIZA PRIMARNOG DIFUZNOG B KRUPNOĆELIJSKOG LIMFOMA TESTISA

AUTORI

Maja Peruničić Jovanović¹, Biljana Mihaljević^{2,3}, Petar Jovanović⁴, Jelena Jeličić², Vesna Čemerikić Martinović⁵, Jelica Jovanović², Marija Denčić Fekete², Milica Čekerevac¹, Nebojša Bojanić^{3,6}

¹ Služba za patohistologiju, Kabinet za hematopatologiju, Klinički centar Srbije, Beograd

² Klinika za hematologiju, Klinički centar Srbije, Beograd

³ Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd

⁴ Medicinski fakultet, Univerzitet u Prištini - Kosovskoj Mitrovici

⁵ Beo-lab, Beograd

⁶ Klinika za urologiju, Klinički centar Srbije, Beograd

SAŽETAK

Primarni testikularni difuzni B krupnoćelijski limfom (PT-DBKL) predstavlja redak i agresivan oblik ekstranodalnog non-Hodgkin limfoma (NHL) sa karakteristikama drugačijim od ostalih NHL-a.

Analizirani su tkivni uzorci fiksirani u formalinu, kalupljeni u parafinu, 21 pacijenta sa PT-DBKL koji su bili raspoloživi za histološku, imunohistohemijsku i biološku evaluaciju. Svi uzorci dodatno su analizirani imunohistohemijski (Bcl-2, Myc proteinska ekspresija) i fluorescentnom in situ hibridizacijom (FISH) (BCL2 i MYC).

Dvadeset PT-DBKL pacijenata tretirano je R-CHOP protokolom (rituximab, ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin i prednizolon) uz zračenje kontralateralnog testisa aplikovanog kod 9 pacijenata i intratekalnu terapiju za 10 bolesnika.

Pacijenti sa PT-DLBCL (srednja starost 48,5 godina) imali su nisku frekvenciju B simptoma (28,6%) i često su dijagnostikovani kao I i II Ann Arbor klinički stadijum (66,0%). Većina PT-DBKL (80,9%) imala je imunofenotip tipa B ćelija porekla non-germinativnog centra. Imunohistohemijsko bojenje pokazalo je povećanje ekspresije c-Myc proteina u PT-DBKL grupi u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,016$). MYC rearanžman otkriven je u 1 od 14 (7,0%) i MYC amplifikacija u 3 od 14 (21,0%) pacijenata. Jedan od 14 slučajeva (7%) u PT-DLBCL grupi pokazao je BCL2 rearanžman i 4 od 14 (28,05%) pokazalo je BCL2 amplifikaciju. Kompletna remisija (KR) postignuta je u 75,0% PT-DLBCL pacijenata koji su imali superiorno preživljavanje u odnosu na one koji nisu postigli KR (mediana 48 prema 21 mesec, $p=0,012$).

Imunohistohemijske i biološke karakteristike primarnog difuznog B krupnoćelijskog limfoma se razlikuju u odnosu na nodalne ili ekstranodalne DBKL. S obzirom da su primarni DBKL testisa retki, neophodne su prospektivne multinacionalne studije u cilju boljeg razumevanja biologije ovih tumora, pa samim tim i unapređenja tekućeg terapijskog pristupa.

Ključne reči: Primarni limfom testisa, difuzni krupnoćelijski B-limfom

ENGLISH

CLINICOPATHOLOGICAL AND FISH ANALYSIS OF PRIMARY TESTICULAR DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA

SUMMARY

Primary testicular diffuse large B cell lymphoma (PT-DLBCL) represents a rare and aggressive extranodal non-Hodgkin's lymphoma (NHL) with some specific features that differ from other NHLs.

Formalin fixed, paraffin wax embedded (FFPE) samples of 21 PT-DLBCLs and comparative 30 patients with DLBCL were analysed. All PT-DLBCL patients were treated with rituximab containing regimens, intrathecal prophylaxis (10 patients), and irradiation of the contralateral testis (9 patients). FFPE samples were additionally analysed by immunohistochemistry (Bcl-2, C-Myc protein expression) and fluorescence in situ hybridisation (FISH) (BCL2 and C-MYC).

The patients with PT-DLBCL (median age 48.5 years), had low frequency of B symptoms (28.6%), and were often diagnosed in I and II Ann Arbor clinical stage (66.0%). The majority of PT-DLBCL (80.9%), had a non-germinal center B-cell like immunophenotype. Immunohistochemical staining showed increased Myc protein expression in the PT-DLBCL group compared to the control group ($p=0.016$). MYC rearrangement was detected in 1 of 14 (7.0%), and MYC amplification in 3 of 14 (21.0%) patients. One of the 14 cases (7.0%), in the PT DLBCL group, showed BCL2 rearrangement, four of 14 (28.05%) cases showed BCL2 amplification. Complete remission (CR) was achieved in 75.0% PT-DLBCL patients who had superior survival compared to those who didn't achieve CR (median 48 vs. 21 months, $p=0.012$).

The patients with PT-DLBCL express some immunohistochemical, biological and clinical features that are different from nodal and extranodal DLBCL, indicating the need for a more personalized treatment approach in these patients.

Key word: primary testicular lymphoma, diffuse large B cell lymphoma

UVOD

Primarni limfomi testisa su retki: čine 3-5% svih tumora testisa^{1, 2}. Najčešći tip limfoma koji se javljaju u testisima je Difuzni B krupoćelijski limfom (DBKL) 1, 2. Primarni DBKL testis ima agresivan klinički tok i loš odgovor na aktuelnu terapiju³.

U odnosu na poreklo ćelije, PT-DBKL su češće porekla B ćelija van germinativnog centra (non GCB), poput ostalih ekstranodalnih limfoma 4-6. Mnoge studije su pokazale da klinički ishod non GC DBKL je lošiji od onih koji su porekla germinativnog centra (GC)⁵⁻⁷.

Ispitivani su brojni prognostički faktori kod DBKL, uključujući BCL2 i MYC translokacije i proteinske ekspresije⁸. Poselednjih godina je postignut značajan napredak u razumevanju alteracije MYC gena u DBKL. Rearanžman MYC gena se viđa kod 5-15% DBKL, koji nisu drugačije specifikovani (not otherwise specified-NOS), i često je udružen sa BCL2 i/ili BCL6 translokacijom, kod takozvanih "double-hit" i "triple-hit" limfoma 9-12.

Ekspresija Myc protein se uočava u većem procentu slučajeva DBKL (30- 50%) od MYC alteracija (5-15%) i udružena je sa ekspresijom Bcl-2 proteina u 20-35% slučajeva¹³⁻¹⁵. Mnogi od ovih tumora nemaju alteracije MYC/ BCL2 gena, ali zbog proteinske ekspresije se nazivaju „double-expressor lymphoma“. Brojne studije su pokazale da ovakvi limfomi imaju lošiju prognozu od ostalih DBKL, NOS 13-15.

Cilj naše studije bio je analiza kliničkih, histoloških, imunohistohemijskih i bioloških karakteristika PT DBKL i poređenje sa nodalnim i ekstranodalnim difuznim B krupoćelijskim limfomom.

MATERIJAL I METODE

Analizirani su tkivni uzorci fiksirani u formalinu, kalupljeni u parafinu, 21 pacijenta sa PT-DBKL koji su bili raspoloživi za histološku, imunohistohemijsku i biološku evaluaciju. Primarni limfom testisa je definisan kao prisustvo testikularne mase i bez dokaza o pri-

sutnom prethodno dijagnostikovanom limfomu drugih lokalizacija. Kao komparativna gupa, dodatno je ispitana grupa 30 novodijagnostikovanih bolesnika sa DBKL (19 nodalnih i 11 ekstranodalnih) sa raspoloživim arhiviranim biopsijskim uzorcima. Svi bolesnici su dijagnostikovani u Kabinetu za hematopatologiju Službe za patohistologiju Kliničkog centra Srbije, u Beogradu, u periodu 2002-2016. godine i tretirani na Klinici za Hematologiju Kliničkog centra Srbije, u istom periodu. Svi bolesnici podvrgnuti su standardnim procedurama (klinički pregled, laboratorijske analize, imidžing procedure i biopsija kostne srži.) Pacijenti sa PT-DBKL su smatrani za uznapredovali stadijum ukoliko je postojalo prisustvo uvećanih limfnih čvorova bilo gde drugo u organizmu prema Ann Arbor Stejdžing sistemu. Internacionalni Prognostički Indeks je korišćen za predviđanje dužine preživljavanja (16). Dvadeset PT-DBKL pacijenata tretirano je R-CHOP protokolom (rituximab, ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin i prednizon) uz zračenje kontralateralnog testisa aplikovanog kod 9 pacijenata i intratekalnu terapiju za 10 bolesnika (Tabela 1). Svi pacijenti u kontrolnoj grupi su tretirani R-CHOP/R-CHOP sličnim režimima. Odgovor na terapiju evaluiran je prema prethodno navedenim kriterijumima za odgovor na terapiju¹⁷. Ovaj rad je izveden u skladu sa Helsinškom deklaracijom i odobren od strane Etičkog komiteta Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Imunohistohemijska analiza je primenjena na arhiviranim FFPE uzorcima tkiva PT-DLBCL dobijenim nakon orhiektomije i arhiviranim FFPE tumorskog tkiva DLBCL pacijenata. U dijagnostičke svrhe, imunohistohemijska bojenja za CD20 (L26:Dako), CD3 (SP7:Thermoscientific), CD5 (4C7:Leica Biosystems), CD10 (clone 56C6:Dako), Ki-67 (MIB1-:Dako), Bcl-6 (clone PG-B6p:Dako), MUM1 (clone MUM1p:Dako), Bcl-2 (clone 124:Dako), Cyclin D1 (SP4:Thermoscientific), CD23 (1B12:Leica Biosystems) i TdT (clone EP266:Dako) su izvršena prema uputstvima proizvođača i važećem laboratorijskom protokolu koji podrazumeva aplikaciju avidin-biotin kompleks metode (LSAB2 kit peroksidaza:Dako), uz korišćenje AEC kao hromogena. C-Myc je detektovan pomoću Leica Bond Max Refine KIT metoda (Leica Bond Polymer Refine detection system-DS9800) i zečijeg monoklalnog anti c-Myc antitela (Abcam Rabbit monoclonal anti c-Myc, Clone Y69, 1:50).

Slučajevi su smatrani pozitivnim kada je najmanje 50% tumorskih ćelija ekspimiralo Bcl-2 protein i $\geq 40\%$ tumorskih ćelija ekspimiralo c-Myc, u skladu sa drugim studijama 2,4. Pacijenti su klasifikovani u GCB i na non-GCB subtipove prema Hansovom algoritmu 4.

Svi slučajevi sa raspoloživim arhiviranim biopsijskim uzorcima su analizirani metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) za MYC i BCL2, korišćenjem komercijalnih proba (Abbott Vysis, USA) 18.

REZULTATI

Kliničke karakteristike pacijenata sa PT-DBKL su prikazane u Tabeli 1. Srednje životno doba bilo je 64 godine (range, 32 do 78 godina). Većina pacijenata (14, 66%) je dijagnostikovana u ranoj fazi bolesti, odnosno I i II kliničkom stadijumu, dok je 7 pacijenata (33%) bilo u uznapredovalom kliničkom stadijumu (III i IV) bolesti. Šest pacijenata (28.6%) imalo je B simptomatologiju. Visok IPI stadijum bio je prisutan kod 10 (47.6%) PT-DBKL pacijenata.

Tabela 1. Kliničke karakteristike 21 pacijenta sa primarnim difuznim B krupnoćelijskim limfomom testisa.

NO	AGE	ANN ARBOR STAGE	IPI	THERAPY	RTX	IT	CR	RELAPSE	OS MONTHS	VITAL STATU
1	74	III-IV	high	R-CHOP	no	yes	yes	no	28	alive
2	67	I-II	low	R-CHOP	no	no	yes	no	24	alive
3	61	III-IV	high intermediate	R-CHOP	no	yes	yes	yes	10	alive
4	62	I-II	high intermediate	R-CHOP	yes	yes	no	resistant disease	24	dead
5	67	III-IV	high intermediate	R-CHOP	yes	no	yes	yes	16	dead
6	62	I-II	high	R-CHOP	yes	no	yes	no	39	alive
7	64	I-II	low intermediate	R-CHOP	yes	no	yes	no	72	alive
8	55	III-IV	low	R-CHOP	yes	no	yes	no	20	alive
9	66	I-II	low	R-CHOP	yes	yes	no	no	16	alive
10	78	I-II	low	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
11	77	I-II	low	R-CHOP	N/A	yes	yes	no	8	alive
12	69	III-IV	high intermediate	R-CHOP	no	yes	no	resistant disease	7	dead
13	72	I-II	low	R-CHOP	no	no	no	resistant disease	9	alive
14	70	I-II	low	R-CHOP	no	no	yes	no	44	dead
15	54	I-II	low	R-CHOP	yes	yes	yes	yes	18	dead
16	66	I-II	low	R-CHOP	no	yes	yes	no	46	alive
17	59	III-IV	high intermediate	R-CHOP	no	yes	no	resistant disease	21	dead
18	76	I-II	high intermediate	R-CHOP	yes	no	yes	no	40	alive
19	32	I-II	low	R-CHOP	yes	yes	yes	no	12	alive
20	58	III-IV	low intermediate	R-CHOP	no	no	yes	yes	48	dead
21	64	I-II	low intermediate	R-CHOP	no	no	yes	no	119	dead

IPI - International Prognostic Index; RTX - radiotherapy; IT - intrathecal therapy; CR - complete remission; OS - overall survival; R-CHOP - rituximab, cyclophosphamide, vincristine, prednisone; N/A - not applicable

Morfološka, imunohistohemijska i FISH analiza:

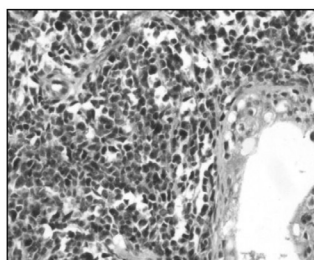
Svi ispitivani slučajevi su imali centroblastnu morfologiju i svi su bili CD20 pozitivni.

