

ВОЈНОСАНИТЕТСКИ ПРЕГЛЕД



Часопис лекара и фармацеутика Војске Србије

Military Medical and Pharmaceutical Journal of Serbia

Vojnosanitetski pregled

Vojnosanit Pregl 2011; Jun Vol. 68 (No. 6): p. 467-534.



VOJNOSANITETSKI PREGLED

Prvi broj *Vojnosanitetskog pregleda* izašao je septembra meseca 1944. godine

Časopis nastavlja tradiciju *Vojno-sanitetskog glasnika*, koji je izlazio od 1930. do 1941. godine

IZDAVAČ

Uprava za vojno zdravstvo MO Srbije

IZDAVAČKI SAVET

prof. dr sc. pharm. **Mirjana Antunović**
prof. dr sc. med. **Nikola Filipović**, puk.
prof. dr sc. med. **Branko Gligić**, puk.
prof. dr sc. med. **Miodrag Jevtić**, general-major
dr **Mladen Milivojević**, puk.
prim. dr **Milorad Rabrenović**, puk.
prof. dr sc. med. **Nebojša Stanković**, puk.
doc. dr **Veljko Todorović**, brigadni general (predsednik)
prof. dr sc. med. **Mirjana Životić-Vanović**

MEĐUNARODNI UREĐIVAČKI ODBOR

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

UREĐIVAČKI ODBOR

Glavni i odgovorni urednik
prof. dr sc. pharm. **Silva Dobrić**

Urednici:

prof. dr sc. med. **Bela Balint**
prof. dr sc. stom. **Zlata Brkić**
prof. dr sc. med. **Snežana Cerović**
akademik **Miodrag Čolić**, puk.
akademik **Radoje Čolović**
prof. dr sc. med. **Aleksandar Đurović**, puk.
doc. dr sc. med. **Branka Đurović**
prof. dr sc. med. **Borisav Janković**
doc. dr sc. med. **Lidija Kandolf-Sekulović**
akademik **Vladimir Kanjuh**
akademik **Vladimir Kostić**
prof. dr sc. med. **Zvonko Magić**
prof. dr sc. med. **Đoko Maksić**, puk.
doc. dr sc. med. **Gordana Mandić-Gajić**
prof. dr sc. med. **Dragan Mikić**, puk.
prof. dr sc. med. **Darko Mirković**
doc. dr sc. med. **Slobodan Obradović**, major
akademik **Miodrag Ostojić**
prof. dr sc. med. **Predrag Peško**, FACS
akademik **Đorđe Radak**
prof. dr sc. med. **Ranko Raičević**, puk.
prof. dr sc. med. **Predrag Romić**, puk.
prof. dr sc. med. **Vojkan Stanić**, puk.
doc. dr sc. med. **Dara Stefanović**
prof. dr sc. med. **Dušan Stefanović**, puk.
prof. dr sc. med. **Vesna Šuljagić**
prof. dr sc. stom. **Ljubomir Todorović**
prof. dr sc. med. **Milan Višnjijć**
prof. dr sc. med. **Slavica Vučinić**



Tehnički sekretar uređivačkog odbora
dr Maja Marković

REDAKCIJA

mr sc. med. dr Sonja Andrić-Krivokuća, dr sc. Aleksandra Gogić, dr Snežana Janković, dr Maja Marković

Tehnički urednik: Milan Perovanović

Redaktor za srpski i engleski jezik:

Dragana Mučibabić, prof.

Korektor: Ljiljana Nikolić, Brana Savić

Kompjutersko-grafička obrada:

Svetlana Stajić, Vesna Totić, Jelena Vasilj

Adresa redakcije: Vojnomedicinska akademija, Institut za naučne informacije, Crnotravska 17, poštanski fah 33–55, 11040 Beograd, Srbija. Telefoni: glavni i odgovorni urednik 3609 311, tehnički sekretar 3608 943, redakcija 3609 479 i 3609 179, pretplata 3608 997. Faks 2669 689. E-mail (redakcija): vsp@vma.mod.gov.rs i vmavsp@hotmail.com.

Radove objavljene u „Vojnosanitetskom pregledu“ indeksiraju: Science Citation Index Expanded (SCIE), Journal Citation Reports/Science Edition, Index Medicus (Medline), Excerpta Medica (EMBASE), EBSCO, Biomedicina Serbica. Sadržaje objavljuju *Giornale di Medicina Militare* i *Revista de Medicina Militara*. Prikaze originalnih radova i izvoda iz sadržaja objavljuje *International Review of the Armed Forces Medical Services*.

Časopis izlazi dvanaest puta godišnje. Pretplate: žiro račun kod Uprave za javna plaćanja u Beogradu br. 840-941621-02 – VMA (za Vojnosanitetski pregled), PIB 102116082. Za pretplatu iz inostranstva obratiti se službi pretplate na tel. 3608 997. Godišnja pretplata: 4 000 dinara za građane Srbije, 8 000 dinara za ustanove iz Srbije i 150 € (u dinarskoj protivvrednosti na dan uplate) za pretplatnike iz inostranstva. Kopiju uplatnice dostaviti na gornju adresu.

VOJNOSANITETSKI PREGLED

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

PUBLISHER

Military Health Department, Ministry of Defence, Serbia

PUBLISHER'S ADVISORY BOARD

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

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL BOARD

Editor-in-chief

Prof. **Silva Dobrić**, BPharm, PhD

Co-editors:

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

Editorial staff

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

Technical editor

Milan Perovanović

Proofreading

Ljiljana Nikolić, Brana Savić

Technical editing

Svetlana Stajić, Vesna Totić, Jelena Vasilj



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

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

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



SADRŽAJ / CONTENTS

ORIGINALNI ČLANCI / ORIGINAL ARTICLES

Radmila Gudović, Dušica L. Marić, Bojana Krstonošić, Siniša S. Babović, Dušan Ristanović, Nebojša T. Milošević

Kvantitativna analiza promene numeričke gustine neurona zupčastog jedra čoveka tokom razvoja

Quantitative analysis of the change in neuronal numerical density of the human *nucleus dentatus* within development 471

Aleksandra Trninić-Pjević, Vesna Kopitović, Sonja Pop-Trajković, Artur Bjelica, Irena Bujas, Dunja Tabš, Djordje Ilić, Dragan Stajić

Uticaj histeroskopije na ishod postupaka vantelesne oplodnje

Effect of hysteroscopic examination on the outcome of *in vitro* fertilization 476

Snežana Tomašević-Todorović, Ksenija Bošković, Danka Filipović, Nada Naumović

Procena pamćenja kod obolelih od reumatoidnog artritisa

Assessment of memory in patients with rheumatoid arthritis 481

Zoran Stanojković, Ana Antić, Miodrag Stojanović

Efekat inaktivacije patogena primenom riboflavina i ultravioletnog zračenja na kvalitet trombocitnih koncentrata

Effectiveness of use of riboflavin and ultraviolet light for pathogen inactivation on quality of platelet concentrates 489

Milovan Petrović, Gordana Panić, Aleksandra Jovelić, Tibor Čanji, Ilija Srdanović, Tanja Popov, Miodrag Golubović

Therapeutic hypothermia and neurological outcome after cardiac arrest

Terapijska hipotermija i neurološki ishod nakon srčanog zastoja 495

Ivana Vorgučin, Jovan Vlaški, Nada Naumović, Dragan Katanić

Poređenje dva definisana kriterijuma za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma kod prekomerno uhranjene i gojazne dece u Vojvodini

Comparison of the established definition criteria for diagnosing metabolic syndrome between overweight and obese children in Vojvodina 500

Goran Jovanović, Nikola Burić, Nebojša Krunić, Miloš Tijanić, Simona Stojanović

Procena efikasnosti primene lasera male snage u terapiji alveolarnog osteitisa

Assessment of the effectiveness of low level laser in the treatment of alveolar osteitis 506

CURRENT TROPICS / AKTUELNA TEMA

Ana Ristić, Ljubinka Janković Veličković, Dragana Stokanović

Prognostic value of apoptotic activity in muscle-invasive bladder cancer

Prognostička vrednost apoptoze kod mišićnoinvazivnog karcinoma mokraćne bešike 510

CASE REPORTS / KAZUISTIKA

*Jasmina V. Gligorijević, Ljubinka V. Veličković, Snežana A. Jančić, Zoran Radovanović,
Miljan S. Krstić, Vuka V. Katić*

Focal neuroendocrine differentiation in prostatic gland carcinoma with basaloid pattern

Bazalnoćelijski karcinom prostate sa neuroendokrinom diferencijacijom 515

*Mirko D. Kerkez, Nebojša S. Lekić, Djordje M. Čulafić, Zoran J. Ražnatović, Igor I. Ignjatović,
Dragana D. Lekić, Dragana D. Mijač*

Gastric adenomyoma

Adenomiom želuca 519

Ivan Mikov, Ivan Turkalj, Marina Jovanović

Occupational contact allergic dermatitis in dentistry

Profesionalni alergijski kontaktni dermatitis u stomatologiji 523

Fadil Škrijelj, Dragoslav Sokić

Dilemmas in diagnostics and therapy of rolandic epilepsy

Dileme u dijagnostici i terapiji rolandične epilepsije 526

PRIKAZ KNJIGE 529

UPUTSTVO AUTORIMA / INSTRUCTIONS TO THE AUTHORS 531



Opijumski mak (*Papaver somniferum* L., *Papaveraceae*) iz čijih se zelenih čaura zasecanjem dobija opijum, glavna sirovina za ilegalnu proizvodnju heroína, jedne od najčešće korišćenih i najopasnijih droga.