Marker geminativnog centra, CD10, bio je ekspimiran kod 3 od 21 (14%), Bcl-6 kod 13 od 21 (61%), MUM-1 kod 16 od 18 (88%) PT-DBKL slučajeva (Tabela 2). Većina je imala non GCB imunofenotip (17 of 21, 80.95%). Četiri od 21 (19%) su klasifikovani kao GCB imunohistohemijski podtip. Dva od 4 GCB slučaja su imali sva tri markera pozitivna (CD10+, Bcl-6+, MUM-1+).

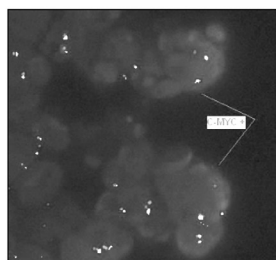
U kontrolnoj grupi, 23 od 30 slučajeva (76%) su bili non GCB subtype ($p>0.05$).

Bcl-2 proteinska ekspresija je detektovana kod 16 od 21 (76%) PT-DBKL uzoraka i kod 67% u DBKL NOS kontrolnoj grupi ($p>0.05$).

Myc protein je bio ekspimiran kod 8 od 14 slučajeva (57.0%), u odnosu na 23% u kontrolnoj grupi ($p<0.05$) (Slika 1). Uočena je značajna razlika u ekspresiji Myc protein u PT-DBKL grupi (median 40.0%, $n=14$) i kontrolnoj grupi (median 10.0%, $n=29$) (Mann Vitney test, $U=111.50$, $z=-2.415$, $p=0.016$).



Slika 1. Difuzni B krupnoćelijski limfom testisa, imunohistohemija, Mycx400



Slika 2. FISH, MYC rearanžman

Imunohistohemijska ekspresija oba proteina, Myc i Bcl2 bila je prisutna kod 5 od 14 PT-DBKL pacijenata (36.0%), koji su kalsifikovani kao „double expressors“. U kontrolnoj grupi, bilo je 13% imunofenotipskih „double hit“ slučajeva ($p>0.05$).

Ukupno 4 od 14 (28.5%) pacijenata je pokazalo alteracije MYC gena u PT-DBKL grupi. MYC rearanžman je uočen kod 1 od 14 (7%), MYC amplifikacija kod 3 od 14 (21%) pacijenata (Slika 2). Jedan pacijent sa MYC rearanžmanom je imao i Myc i Bcl-2 proteinsku ekspresiju i GCB imunofenotip. Kod dva PT-DBKL slučaja (2 od 4, 50%) sa MYC alteracijama, uočena je Myc pozitivnost u $\geq 40.0\%$ tumorskih ćelija (range 40.0-80.0%). Šest pacijenata sa Myc proteinskom ekspresijom nije imala alteracije MYC gena. Dva pacijenta sa MYC amplifikacijom, takođe su imala BCL2 amplifikaciju. U kontrolnoj grupi, 3 pacijenta (10%) su imala MYC rearanžman, a 3 pacijenta amplifikaciju (10%).

Jedan od 14 pacijenata (7.0%) u PT-DBKL grupi imao je BCL2 rearanžman, a 4 od 14 (28.05%) BCL2 amplifikaciju. Četiri od 5 pacijenata sa alteracijama BCL2 gena, pokazivalo je i imunohistohemijsku ekspresiju Bcl-2 proteina. Jedan pacijent je imao BCL2 translokaciju udruženu sa non GCB podtipom (Tabela 2.).

Tabela 2. Imunohistohemijska i FISH analiza 21 pacijenta sa primarnim difuznim B krupnoćelijskim limfomom testisa.

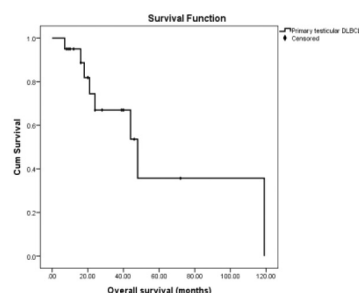
NO	CELL OF ORIGIN	CD10	BCL-6	MUM-1	BCL-2	C-MYC (%)	DOUBLE EXPRESSORS	C-myc fish	bcl-2 fish	DOUBLE HIT FISH
1	non GCB	no	no	yes	no	40	no	AMP	AMP	no
2	non GCB	no	yes	yes	yes	20	no	NEG	AMP	no
3	non GCB	no	no	yes	yes	60	yes	NEG	NEG	no
4	non GCB	no	no	yes	yes	10	no	NEG	NEG	no
5	non GCB	no	yes	yes	no	40	no	NEG	NEG	no
6	GCB	yes	yes	no	yes	40	no	REA	NEG	no
7	GCB	yes	yes	yes	no	80	no	NEG	NEG	no
8	non GCB	no	no	yes	yes	40	no	NEG	NEG	no
9	non GCB	no	no	yes	yes	10	no	NEG	NEG	no
10	non GCB	no	yes	yes	yes	20	no	NEG	REA	no
11	GCB	no	yes	no	yes	1	no	AMP	NEG	no
12	non GCB	no	yes	yes	yes	80	yes	NEG	NEG	no
13	GCB	yes	yes	yes	yes	60	yes	NEG	AMP	no
14	non GCB	no	yes	yes	yes	10	no	AMP	AMP	no
15	non GCB	no	yes	yes	yes	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
16	non GCB	no	yes	yes	yes	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
17	non GCB	no	no	N/A	yes	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
18	non GCB	no	yes	yes	yes	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
19	non GCB	no	yes	yes	yes	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
20	non GCB	no	no	N/A	no	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
21	non GCB	no	no	N/A	no	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

FISH - Fluorescence in situ hybridisation; GCB - germinal centre B cell; N/A - not applicable.

Odgovor na terapiju i preživljavanje:

Kompletna remisija (KR) postignuta je kod 15 od 20 pacijenata sa PT-DBKL (75%), dok su 4 pacijenta imala primarno rezistentnu bolest, a troje od njih je umrlo unutar 2 godine. Među pacijentima koji su postigli kompletnu remisiju, 4 od 16 (25%) je doživelo relaps bolesti. Na kraju istraživanja, 8 pacijenata (40.0%) sa PT-DBKL je umrlo od posledica bolesti.

Medijana praćenja pacijenata sa PT-DBKL bila je 22.5 meseca (range 7-119 meseci). Srednje ukupno preživljavanje u PT-DBKL grupi bilo je 48 meseci (95% CI, 21.084-74.916) (Slika 3.). PT-DBKL pacijenti sa niskim IPI imali su srednje ukupno preživljavanje 48 meseca, u odnosu na 24 meseca u grupi pacijenata sa visokim IPI (95% CI 21.084-74.916, Log Rank=3.192, $p=0.074$). Pacijenti u grupi PT-DBKL koji su postigli kompletnu remisiju imali su značajno bolje ukupno preživljavanje u odnosu na pacijente koji nisu postigli kompletnu remisiju (mediana 48 meseci vs. 21 mesec, Log Rank=6.240, $p=0.012$). Ostali analizirani klinički morfološki, imunohistohemijski i biološki parametri nisu imali uticaja na preživljavanje.



Slika 3. Ukupno preživljavanje pacijenata sa primarnim difuznim B krupnoćelijskim limfomom testisa

DISKUSIJA

Primarni difuzni B krupnoćelijski limfom je najčešći maligni tumor testisa kod muškaraca starijih od 60 godina 3, 6. U našoj studiji, starosna dob, klinički stadijum, postojanje B simptoma kod pacijenata su bili u skladu sa literaturnim podacima 3, 6.

Uprkos značajnom napretku u terapiji pacijenata sa DBKL, koji je postignut naročito dodavanjem rituximab-a standardnoj hemioterapiji, radioterapiji i profilaksi centralnog nevnog sistema (CNS), ishod bolesti je fatalan kod skoro polovine pacijenata sa DBKL6, 19-21. Uloga profilakse CNS, kao i radioterapije se još uvek razmatra 20, 21. Ishod bolesti kod pacijenata sa PT-DBKL je bio lošiji u poređenju sa nodalnim DBKL, u skladu sa specifičnošću anatomske lokalizacije i funkcije testisa 1, 2. Naši rezultati ukazuju da lošije ukupno preživljavanje pacijenata sa PT-DBKL, je najverovatnije posledica agresivnosti ovih tumora. Mnogi izveštaji govore o tome da IPI ima važnu ulogu kao prognostički parameter preživljavanja pacijenata sa DBKL22. Ovaj podatak je potvrđen u našoj studiji u kontrolnoj grupi, gde je IPI zadržao svoj prognostički značaj. Međutim, u grupi pacijenata sa PT-DBKL, bilo je najviše pacijenata sa niskim IPI indeksom.

Iako klinički parametri mogu odrediti ishod bolesti nakon terapije bazirane na rituximab-u, nameće se potreba za evaluacijom molekularnih i genetskih faktora udruženih sa preživljavanjem 23. Booman i saradnici 7, su pokazali da su PT-DLBCL skoro isključivo tipa aktiviranih B ćelija na osnovu „gene expression” studija, a da trećina u istoj grupi ima koekspresiju markera kako germinativnog centra, tako i onih aktiviranih B ćelija. Većina slučajeva u studiji Deng i saradnika imalo je non GCB (84%) imunofenotip i ABC (86%) podtip 23. U našoj studiji, većina slučajeva (81%), je imala non GCB imunofenotip, u odnosu na 76% u kontrolnoj grupi; dva su bila GCB i dva sa koekspresijom CD10, Bcl-6 i MUM-1. Predominacija non GCB tipa može delom biti od uticaja na loš ishod bolesti kod pacijenata sa DBKL testisa 1.

Prognostički uticaj ekspresije Bcl-2 proteina kod DBKL je kontroverzan, ali neke skorašnje studije su

pokazale udruženost sa agresivnošću bolesti i kraćim preživljavanjem 13-15, 24. Takođe je uočeno da Bcl-2 ekspresija ima prognostički vrednost samo kod GCB podtipa, u vezi sa prisustvom BCL2 translokacije, koja se mnogo češće nalazi kod GCB podtipa DBKL 24. U našoj studiji, Bcl-2 ekspresija je uočena kod 76% non GCB PT-DBKL pacijenata. BCL2 translokacija je uočena samo kod jednog pacijenta udružana sa non GCB imunofenotipom. Učestalost alteracija BCL2 gena i ekspresije Bcl-2 proteina u našoj studiji je u saglasnosti sa rezultatima ostalih istraživača 12-15.

Naši rezultati podržavaju rezultate prethodnih studija koji govore o tome da je Myc protein ekspimiran u većem procentu slučajeva u PT-DBKL grupi u odnosu na ostale DBKL12-15, 2. Kada je reč o FISH analizi, MYC rearanžman je uočen kod 7% PT DBKL, što se nije značajno razlikovalo od pacijenata u kontrolnoj grupi i u saglasnosti je sa prethodno objavljenim rezultatima 11, 12, 24, 25.

U našoj grupi pacijenata nije bilo “double hit” slučajeva, ali koekspresija Myc i Bcl-2 proteina je bila prisutna kod 36% slučajeva, dok je u kontrolnoj grupi bilo 13.0% sa koekspresijom. Pacijenti sa MYC/BCL2 pozitivnim tumorima imaju značajno lošiji ishod bolesti u poređenju sa pacijentima kod kojih nije uočena koekspresija 11-14, 25-27.

ZAKLJUČAK

Rezultati naše studije pokazuju da se imunohistohe-mijske i biološke karakteristike primarnog difuznog B krupnoćelijskog limfoma razlikuju u odnosu na nodalne ili ektranodalne DBKL. Uprkos izvesnim ograničenjima studije, ukazano je na različitost primarnog DBKL testisa, agresivnost i potencijalno lošije preživljavanje ovih pacijenata.

S obzirom da su primarni DBKL testisa retki, neophodne su prospektivne multinacionalne studije u cilju boljeg razumevanja biologije ovih tumora, pa samim tim i unapređenja tekućeg terapijskog pristupa.

LITERATURA

1. Cheah CY, Wirth A, Seymour JF. Primary testicular lymphoma. *Blood*. 2014;123:486-493.
2. Menter T, Ernst M, Drachneris J, Dirnhofer S, Barghorn A, Went P, Tzankov A. Phenotype profiling of primary testicular diffuse large B-cell lymphomas. *Hematological Oncology*. 2014;3272-81.
3. Zucca E, Conconi A, Mughal TI, Sarris AH, Seymour JF, Vitolo U, Klasa R, Ozsahin M, Mead GM, Gianni MA, Cortelazzo S, Ferreri AJ, Ambrosetti A, Martelli M, Thiéblemont C, Moreno HG, Pinotti G, Martinelli G, Mozzana R, Grisanti S, Provencio M, Balzarotti M, Laveder F, Oltean G, Callea V, Roy P, Cavalli F, Gospodarowicz MK. International Extranodal Lymphoma Study Group. Patterns of outcome and prognostic factors in primary large-cell lymphoma of the testis in a survey by the international extranodal lymphoma study group. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21:20-27.
4. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004; 103:275-282.
5. Fonseca R, Habermann TM, Colgan JP, O'Neill BP, White WL, Witzig TE, Egan KS, Martenson JA, Burgart LJ, Inwards DJ. Testicular lymphoma is associated with a high incidence of extranodal recurrence. *Cancer*. 2000; 88:154-161.
6. Gundrum JD, Mathiason MA, Moore DB, Go RS. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study on the incidence, natural history, and survival comparison with primary nodal counterpart before and after the introduction of rituximab. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27:5227-5232.
7. Booman M, Douwes J, Glas AM, de Jong D, Schuurin E, Kluin PM. Primary testicular diffuse large B-cell lymphomas have activated B-cell-like subtype characteristics. *The Journal of Pathology*. 2006; 210:163-171.
8. Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES, Chan JKC, Gatter KC, Campo E. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Haris LN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France: IARC; 2008.
9. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES, Rosenwald A, Campo E, Chan WC, Connors JM, Smeland EB, Mottok A, Braziel RM, Ott G, Delabie J, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Greiner TC, Glinzmann-Gibson BJ, Fu K, Staudt LM, Gascoyne RD, Rimsza LM. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*. 2014; 123:1214-1217.
10. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127:2375-2390.
11. Karube K, Campo E. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol*. 2015;52:97-106.
12. Swerdlow SH. Diagnosis of 'double hit' diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;1:90-99.
13. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, Feller AC, Klapper W, Hummel M, Stein H, Hansmann ML, Schmelter C, Möller P, Cogliatti S, Pfreundschuh M, Schmitz N, Trümper L, Siebert R, Loeffler M, Rosenwald A, Ott G. German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013;121:2253-2263.
14. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, Nielsen O, Gadeberg OV, Mourits-Andersen T, Frederiksen M, Pedersen L.M, Møller MB. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30:3460-3467.
15. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, Scott DW, Tan KL, Steidl C, Sehn LH, Chan WC, Iqbal J, Meyer PN, Lenz G, Wright G, Rimsza LM, Valentino C, Brunhoeber P, Grogan TM, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Weisenburger DD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Holcroft C, Jaffe ES, Staudt LM, Gascoyne RD. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30:3452-3459.
16. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*. 1993; 329:987-994.
17. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-López A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP.

- Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas, NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol.* 1999;17:1244.
18. Chin SF, Daigo Y, Huang HE, Iyer NG, Callagy G, Kranjac T, Gonzalez M, Sangan T, Earl H, Caldas C. A simple and reliable pretreatment protocol facilitates fluorescent in situ hybridisation on tissue microarrays of paraffin wax embedded tumour samples. *Mol Pathol.* 2003;56:275-279.
 19. Chapuy B, Roemer MG, Stewart C, Tan Y, Abo RP, Zhang L, Dunford AJ, Meredith DM, Thorner AR, Jordanova ES, Liu G, Feuerhake F, Ducar MD, Illerhaus G, Gusenleitner D, Linden EA, Sun HH, Homer H, Aono M, Pinkus GS, Ligon AH, Ligon KL, Ferry JA, Freeman GJ, van Hummelen P, Golub TR, Getz G, Rodig SJ, de Jong D, Monti S, Shipp MA. Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood.* 2016;127:869-881.
 20. Schmitz N, Nickelsen M, Savage KJ. Central Nervous System Prophylaxis for Aggressive B-cell Lymphoma: Who, What, and When?. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2016;30:1277-1291.
 21. Kridel R, Telio D, Villa D, Sehn LH, Gerrie AS, Shenkier T, Klasa R, Slack GW, Tan K, Gascoyne RD, Connors JM, Savage KJ. Diffuse large B-cell lymphoma with testicular involvement: outcome and risk of CNS relapse in the rituximab era. *Br J Haematol.* 2017; 176:210-221.
 22. Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Ann Oncol.* 2014;25:2124-2133.
 23. Deng L, Xu-Monette ZY, Loghavi S, Manyam GC, Xia Y, Visco C, Huh J, Zhang L, Zhai Q, Wang Y, Qiu L, Dybkær K, Chiu A, Perry AM, Zhang S, Tzankov A, Rao H, Abramson J, Sohani AR, Xu M, Hsi ED, Zhu J, Ponzoni M, Wang S, Li L, Zhang M, Ferreri AJ, Parsons BM, Li Y, Piris MA, Medeiros LJ, Young KH. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma displays distinct clinical and biological features for treatment failure in rituximab era: a report from the International PTL Consortium. *Leukemia.* 2016;30:361-372.
 24. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, Liu WM, d'Amore ES, Li Y, Montes-Moreno S, Dybkær K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Wang HY, Dunphy CH, His ED, Zhao XF, Choi WW, Zhao X, van Krieken JH, Huang Q, Ai W, O'Neill S, Ponzoni M, Ferreri AJ, Kahl BS, Winter JN, Go RS, Dirnhofer S, Piris MA, Møller MB, Wu L, Medeiros LJ, Young KH. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica.* 2013;98:255-263.
 25. Bernasconi B, Uccella S, Martin V, Mazzucchelli L, Sessa F, Capella C, Tibiletti MG. Gene translocations in testicular lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2014;55:1410-1412.
 26. Twa DD, Mottok A, Chan FC, Ben-Neriah S, Woolcock BW, Tan KL, Mungall AJ, McDonald H, Zhao Y, Lim RS, Nelson BH, Milne K, Shah SP, Morin RD, Marra MA, Scott DW, Gascoyne RD, Steidl C. Recurrent genomic rearrangements in primary testicular lymphoma. *The Journal of Pathology.* 2015;236:136-141.
 27. Wang XJ, Medeiros LJ, Lin P, Yin CC, Hu S, Thompson MA, Li S. MYC cytogenetic status correlates with expression and has prognostic significance in patients with MYC/BCL2 protein double-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2015;39:1250-1258.

ZNAČAJ P16INK4A TESTA U DIJAGNOSTICI PREMALIGNIH I MALIGNIH LEZIJA NA GRLIĆU MATERICE

AUTORI

Prof.dr Leonida Vitković
Univerzitet u Prištini - Medicinski fakultet, Kosovska Mitrovica, Srbija

SAŽETAK

Uvod/cilj: U našem istraživanju ispitivali smo značaj p16INK4a testa u cervikalnoj citologiji u odnosu na Papanicolau test i HPV test.

Materijal i metode: Ispitivanjem je obuhvaćeno 100 ispitanica sa sumnjom na premaligne lezije na cerviksu. Cervikalna citologija analizirana je na Papanicolau test i p16INK4a test. Kod 56 ispitanica uzet je cervikalni bris za HPV DNA tipizaciju. Histološki nalaz cervikalnih biopsija predstavljao je "zlatni standard". Za imunocitohemijsku analizu korišćen je CINtec citološki kit. Za analizu podataka korišćene su: deskriptivne statističke metode, metode za ispitivanje zavisnosti i testiranje statističkih hipoteza.

Rezultati: Između histološkog i citološkog nalaza Papanicolau testa postoji značajna pozitivna korelacija (Spearman $r = 0.71$, $p < 0.001$). P16INK4a test je bio pozitivan kod 36 (36.0%) ispitanica. Između Papanicolau i p16INK4a testa postoji statistički značajna pozitivna korelacija (Spearman $r=0.70$, $p<0.001$). Intenzitet ekspresije p16INK4a proteina u citološkom nalazu je značajno veći kod ispitanica sa pozitivnim HPV16 nalazom (Mann-Whitney test, $p=0.0065$).

Zaključak: Dobra korelacija stepena ekspresije i težine promene, ukazuje da bi ovaj test mogao popraviti rezultate citološkog i HPV skrininga, kao i rezultate u predikciji i prognozi oboljenja grlića materice.

Ključne reči: P16INK4a protein, Papanicolau test, HPV.

ENGLISH

THE SIGNIFICANCE OF P16INK4A TEST IN THE DIAGNOSIS OF PREMALIGNANT AND MALIGNANT CERVICAL LESIONS

SUMMARY

Introduction/aim: In our study, we examined the significance of the p16INK4a test in cervical cytology relative to the Papanicolau test and the HPV test.

Material and methods: The study included 100 subjects with suspected premalignant lesions of the cervix. Cervical cytology was analyzed for Papanicolau test and p16INK4a test. In 56 subjects, a cervical swab was used for HPV DNA typing. The histologic findings of cervical biopsies represented the „gold standard“. A CINtec cytology kit was used for immunocytochemical analysis. The following were used to analyze the data: descriptive statistical methods, methods for testing dependencies and testing statistical hypotheses.

Results: There was a significant positive correlation between the histological and cytological findings of the Papanicolau test (Spearman $r = 0.71$, $p < 0.001$). The P16INK4a test was positive in 36 (36.0%) subjects. There was a statistically significant positive correlation between Papanicolau and p16INK4a (Spearman $r = 0.70$, $p < 0.001$).

The intensity of p16INK4a protein expression in the cytologic finding was significantly higher in subjects with a positive HPV16 finding (Mann-Whitney test, $p = 0.0065$).

Conclusion: A good correlation of expression rate and severity of change indicates that this test could improve the results of cytologic and HPV screening, as well as results in the prediction and prognosis of cervical disease.

Key words: P16INK4a protein, Papanicolau test, HPV.

UVOD

Premaligne promene na grliću materice i karcinom grlića materice su kontinuiran proces. Metode u dijagnostici premalignih i malignih promena epitela grlića materice iste su kao i pre više od šest decenija - kolposkopija i citološka dijagnostika (Papanicolau test) - i primenjuju se kod većeg dela populacije kao skrining. Ove metode imaju ograničenu senzitivnost i specifičnost, pa se danas traga za metodama koje bi povećale tačnost i smanjile broj lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. HPV DNA test je visokosenzitivna, ali niska specifičnost i pozitivna prediktivna vrednost ograničile su njegovu upotrebu u cervikalnom skriningu. Patohistološka dijagnoza predstavlja „zlatni standard“ u dijagnozi premalignih i malignih promena grlića materice, ali je njen nedostatak u tome što se materijal dobija invazivnim metodama, pa nije pogodna za masovni skrining.

Od kako je dokazano da je uzročnik maligne transformacije epitelnih ćelija infekcija visokorizičnim tipovima humanih papiloma virusa (HPV), ispituju se nove dijagnostičke metode, koje se baziraju se na molekularnom razumevanju interakcije između visokorizičnih HPV tipova i ćelija domaćina. Danas se većina istraživača slaže da dve velike familije gena imaju značajnu ulogu u nastanku malignoma, to su tumor supresorski geni i onkogeni. Molekularnobiološka ispitivanja su pokazala da tumor supresorski gen INK4a (sinonimi: MTS1, CDKN2, INK4a/ARF) ima važnu ulogu u regulatornom mehanizmu ćelijskog ciklusa i da kodira protein P16INK4a. Danas se po najvišim ocenama dijagnostičkih performansi izdvaja protein p16INK4a kao značajan biomarker cervikalne neoplazije.

Protein p16INK4a je tumor-supresorski protein koji pripada grupi inhibitora ciklin-zavisnih kinaza 4 i 6 (Cyclin-Dependent Kinase, CDK4/6). U normalnim ćelijskom ciklusu ekspresija proteina p16INK4a ne može se imunohistohemijski dokazati u ćelijama pločastostlojevitog i cilindričnog epitela grlića materice. Ekspresiju proteina p16INK4a reguliše protein retinoblastoma (Rb) negativnim povratnim mehanizmom. U infekciji visokorizičnim tipovima HPV, onkoproteini E6

i E7 indukuju malignu transformaciju epitelnih ćelija grlića materice. Onkoprotein E7 vezuje se za protein retinoblastoma (Rb), pa nastaje funkcionalna inaktivacija proteina retinoblastoma (Rb). Proces je praćen pojačanom ekspresijom proteina p16INK4a koja se imunohistohemijski može detektovati u displastičnim ćelijama epitela grlića materice u biopsijskim uzorcima i cervikalnim razmazima (19-26).

CILJ RADA

Osnovni cilj ovog rada je ispitivanje značaja molekularnog biomarkera, proteina p16INK4a, u detekciji diskariotičnih cervikalnih ćelija u premalignim promenama grlića materice u odnosu na Papanicolau test i HPV test.

METODE RADA

Ispitivanjem je obuhvaćeno 100 ispitanica sa sumnjom na premaligne promene grlića materice. Kod svih ispitanica uzeti su cervikalni brisevi za: citološku analizu na malignitet i imunocitohemijsku analizu na p16INK4a protein. Kod 56 ispitanica uzet je cervikalni bris za HPV DNA tipizaciju na HPV tipove 16, 18, 31 i 33. U toku kolposkopije urađena je ciljana biopsija grlića materice. Histološki nalaz je predstavljao „zlatni standard“ u analizi materijala. Za imunocitohemijsku analizu korišćen je CINtec citološki kit, MTM laboratorije. CINtec citološki kit sadrži primarni monoklon antitela miša E6H4 koji se koristi za otkrivanje p16INK4a preina kao antigena. Kao hromogen koristi se DAB+. Pozitivna reakcija dokazana je ukoliko postoji citoplazmatska i nuklearna reakcija u više od 10 diskariotičnih ili atipičnih ćelija. Za analizu primarnih podataka korišćene su: deskriptivne statističke metode, metode za ispitivanje zavisnosti, za testiranje statističkih hipoteza i za ocenu dijagnostičkih performansi.

REZULTATI

Ispitano je 100 žena sa sumnjom na premaligne i maligne bolesti na grliću materice.

Normalan histološki nalaz biopsije imalo je 40 (40.0%), blaže promene na grliću tipa LSIL (CIN1) imalo je 41 (41.0%), teže promene tipa HSIL (CIN2/3) imalo je 5 (15.0%), a planocelularni karcinom je dijagnostikovao kod 4 (4.0%) ispitanice.