Od 1987. godine, 26. jun obeležava se širom sveta kao Internacionalni dan protiv zloupotrebe i nedozvoljenog prometa droga. Taj dan je prilika da se svi zajedno podsetimo na pogubne posledice zloupotrebe droga i istaknemo značaj borbe svih struktura društva u njenom sprečavanju.

Opium poppy (*Papaver somniferum* L., *Papaveraceae*) from whose immature fruit cutted opium is obtained. Opium is the main raw material for illegal producing of heroin, one of the most used and dangerous drugs.

From 1987, June 26 celebrates as the International Day against Drug Abuse and Illicit Trafficking. This day should remind all of us to baleful consequences of drug abuse and to emphasize the significance of fight against it by the whole society.



Kvantitativna analiza promene numeričke gustine neurona zupčastog jedra čoveka tokom razvoja

Quantitative analysis of the change in neuronal numerical density of the human *nucleus dentatus* within development

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

*Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Zavod za anatomiju, Novi Sad, Srbija;

†Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za biofiziku, Beograd, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Uloga zupčastog jedra jeste da uskladi ulazne informacije iz donjeg olivarnog komplementa i različitih delova moždanog stabla ili kičmene moždine sa izlaznim informacijama iz kore malog mozga. Da bi se razumele funkcije i veze zupčastog jedra, veoma je važno da se prouči njegov razvoj. Cilj ove studije bio je da se utvrdi da li se numerička gustina neurona zupčastog jedra čoveka u različitim stadijumima razvoja smanjuje po zakonitosti koja bi mogla da se matematički formuliše. **Metode.** Za ovu studiju koristili smo 25 čovečijih mozgova različite gestacijske starosti (12,5–31 gestacijske nedelje) i jedan mozak novorođenčeta starog šest dana. Mozgove smo fiksirali u 10% formalinsko-alkoholnom rastvoru, kalupili u parafinu, sekli na 5 ili 30 μm i bojili po metodi krezilviolet. Za određivanje numeričke gu-

stine neurona zupčastog jedra koristili smo Weibel-ovu mrežicu M42. Čelije smo brojali na svakom petom rezu pod optičkim mikroskopom. **Rezultati.** Dobijeni rezultati ukazali su na stalno smanjenje vrednosti numeričke gustine. Promene numeričke gustine u različitim stadijumima razvoja prate zakonitosti Bolcmanove krive. Strmi deo Bolcmanove krive odgovara rastu dorzomedijalne lamine i pojavi začetka ventrolateralne lamine, dok preostali relativno horizontalni deo Bolcmanove krive odgovara razvoju obe ove lamine. **Zaključak.** Bolcmanova funkcija može da se smatra matematičkim modelom promene numeričke gustine neurona zupčastog jedra tokom njegovog razvoja.

Ključne reči:

mozak; anatomija; neuroni; fetus, smrt; novorođenče; ćelije, broj; histološke tehnike.

Abstract

Background/Aim. The role of the dentate nucleus is to coordinate input information coming from the lower olivary complex and various parts of the brainstem of the spinal marrow with the output information from the cerebellar cortex. To better understand functions and relations of the dentate nucleus it is highly important to study its development process. The aim of this study was to determine a possible mathematical model of decrease in neuronal numerical density of the human *nucleus dentatus* at different stages of development. **Methods.** This study included 25 fetal brains of different age (12.5–31 weeks of gestational age and one brain of a 6-day-old newborn). The brains were fixed in 10% formalin-alcohol solution and embedded in paraffin. Sections were cut at a thickness of 6, 15, and 30 μm and stained with cresyl violet. Each fifth section was analyzed using a light microscope, and numerical density of

dentate nucleus neurons was established using the M42 Weibel's grid system. **Results.** The obtained results revealed a constant decrease in numerical density value. The changes of numerical densities at different stages of development correspond with Boltzmann function principles. The first, almost perpendicular part of Boltzmann function corresponds with the development of the dorsomedial lamina and the appearance of ventrolateral lamina primordium. The second, more or less horizontal part of Boltzmann function corresponds with the development of both laminae. **Conclusion.** The obtained results indicate that Boltzmann function can be considered a mathematical model of change in neuronal numerical density of dentate nucleus at different stage of development.

Key words:

brain; anatomy; neurons; fetus, aborted; infant, newborn; cell count; histological techniques.

Uvod

Zupčasto jedro (*nucleus dentatus*) ima izgled višestruko izuvijane trake sive mase, čija je razvijenost najizraženija kod čoveka. Izuvijanost zupčastog jedra odgovara izrazitom povećanju neokortikalnih delova velikog i malog mozga. Pretpostavlja se da je ovaj razvoj povezan s korisnim i dobro usklađenim pokretima prstiju, a ne sa bipedalnim hodom. Takođe, pretpostavlja se da je razvoj zupčastog jedra uslov za razvoj viših funkcija malog mozga kao što su kognitivne funkcije i motorika jezika¹. Novija istraživanja ukazuju na mogućnost da se zupčasto jedro sastoji od dva prostorno odeljena dela – motornog i nemotornog². Motorni deo jedra odgovara dorzomedijalnoj ploči (lamini) zupčastog jedra i sadrži izlazne informacijske kanale koji se završavaju u određenim područjima kore velikog mozga³. Nemotorni deo zupčastog jedra odgovara njegovom ventralnom delu koji je povezan sa prefrontalnom korom recipročnim vezama^{2,3}. Zupčasto jedro ima veoma bogate veze i sa drugim strukturama mozga. Uloga zupčastog jedra jeste da uskladi ulazne informacije iz donjeg olivarnog kompleksa i različitih delova moždanog stabla ili kičmene moždine sa izlaznim informacijama iz kore malog mozga. Na taj način, zupčasto jedro ima ključni položaj u cerebelarnim neuronskim krugovima, a njegovi aksoni predstavljaju glavni izlazni sistem malog mozga⁴.

Da bi se razumele funkcije i veze zupčastog jedra, veoma je važno da se dobro prouči njegov razvoj. Razvoj zupčastog jedra kod čoveka proučavali su mnogi autori koristeći klasične anatomske, histološke i morfološke analize⁵⁻¹³.

U našem prethodnom radu⁸, koristili smo klasičnu stereološku metodu da bismo prikazali promene numeričke gustine u toku razvoja zupčastog jedra. Poznato je da je stereologija grana primenjene matematike koja omogućava trodimenzionalnu analizu slike na bazi kriterijuma geometrijske verovatnoće. Jedan od veoma važnih, ali istovremeno i najvarijabilnijih, stereoloških parametara je numerička gustina (N_V). Ona predstavlja broj ćelija u određenoj zapremini tkiva¹⁴. U ovom radu koristili smo izračunate vrednosti N_V jezgara nervnih ćelija zupčastog jedra čoveka u različitim gestacijskim nedeljama (g.n). Dobijene vrednosti prilagođavali smo (fitovali) dvema matematičkim funkcijama da bismo predložili odgovarajući matematički model koji opisuje N_V . Pronalaženjem takvog modela pokušali smo da prikažemo moguće veze između promene numeričke gustine i fiziološkog sazrevanja zupčastog jedra.

Metode

Za ispitivanje promene numeričke gustine zupčastog jedra koristili smo 25 fetalnih mozгова čoveka starosti od 12,5 do 31 g.n. i mozak novorođenčeta starog šest dana (1 postnatalna nedelja – p.n.d). Svi korišćeni fetusci poticali su iz Klinike za akušerstvo u Novom Sadu, a dobijeni su posle spontanih ili medicinski indikovanih pobačaja. Novorođenčad su umrla posle respiratornog distresa. Svi mozgovci sakupljeni su u periodu od oko četiri godine. Ni na jednom fetusu, niti mozgu, nisu makroskopski uočene malformacije, niti

neka oboljenja. Starost fetusa određivna je prema Olivier-Pineau¹⁵. Posle vađenja mozgovca iz lobanjskih duplji, fiksirali smo ih u 10% formalinsko-alkoholnom rastvoru kome je dodato nekoliko kapi sirćetne kiseline. Proces fiksacije trajao je četiri nedelje. Mozgovci su zatim dehidrisani u ushodnoj seriji gradijenta alkohola (50, 60, 70, 96 i 100%), prosvetljavani u tri izmene ksilola i kalupljeni u parafinu. Da bi se dobio optimalan broj preseka za svaku g.n, mozgovci su serijski sečeni na isečke debljine 15 ili 30 μm . Svaki peti isečak bojen je po metodi krezilviolet i proučavan pod optičkim mikroskopom, uz korišćenje objektiva sa imerzijom (occ. 10; obj. 100).