Citološki nalaz ispitanica (Papanicolau test) prikazan je u tabeli 1. Najčešći citološki nalaz bio je ASC-US 38 (38.0%), zatim uredan nalaz u 26 (26.0%), ASC-H (IIIa) u 15 (15.0%), LSIL (IIIb) u 12 (12.0%), HSIL kod 5 (5.0%) i karcinom kod 4 (4%) ispitanica.

Tabela 1. Papanicolau test (n=100)

	broj	%
Uredan nalaz	26	26.0%
ASC-US	38	38.0%
ASC-H (IIIa)	15	15.0%
LSIL (IIIb)	12	12.0%
HSIL (IV)	5	5.0%
Ca (V)	4	4.0%
Total	100	100.0%

Korelacija histološkog i citološkog nalaza prikazana je u tabeli 2. Između histološkog i citološkog nalaza postoji značajna pozitivna korelacija (Spearman $r = 0.71$, $p < 0.001$). Kod ispitanica sa histološkim nalazom CIN1 najčešći citološki nalaz bio je ASC-US 23 (56.1%), zatim ASC-H kod 12 (29.3%). Kod ispitanica sa histološki dijagnostikovanim HSIL (CIN2/3), najčešći citološki nalaz je bio LSIL kod 11 (73.3%), zatim HSIL kod 3 (20.0%). Sve ispitanice sa histološki verifikovanim karcinomom imale su isti i citološki nalaz.

Tabela 2. Korelacija histološkog nalaza i Papanicolau testa (n=100)

Histološki nalaz	Citološki nalaz						Total
	Normalan	ASC-US	ASC-H (IIIa)	LSIL (IIIb)	HSIL (IV)	Ca (V)	
Cervitis	22 55.0%	14 35.0%	3 7.5%	0 0.0%	1 2.5%	0 0.0%	40 100.0%
LSIL (CIN1)	4 9.8%	23 56.1%	12 29.3%	1 2.4%	1 2.4%	0 0.0%	41 100.0%
HSIL (CIN2/3)	0 0.0%	1 6.7%	0 0.0%	11 73.3%	3 20.0%	0 0.0%	15 100.0%
Carcinoma	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	4 100.0%	4 100.0%
Total	26 26.0%	38 38.0%	15 15.0%	12 12.0%	5 5.0%	4 4.0%	100 100.0%

(Spearman $r = 0.71$, $p < 0,001$)

Imunocitohemijskom analizom ekspresije p16INK4a proteina u epitelnim ćelijama cervikalnog razmaza, 36 (36.0%) ispitanica imalo je povećanu ekspresiju p16INK4a proteina (pozitivan nalaz), a 64 (64.0%) negativan nalaz (tabela 3).

Tabela 3. P16INK4a test (n=100)

	Učestalost	%
P16INK4a negativan	64	64.0%
P16INK4a pozitivan	36	36.0%
Total	100	100.0%

Intenzitet ekspresije p16INK4a proteina u epitelnim ćelijama cervikalnog razmaza u odnosu na citološki nalaz Papanicolau testa prikazan je u tabeli 4.

Tabela 4. P16INK4a test u odnosu na Papanicolau test (n=100)

Papa	P16INK4a		Total
	P16 -	P16+	
Uredan nalaz	26 100.0%	0 0.0%	26 100.0%
ASC-US	29 76.3%	9 23.7%	38 100.0%
ASC-H (IIIa)	8 53.3%	7 46.7%	15 100.0%
LSIL (IIIb)	0 0.0%	12 100.0%	12 100.0%
HSIL (IV)	1 20.0%	4 80.0%	5 100.0%
Ca (V)	0 0.0%	4 100.0%	4 100.0%
Total	64 64.0%	36 36.0%	100 100.0%

(Spearman $r = 0.70$, $p < 0.001$)

Između Papanicolau i p16INK4a testa postoji statistički značajna pozitivna korelacija (Spearman $r = 0.70$, $p < 0.001$). Kod 29 (76.3%) ispitanica sa citološkim nalazom ASC-US utvrđen je negativan imunocitohemijski nalaz p16INK4a proteina u cervikalnom razmazu, a kod 9 (23.7%) pozitivan. Kod 8 (53.3%) ispitanica sa citološkim nalazom ASC-H nije detektovana povećana ekspresija p16INK4a proteina u cervikalnom razmazu, a kod 7 (46.7%) je detektovana. Kod svih 12 ispitanica sa citološkim nalazom LSIL detektovana je povećana ekspresija p16INK4a proteina u epitelnim ćelijama cervikalnog razmaza. Citološki nalaz HSIL i karcinom imalo je 9 ispitanica i samo kod 1 (11.1%) nije detektovana povećana ekspresija p16INK4a proteina.

Kod 56 žena ispitano je prisustvo onkogenih tipova HPV. Kod 47 (84%) žena HPV DNA test je bio pozitivan, a kod 9 (16%) negativan. U grupi od 56 ispitanica, 27 (48.2%) je imalo HPV 16, 26 (46.4%) HPV 31, a HPV 18 imalo je 18 (32.1%). Najmanja zastupljenost je bila je HPV 33 kod 4 (7.1%) žene.

Imunocitohemijski nalazi intenziteta ekspresije p16INK4a proteina u epitelnim ćelijama cervikalnog razmaza i prisustvo onkogenih tipova HPV prikazani su u tabeli 5.

Tabela 5. P16INK4a test i HPV test (n=56)

P16INK4a	HPV 16		HPV 18		HPV 31		HPV 33		Total
	-	+	-	+	-	+	-	+	
P16 negativan	20 69.0%	9 33.3%	20 52.6%	9 50.0%	15 50.0%	14 53.8%	26 50.0%	3 75.0%	26 46.4%
P16 pozitivan	9 31.0%	18 66.7%	18 47.4%	9 50.0%	15 50.0%	12 46.2%	26 50.0%	1 25.0%	30 53.6%
Total	29 100.0%	27 100.0%	38 100.0%	18 100.0%	30 100.0%	26 100.0%	52 100.0%	4 100.0%	56 100.0%
	p=0.0065		p=0.92		p=0.56		p=0.64		

Od 27 ispitanica sa pozitivnim HPV 16 nalazom, pozitivan nalaz p16INK4a proteina u cervikalnom razmazu imalo je 18 (66.7%). Intenzitet ekspresije p16INK4a proteina u cervikalnom razmazu značajno je veći kod ispitanica sa pozitivnim HPV 16 nalazom (Mann-Whitney test, $p = 0.0065$). Od 18 ispitanica sa pozitivnim HPV 18 nalazom, pozitivan imunocitohemijski nalaz p16INK4a proteina u cervikalnom razmazu imalo je 9 (50.0%). Nema statistički značajne razlike kod ispitanica sa pozitivnim i negativnim HPV 18 nalazom u odnosu na intenzitet ekspresije p16INK4a proteina u cervikalnom razmazu (Mann-Whitney test, $p=0.92$). Od 26 ispitanica sa pozitivnim HPV 31 nalazom, pozitivan nalaz p16INK4a proteina u cervikalnom razmazu imalo je 12 (46.2%). Nema statistički značajne razlike kod ispitanica sa pozitivnim i negativnim HPV 31/33 nalazom u odnosu na intenzitet ekspresije p16INK4a proteina u cervikalnom razmazu (Mann-Whitney test, $p=0.56/0.64$).

DISKUSIJA

U našem istraživanju pronašli smo značajnu pozitivnu korelaciju između histološkog i citološkog nalaza, odnosno porast težine histološke lezije pratio je teži citološki nalaz.

U normalnim ćelijama pločastoslojevitog epitela i cilindričnog epitela nismo detektovali pojačanu ekspresiju proteina p16INK4a. Ovakvi rezultati potvrđuju hipotezu da se protein p16INK4a ne može detektovati u delovima epitela gde je očuvana kontrola ćelijskog ciklusa. U normalnom ćelijskom ciklusu protein p16INK4a sprečava fosforilaciju proteina retinoblastoma (Rb), tako što inaktivira CDK4/6 koje fosforilišu protein retinoblastoma (Rb). Hipofosforilisani protein retinoblastoma (Rb) veže E2F transkripcioni faktor i zaustavlja ćelijski ciklus u G1 fazi. U hipofosforilisanim stanju protein retinoblastoma (Rb) sprečava aktivnost E2F transkripcionog faktora i negativnim povratnim mehanizmom reguliše ekspresiju proteina p16INK4a. U normalnom ćelijskom ciklusu nema pojačane ekspresije proteina p16INK4a, pa se u normalnom pločastoslojevitom i cilindričnom epitelu grlića materice protein p16INK4a imunohistohemijski ne detektuje.

Pojačanu ekspresiju proteina p16INK4a u diskariotičnim i malignim ćelijama epitela grlića materice detektovali smo imunohistohemijskim bojenjem jedra i citoplazme, što je u skladu sa nalazima drugih autora. Smatra se da je protein p16INK4a lokalizovan u jedru, a njegova detekcija u citoplazmi ćelija objašnjava se pojačanom ekspresijom i povećanim transferom proteina p16INK4a u citoplazmu.

Pronašli smo značajnu pozitivnu korelaciju između stepena ekspresije p16INK4a proteina u cervikalnom razmazu u odnosu na citološki nalaz Papanicolau testa. Detekcija p16INK4a proteina u cervikalnom razmazu se povećavala sa težinom citološkog nalaza.

Detekcija proteina p16INK4a u premalignim lezijama cerviksa mogla bi da ukazuje na deregulisanu ekspresiju onkogenih HPV tipova i na poremećaj ćelijskih kontrolnih mehanizama u ćelijama pločastoslojevitog epitela. U infekciji izazvanoj visokorizičnim tipom HPV, onkoprotein E7 vezuje se za protein retinoblastoma (Rb), pa nastaje funkcionalna inaktivacija i hiperfosforilacija proteina retinoblastoma (Rb), otpuštanje E2F transkripcionog faktora i pojačana ekspresija proteina p16INK4a. Na taj način infekcija visokorizičnim tipom HPV, koji je integrisao svoj genom u domaćinov, indukuje ekspresiju proteina p16INK4a. Oslobođeni transkripcioni faktor E2F takođe pojačava ekspresiju proteina p16INK4a. Pojačana ekspresija proteina p16INK4a može se imunohistohemijski detektovati u diskariotičnim ćelijama epitela grlića materice u cervikalnim razmazima.

Sve ispitanice sa nalazima ASC-US, ASC-H i LSIL kod kojih je detektovana ekspresija p16INK4a proteina u cervikalnom razmazu imale su histološki dokazanu premalignu leziju na cerviksu, pa smatramo da bi upotreba p16INK4a testa u citologiji značajno smanjila procenat lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata i pomogla u interpretaciji ASC-US, ASC-H i LSIL nalaza.

HPV 16 i HPV 18 su najčešće detektovani tipovi visokorizičnih HPV u HSIL lezijama i invazivnim karcinomima anogenitalne regije. U mnogim radovima se ispituje ekspresija p16INK4a proteina kao indikatora infekcije visokorizičnim tipovima HPV. Mi smo pronašli značajno veći intenzitet ekspresije p16INK4a proteina u cervikalnom razmazu kod ispitanica sa pozitivnim HPV 16 nalazom.

U literaturi postoje podaci i o prisustvu p16INK4a proteina u displastičnim ćelijama kod HPV negativnih ćelijskih linija karcinoma grlića materice (C33A). To ukazuje na postojanje HPV nezavisne putanje ekspresije p16INK4a proteina. Iz priloženog možemo zaključiti da negativan p16INK4a nalaz ne znači da žena nije inficirana nekim od HPV virusa. Isto tako ni pozitivan p16INK4a nalaz ne mora da bude povezan sa HPV infekcijom.

ZAKLJUČAK

Naši rezultati istraživanja, kao i podaci iz literature, o dobroj korelaciji stepena ekspresije p16INK4a proteina i težine promene, ukazuju da bi ovaj test u budućnosti mogao ne samo popraviti rezultate citološkog i HPV

skrininga, nego i rezultate u predikciji i prognozi prema-
lignih i malignih oboljenja grlića materice.