Za brojanje jedara nervnih ćelija korišćen je svaki treći obojeni rez u rostrokaudalnom pravcu. Na svakom preseku brojali smo ukupno 20 polja testiranja: 10 na levoj i 10 na desnoj strani. Kod mlađih fetusa sva testna polja bila su postavljena u jednom redu. Kod starijih fetusa, gde su se mogle razlikovati obe lamine, 5 polja testiranja izbrojano je u dorzomedijalnoj, a pet u ventrolateralnoj lamini. Pošto je uočeno da postoji jasan odnos između prečnika jedra, koje ima oblik lopte i njegovog profila, vrednost izmerenog prečnika svakog jedra ćelije korigovana je za vrednost $4/\pi$. U svakoj ispitivanoj g.n. brojali smo 240 testnih polja. Jedra nervnih ćelija brojali smo na optičkom rezu koristeći višenamenski sistem testiranja M42 po Weibel-u. Prema našem iskustvu, ovaj sistem testiranja je najoptimalniji za ovu vrstu brojanja, kada je reč o zupčastom jedru u razvoju. Zbog brojanja jedara na optičkom rezu, u formuli za izračunavanje numeričke gustine, debljinu reza zamenili smo subjektivnom dubinom fokusa (DF). Praktično, za izračunavanje numeričke gustine koristili smo sledeću formulu¹⁶:

$$N_V = \frac{N_A}{DF + D_s} \quad (1)$$

gde je N_A broj nervnih ćelija na području testiranja, D_s prosečni prečnik jedra nervne ćelije i DF dubina fokusa. Mogući efekti koji bi mogli da modifikuju rezultate merenja, a koji utiču na vrednost numeričke gustine (kao što je neravnomerno skvrčavanje u toku fiksacije), umanjani su korišćenjem uputstava koje je predložio Haug¹⁷.

Rezultati

U svakom ispitivanom stadijumu razvoja brojali smo jedra nervnih ćelija na 240 polja testiranja i izračunali numeričku gustinu pomoću jednačine 1. Za svaki stadijum izračunali smo srednju vrednost i standardnu grešku. Ove vrednosti za svaki od ispitivanih stadijuma prikazane su u tabeli 1.

Za procenu promene numeričke gustine u različitim stadijumima razvoja (t_g) zavisnost srednje vrednosti N_V od t_g prikazali smo grafički, a zatim smo ispitivali koja funkcija se najbolje uklapa u prikazanu zavisnost. Za kriterijum odabira funkcije koristili smo statističku ocenu koeficijenta korelacije (R) fitovane krive. Konkretno, ako se R fitovane krive razlikuju od nule na nivou značajnosti $p < 0,05$ (minimalno!), tada između N_V i t_g postoji stroga korelacija opisana jednačinom funkcije koja fituje ovu zavisnost.

Tabela 1.
Vrednosti numeričke gustine (N_V) zupčastog jedra u različitim stadijumima razvoja (t_g)

t_g (g.n.)	Broj mozгова	$N_V \cdot 10^3$ (mm^{-3})
12,5	4	273 ± 5
17,5	5	$28,0 \pm 0,6$
19,5	4	$16,0 \pm 0,4$
24	4	$14,0 \pm 0,5$
31	4	$13,6 \pm 0,3$
1 p.n.d.	4	$11,5 \pm 0,3$

Svaka vrednost prikazana je kao aritmetička sredina \pm standardna greška; u svakom stadijumu razvoja prikazan je i broj mozгова sa kojih je određivana numerička gustina; g.n. – gestacijska nedelja; p.n.d. – postnatalna nedelja

Sledeći prethodno opisani kriterijum, pronašli smo dve funkcije, racionalnu i Bolcmanovu (slika 1) kod kojih je R statistički značajno različit od nule. Ako se zavisnost N_V od t_g fituje racionalnom funkcijom (slika 1A), tada se promena N_V prikazuje jednačinom:

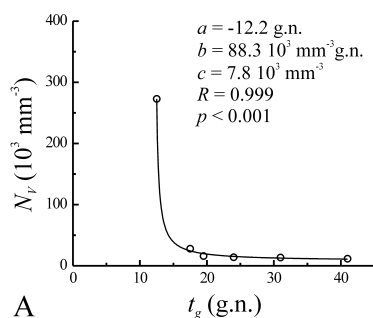
$$N_V = c + \frac{b}{t_g + a} \quad (2)$$

u kojoj a, b i c predstavljaju parametre fitovanja. U drugom slučaju, kada je zavisnost fitovana Bolcmanovom (logističkom) funkcijom (slika 1B), promenu N_V opisuje jednačina:

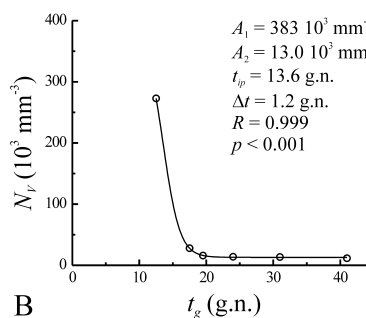
$$N_V = A_2 - \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{t_g - t_{ip}}{\Delta t}}} \quad (3)$$

u kojoj su A_1 i A_2 horizontalne asimptote, t_{ip} je kritična vrednost (tj. apscisa prevojne tačke) i Δt je parametar fitovanja.

Slika 1 pokazuje da obe fitovane funkcije imaju istu vrednost koeficijenta korelacije R koji je statistički značajno



A

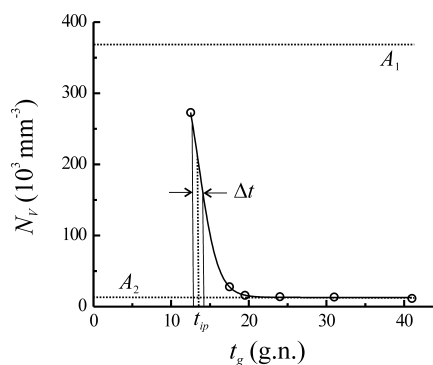


B

Sl. 1 – Zavisnost numeričke gustine (N_V) od stadijuma razvoja jedra (t_g), fitovana racionalnom (A) i Bolcmanovom funkcijom (B). Vrednosti parametara fitovanja prikazani su u gornjem desnom uglu (R je koeficijent korelacije i p nivo njegove značajnosti; g. n. – gestacijska nedelja; a, b, c – parametri fitovanja; A_1 , A_2 – horizontalne asimptote; t_{ip} – apscisa prevojne tačke funkcije; Δt – interval promenljive t_g unutar koga se vrednost N_V značajnije menja)

različit od nule. To znači da se zavisnost N_V od t_g može da opiše i racionalnom i Bolcmanovom funkcijom. Međutim, racionalna funkcija, prikazana jednačinom 2, ne može da se koristi za opis promene N_V , jer parametri ove funkcije ne odražavaju realnost. Na primer, za $t_g = 12,2$ g.n. funkcija ima vertikalnu asimptotu, što znači da vrednost N_V u ovom slučaju teži beskonačnosti. Dalje, za $t_g = 0$, vrednost N_V iznosi $0,6 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$, što je u suprotnosti s eksperimentalnim podacima (tabela 1). Naime, na osnovu vrednosti N_V realno je očekivati da ona raste kada t_g teži nuli, no ovaj zaključak ne važi ako se N_V opisuje racionalnom funkcijom.

Ako se promena N_V sa t_g fituje Bolcmanovom funkcijom, sve prethodne nelogičnosti parametara fitovanja ne postoje (slika 2). Parametri A_1 i A_2 predstavljaju horizontalne



Sl. 2– Ilustracija značenja parametara A_1 , A_2 , t_{ip} i Δt Bolcmanove logističke funkcije koja fituje eksperimentalno dobijene tačke koje prikazuju zavisnost N_V od t_g ; N_V – numerička gustina zupčastog jedra; t_g – stadijum razvoja; g. n. – gestacijska nedelja; A_1 , A_2 – horizontalne asimptote; t_{ip} – apscisa prevojne tačke funkcije; Δt – interval promenljive t_g unutar koga se vrednost N_V značajnije menja

asimptote, odnosno najnižu i najvišu vrednost N_V u toku prenatalnog razvoja. U slučaju naših podataka (slika 1B) ove vrednosti su $383 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ i $13,6 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$. Parametar t_{ip} ($t_{ip} = 13,6$ g.n.) predstavlja apscisu prevojne tačke funkcije, koja se nalazi između dve horizontalne asimptote (slika 2). Parametar Δt ($\Delta t = 12,2$ g.n.) definiše interval promenljive t_g unutar koga se vrednost N_V značajnije menja.

Diskusija

U opštem slučaju, zavisnost između dve veličine ne mora uvek da bude linearna, odnosno prikazana pravom linijom u Dekartovom koordinatnom sistemu. U slučaju nelinearne zavisnosti dveju veličina, još uvek ne postoji zadovoljavajući odgovor na pitanje koja funkcija najbolje fituje ovakvu vezu. Uobičajeno je da se problem prilagođavanja (fitovanja) nelinearnih zavisnosti rešava empirijski, tj. biranjem odgovarajuće funkcije čiji parametri na najbolji mogući način opisuju konkretnu zavisnost¹⁸.

U ovoj studiji pokušali smo da odgovarajućim matematičkim modelom opišemo promenu numeričke gustine ćelija zupčastog jedra čoveka u različitim stadijumima razvoja. Nelinearnu zavisnost između numeričke gustine i odgovarajućeg stadijuma razvoja prilagođavali smo na gore opisan način. Od nekoliko funkcija koje mogu da opišu ovu zavisnost izabrali smo dve najbolje: racionalnu (jednačina 2) i Bolcmanovu logističku funkciju (jednačina 3). Analizom njihovih parametara fitovanja zaključili smo da se promena numeričke gustine ćelija može kvalitetno opisati Bolcmanovom funkcijom. Poznato je da Bolcmanova logistička funkcija (definisana jednačinom 3) predstavlja jedan oblik logističke (sigmoidne) funkcije kojom se opisuju procesi rasta. Ove funkcije često se javljaju u različitim naučnim disciplinama kao što su ekonomija, biologija, medicina i sl. U medicini, izvesni fenomeni u farmakologiji i onkologiji jedino mogu da se kvantitativno procene logističkom funkcijom.

Iako logistička funkcija opisuje nelinearno rastuću zavisnost između veličina, ona može jednako pouzdano da modeluje i nelinearno opadajuće zavisnosti, kao što je slučaj u ovoj studiji. Naime, numerička gustina ćelija zupčastog jedra modelovana Bolcmanovom logističkom funkcijom (slika 1B) opada tokom razvoja, što je u saglasnosti sa nalazima Hayaran-a i sar.⁹ U početku našeg istraživanja imali smo u vidu različitu filogenetsku starost lamina zupčastog jedra, iako naša stereološka istraživanja nisu pokazala statistički značajne razlike između njih. Iz tog razloga, vrednosti numeričkih gustina za obe lamine prikazali smo na ovaj način.

Smanjivanje vrednosti numeričke gustine jedara nervnih ćelija u toku razvoja moglo bi se pripisati i gubitku značajne količine vode u toku histološke procedure, koja se naročito odigrava u toku fiksiranja u formalinu i alkoholu, kao i u tretiranju preparata u ushodnoj seriji alkohola¹⁹. Istovremeno, u toku razvoja dolazi do ukupnog rasta ne samo malog mozga, nego i zupčastog jedra što se ogleda u ukupnom porastu njihove zapremine¹², te se početni broj ćelija preraspoređuje na veću zapreminu. Takođe, zna se da broj ćelija neke strukture centralnog nervnog sistema značajno zavisi i od apoptoze, tj. programirane ćelijske smrti²⁰. Istražujući mehanizme apoptoze, došlo se do zaključka da disregulacija ovog procesa može da dovede do različitih poremećaja u toku razvoja, kao i da može da bude jedan od uzroka različitih neurodegenerativnih i autoimunskih oboljenja ili karcinoma²¹.

Primena najnovijih metoda u molekularnoj biologiji iz korena izmenila je naša saznanja o razvoju malog mozga i njegovih struktura. Istraživanjima se došlo do zaključka da progenitorne ćelije iz kojih će nastati strukture malog mozga potiču iz ventrikularne zone i rombičke usne²². Iz ventrikularne zone nastaju GABA-ergički neuroni, a iz rombičke usne glutamatergički neuroni tj. zrnaste i unipolarne četkaste (*brush*) ćelije, kao i projekcioni neuroni zupčastog jedra²³. Takođe, zna se da svi ovi neuroni nastaju po jednom utvrde-

nom vremenskom rasporedu. Generalno, prvo nastaju projekcioni neuroni, a zatim interneuroni.

Kod čoveka, neuroni koji daju populaciju zupčastog jedra zauzimaju definitivni položaj kod fetusa starog 12,5 g.n. Začetak zupčastog jedra uočava se u vidu masivne okruglaste strukture koju sačinjavaju grozdovi malih okruglih ćelija⁷. U ovom stadijumu razvoja numerička gustina jezgara nervnih ćelija iznosi $273 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$. U kasnijim stadijumima, prvo dolazi do rasta i razvoja dorzomedijalne lamine. Izuzetno izražen razvoj dorzomedijalne lamine traje do 19,5 g.n. i ovaj period odgovara izraženom padu numeričke gustine. Podaci iz literature ukazuju da rast dorzomedijalne lamine prati pojava jake imunoreaktivnosti na kalbindin D28K i parvalbumin¹¹, kao i slaba imunoreaktivnost na nefosforilisani oblik NF-M subjednice neurofilamenata i na mikrotubule udružene sa proteinom MAP2. Yew i sar.²⁴ dokazali su prisustvo neurona koji su bili pozitivni na tirozin-hidroksilazu i dopamin- β -hidroksilazu u ovom periodu razvića. Mihajlović i Zečević⁶ otkrili su u 16. g.n. dve osnovne klase neurona (velike i male) u zupčastom jedru.

Nakon 19,5 g.n. pad vrednosti numeričke gustine je umeren i traje sve do rođenja. Međutim, u ovom stadijumu razvoja, ventrolateralna lamina počinje da raste. Najveće izduženje ventrolateralne lamine uočava se kod fetusa starog 23 g.n, a početak njenog nabiranja kod fetusa od 23,5 g.n. Rast i razvoj ventrolateralne lamine prati pojava imunoreaktivnosti na kalretinin, koja postaje sve izraženija u toku sazrevanja zupčastog jedra. Istovremeno, smanjuje se imunoreaktivnost na kalbindin D28K i parvalbumin¹¹. Hayaran i sar.¹⁰ u ovom stadijumu razvoja otkrili su prisustvo pet klasa ćelija, dok Mihajlović i Zečević⁶ opisuju rast i razvoj velikih i malih neurona.

Na osnovu ovog i drugih istraživanja može se zaključiti da promenu vrednosti numeričke gustine, odnosno broja ćelija u jedinici zapremine, prati promena njihove morfologije, kao i njihovo „molekularno” sazrevanje. Na kraju, iako razlike u promeni numeričke gustine kod starijih fetusa nisu statistički značajne, bilo bi korisno imati na umu da prvi, strmi deo Bolcmanove krive odgovara i rastu dorzomedijalne lamine, kao i pojavi početka ventrolateralne lamine; drugi, manje ili više horizontalni deo Bolcmanove krive odgovara razvoju obe lamine.

Zaključak

Rezultati ove studije pokazali su da se numerička gustina neurona zupčastog jedra čoveka u različitim stadijumima razvoja smanjuje po matematičkoj zakonitosti, prikazanoj Bolcmanovom logističkom funkcijom. Strmi deo ove krive odgovara veoma izraženom rastu i razvoju malog mozga i zupčastog jedra u celini, kao i veoma izraženom procesu apoptoze. Zbog toga, Bolcmanova funkcija može se smatrati matematičkim modelom promene numeričke gustine neurona zupčastog jedra tokom njegovog razvoja.

L I T E R A T U R A

1. *Matano S.* Brief communication: Proportions of the ventral half of the cerebellar dentate nucleus in humans and great apes. *Am J Phys Anthropol* 2001; 114(2): 163–5.
2. *Dum RP, Strick PL.* An unfolded map of the cerebellar dentate nucleus and its projections to the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 2003; 89(1): 634–9.
3. *Dum RP, Li C, Strick PL.* Motor and nonmotor domains in the monkey dentate. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 978: 289–301.
4. *Uusisaari M, Obata K, Knöpfel T.* Morphological and electrophysiological properties of GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 2007; 97(1): 901–11.
5. *Sidman RL, Rakić P.* Development of the human central nervous system. In: *Haymaker W, Adams RD*, editors. *Histology and histopathology of the nervous system*. Springfield, MA: Thomas; 1982. p. 3–145.
6. *Mihajlović P, Zecević N.* Development of the human dentate nucleus. *Hum Neurobiol* 1986; 5(3): 189–97.
7. *Gudović R, Marinković R, Aleksić S.* The development of the dentate nucleus in man. *Anat Anz* 1987; 163(3): 233–8.
8. *Gudović R, Drinčević D.* Stereological analysis of the dentate nucleus in developing human brain. *Acta Stereol* 1990; 9(1): 135–4.
9. *Hayaran A, Wadhwa S, Gopinath G, Bijlani V.* Developing dentate nucleus in man: a qualitative and quantitative study. *Exp Brain Res* 1992; 89(3): 640–8.
10. *Hayaran A, Wadhwa S, Bijlani V.* Cytoarchitectural development of the human dentate nucleus: a Golgi study. *Dev Neurosci* 1992; 14(3): 181–94.
11. *Yew DT, Luo CB, Heizmann CW, Chan WY.* Differential expression of calretinin, calbindin D28K and parvalbumin in the developing human cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 1997; 103(1): 37–45.
12. *Yamaguchi K, Goto N.* Three-dimensional structure of the human cerebellar dentate nucleus: a computerized reconstruction study. *Anat Embryol (Berl)* 1997; 196(4): 343–8.
13. *Kwong WH, Chan WY, Lee KK, Fan M, Yew DT.* Neurotransmitters, neuropeptides and calcium binding proteins in developing human cerebellum: a review. *Histochem J* 2000; 32(9): 521–34.
14. *Elias H, Hyde DM.* A guide to practical stereology. Basel: Karger; 1983.
15. *Kostović I.* Development and the structure of the cerebral cortex. Zagreb: Jugoslavenska medicinska naklada; 1979. (Croatian)
16. *Pajer Z, Kališnik M.* The particle number estimation and the depth of focus. *Acta Stereol* 1984; 3: 19–22.
17. *Hang H.* Stereological methods in the analysis of neuronal parameters in the central nervous system. *J Microsc* 1972; 95(1): 165–80.
18. *Ristanović D.* Modern biophysics, 3 – Mathematical modeling of phenomena in biological systems. Beograd: Naučna knjiga; 1989. (Serbian)
19. *Hopwood D.* Fixation and fixatives. In: *Bancroft JD, Stevens A*, editors. *Theory and practice of histological techniques* 3 ed. Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone; 1990.
20. *Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S.* Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol Rev* 2004; 84(2): 411–30.
21. *David KK, Sasaki M, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL.* EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis. *Cell Death Differ* 2006; 13(7): 1147–55.
22. *Sotelo C.* Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol* 2004; 72(5): 295–339.
23. *Carletti B, Rossi F.* Neurogenesis in the cerebellum. *Neuroscientist* 2008; 14(1): 91–100.
24. *Yew DT, Luo CB, Shen WZ, Chow PH, Zheng DR, Yu MC.* Tyrosine hydroxylase- and dopamine-beta-hydroxylase-positive neurons and fibres in the developing human cerebellum--an immunohistochemical study. *Neuroscience* 1995; 65(2): 453–61.