LITERATURA

1. Wong YP, Abdul Raub S H, Mohd Dali AZH, Kassim F, Visvalingam V, Zakaria Z, Kamaluddin MA, Noorakmal S. P16INK4a: a potential diagnostic adjunct for prediction of highgrade cervical lesions in liquid-based cytology: with HPV testing and histological correlation. *Malaysian J Pathol*, 2016; 38(2) : 93 - 101
2. Reuschenbach M, Clad A, von Knebel Doeberitz C, Wentzensen N, Rahmsdorf J, Schaffrath F, Griesser H, Freudenberg N, von Knebel Doeberitz M. Performance of p16INK4a-cytology, HPV mRNA, and HPV DNA testing to identify high grade cervical dysplasia in women with abnormal screening results. *Gynecologic Oncology*, 2010; 119: 98-105
3. Qiu-Ping Qiana, Xiaoa Zhangb, Bo Dingc, Shi-Wen Jiangd, Ze-Min Lia, Mu-Lan Renc, Yang Shenc. Performance of P16/Ki67 dual staining in triaging hr-HPV-positive population during cervical Cancer screening in the younger women. *Clinica Chimica Acta*, 2018; 483: 281-285.
4. Vitković L, Mitić B.N, Piperski V, Trajković G, Anđelković Z, Vukićević D, Stević S. Ekspresija proteina p16INK4a u normalnom i displastično promjenjenom epitelu grlića materice. *Praxis medica*, 2011; 39(3-4):13-17.
5. Vitkovic L, Perisic Z, Zamurovic M, Mitic N, Piperski V, Trajkovic G, Cvejic M, Perisic M. p16INK4a as an adjunct test in cervical cytology. *EJGO*, 2015; XXXVI(6):685-689.
6. Dray M, Russel P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G, Leong A, et al. p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix.I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology*, 2005. 37 (2): 112-24.
7. Klaes R., Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* , 2001; 92:276-284.
8. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, et al. P16INK4a expression and progression of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix. *Virchows Arch*, 2004; 445:616-20.
9. Murphy N, Ring M, Killaea AG , Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskariosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and Thin Prep™ smears. *J Clin Pathol*, 2003; 56:53-63.
10. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature*, 2002; 2:342-350.
11. Lambert APF, Anschau F, Schmitt VM. p16INK4a expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Experimental and Molecular Pathology*, 2006; 80: 192-196.
12. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, et al. p16INK4a immunohistochemistry improver interobsver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 2002; 26(11):1389-1399.
13. Bose S, Evans H, Lantzy L, Scharre K, Youssef E. p16INK4a is surrogate biomarker for a subset of human papilloma virus-associated dysplasias of the uterine cervix as determined on the Pap smear. *Diagn Cytopathol*, 2005; 32:21-4.
14. Negri G, Moretto G, Menia E, Vittadello F, Kasal A, Mian C, et al. P16(INK4a) immunocytochemistry in liquid based cervicovaginal specimens with modified Papanicolaou counterstaining. *JClin Pathol* 2006;59:827-30.
15. Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatish AJ. Procedure for immunocytochemical detection of p16INK4a antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol*, 2002; 46:25-9.

FOKALNA NEUROENDOKRINA DIFERENCIJACIJA U KARCINOMU PROSTATE U KORELACIJI SA DRUGIM PARAMETRIMA OD PREDIKTIVNOG ZNAČAJA

AUTORI

Milica Mijović

Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici, Srbija

SAŽETAK

Uvod. Fokalna neuroendokrina diferencijacija (FNED) u karcinomu prostate (KP) predstavlja subpopulaciju pojedinačnih ili zgomilanih ćelija koje pokazuju imunoreaktivnost i imunosenzitivnost pretežno na hromogranin A i serotonin. Prognostički značaj FNED u primarnim netretiranim KP je kontroverzne prirode. Jedino je dobro poznata činjenica da ona predstavlja agresivni subtip, koji obično nastaje iz već postojećeg KP koji nije pokazao nikakav odgovor na hormonsku terapiju (tzv. androgen nezavisni KP).

Cilj. Cilj ovog rada je utvrditi stepen prisustva FNED u KP sa posebnim osvrtom na korelaciju između FNED i parametara od jasnog prediktivnog značaja (Gleason score, ukupni serumski prostata specifični antigen (PSA), tumorski volumen i klinički stadijum).

Metode. Studija je sprovedena na biopsijskom materijalu 70 uzastopnih KP. Kalupi sa najreprezentativnijim uzorcima dijagnostikovanih na rutinskim hematoksilin-eozin preparatima, imunohistochemijski su obojeni na tkivni PSA (za obeležavanje prostatičnih sekretornih ćelija) i hromogranin A, serotonin i sinaptofizin (za obeležavanje NE ćelija).

Rezultati. Veoma izražen stepen FNED nađen je u 16 (22,9%) KP. Među njima, kod 10 (62,5%) je dijagnostikovano Gleason score ≥ 7 . Prosečna vrednost serumskog PSA bila je $32,62 \pm 30,80$ ng/ml, prosečni tumorski volumen bio je $43,18 \pm 31,45$ ml, dok je 6 (37,5%) KP otkriveno u D kliničkom stadijumu sa detektovanim udaljenim hematogenim metastazama. FNED je negativno korelisana sa vrednostima serumskog PSA, Gleason score-om i kliničkim stadijumom i pozitivno korelisana sa tumorskim volumenom, ali bez statistički značajne razlike.

Zaključak. Nema značajne uloge FNED u prognozi karcinoma prostate.

Ključne reči: karcinom prostate, fokalna neuroendokrina diferencijacija, Gleason score, tumorski volumen, klinički stadijum.

ENGLISH

SUMMARY

Introduction. Focal neuroendocrine differentiation (FNED) in prostate cancer (PC) is a sub-population of individual or accumulated cells that exhibit immunoreactivity predominantly on chromogranin A and serotonin. Prognostic significance of FNED in primary untreated PC has controversial nature. The only well-known fact is that it is an aggressive subtype, that evolves from preexisting PC which does not respond to hormone therapy (androgen independent PC).

Aim. The aim of this paper is to determine the degree of FNED in PC with special reference to its relationship with some clear parameters of predictive value (Gleason score, total prostatic specific antigen (PSA) value, tumor volume and tumor stage).

Methods. The study included the biopsy of 70 consecutive untreated PC. A block containing part of the main bulk was chosen as representative based on hematoxylin-eosin appearance, and immunohistochemically stained for tissue PSA (to mark prostatic secretory cells) and chromogranin A, serotonin and synaptophysin (to mark NE cells).

Results. Very pronounced degree of FNED differentiation was found in 16 (22.9%) PC. 10 (62.5%) of them had Gleason score ≥ 7 , average serum PSA value was 32.62 ± 30.80 ng/ml, average tumor volume was 43.18 ± 31.45 ml and 6 (37.5%) of this PC were detected in D clinical stage with hematogenous metastases. FNED is negatively correlated with serum PSA value, Gleason score and clinical stage and positively correlated with tumor volume, but without statistically significant differences.

Conclusion. The FNED has no significant role in the prognosis of PC.

Key words: prostate cancer, focal neuroendocrine differentiation, Gleason score, tumor volume, clinical stage.

UVOD

Karcinom prostate (KP) je drugi po učestalosti maligni epitelni tumor u muškaraca. Može se manifestovati na različite načine - od sporastućeg do tumora sa agresivnim metastazirajućim potencijalom. Najveća incidenca beleži se u Australiji, Novom Zelandu, zapadnoj i severnoj Evropi, što je u skladu sa višedecenijskom standardizovanom obavezom ranog skrininga KP upotrebom serumskog prostata specifičnog antigena (PSA) i biopsije prostate. U Srbiji je karcinom prostate oko 30% češći nego prethodnih deset godina i posle karcinoma pluća i kolona, nalazi se na trećem mestu po učestalosti. To je malignitet muškaraca pretežno starijih od 50 godina. Oko 75% svih karcinoma prostate dijagnostikuje se između 60. i 80. godine života. Svega 1% ovih karcinoma u SAD-u dijagnostikuje se kod muškaraca mlađih od 50 godina. Smatra se da u oko 10% ispitivanih muškaraca oko 50. godine, već počinje da se razvija klinički evidentan karcinom prostate. Ovaj malignitet je peti po učestalosti uzrok smrti među svim karcinomima. Najveći mortalitet zapaža se među crncima. Pojedini epidemiološki podaci ukazuju na to da za nastanak karcinoma prostate postoji i genetska predispozicija. Takođe, gojaznost i prekomerno unošenje masti životinjskog porekla takođe su neki od značajnih faktor rizika u nastanku ovog karcinoma. Mada postoje i teorije o hormonskom okidaču, kao uzroku karcinoma (ne nastaje kod evnuha, a pokazuju i smanjenje ukoliko dođe do androgene ablacije), kao i neke nedovoljno potvrđene o infekcijama (bakterijski prostatitis i neke virusne infekcije izazvane virusom herpesa, humanim

papiloma virusom, citomegalovirusom), kao mogućem uzroku.

Uprkos značajno većoj učestalosti i mnogobrojnim studijama koje se bave ovom problematikom, nema jasne slike ni definitivnih odgovora na pitanja o biologiji KP. I dalje je veoma teško predvideti klinički tok uznapredovalog KP. Zato je neophodno ne samo unaprediti znanje o nastanku i razvoju karcinoma prostate, već i tragati za odgovarajućim biomarkerima neophodnim za planiranje i sprovođenje terapije u optimalnim uslovima.

Za dijagnostiku i određivanje kliničkog stadijuma karcinoma prostate koriste se razne kliničke i patološke metode. Primarni skrining test podrazumeva određivanje vrednosti serumskog PSA i transrektalni digitalni ili ultrazvučni pregled, nakon kojih sledi citološki (nakon biopsije tankom iglom; eng. fine needle biopsy) i histopatološki pregled tkiva (nakon transperinealne i transrektalne biopsije, kao i transureteralne resekcije prostate - TURP). PSA nije specifičan marker, ali u kombinaciji sa digitorektalnim pregledom spada u najznačajnije kliničke markere ranog otkrivanja i dijagnoze KP. Histopatološkim pregledom utvrđuje se tumorski Gleason gradus od koga direktno zavisi prognoza. Osim histološkog gradusa i klinički stadijum karcinoma prostate, takođe, bitno utiče na prognozu i izbor terapije. Razlikuju se 4 stadijuma karcinoma prostate: T1, T2, T3 i T4.

Sa histopatološkog aspekta, na prognozu i izbor terapije utiče i stepen fokalne neuroendokrine diferencijacije (FNED) tumorskih ćelija. Neuroendokrine (NE) ćelije prostate prvi je opisao Pretl 1944. godine. One se nalaze u prostatičnim žlezdama svih anatomskih

zona i čine manje od 1% celokupne ćelijske populacije. Imaju karakteristične lateralne dendritičke produžetke. Gustina NE ćelija u perifernim acinusima prostate najveća je u neonatalnom periodu i posle puberteta i smatra se da je pod direktnim uticajem androgena. Funkcija ovih ćelija nije potpuno razjašnjena, ali se pretpostavlja da imaju značajnu ulogu u endokrinnoj i neuronalnoj regulaciji funkcije patološki nepromenjene prostate. NED se može javiti u tri različite forme u KP: fokalna NED u konvencionalnom adenokarcinomu prostate, karcinoidni tumor (prema SZO dobro diferentovan neuroendokrini tumor) i sitnoćelijski neuroendokrini tumor (prema SZO slabo diferentovan neuroendokrini tumor). Histološke karakteristike NE ćelija u KP identične su sličnim ćelijama druge lokalizacije. Najčešće grade gnezda različite veličine, ali se mogu javiti i u vidu ostrva ili trabekula uglavnom okruglih ćelija sa low grade citološkim karakteristikama i tipičnom „salt and pepper” distribucijom hromatina. NED se nalazi u 30-100% svih KP, ali je prominentna u oko 5-10% njih i to pretežno kao fokalna NED. KP sa NED se od konvencionalnog KP razlikuje po prisustvu NE ćelija koje ne pokazuju ekspresiju generičkih markera prostatičnog karcinoma: tkivni prostata specifični antigen (PSA), prostata specifična kisela fosfataza (PSAP), prostata specifični membranski antigen (PSMA), androgen receptor (AR), P501S, kao i prostata specifični regulatorni gen protein (NKX3.1) (eng. prostate specific androgen regulated homeobox gene protein), ali pokazuju specifičnu ekspresiju neuroendokrinih markera, kao što su hromogranin A, sinaptofizin, CD56 i neuron-specifična enolaza (NSE).

Prognostički značaj FNED u netretiranim KP je kontroverzne prirode. Većina autora smatra da je ona u direktnoj vezi sa slabom diferencijacijom tumora, tj. visokim Gleason score-om i da shodno tome, takvi tumori imaju goru prognozu. To se naročito odnosi na KP koji nisu osetljivi na hormonsku terapiju (tzv. androgen nezavisne karcinome prostate). Međutim, brojne studije ne nalaze nikakvu vezu FNED sa gorom prognozom klinički uznapredovalog KP. Upravo ova nepodudaranja mogu se objasniti nestandardizovanim kohortnim studijama, različitim metodama i drugim neusaglašenim stavovima, kao što su limitiran volumen tkivnog uzorka i neravnomerna distribucija NE ćelija.

Svi prognostički i prediktivni faktori su od strane Koledža patologa Amerike (eng: The College of American Pathologists - CAP) svrstani u tri kategorije: 1. Faktori kategorije I - preoperativna vrednost serumskog prostata specifičnog antigena (PSA), histološki gradus, tj. Gleason score, klinički stadijum i status hirurških margina; 2. Faktori kategorije II - tumorski volumen, histološki tip

i DNK-ploidija; 3. Faktori kategorije III - perineuralna invazija, neuroendokrini diferencijacija, gustina krvne mreže u tumoru, nuklearne karakteristike, proliferativni markeri i molekularni markeri kao što su onkogeni i tumor supresor geni.

CILJ RADA

Osnovni cilj ovog rada je ispitivanje histopatoloških, biohemijskih i kliničkih karakteristika karcinoma prostate (KP), prostatične intraepitelne neoplazije (PIN) i benigne hiperplazije prostate (BHP). Shodno opštem cilju istraživanja izdvojeni su sledeći konkretni ciljevi: utvrditi prisustvo i stepen FNED u KP, PIN i BHP sa posebnim osvrtom na korelaciju između FNED u KP i parametara od jasnog prediktivnog značaja (Gleason score, preoperativne vrednosti ukupnog serumskog prostata specifičnog antigena (PSA), tumorski volumen i klinički stadijum).