Primljen 26. I 2009.
 Revidiran 20. XII 2010.
 Prihvaćen 30. XII 2010.



Uticaj histeroskopije na ishod postupaka vantelesne oplodnje

Effect of hysteroscopic examination on the outcome of in vitro fertilization

Aleksandra Trninić-Pjević*, Vesna Kopitović*, Sonja Pop-Trajković†, Artur Bjelica*, Irena Bujas*, Dunja Tabš*, Djordje Ilić*, Dragan Stajić*

*Klinički centar Vojvodine, Klinika za ginekologiju i akušerstvo, Novi Sad, Srbija;

†Klinički centar Niš, Klinika za ginekologiju i akušerstvo, Niš, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. S obzirom na to da je neuspeh implantacije nakon embriotransfera jedan od glavnih problema vantelesne oplodnje i da sama intrauterina patologija može da bude povezana sa neuspešnim ishodom, cilj našeg istraživanja bio je da se utvrdi da li histeroskopska pretraga materične šupljine i lečenje patoloških promena pre postupka *in vitro* fertilizacije (IVF) mogu poboljšati stopu trudnoće kod žena mlađih od 38 godina. **Metode.** Prospektivna analiza obuhvatila je 480 bolesnica mlađih od 38 godina, koje su bile podvrgnute proceduri IVF, sa jednim ili više embriona dobrog kvaliteta za transfer. Svim bolesnicama ponuđena je histeroskopija, a onima sa pozitivnim patološkim nalazom transvaginalnog ultrazvuka obavezno je i urađena. Ultrazvučnim pregledom procenjeno je odsustvo patologije kavuma materice kod svih bolesnica pre započinjanja postupka IVF. Bolesnice su bile podeljene u tri grupe: grupa A – nikakva patologija nije otkrivena ultrazvučno i bolesnice nisu bile podvrgnute histerosko-

piji; grupa B – bolesnice su bile podvrgnute histeroskopiji i nikakva patologija nije otkrivena i grupa C – bolesnice su imale abnormalan histeroskopski nalaz i bile sledstveno lečene. **Rezultati.** Nije nađena statistički značajna razlika u prosečnoj starosti bolesnica, dužini trajanja neplodnosti i broja zrelih oocita po grupama ($p > 0,05$). Stopa kliničke trudnoće u grupama A, B i C bila je 36,9%, 58,75% i 32,7%, a stopa porođaja 27,5%, 48,7% i 25,7%, respektivno. Našli smo statistički značajne razlike u stopama trudnoće i porođaja između grupa. Histeroskopski uredan nalaz imalo je 80 žena (41,4%), a abnormalan nalaz 113 (58,6%). **Zaključak.** Na osnovu rezultata našeg istraživanja smatramo da histeroskopija, kao rutinska procedura, treba da se izvodi pre prvog IVF ciklusa kod svih trudnica. Na ovaj način redukuje se broj neuspešnih IVF ciklusa.

Ključne reči:

oplođenje, *in vitro*; histeroskopija; materica, bolesti; trudnoća, ishod; osetljivost i specifičnost.

Abstract

Background/Aim. Implantation failure after embryo transfer is one of the main problems of *in vitro* fertilization (IVF) and intrauterine pathologies can lead to unsuccessful outcome. The aim of this study was to determine if hysteroscopic examination of uterine cavity and consequent treatment of intrauterine lesions prior to IVF could improve the pregnancy rate in women under 38. **Methods.** This study included 480 patients under 38, who had undergone IVF or IVF\ICSI – embryo transfer cycles, in which one or more good quality embryos were transferred. By transvaginal sonography performed within the past 2 months, the uterus was found normal in all the patients enrolled in our IVF unit. The patients were divided into three groups: group A – with no hysteroscopic evaluation and no pathology, group B – with hysteroscopy but no pathology, and group C – with

abnormal hysteroscopy finding and corresponding treatment. **Results.** The obtained results revealed no difference in the mean age, duration of infertility, number of mature oocytes in either group ($p > 0.05$). Clinical pregnancy rates in the groups A, B and C were 36.9%, 58.75% and 32.7%, respectively, and delivery rates were 27.5%, 48.7% and 25.7%, respectively. There was a statistically significant difference among the groups concerning pregnancy and delivery rates. **Conclusion.** Considering the results of this study we could conclude that hysteroscopy, as a routine examination, should be performed before the first IVF-ET cycle in all patients thereby reducing the failures and then the costs of IVF-ET.

Key words:

fertilization *in vitro*; hysteroscopy; uterine diseases; pregnancy outcome; sensitivity and specificity.

Uvod

S obzirom na to da je neuspeh implantacije nakon embriotransfera (ET) jedan od glavnih problema *in vitro* fertilizacije (IVF) i da intrauterina patologija može da bude povezana sa neuspešnim ishodom, neophodno je da se pre započinjanja IVF isključivo svi potencijalno negativni faktori. Različiti su stavovi u vezi sa značajem histeroskopije kao rutinske bazične procedure u utvrđivanju bračne neplodnosti, a posebno pre IVF.

Ispitivanje šupljine materice obično se sprovodi primenom histerosalpingografije (HSG), uprkos limitiranosti i upotrebi rendgenskog zračenja. Metoda HSG ima nisku specifičnost i visoku stopu lažno pozitivnih (15,6%) i lažno negativnih nalaza (34,5%)^{1,2}. Druga metoda je ispitivanje sonohisterografijom, koja je nešto praktičnija i pogodnija metoda za ambulantno izvođenje. Transvaginalni ultrazvuk ima jaku korelaciju sa histeroskopijom za endometrijalne polipe, miome i ponekad adhezije.

Ipak, histeroskopija je prihvaćena kao zlatni standard u dijagnostici i, što je još važnije, omogućava lečenje patoloških promena u istom aktu. Ambulantna histeroskopija (*office hysteroscopy*) izvodi se bez opšte anestezije, u ambulantnim uslovima, sa minimalnim rizikom, a sve zahvaljujući napretku tehnike i razvoju mini-histeroskopa sa spoljnim prečnikom 5 mm.

Danas je zvanični stav da se histeroskopija preporučuje bolesnicama sa sumnjom na postojanje intrauterine patologije u cilju njenog lečenja i uklanjanja, kao i nakon ponavljanih neuspeha IVF postupaka, a poznato je da do 50% infertilnih bolesnica ima intrauterine abnormalnosti³⁻⁷.

Shodno tome, došlo se do ideje o primeni histeroskopije pre prvog postupka IVF. Utvrđeno je da postoji značajna razlika u stopi trudnoće kod onih bolesnica koje su pre planiranog IVF postupka imale histeroskopiju i eventualnu korekciju otkrivenih abnormalnosti^{7,8}. Cilj ovog ispitivanja bio je da se proceni da li histeroskopska pretraga materične šupljine i lečenje patoloških promena pre IVF mogu da poboljšaju stopu trudnoće kod žena mlađih od 38 godina.

Metode

Prospektivnom studijom bilo je obuhvaćeno 480 bolesnica mlađih od 38 godina koje su imale IVF proceduru sa jednim ili više embriona dobrog kvaliteta za transfer, u periodu od novembra 2006. do juna 2008. godine. Svim bolesnicama bila je ponuđena histeroskopija, a onima sa patološkim intrauterinim nalazom transvaginalnog ultrazvuka obavezno je i urađena. Intervencija je izvođena 2–6 meseci pre IVF, u zavisnosti od toga da li je bilo potrebno lečenje i rehisteroskopija pre planiranog IVF. Bolesnice su bile podeljene u tri grupe: grupa A – nikakva patologija nije nađena ultrazvučno i bolesnice nisu bile podvrgnute histeroskopiju; grupa B – bolesnice su bile podvrgnute histeroskopiji i nije otkrivena nikakva patologija, i grupa C – bolesnice su imale abnormalan histeroskopski nalaz i sledstveno lečenje.

Histeroskopija je izvođena u ranoj proliferativnoj fazi ciklusa, sa fiziološkim rastvorom kao distenzionim mediju-

mom i 5 mm *Bettocchi office* histeroskopom (*Karl Storz GmbH and Co, Tuttlingen, Germany*), odnosno 6,5 mm kada je operativna intervencija bila neophodna. Radni kanal 5 Fr i mehanički instrumenti (forceps, makaze) korišćeni su za biopsije endometrijuma, polipektomije, resekcije adhezija i resekcije malih septuma kod arkuatusa. *Versapoint* elektroda (*Johnson*) upotrebljavana je kod polipektomija, resekcija septuma i manjih mioma, a kod većih mioma korišćen je monopolarni resektoskop sa prečnikom spoljnog omotača 9 mm, a uterina šupljina distendirana je rastvorom glukoze. Polipi, miomi i sumnjive lezije bioptrane su radi patohistološke evaluacije. Hiperplazija endometrijuma lečena je gestagenima u trajanju od tri meseca, te kasnijom rehisteroskopijom. Dokazani ili suspekti endometritis lečen je antibiotikom (doksiciklin), peroralno, u trajanju od 10 dana, uz dva meseca kontraceptivne terapije.