MATERIJAL I METODE RADA

U istraživanju je korišćen biopsijski materijal Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Prištini, kao i klinički i biohemijski podaci Klinike za urologiju KBC Priština i Odeljenja za urologiju ZC Kosovska Mitrovica za 70 uzastopnih karcinoma prostate. Kontrolnu grupu činile su biopsije pacijenata sa prostatičnom intraepitelnom neoplazijom (PIN) - 20 i benignom hiperplazijom prostate (BHP) - 10. Materijal za histopatološku analizu dobijen je iglenom biopsijom ili radikalnom prostatektomijom. Histopatološka dijagnoza KP (uključujući i Gleason score), PIN i BHP postavljena je na rutinskim mikroskopskim hematoksilin-eozin (HE) preparatima. U tu svrhu tkivo je fiksirano u 10% formalinu, kalupljeno u parafinskim blokovima, rezano na mikrotomu u više preseka i bojeno metodom hematoksilin-eozin. Gotovi parafinski blokovi sa najreprezentativnijim uzorcima korišćeni su za imunohistohemijska (IHH) bojenja, tj. za analizu nivoa ekspresije tumorskih markera (PSA, hromogranin A, serotonin i sinaptofizin). U tu svrhu korišćena su antitela: za PSA - DAKO Code No A0562, ER-PR8, razblaženje 1:1000, za pozitivnu kontrolu korišćeno tkivo prostate; za hromogranin - DAKO Code No M0869 DAK-A3, razblaženje 1:800, za pozitivnu kontrolu korišćeno tkivo karcinoida; za serotonin - DAKO Code No M0758 5HT-H209, razblaženje 1:20, za pozitivnu kontrolu korišćeno tkivo želuca; za sinaptofizin - DAKO Code No M0776 SY38, razblaženje 1:10, za pozitivnu kontrolu korišćeno tkivo endokrinog pankreasa. Vrednost ekspresije određena je metodom „H skora”, izražena je procentualno na najmanje 100, a optimalno preko

500, preko milimetarske mrežice, izbrojanih tumorskih ćelija, sa konačnim svrstavanjem nivoa ekspresije za PSA (čime je određen stepen egzokrine diferencijacije KP) u 4 grupe: negativna (do 10 % pozitivnih ćelija), slabo+ (10-40 % pozitivnih ćelija), umereno+ (40-90% pozitivnih ćelija) i jako+ (>90 % pozitivnih ćelija). Pozitivnost na neuroendokrine (NE) ćelije određena je na osnovu izbrojanih pozitivnih NE ćelija na 10 polja velikog uvećanja (PVU) - 400x. Na osnovu toga rezultati su svrstani u dve grupe: NE-negativnu - kod koje ne postoje NE pozitivne ćelije ili ih ima <10/10PVU i NE-pozitivnu - kod koje ih ima >10/10PVU. Stepenn neuroendokrine diferencijacije (NED) određen je na osnovu imunoreaktivnosti, pri čemu je NED svrstana u tri grupe: slabo izražena NED - kod koje postoji imunoreaktivnost jednog antitela, umereno izražena NED - kod koje postoji imunoreaktivnost dva antitela i jako izražena NED - kod koje postoji imunoreaktivnost sva tri antitela.

Preoperativne vrednosti ukupnog serumskog PSA određene su metodom Tandem-R. Klinički stadijum KP određen je na osnovu kliničkog pregleda, transrektalnog ultrazvučnog pregleda, radiografskog preleda, kompjuterizovane tomografije i magnetne rezonance. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Prikupljeni podaci su primarno obrađeni deskriptivnim statističkim metodama (apsolutni brojevi, mere centralne tendencije - srednja vrednost, kao i mere varijabiliteta - standardna devijacija), statističkim testiranjem rezultata testovima: Studentov t-test, c^2 (hi-kvadrat), Mann-Whitney, Kruskal Wallis - test, neparametarskom korelacionom analizom i ROC (Receiver Operating Characteristic) analizom. Testiranje značajnosti izvršeno je na nivou verovatnoće $p < 0,05$.

REZULTATI

Pacijenti sa karcinomom prostate u proseku su imali 71,8 \pm 5,48 godina (maks=82 god.; min=58 god.), a slične starosne dobi, u proseku, bili su i pacijenti sa prostatičnom intraepitelnom neoplazijom (69,8 \pm 8,01 godina) (maks=80 god.; min=53 god.), kao i sa benignom hiperplazijom prostate (72,6 \pm 6,13 godina) (maks=86 god.; min=66 god.) (Tabela 1).

Tabela 1. Starosna distribucija osoba sa KP, PIN i BHP.

Dijagnoza	Ukupno	Min	Max	Mean	SD
KP	70	58	82	71.8	5.48
PIN ^c	20	53	80	69.8	8.01
BHP ^c	10	66	86	72.6	6.13

^c - kontrolna grupa; SD - standardna devijacija; KP - karcinom prostate PIN - prostatična intraepitelna neoplazija; BHP - benigna hiperplazija prostate.

Kao jedna od primarnih dijagnostičkih procedura, kod svih ispitivanih netretiranih pacijenata, određena je preoperativna vrednost ukupnog serumskog prostata specifičnog antigena - PSA (ng/ml). Raspodela pacijenata u ispitivanim grupama po intervalnim vrednostima navedenog biohemijskog markera, prikazana je na tabelama 2 i 3. Normalne vrednosti serumskog PSA bile su ≤ 4 ng/ml. Medijana PSA vrednosti bila je: KP - 35,82 ng/ml, PIN - 9,15 ng/ml i BHP - 8,68 ng/ml.

Tabela 2. Preoperativne vrednosti ukupnog serumskog PSA (ng/ml) kod pacijenata sa KP, PIN i BHP.

PSA (ng/ml)	KP† n (%)	PIN ^c n (%)	BHP ^c n (%)
5-10	7 (10,0)	12 (60,0)	7 (70,0)
11-20	10 (14,3)	6 (30,0)	1 (10,0)
21-30	12 (17,1)	2 (10,0)	1 (10,0)
31-40	8 (11,4)	0 (0,0)	1 (10,0)
>40	33 (47,1)	0 (0,0)	0 (0,0)
Ukupno	70 (100,0)	20 (100,0)	10 (100,0)

KP - karcinom prostate PIN - prostatična intraepitelna neoplazija; BHP - benigna hiperplazija prostate; PSA - prostata specifični antigen; ^c - kontrolna grupa; † - statistička značajnost u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,05$).

Distribucija vrednosti serumskog PSA imala je statističku značajnost u grupi KP u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,0001$). Skoro polovina pacijenata sa KP (47,1%) imala je vrednost serumskog PSA >40 ng/ml, što se ne razlikuje značajno u odnosu na vrednosti PSA kod pacijenata u ostalim intervalnim grupama ($t=0,49$; $p=0,314$). Statistički značajna razlika nađena je kod PIN i BHP za intervalne grupe od 5-10 i 11-20 ng/ml ($t=5,96$; $p < 0,001$).

Tabela 3. Karakteristike preoperativnih vrednosti serumskog SA (ng/ml) kod pacijenata sa KP, PIN i BHP.

Dijagnoza	n	Min	Max	Medijana	Percentil 10.	90.
KP	70	6,00	960,40	35,82	10,54	266,97
PIN ^c	20	3,16	27,61	9,15	5,44	20,80
BHP ^c	10	0,80	31,20	8,68	1,05	30,90

KP - karcinom prostate; PIN - prostatična intraepitelna neoplazija; BHP - benigna hiperplazija prostate; PSA - prostata specifični antigen; ^c - kontrolna grupa.

U grupi KP sa veoma izraženom FNED vrednosti serumskog PSA bile su 32,62 \pm 30,80 ng/ml.

Rezultati imunohistohemijskog (IHH) bojenja na tkivni PSA i markere NED diferencijacije: hromogranin A, serotonin i sinaptofizin prikazani su na tabeli 4.

Tabela 4. Imunohistohemijsko (IHH) bojenje u KP, PIN i BHP

Dijagnoza	Imunohistohemijsko bojenje							
	PSA		CgA		Ser		Syn	
	40-90% ^a	>90% ^a	≤10/ ^b 10 VMU	>10/ ^b 10 VMU	≤10/ ^b 10 VMU	>10/ ^b 10 VMU	≤10/ ^b 10 VMU	>10/ ^b 10 VMU
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
KP	16 (22,9)	54 [†] (77,1)	42 (60,0)	28 (40,0)	18 (25,7)	52 [†] (74,3)	31 (44,3)	39 (55,7)
PIN ^c	1 (5,0)	19 [†] (95,0)	11 (55,0)	9 (45,0)	7 (35,0)	13 (65,0)	13 (65,0)	7 (35,0)
BHP ^c	1 (10,0)	9 [†] (90,0)	10 [†] (100,0)	0 (0,0)	9 [†] (90,0)	1 (10,0)	10 [†] (100,0)	0 (0,0)

KP - karcinom prostate PIN - prostatična intraepitelna neoplazija; BHP - benigna hiperplazija prostate; PSA - prostata specifični antigen; ^c - kontrolna grupa; CgA - hromogranin A; Ser - serotonin; Syn - sinaptofizin; + - IHH pozitivne ćelije; ^c - kontrolna grupa; † - statistička značajnost u poređenju sa kontrolnom grupom bez IHH bojenja (p=0,05).

Nađena je statistička značajnost u subgrupi od >90% pozitivnih ćelija u poređenju sa subgrupom od 40-90% pozitivnih ćelija na PSA bojenje u svim ispitivanim grupama (t=4,22; p<0,0001). Takođe, respektabilna incidenca od 40-90% pozitivnih PSA ćelija u grupi KP nađena je u skoro 23% slučajeva, ali bez statistički značajne razlike (x²=3,804; p=0,149).

Imunohistohemijsko bojenje na hromogranin A pokazalo je statistički značajnu razliku između subgrupa sa KP, PIN i BHP (x²=6,625; p=0,035) sa značajnim osvrtnom na prisustvo ≤10 pozitivnih ćelija na 10 VMU u svim BHP slučajevima. Nađena je respektabilna incidenca ovih ćelija kod KP u 60% i kod PIN u 55% slučajeva, ali bez statistički značajne razlike (Mann-Whitney U=78,00; p=0,690). Takođe, nije nađena ni statistički značajna razlika u grupi KP na osnovu prisustva ≤10 pozitivnih ćelija u poređenju sa >10 pozitivnih ćelija po 10 polja velikog mikroskopskog uvećanja (VMU) (t=1,96; p=0,05), kao ni u grupi sa PIN promenama (t=0,45; p=0,32).

Imunohistohemijsko bojenje na serotonin pokazalo je statistički značajnu razliku između KP, PIN i BHP (x²=15,964; p=0,002) uzimajući u obzir prisustvo ≤10 pozitivnih ćelija na 10 polja VMU u 90% slučajeva BHP. Sa respektabilnom incidencom ove ćelije su nađene u KP u 25,7% i PIN u 35% slučajeva, ali bez statistički značajne razlike (Mann-Whitney U=635,000; p=0,690). Statistički značajna razlika nije nađena u grupi PIN na osnovu prisustva ≤10 pozitivnih ćelija u poređenju sa >10 pozitivnih ćelija po 10 polja VMU (t=1,40; p=0,08). Sa statistički značajnom razlikom nađeno je prisustvo >10 pozitivnih ćelija u poređenju sa ≤10 pozitivnih ćelija po 10 polja VMU u KP grupi (t=4,65; p<0,001) i grupi sa BHP (t=4,22; p<0,0001). U poređenju sa hromograninom A postoji statistički značajna razlika u slučajevima sa 10 pozitivnih ćelija po 10 polja VMU u odnosu na IHH bojenje na serotonin, što direktno sugeriše da se u ovoj studiji serotonin pokazao kao bolji marker neuroendokrine diferencijacije (t=3,02; p=0,001).

Testiranje razlika u distribuciji stepena imunohistohemijskog bojenja na sinaptofizin pokazalo je stati-

tički značajnu razliku između KP, PIN i BHP (x²=12,031; p=0,002) uzimajući u obzir prisustvo ≤10 pozitivnih ćelija po 10 polja VMU u svim slučajevima BHP. Statistički značajna razlika nije nađena u prisustvu >10 pozitivnih ćelija po 10 polja VMU u KP grupi (t=0,96; p=0,17) i PIN grupi (t=1,40; p=0,08) u poređenju sa ≤10 pozitivnih ćelija po 10 polja VMU.

U cilju utvrđivanja komparabilnih kvalitativnih karakteristika svakog primenjenog markera NED u dijagnozi KP i PIN određene su vrednosti njihovih parametara (Tabela 5).

Tabela 5. Performanse markera neuroendokrine diferencijacije (NED).

Markeri NED	Karcinom prostate					Prostatična intraepitelna neoplazija				
	SE	SP	OR	PPV	NPV	SE	SP	OR	PPV	NPV
Chromogranin A	40,0%	70,0%	1,55	75,7%	33,3%	45,0%	65,0%	1,52	24,3%	82,5%
Serotonin	74,3%	53,3%	3,30	78,8%	53,5%	65,0%	33,8%	0,95	19,7%	79,4%
Synaptophysin	55,7%	76,7%	4,13	84,8%	42,6%	35,0%	51,2%	0,57	15,2%	75,9%

SE - senzitivnost; SP - specifičnost; OR - odd ratio; PPV- pozitivna prediktivna vrednost; NPV- negativna prediktivna vrednost.

Bolje dijagnostičke performanse za fokalnu NED pokazali su serotonin (OR = 3,30) i sinaptofizin (OR = 4,13) za KP, a hromogranin A (OR = 1,52) za PIN. Takođe, dodatna ROC analiza pokazala je da se kao najbolji NED dijagnostički marker pokazao sinaptofizin za KP i to na osnovu najveće površine ispod ROC (AUC=0,662; p=0,011) u poređenju sa serotoninom (AUC=0,638; p=0,029) i hromograninom A (AUC=0,550; p=0,430) (Tabela 6).

Tabela 6. Performanse NED markera i stepena fokalne NED kod KP.

Parametar	AUC	p	SE	SP
Chromogranin A	0,550	0,430	40,0%	70,0%
Serotonin	0,638	0,029 [†]	74,3%	53,3%
Synaptophysin	0,662	0,011 [†]	55,7%	76,7%
Stepen FNED	0,644	0,023 [†]	62,9%	66,7%

SE - senzitivnost; SP - specifičnost; AUC - area under curve; † - statistička značajnost (p<0,05).

U sklopu daljeg ispitivanja i razumevanja neuroendokrine diferencijacije, određen je i stepen fokalne NED prema pokazanoj jakoj reakciji imunohistohemijskog bojenja NE ćelija od najmanje 10 pozitivnih ćelija na 10 polja VMU. Stepen fokalne NED je u zavisnosti od toga da li su NE ćelije pokazale imunoreaktivnost samo na jedan, dva ili na sva tri primenjena markera podeljen na nizak, umeren i veoma izražen (Tabela 7).

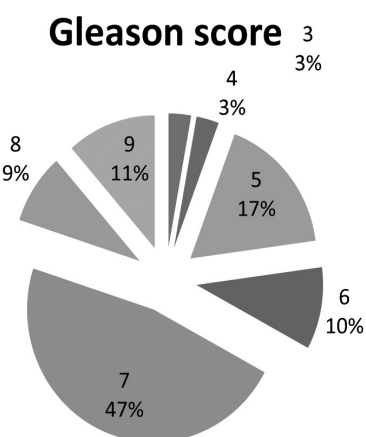
Tabela 7. Stepen fokalne neuroendokrine diferencijacije.

Stepen fokalne neuroendokrine diferencijacije	KP	PIN ^c	BHP ^c
	n (%)	n (%)	n (%)
nizak	26 (37,1)	10 (50,0)	10 [†] (100,0)
umeren	28 (40,0)	6 (30,0)	0 (0,0)
veoma izražen	16 (22,9)	4 (20,0)	0 (0,0)
Ukupno	70 (100,0)	20 (100,0)	10 (100,0)

KP - karcinom prostate PIN - prostatična intraepitelna neoplazija; BHP - benigna hiperplazija prostate; c - kontrolna grupa; † - statistička značajnost (p=0,05).

Nađena je statistički značajna razlika između BHP u poređenju sa KP i PIN u odnosu na nizak stepen fokalne NED u svim slučajevima ($p=0,002$). Nije bilo statistički značajne razlike između KP i PIN grupe (Mann-Whitney $U=618,000$; $p=0,394$), kao ni u subgroupama unutar KP ($t=1,15$; $p=0,12$), kao ni unutar PIN ($t=0,78$; $p=0,20$).

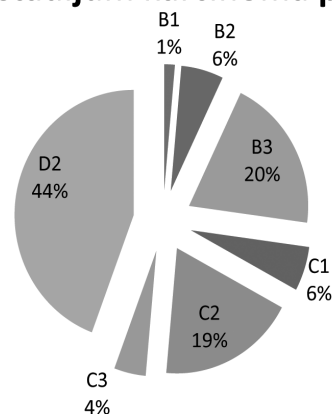
U karcinomu prostate je u okviru određivanja obaveznih parametara, determinisan i Gleason score (GS) kao zbir primarnog i sekundarnog Gleason gradusa. Dobijeni rezultati prikazani su na grafikonu 1. U skoro polovini slučajeva - 33 (47,1%) svih 70 KP nađen je GS 7 sa statistički značajnom razlikom u poređenju sa drugim Gleason score-ovima ($t=3,38$; $p=0,03$). U istoj grupi pacijenata veoma izražena fokalna NED nađena je kod Gleason score-a ≥ 7 u 10 (62,5%) svih slučajeva.



Grafikon 1. Gleason score (3-9) u karcinomu prostate.

Najčešći klinički stadijum u kome je postavljena dijagnoza KP nađen u ovoj studiji je D2 - 31 (44,3%) bez statistički značajne razlike unutar samih podgrupa ($t=1,89$; $p=0,058$) (Grafikon 2). U istoj grupi pacijenata veoma izražena fokalna NED u D2 kliničkom stadijumu nađena je u 6 (37,5%) slučajeva.

Klinički stadijum karcinoma prostate



Grafikon 2. Klinički stadijum karcinoma prostate.

Prosečan volumen svih karcinoma prostate bio je 47,3±30,39 ml (max=183 ml; min=10 ml). Većina KP (51,4%) imao je volumen u intervalu od 21-40 ml ($t=3,81$; $p<0,001$). Dodatne analize pokazale su da je veoma izražena fokalna NED nađena kod KP prosečnog volumena 43,18±31,45 ml.

Rezultati korelacione analize svih ispitanih parametara prikazani su na tabeli 8. Fokalna neuroendokrinih diferencijacija je negativno korelisana sa preoperativnim vrednostima serumskog PSA, Gleason score-om i kliničkim stadijumom i pozitivno korelisana sa tumorskim volumenom, ali bez statistički značajne razlike.

Tabela 8. Korelaciona matrica neuroendokrine diferencijacije i drugih parametara u pacijenata sa karcinomom prostate.

Parameter	Stepen NED	PSA IHH bojenje	Gleason score	Serumski PSA	Tumorski volumen	Klinički stadijum
Stepen NED	cc 1,000	0,126	-0,181	-0,197	0,083	-0,058
	p	0,298	0,135	0,102	0,494	0,636
PSA IHH bojenje	cc 0,126	1,000	-0,017	0,083	-0,101	-0,132
	p	0,298	0,889	0,493	0,405	0,275
Gleason score	cc -0,181	0,298	1,000	0,423**	0,195	0,317**
	p	0,135	-0,017	0,000	0,105	0,007
Serumski PSA	cc -0,197	0,083	0,423**	1,000	0,284*	0,334
	p	0,102	0,493	0,000	0,017	0,002
Tumorski volumen	cc 0,083	-0,101	0,195	0,284	1,000	0,152
	p	0,494	0,405	0,105	0,017	0,210
Klinički stadijum	cc -0,058	-0,132	0,317**	0,334	0,152	1,000
	p	0,636	0,275	0,007	0,002	0,210

cc - Spearman-ov koeficijent korelacije; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ - značajan cc.

DISKUSIJA

NED nalazi se u gotovo svim KP, ali je značajno prisutna u oko 5-10% svih njih. Može se javiti u pojedinačnim ili zgomilanim tumorskim ćelijama. Najveći broj ćelija je pozitivan na hromogranin A, dok je manji broj ćelija pozitivan na serotonin. Subpopulacija tumorskih ćelija može pokazivati imunoreaktivnost i imunosenzitivnost i na neuron-specifičnu enolazu, sinaptofizin, bombesin i VEGF (vaskularni endotelni faktor rasta; eng. vascular endothelial growth factor). Značaj prisustva svih drugih neuroendokrinih elemenata, osim hromogranina A i serotonina, još uvek čeka na svoj definitivan stav. Različite studije daju kontroverzne podatke u vezi androgen nezavisnih tumora i pojave izraženije fokalne NED. Prognostički značaj fokalne NED u primarnim netretiranim KP je diskutabilan. Neki autori smatraju da ona ima negativan efekat na prognozu bolesti, dok pojedini autori navode da ne nalaze vezu između fokalne NED i prognoze bolesti. U uznapredovalom KP, naročito u androgen nezavisnim, fokalna NED je u direktnoj vezi sa lošom prognozom. U ovom istraživanju za procenu prisustva fokalne NED korišćena su antitela na hromogranin A, serotonin i sinaptofizin, i primenjena su kako na KP, tako i na PIN i BHP. Većina KP pokazala

je imunoreaktivnost na serotonin u 52 (74,3%) ($t=4,65$; $p<0,001$). Nije bilo statistički značajne razlike kada su primenjeni hromogranin A (za 28 (40,0%) slučajeva; $t=1,96$; $p=0,05$) i sinaptofizin (za 39 (55,7%) slučajeva; $t=0,96$; $p=0,17$). Dobijeni podaci nisu u skladu sa podacima drugih autora, kod kojih većina KP pokazuje imunoreaktivnost na hromogranin A. U većini PIN slučajeva nađena je dominantna imunoreaktivnost na hromogranin A (11 (55,0%) slučajeva; $t=0,45$; $p=0,32$) i sinaptofizin (13 (65,0%) slučajeva; $t=1,40$; $p=0,08$). Samo je IHH bojenje na serotonin pokazalo pozitivnost u većini slučajeva (52 (74,3%); $t=4,65$; $p<0,001$). U svim slučajevima BHP nađena je imunoreaktivnost na hromogranin A i sinaptofizin, kao i u 9 (90,0%) slučajeva kada je primenjeno IHH bojenje na serotonin ($t=4,22$; $p<0,0001$). Postoji statistički značajna razlika u imunoreaktivnosti na sve markere NED u KP u poređenju sa kontrolnim grupama: za hromogranin A ($x_2=6,625$; $p=0,035$), serotonin ($x_2=15,964$; $p=0,002$) i sinaptofizin ($x_2=12,031$; $p=0,002$). Na osnovu iznetog, jasno je da se serotonin izdvojio kao najbolji marker neuroendokrine diferencijacije ($t=3,02$; $p=0,001$). Rezultati ovog istraživanja pokazala su da je u dijagnostici fokalne NED u KP, hromogranin A imunohistohemijski marker neuroendokrine diferencijacije sa senzitivnošću od 40% i specifičnošću od 70% (OR =1,55) (OR - odd ratio, odnos šansi). Mnogo bolje performanse pokazuju serotonin (sa senzitivnošću od 74,3% i specifičnošću od 53,3%, (OR =3,30)) i sinaptofizin (sa senzitivnošću od 55,7% i specifičnošću od 76,7%, (OR =4,13)). Može se zaključiti da je sinaptofizin najosteljiviji IHH marker za dijagnostikovanje fokalne NED u KP. U cilju boljeg razumevanja osobina svakog od primenjenih markera NED u dijagnostici KP i PIN određen je i stepen izraženosti fokalne NED i podeljen u tri grupe: 1. slabo izražena fokalna NED (kada postoji imunoreaktivnost od preko 10 ćelija/10 polja VMU samo na jedan od markera NED), 2. umereno izražena fokalna NED (kada postoji imunoreaktivnost od preko 10 ćelija/10 polja VMU na dva markera neuroendokrine diferencijacije) i 3. jako izražena fokalna NED (kada postoji imunoreaktivnost od preko 10 ćelija/10 polja VMU na sva tri markera NED). Fokalna NED u KP bila je slabo izražena u 26 (37,1%) slučajeva, umereno izražena u 28 (40%) slučajeva i jako izražena u 16 (22,9%) slučajeva, bez statistički značajne razlike ($t=1,15$; $p=0,12$). Fokalna NED u PIN bila je slabo izražena u 10 (50,0%) slučajeva, umereno izražena u 6 (30%) slučajeva i jako izražena u 4 (20,0%) slučaja, bez statistički značajne razlike ($t=0,78$; $p=0,20$). Fokalna NED u BHP bila je slabo izražena u svim slučajevima, što je u skladu sa podacima iz literature. Raspodela stepena NED prema ispitivanim grupama pokazuje sli-

čne karakteristike kao i svaki pojedinačni, prethodno razmatrani marker, jer ovaj stepen je i određen kao zbirni rezultat svakog od njih. Razlika u raspodelama stepena NED postoji jedino u odnosu na BHP ($p=0,002$). Sa 100% verovatnoće kod BHP NED je slabo izražena. Grupe sa KP i PIN ne razlikuju se u odnosu na raspodelu stepena NED, kada se on odredi uz primenu prethodno definisanih markera ($U=618,000$; $p=0,394$). U grupi sa PIN u oko 50% NED je umereno ili jako izražena a u slučajevima sa KP je u preko 60% umereno ili jako izražena.

Kliničkim i ultrazvučnim pregledom kod svih pacijenata sa KP određen je i klinički stadijum. U ovom istraživanju klinički stadijum bio je označen prema abecednoj klasifikaciji, u skladu sa kojom se karcinom prostate deli u četiri stadijuma: A (prema TNM klasifikaciji odgovara primarnom tumoru T1), B (prema TNM klasifikaciji odgovara primarnom tumoru T2), C (prema TNM klasifikaciji odgovara primarnom tumoru T3) i D (prema TNM klasifikaciji odgovara primarnom tumoru T4), koji se dele u podstadijume. Najveći broj ovog maligniteta - 31 (44,29%), dijagnostikovao u stadijumu D i to svi slučajevi u stadijumu D2, sa verifikovanim udaljenim hematogenim metastazama najčešće u predelu kičme i rebara (u preko 75% ispitivanih pacijenata u ovom stadijumu). Zatim sledi po učestalosti pojave klinički stadijum B (podrazumeva intraprostatični karcinom bez proboja kapsule), koji je dijagnostikovao kod 19 (27,14%) pacijenata. U toj grupi najčešće je dijagnostikovao stadijum B3 - u 14 pacijenata, tj. u 20,0% od ukupnog broja pacijenata, odnosno 73,68% pacijenata ako se uzme u obzir samo stadijum B. KP u stadijumu C (kod koga postoji bilateralni proboj kapsule, sa ili bez zahvatanja semenih vezikula) dijagnostikovao je u 20 (28,57%) pacijenata. U toj grupi najčešće je dijagnostikovao klinički stadijum C2, i to u 13 pacijenata, tj. u 18,57% od ukupnog broja pacijenata, odnosno 65% pacijenata ako se uzme u obzir samo stadijum C. KP u stadijumu D, odnosno kada su pacijenti već imali udaljene hematogene metastaze, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na druge kliničke stadijume ($t=1,89$; $r=0,058$). Ostali stadijumi karcinoma zastupljeni su sa znatno manjom verovatnoćom (1,43%-5,71%). Dobijeni podaci u mnogome jesu razočaravajući jer se većina ispitivanih pacijenata lekaru javila u trenutku postojanja udaljenih hematogenih metastaza, kada su mogućnosti da do izlečenja dođe skoro nikakve. U zemljama sa razvijenim skriningom, ovakvi slučajevi postali su retkost, jer se karcinom prostate najčešće otkriva još u stadijumu A ili B. Ovo je samo još jedan u nizu dokaza da treba uložiti mnogo veći trud kada je u pitanju zdravstvena

prosvেćenost muškaraca, naročito posle 50. godine života, kao i potrebu za ranim skriningom, kada je ovaj malignitet u pitanju, jer različiti klinički stadijumi KP nose različit rizik za progresiju bolesti.