Procedura IVF izvođena je kratkim protokolom nakon prethodne terapije kontraceptivima u trajanju od dva meseca. Kliničke trudnoće verifikovane su transvaginalnim ultrazvukom, vizualizacijom srčane akcije embriona. Bolesnice su dolazile na kontrolu radi verifikacije vitalne trudnoće, porođaja, kao i vremena porođaja.

Podaci su obrađeni korišćenjem standardnih deskriptivnih statističkih metoda (srednja vrednost, procentualna zastupljenost). Statistička obrada podataka izvršena je pomoću Studentovog *t*-testa i analizom varijanse (ANOVA).

Rezultati

Od 480 bolesnica, koje su bile uključene u program IVF, kod 193 urađena je histeroskopija.

Histeroskopski uredan nalaz imalo je 80 žena (41,4%), a abnormalan 113 (58,6%). Patološki nalazi pri histeroskopiji bili su sledeći: endometrijalni polipi (29), endometrijalna polipoza (12), endometrijalne adhezije (5), endometrijalna atrofija (5), adenomioza (5), hiperplazija (9), septum (29), *strawberrylike* endometrijum (7), cervikalna stenoza (5), miomektomija (7). Najveći broj bolesnica (25,6%) sa patološkim histeroskopskim nalazom imalo je polip (jedan ili više) promera 5–25 mm.

Nije nađena statistički značajna razlika u prosečnoj starosti bolesnica, dužini trajanja neplodnosti i broju dobijenih zrelih oocita između pojedinih grupa ($p > 0,05$). Stope kliničkih trudnoća u grupama A, B, C bile su 36,9%, 58,75% i 32,7%, a stope porođaja 27,5%, 48,7% i 25,7%, respektivno. Našli smo statistički značajne razlike u stopama trudnoća i porođaja između pojedinih grupa (tabela 1). Nije bilo razlike u dužini trajanja trudnoće u gestacijskim nedeljama, ni porođajnoj težini novorođenčadi kod pojedinih grupa (tabela 2).

Diskusija

Danas je važeći stav, prema navodima literature, da se histeroskopija sprovodi nakon ponavljanih neuspeha IVF²⁻⁴. Incidencija patoloških histeroskopskih nalaza kod ovih bolesnica visoka je⁸, a tretman intrauterine patologije popravlja stopu trudnoća⁷.

Tabela 1

Prosečna starost bolesnica, prosečno trajanje neplodnosti, broj zrelih oocita, broj kliničkih trudnoća i broj porođaja

Parametri posmatranja	Grupa A n = 287	Grupa B n = 80	Grupa C n = 113	p
Prosečna starost (god), $\bar{x} \pm SD$	33,16 \pm 3,6	33,14 \pm 3,6	34,5 \pm 2,7	0,19
Prosečno trajanje neplodnosti (god), $\bar{x} \pm SD$	7,95 \pm 4,2	8,05 \pm 4,87	10,05 \pm 4,2	0,06
Prosečan broj maturnih oocita	5,98	6,9	6,16	0,69
Broj kliničkih trudnoća (%)	106 (36,9)	47 (58,75)	37 (32,7)	< 0,05
Broj porođaja (%)	79 (27,5)	39 (48,7)	29 (25,7)	< 0,05

Grupa A – nikakva patologija nije nađena ultrazvučno i bolesnice nisu bile podvrgnute histeroskopiji; grupa B – bolesnice su bile podvrgnute histeroskopiji i nije otkrivena nikakava patologija; grupa C – bolesnice su imale abnormalan histeroskopski nalaz i sledstveno lečenje

Tabela 2

Ishodi trudnoća iz procedura *in vitro* fertilizacije (IVF) po grupama

Broj i ishod porođaja	n (%)	Prosečno trajanje trudnoće (GN)	Prosečna masa (g)
Broj porođaja	147 (100)	36,3	3241,5
jedno dete	90 (61,22)	38,36	2229
blizanci	51 (34,7)	34,5	2081
trojke	6 (4,08)	35,5	2145,8
Broj rođene dece	210 (100)		
Prosečna telesna masa neonatusa (g)	2 608		
grupa A	2600	37,0	
grupa B	2 629	36,5	
grupa C	2 595	36,2	

GN – gestacijska nedelja

Grupa A – nikakva patologija nije nađena ultrazvučno i bolesnice nisu bile podvrgnute histeroskopiji;

Grupa B – bolesnice su bile podvrgnute histeroskopiji i nije otkrivena nikakava patologija;

Grupa C – bolesnice su imale abnormalan histeroskopski nalaz i sledstveno lečenje

Izvođenje histeroskopije pre prvog IVF postupka, kao u našem ispitivanju, a u skladu sa nalazima drugih autora, otkriva veliki broj patoloških nalaza⁸⁻¹⁰. Čak 58,6% bolesnica imalo je histeroskopski patološki nalaz, što je nešto više nego što navode neki autori (38%), ali nalaze kao što su *strawberrylike* endometrijum, hronični endometritis, mikropolipoza nisu opisivali ovi autori^{9, 10}. Utvrđeno je da se diskretne patološke promene, otkrivene histeroskopski, ultrazvučno uvek previde.

U našem ispitivanju stopa kliničkih trudnoća u grupama A, B, C bila je 36,9%, 58,75% i 32,7%, a stope porođaja 27,5%, 48,7% i 25,7%, respektivno. Našli smo statistički značajne razlike u stopi trudnoće i porođaja između grupa. Poređenjem stopa trudnoće, kao i stopa porođaja kod bolesnica bez intrauterine patologije, sa onima koje su lečene zbog verifikovane patologije, našli smo razlike u odnosu na druge autore. Naime, Demirolo i sar.⁷ navode da stopa trudnoća može značajno da se poboljša nakon lečenja intrauterine patologije i patologije cervikalnog kanala. Oni, u grupi lečenih, registruju statistički značajno nižu stopu trudnoće u odnosu na grupu sa verifikovanim urednim nalazom. Doldi i sar.⁸ navode značajno višu stopu trudnoća u grupi žena sa predhodnom histeroskopijom (38%), u odnosu na grupu bez histeroskopije pre IVF (18%), čime se naglašava značaj lečenja intrauterine patologije pre započinjanja postupka IVF.

Ono što se zapaža u našim rezultatima jeste da se najbolje stope trudnoće ostvaruju u grupi sa histeroskopski verifikovanim urednim nalazom kavuma, ali i da je uprkos lečenju patologije kavuma, stopa trudnoće bila niža u odnosu na grupu sa urednim nalazom. Grupa C bila je raznovrsna po vrsti patologije, a uzorak nije bio dovoljno veliki da bismo

moгли da analiziramo pojedine činioce i utvrdimo njihov značaj i uticaj na niže stope trudnoća u ovoj grupi.

Uočeno je da nema značaja u perinatalnom ishodu između tri grupe, čime se podvlači značaj same histeroskopije i korekcije patologije kavuma u smislu ostvarivanja trudnoće, ali ne i njenog ishoda.

Kontrolisane randomizirane studije pokazale su da histeroskopsko uklanjanje polipa doprinosi statistički značajno višoj stopi trudnoće u grupi bolesnica kod kojih je ova intervencija sprovedena, u odnosu na gupu koja je imala endometrijalnu biopsiju (63% prema 28%)^{11, 12}. Prema rezultatima sprovedenih studija stopa kliničkih trudnoća i stopa porođaja u grupi sa histeroskopijom iznosila je 68,57% i 48,57%, dok su u kontrolnoj grupi bez polipektomije iznosile 13,88% i 11,11%.

Veoma je važno podvući značajnu razliku u stopi kliničkih trudnoća i porođaja između grupa A i B, čime se ističe značaj „fihnih lezija“ koje ultrazvučno nije moguće otkriti (endometritis, endometrijalna mikropolipoza, cervikalna stenozna, intrauterine sinehije).

Incidencija endometritisa varira od 1 do 16% kod infertilnih žena¹³ i crvenkasti endometrijum sa beličastim tačkastim otvorima žlezda pokazuje tipičnu sliku „jagodičaste“ sluznice (*strawberry like* endometrijum). Opšti stav je da histološka i mikrobiološka ispitivanja nisu značajna, jer u rutinskom radu retko uspeavaju da dokažu uzročnike. Ponovnom histeroskopijom, nakon hormonske terapije (gestagenima ili kontraceptivima) uz terapiju antibioticima, gotovo uvek uočava se uredan nalaz.

Značaj endometrijalne mikropolipoze je nejasan, ali je ginekolozi uvek uklanjaju iz kavuma uterusa ukoliko naiđu

na ovakav nalaz prilikom histeroskopije. Cicinelli i sar.^{14, 15} posumnjali su na vezu mikropolipoze i hroničnog endometritisa i pri incidenciji ovog nalaza od 9,5% svih histeroskopija, našli su u bioptiranom materijalu postojanje plazma ćelija, ističući vezu malih polipa sa inflamacijom.

Uzimajući sve rezultate u obzir, brojne studije pokušale su da sumiraju ulogu histeroskopije u IVF ciklusima.

Sistematizovanim pregledom studija koje su se bavile uticajem histeroskopije na ishod IVF ciklusa, razmatrali smo ona ispitivanja u kojima je kod bolesnica izveden IVF postupak u ciklusu neposredno nakon ciklusa sa histeroskopijom, u poređenju sa kontrolnom grupom kod koje histeroskopija nije rađena. Najvažniji analizirani rezultat bila je stopa trudnoće. Ukupno 1 691 bolesnica bila je uključena u dve randomizovane (n = 941) i tri nerandomizovane studije (n = 750). Metaanaliza rezultata pet studija pokazala je da histeroskopija doprinosi većoj stopi trudnoće u sledstvenim IVF ciklusima (sumirani relativni rizik 1,73; 95% interval poverenja 1,51–2,03)¹⁶.

Dve velike randomizovane studije ispitivale su ulogu histeroskopije pre planiranog postupka IVF. Stopa kliničke trudnoće iznosila je 21,6%, kada histeroskopija nije rađena, 32,5% kod urednog nalaza histeroskopije, i 30,4% kod patološkog nalaza histeroskopije⁷. U drugoj studiji dobijane su stope kliničke trudnoće od 26,2%, 44,4% i 39,5% za iste grupe bolesnica¹⁷. Oba istraživanja pokazala su statistički visoko značajnu razliku u uspešnosti IVF postupaka kod bolesnica koje nisu bile podvrgnute histeroskopiji u odnosu na one koje jesu. Nije utvrđeno postojanje značajne razlike u uspešnosti ishoda IVF postupka kod bolesnica sa normalnim histeroskopskim nalazom i onih sa detektovanom patologijom kavuma. Metaanaliza je pokazala da se izvođe-

njem histeroskopije pre planiranog IVF ciklusa stopa trudnoće duplira, mada su rezultati velikog multicentarskog ispitivanja, koje je u toku, neophodni za uspostavljanje protokola procedura i utvrđivanja definitivnog učinka histeroskopije na ishod IVF ciklusa¹⁸. Ovi rezultati slažu se sa našim i konačno se potvrđuje da otkrivanje urednog nalaza histeroskopije daje dvostuko veću stopu trudnoće i porođaja.

Histeroskopija značajno doprinosi boljem ishodu IVF ciklusa. Mehanizmi kojima se objašnjava pozitivan učinak histeroskopije su: lečenje prisutne patologije materične šupljine, olakšavanje postupka embriotransfera dilatacijom cervikalnog kanala i nanošenjem lokalne endometrijalne traume¹⁹. Naime, prilikom histeroskopije, kako operativne, tako i dijagnostičke, pokreće se kaskada inflamatornih reakcija i sekrecija i aktivacija citokina i faktora rasta koji imaju pozitivan učinak na endometrijum i implantaciju embriona.

Zaključak

Stopa trudnoće, nakon postupaka IVF, može značajno da se poboljša lečenjem intrauterine patologije i patologije cervikalnog kanala. Prema našim rezultatima, najbolja stopa trudnoće ostvaruju se kod bolesnica sa histeroskopski verifikovanim urednim nalazom kavuma, ali i lečenjem patologije kavuma.

Uvidom u značajno veći broj kliničkih trudnoća i porođaja kod bolesnica koje su bile na histeroskopiji pre IVF, u poređenju sa onima koje nisu, smatramo da histeroskopija treba da se izvodi rutinski, pre prvog (svakog) postupka vantelesne oplodnje.

L I T E R A T U R A

- Golan A, Ron-El R, Herman A, Soffer Y, Bukovsky I, Caspi E. Diagnostic hysteroscopy: its value in an in-vitro fertilization/embryo transfer unit. *Hum Reprod* 1992; 7(10): 1433–4.
- Golan A, Eilat E, Ron-El R, Herman A, Soffer Y, Bukovsky I. Hysteroscopy is superior to hysterosalpingography in infertility investigation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996; 75(7): 654–6.
- Crosignani PG, Rubin BL. The ESHRE Capri Workshop Group. Optimal use of infertility diagnostic tests and treatments. *Hum Reprod* 2000; 15(3): 723–32.
- Dicker D, Ashkenazi J, Feldberg D, Farbi J, Shalev J, Ben-Rafael Z. The value of repeat hysteroscopic evaluation in patients with failed in vitro fertilization transfer cycles. *Fertil Steril* 1992; 58(4): 833–5.
- Balmaceda JP, Ciuffardi I. Hysteroscopy and assisted reproductive technology. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1995; 22(3): 507–18.
- Oliveira FG, Abdelmassih VG, Diamond MP, Dozortsev D, Nagy ZP, Abdelmassih R. Uterine cavity findings and hysteroscopic interventions in patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer who repeatedly cannot conceive. *Fertil Steril* 2003; 80(6): 1371–5.
- Demiroglu A, Gurgan T. Effect of treatment of intrauterine pathologies with office hysteroscopy in patients with recurrent IVF failure. *Reprod Biomed Online* 2004; 8(5): 590–4.
- Doldi N, Persico P, Di Sebastiano F, Marsiglio E, De Santis L, Rabellotti E, et al. Pathologic findings in hysteroscopy before in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET). *Gynecol Endocrinol* 2005; 21(4): 235–7.
- Mooney SB, Milki AA. Effect of hysteroscopy performed in the cycle preceding controlled ovarian hyperstimulation on the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003; 79(3): 637–8.
- Hinckley MD, Milki AA. 1000 office-based hysteroscopies prior to in vitro fertilization: feasibility and findings. *JSL* 2004; 8(2): 103–7.
- Bozdogan G, Aksan G, Esinler I, Yarali H. What is the role of office hysteroscopy in women with failed IVF cycles? *Reprod Biomed Online* 2008; 17(3): 410–5.
- Silberstein T, Saphier O, van Voorhis BJ, Plosker SM. Endometrial polyps in reproductive-age fertile and infertile women. *Isr Med Assoc J* 2006; 8(3): 192–5.
- Van Belle Y, Puttemans P. Fertility enhancing hysteroscopic surgery. In: Gordts S, Campo R, Varhoeven HC, Brosens I, editors. *Atlas of transvaginal endoscopy*. Belgium, Leuven: Informa; 2007. p. 52–3.
- Cicinelli E, Resta L, Nicoletti R, Zappimbulso V, Tartagni M, Saliani N. Endometrial micropolyps at fluid hysteroscopy suggest the existence of chronic endometritis. *Hum Reprod* 2005; 20(5): 1386–9.
- Cicinelli E, De Ziegler D, Nicoletti R, Colafoglio G, Saliani N, Resta L, et al. Chronic endometritis: correlation among hysteroscopic, histologic, and bacteriologic findings in a prospective

- trial with 2190 consecutive office hysteroscopies. *Fertil Steril* 2008; 89(3): 677–84.
16. *El-Toukhy T, Sunkara SK, Coomarasamy A, Grace J, Khalaf Y.* Outpatient hysteroscopy and subsequent IVF cycle outcome: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2008; 16(5): 712–9.
 17. *Rama Raju GA, Shashi Kumari G, Krishna KM, Prakash GJ, Madan K.* Assessment of uterine cavity by hysteroscopy in assisted reproduction programme and its influence on pregnancy outcome. *Arch Gynecol Obstet* 2006; 274(3): 160–4.
 18. *El-Toukhy T, Campo R, Sunkara SK, Khalaf Y, Coomarasamy A.* A multi-centre randomised controlled study of pre-IVF outpatient hysteroscopy in women with recurrent IVF implantation failure: Trial of Outpatient Hysteroscopy - [TROPHY] in IVF. *Reprod Health* 2009; 6: 20.
 19. *Raziel A, Schachter M, Strassburger D, Bern O, Ron-El R, Friedler S.* Favorable influence of local injury to the endometrium in intracytoplasmic sperm injection patients with high-order implantation failure. *Fertil Steril* 2007; 87(1): 198–201.

Primljen 15. VII 2009.

Revidiran 4. II 2010.

Prihvaćen 7. II 2010.



Procena pamćenja kod obolelih od reumatoidnog artritisa

Assessment of memory in patients with rheumatoid arthritis

Snežana Tomašević-Todorović*, Ksenija Bošković*, Danka Filipović†, Nada Naumović†

Klinički centar Vojvodine, *Klinika za medicinsku rehabilitaciju, Novi Sad, Srbija; Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, †Departman za neurofiziologiju, Novi Sad, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Dijagnostika emocionalnih i kognitivnih poremećaja kod bolesnika sa reumatoidnim artritismom često se previdi, bez obzira na njihov značaj i učestalost. Cilj rada bila je procena funkcije pamćenja bolesnika sa reumatoidnim artritismom u zavisnosti od emocionalnih manifestacija, intenziteta bola, dužine trajanja i stepena aktivnosti bolesti, kao i anatomskog i funkcijskog stadijuma bolesti. **Metode.** Istraživanjem bilo je obuhvaćeno 60 bolesnika sa reumatoidnim artritismom i 30 zdravih ispitanika oba pola, starosti do 55 godina, koji su pregledani i testirani u Specijalnoj bolnici za reumatske bolesti u Novom Sadu. Depresija je dijagnostikovana primenom Beck-ove skale za depresiju (*Beck Depression Inventory* – BDI), anksioznost primenom Spielberger-ovog testa za anksioznost (*Spielberger Anxiety Trait Inventory – State and Trait*); procenjen je kognitivni status (Wechsler-ovom skalom pamćenja – WBsp), funkcionalni status (*Health Assessment Questionnaire* – HAQ) i aktivnost bolesti primenom indeksa aktivnosti bolesti (DAS28). **Rezultati.** Simptomi depresivnosti registrovani su kod 38 (63,33%) bolesnika, a simptomi anksioznosti kod 22 (36,67%) bolesnika. Prosečne vrednosti koeficijentata pamćenja bile su statistički značajno niže u grupi obolelih od reumatoidnog artritisa nego u kontrolnoj grupi. **Zaključak.** Velika učestalost emocionalnih poremećaja, kao i oštećenja memorijskih sposobnosti kod bolesnika sa reumatoidnim artritismom zahteva pravovremenu dijagnostiku i adekvatan tretman.