Određivanje stepena diferencijacije KP predstavlja „disciplinu interpretacije“ koja, kroz procene patologa daje prognostičku informaciju. Histološki gradus, kao značajan pokazatelj preživljavanja bolesnika, primenjuje se kao primarni faktor u gotovo svim postojećim algoritmima. U današnje vreme najširu primenu ima Gleason sistem. Zbir dve histološke slike tumorskog rasta, označene kao prva dominantna i druga dominantna, kreće se od 2 do 10 i predstavlja zbirni Gleason gradus ili Gleason score (GS). U ovom istraživanju je najčešće dijagnostikovani KP GS 7, i to kod skoro jedne polovine, tj. 33 ili 47,14% pacijenata, što je u saglasnosti sa nalazima drugih autora. Najređe je dijagnostikovani KP GS 3 i 4, i to u po 2 (2,86%) slučaja, što je, takođe, u skladu sa podacima iz literature, prema kojima se smatra nepreporučljivim postavljanje dijagnoze KP GS 2-4 na iglenim biopsijama prostate. Ultrazvučnim pregledom određen je i volumen tumora (izražen u ml) kod KP. U ovom istraživanju prosečan volumen KP bio je $47,29 \pm 30,39$ ml (maks=183 ml; min=10 ml), što je u saglasnosti sa nalazima drugih autora. Prema podacima iz literature (grupe iz Stanforda) za tumor zapremine 0,5 ml potrebno je 12 godina da dostigne zapreminu od 4 ml, kada postaje sposoban za metastatsko širenje. U principu, što je tumor u trenutku dijagnoze veći, većeg volumena, to je njegov dalji razvoj brži. Kod većine pacijenata u ovom istraživanju (51,4%) KP bio je u intervalu veličine 21-40 ml, sa statistički značajnom razlikom u odnosu na druge intervalne veličine ($t=3,81$; $r < 0,001$).

Primenom neparametarske korelacione analize utvrđeno je postoji statistički značajna pozitivna zavisnost definisana dobrim koeficijentom korelacije između preoperativnih koncentracija PSA i Gleason skor-a (0,423). Dobijeni rezultati nisu u saglasnosti sa nalazima drugih autora, prema kojima je produkcija PSA smanjena kod KP čije ćelije pokazuju veću dediferencijaciju, tj. kod onih tumora koji imaju veći maligni potencijal, odnosno veći Gleason score. Većina autora govori o dobroj pozitivnoj korelaciji vrednosti serumskog PSA sa GS, kliničkim stadijumom i tumorskim volumenom. Neki autori navode PSAD (PSA gustina; eng.: PSA density-PSAD) i PSAV (PSA brzina; eng.: PSA velocity, PSAV) kao bolje prognostičke parametre od samih vrednosti serumskog PSA. Volumen tumora i preoperativna koncentracija PSA nalaze se u zadovoljavajućoj pozitivnoj korelativnoj vezi, što znači da višim preoperativnim koncentracijam PSA odgovaraju veći volumeni tumora. ($kk=0,284$,

$r < 0,05$), što je u saglasnosti sa podacima iz literature. Klinički stadijum je u dobroj pozitivnoj korelativnoj vezi ($kk=0,254$ do $0,334$) sa više parametara. Pre svega sa preoperativnim vrednostima serumskog PSA, što je u saglasnosti sa podacima iz literature; Gleason score-om, što je u saglasnosti sa podacima iz literature. Korelaciona analiza u okviru parametara NED pokazuje da je najveći broj ćelija pokazao pozitivnost na sinaptofizin, sa kojim je ovaj stepen značajno i visoko povezan ($kk=0,751$). To navodi na činjenicu da se u ovom istraživanju sinaptofizin pokazao kao najosetljiviji marker fokalne neuroendokrine diferencijacije. Većina autora u svojim istraživanjima kao najosetljiviji marker fokalne neuroendokrine diferencijacije, navodi hromogranin A. Posle sinaptofizina, na osnovu pokazane osetljivosti, kao markeri fokalne NED slede hromogranin A i serotonin, koji, takođe, umerenim i visokim koeficijentima korelacije ($0,677$ i $0,545$) govore u prilog fokalne NED. Međusobno su dobro povezani, na statistički značajnom nivou $r < 0,05$, rezultati nalaza nivoa ekspresije imunoreaktivnosti na serotonin i sinaptofizin ($kk=0,331$), što ukazuje na potrebu kombinovanja najmanje dva, a najoptimalnije tri markera fokalne neuroendokrine diferencijacije. Svi rezultati ekspresije markera NED nalaze se u negativnoj korelaciji sa vrednostima GS, međutim jedino je statistički značajna međusobna uslovljenost markera sinaptofizina i Gleason score-a ($kk=-0,280$). To znači da nižim vrednostima GS odgovara veći broj pozitivnih ćelija na sinaptofizin. Ovi rezultati nisu u skladu sa podacima iz literature, prema kojima se fokalna NED nalazi u dobroj pozitivnoj korelaciji sa GS. Isti autori navode i da fokalna NED ne korelira sa kliničkim stadijumom, što je potvrđeno i u ovom istraživanju, ali bez statistički značajne razlike ($kk=-0,058$).

ZAKLJUČAK

Najveći broj KP (77,1%) i skoro svi slučajevi PIN (95%) i BHP (90%) pokazuju jaku ekspresiju tkivnog PSA, što je potvrda važne uloge ovog IHH markera u dijagnozi karcinoma prostate, ali i diferencijalnoj dijagnozi metastatskih karcinoma nepoznatog porekla. KP i PIN pokazuju jaku imunoreaktivnost na hromogranin A, sinaptofizin i serotonin, kao markere NED diferencijacije. Za razliku od njih, BHP pokazuje znatno manju osetljivost na ove markere. Serotonin i sinaptofizin su se pokazali kao najsenzitivniji NED markeri u KP. Veoma izražen stepen NED je dijagnostikovani u 16% KP i 4% PIN. Nije nađena značajna korelacija između stepena NED sa jedne strane i preoperativnih vrednosti serumskog PSA, Gleason score-a i kliničkog stadijuma, sa druge strane.

Na osnovu svega iznetog, kao glavni zaključak izdvaja se činjenica da fokalna NED nema naročitu ulogu u prognozi karcinoma prostate.

LITERATURA

1. Tarján M. Prognostic significance of focal neuroendocrine differentiation in prostate cancer: Cases with autopsy-verified cause of death. *Indian J Urol.* 2010; Jan-Mar; 26(1): 41-45.
2. Vashchenko N, Abrahamsson PA. Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer: Implications for New Treatment Modalities. *European Urology* 2005; 47(2): 147-155.
3. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, et al. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(8): 529-34.
4. Parker C, Gillessen S, Heidenreich A, Horwich A. ESMO Guidelines Committee. Cancer of the prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015; 26 (5): 69-77.
5. Egevard L. Reproducibility of Gleason grading of prostate cancers can be improved by the use of reference images. *Urology.* 2001; 57: 291-5.
6. Amin M, Boccon-Gibod L, Egevard L, Epstein JI, Humphrey PA, Mikuz G, et al. Prognostic and predictive factors and reporting of prostate carcinoma in prostate needle biopsy specimens. *Scand. J Urol Nephrol Suppl.* 2005; 216: 20-33.
7. Tarjan M, Tot T. Prediction of extracapsular extension of prostate cancer based on systematic core biopsies. *Scand. J Urol Nephrol.* 2006; 40: 459-64.
8. Parimi V, Goyal R, Poropatich K and Yang X J. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review. *Am J Clin Exp Urol.* 2014; 2(4): 273-285.
9. Cerović S, Brajušković G, Maletić-Vukotić V, Mičić S. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Vojnosanitetski preglad* 2004; 61 (5), 513-518 (Serbian).
10. Wang W, Epstein JI. Small cell carcinoma of the prostate. A morphologic and immunohistochemical study of 95 cases. *Am J Surg Pathol.* 2008; 32: 65-71.
11. Beltran H et al. Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. *Cancer Discov.* 2011; 1: 487-495.
12. Vamsi P. et al. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review. *Am J Clin Exp Urol.* 2014; 2(4): 273-285.
13. Abrahamsson PA, Falkner S, Falt K, Grimelius L. The course of neuroendocrine differentiation in prostatic carcinomas: an immunohistochemical study testing chromogranin A as an 'endocrinemarker'. *Pathol Res Pract* 1989; 185:3 73-80.
14. Noordzij MA, van der Kwast TH, Steenbrugge GJ, Hop WJC, Schroder FH. The prognostic influence of neuroendocrine cells in prostate cancer: results of a long-term follow-up study with patients treated by radical prostatectomy. *Int J Cancer* 1995; 62: 252-258.
15. Cohen MK, Arber DA, Coffield S, Keegan GT, McClintock J, Speights VO. Neuroendocrine differentiation in prostatic adenocarcinoma and its relationship to tumor progression. *Cancer* 1994; 74: 1899-1903.
16. Yamada Y, Nakamura K, Aoki S, Taki T, Naruse K, Matsubara H, et al. An immunohistochemical study of chromogranin A and human epidermal growth factor-2 expression using initial prostate biopsy specimens from patients with bone metastatic prostate cancer. *BJU Int.* 2007; 99: 189-95.
17. Kretschmer A, Wittekind C, Stief CG, Gratzke C. Neuroendocrine prostate cancer. *Urologe A.* 2015; 54(12): 1779-83.
18. Amorino GP, Parsons SJ. Neuroendocrine Cells in Prostate Cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2004; 14(4): 287-300.
19. Bonkhoff H. Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status. *Ann Oncol* 2001; 12(2): 141-144.
20. Hammad A, Farhat A, Nuzhat F, Mohammad I and Shahid P. Correlation of three immunohistochemically detected markers of neuroendocrine differentiation with clinical predictors of disease progression in prostate cancer. *BMC Urol.* 2008; 8: 21.
21. Polascik T.J. Imaging and focal therapy of early prostate cancer. *Current clinical urology.* Springer Science & Business Media, LLC. 2012; p. 76.
22. Ather MH, Abbas F, Faruqui N, Israr M, Pervez S. Expression of pS2 in prostate cancer correlates with grade and Chromogranin A expression but not with stage. *BMC Urol* 2004; 4 (1): 23. Deftos LJ, Nakada S, Burton DW, di Sant'Agnese

- PA, Cockett AT, Abrahamsson PA. Immunoassay and immunohistology studies of chromogranin A as a neuroendocrine marker in patients with carcinoma of the prostate. *Urology* 1996; 48(1): 58-62.
24. Ishida E, Nakamura M, Shimada K, Tasaki M, Konishi N. Immunohistochemical Analysis of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer. *Pathobiology* 2009; 76: 30-38.
25. Tae Jin Kim et al. Comparison of Localized High Volume Tumor and Locally Advanced Low Volume Tumor after Radical Prostatectomy according to Risk Classification. *Korean J Urol Oncol* 2016;14(3):165-171.



CombiNERV®

INOVATIVNA ČETVOROSTRUKA KOMBINACIJA
ZA POBOLJANJE NERVNE FUNKCIJE
I PODRUKU TERAPIJI NEUROPATSKOG BOLA



Synosteo®

JEDINSTVENA KOMBINACIJA
KALCIJUMA, VITAMINA D3 I VITAMINA K2
U FORMI UMEĆEĆ PRAKA ZA ZDRAVLJE KOSTIJU



Selitop®

INOVATIVNA ORODISPERZIBILNA,
ORGANSKA FORMULA L-SELENMETIONINA
VISOKE APSORPTIVNOSTI



Neuronal®

RAPIDNO OBNAVLJA OTEČENE NERVE
NOVI PRISTUP U TERAPIJI
KOMPRESIVNIH NEUROPATIJA



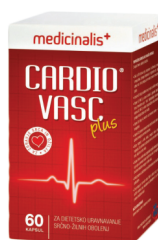
ARTHRONAL®

IZBALANSIRANA KOMBINACIJA 11 AKTIVNIH SASTOJAKA
ZA REGENERACIJU HRŠKAVICE
I BOLJU POKRETLJIVOST ZGLOBOVA



New Iron®

SUPERIORNA FORMULA
(GVOŽĐE-BISGLICINAT, FOLNA KISELINA, VITAMIN B12, VITAMIN C)
NADOKNADA GVOŽĐA BEZ OSEĆAJA MUČNINE



CARDIO VASC^{plus}

JEDINSTVENA FORMULA 10 AKTIVNIH SASTOJAKA
ZA TRETMAN KARDIOVASKULARNIH
I CEREBROVASKULARNIH OBOLJENJA



NATRIJUM-HIJALURONAT 40mg, MANITOL 10 mg



NATRIJUM-HIJALURONAT 60mg, HONDROITIN SULFAT 90 mg



NATRIJUM- HIJALURONAT 25 mg



VEMAX
PHARMA
www.vemaxpharma.rs

medicinalis⁺

45 GODINA ČASOPISA PRAXIS MEDICA