Ključne reči:

arthritis, reumatoidni; depresija; anksioznost; pamćenje.

Abstract

Background/Aim. The diagnosis of emotional and cognitive dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is often not noticed, regardless of their importance and frequency. The aim of this research was to assess memory function in patients with rheumatoid arthritis with respect to its emotional manifestation, pain intensity, the duration and degree of disease activity, and functional and anatomical stages of the disease. **Methods.** The study involved 60 patients with rheumatoid arthritis and 30 healthy subjects of both sexes, aged up to 55, who were examined and tested in the Special Hospital for Rheumatic Diseases in Novi Sad. Depression was diagnosed by using the Beck's scale for depression (*Beck Depression Inventory* – BDI), anxiety by using the Spielberger Trait Anxiety Inventory – State and Trait; we evaluated the cognitive status (by the Wechsler scale-based memory – WBsp), the functional status (*Health Assessment Questionnaire*, HAQ) and disease activity by analyzing the index of disease activity (DAS 28). **Results.** Depressive symptoms were registered in 38 (63.33%) patients, and anxiety symptoms in 22 (36.67%) patients. The average values of the memory coefficient were significantly lower in the group of patients with rheumatoid arthritis compared with the control group. **Conclusion.** High frequency of emotional dysfunction and damaged memory abilities in patients with rheumatoid arthritis requires in time diagnosis and adequate treatment.

Key words:

arthritis, rheumatoid; depression; anxiety; memory.

Uvod

Savremeni biopsihosocijalni pristup obolelima od reumatoidnog artritisa otvara nove vidike u razumevanju kognitivnog funkcionisanja u uslovima hroničnog bola. Tendencije naučnih krugova su utvrđivanje načina i vrste kognitivnih oštećenja hroničnim bolom, u cilju njihovog pravovremenog

dijagnostikovanja i lečenja. Međutim, u rutinskoj kliničkoj praksi bolesnici kod kojih nije naglašen značaj tegoba koje bi upućivale na prisustvo kognitivnog deficita ne podležu detaljnoj neuropsihološkoj ekspertizi.

Podaci iz literature ukazuju na mogućnost oštećenja kognitivnih funkcija (pamćenja, pažnje, koncentracije) kod bolesnika sa hroničnim bolom¹⁻⁴. Podaci o učestalosti kogniti-

vnih disfunkcija kod bolesnika sa hroničnim bolom su heterogeni^{5,6}. Iverson i McCracken⁵ utvrdili su da 42% bolesnika sa hroničnim bolom i bez kraniocerebralne traume, saopštavaju najmanje jedan kognitivni simptom, te pokazuju deficite u testiranju kognitivnih funkcija – pažnje, koncentracije i pamćenja. Studija Kewmana i sar.⁷ ukazuje da 32% bolesnika sa mišičnoskeletnim bolom ima disfunkcije najmanje jednog kognitivnog domena.

Relativno je malo istraživanja koja se bave problemima kognitivnih funkcija kod obolelih od reumatoidnog artritisa. Heterogenost podataka o prevalenciji i vrsti kognitivnih poremećaja kod obolelih od reumatoidnog artritisa zasniva se na metodološkim razlikama neuropsihološkog istraživanja, kao i na različitosti kliničkog ispoljavanja između obolelih.

Dosadašnja istraživanja nisu kompletno objasnila uzroke kognitivnog deficita obolelih od reumatoidnog artritisa, s obzirom na postojanje velikog broja sociodemografskih i kliničkih varijabli koje komplikuju razumevanje ovog fenomena^{8,9}. Razmatranje odnosa između hroničnog bola i pamćenja ima teoretski i klinički značaj, sa potrebom dijagnostike i individualnog pristupa lečenju bolesnika sa kognitivnim disfunkcijama. Katz i sar.¹⁰ sugerišu da kognitivne disfunkcije kod bolnih stanja, kao što su smetnje pamćenja i koncentracije, odražavaju sindrom deficita selektivne pažnje. Selektivna pažnja predstavlja sposobnost kognitivnog sistema da selektuje deo informacija koji je zadržan u čulnoj memoriji i koje se prosleđuju u dalju obradu¹¹.

Doprinos ispitivanju odnosa hroničnog bola i kognicije predstavljaju istraživanja lečenja bola analgeticima koji dovedu do poboljšanja memorijskih sposobnosti (kratkotrajna memorija)^{12,13}.

Kompleksan je odnos depresije i kognitivnih disfunkcija kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom¹⁴. Emocije i kognicija nisu odvojeni u kompleksnim mentalnim procesima i ponašanju, čak imaju i neke zajedničke neuronske krugove^{15,16}. Smatra se da smanjenje memorijskih sposobnosti nije sekundarno kao rezultat emocionalnih disfunkcija, zato što je memorija oštećena i kada nema emocionalnih disfunkcija.

Cilj ovog rada bilo je ispitivanje sposobnosti pamćenja kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom u zavisnosti od emocionalnih manifestacija, intenziteta bola, dužine trajanja i stepena aktivnosti bolesti, kao i anatomske i funkcijske stadijuma bolesti.

Metode

Istraživanjem je bilo obuhvaćeno 90 ispitanika starosti do 55 godina, sa najmanje osnovnim obrazovanjem (radi razumevanja testovnog materijala). Grupu obolelih od reumatoidnog artritisa (RA) sačinjavalo je 60 bolesnika (53 žene, 7 muškaraca), prosečne starosti $49,87 \pm 7,56$ godina, koji su ispunjavali kriterijume za dijagnozu reumatoidnog artritisa Američkog reumatološkog društva (ARA) iz 1987 godine. Bolesnici su dobrovoljno pristupili pregledu i testiranju u Specijalnoj bolnici za reumatske bolesti u Novom Sadu. Kontrolnu grupu (KO) sačinjavalo je 30 zdravih ispitanika (27 žena, 3 muškarca), prosečne starosti $48,30 \pm 6,42$ godine.

Kontrolna grupa je korišćena za definisanje normativa neuropsiholoških parametara.

Iz grupa su isključeni ispitanici sa: oslabljenim sluhom, demencijom, neurološkim i psihijatrijskim oboljenjima, traumom glave, ispitanici koji su upotrebljavali psihoaktivne supstance, antidepresive, 3 nedelje pre istraživanja, ili imali operativni zahvat mesec dana pre istraživanja.

U grupi RA praćeni su sledeći parametri: broj bolnih i otečenih zglobova (bol u zglobovima ocenjivan od strane bolesnika pomoću vizuelne analogne skale VAS od 0–100 mm) brzina sedimentacije eritrocita, indeks aktivnosti bolesti, anatomske stadijum bolesti, funkcijska klasa bolesnika po Steinbrocker-u. Evolutivnost bolesti je procenjivana danas najčešće korišćenim indeksom aktivnosti bolesti – DAS 28 koji obuhvata procenu 28 zglobova. Ispitivanje funkcijskih sposobnosti bolesnika obavljeno je metodom Upitnika procene zdravstvenog stanja (*Health Assessment Questionnaire* – HAQ), koji sadrži 20 pitanja podeljenih u 8 funkcijskih kategorija.

Za detekciju anksioznosti korišćen je Spielberger-ov test anksioznosti (*Spielberger Anxiety Trait Inventory* – *State and Trait*), koji čine dva upitnika sa 20 standardizovanih tvrdnji za merenje trenutne STAI-S i opšte STAIT anksioznosti ispitanika. Ukupan skor do 30 poena govori o niskom nivou anksioznosti, od 31 do 44 o umerenom nivou, a skorovi iznad 45 o visokom nivou anksioznosti.

Za procenu depresivnosti primenjena je Beck-ova skala depresije (*Beck Depression Inventory* – BDI), koja obuhvata 21 aspekt depresivnosti. Ukupan skor BDI određuje težinu simptoma depresivnosti, a skorovi iznad 30 označavaju tešku kliničku depresiju.

Za detekciju verbalnog i neverbalnog funkcionisanja pamćenja korišćena je Wechsler-ova skala pamćenja (*Wechsler Memory Scale* – WBsp oblik 1). Wechsler-ova skala pamćenja sastoji se od 7 supstestova: opšte poučenosti kojima se određuju poučenost (lična i opšta), orijentisanosti (vremenske i prostorne), mentalne kontrole (brojanje unatrag i u intervalima, ponavljanje), logičkog sećanja (neposredno obnavljanje logičkog gradiva), sećanja brojeva (neposredno i mehaničko sećanje), vizuelne reprodukcije (crtanje po sećanju), asocijativnog sećanja (lake i teške asocijacije sa tri uzastopna ponavljanja). Ocenjivanje rezultata vršilo se sabiranjem vrednosti bodova pojedinih supstestova, a zatim dodavanjem korektivne vrednosti u odnosu na starosnu grupu, nakon čega se dobijao koeficijent pamćenja koji je prilagođen hronološkoj starosti ispitanika.

Statistička obrada podataka radena je pomoću softverskog paketa Statistica 8.0, za koji postoji licenca na Univerzitetu u Novom Sadu. Prilikom statističke obrade podataka korišćene su mere deskriptivne statistike: frekvencija, srednja vrednost, mere varijacije. U radu su korišćeni parametarski (*t*-test) i neparametarski (Mann Whitney-ev test, χ^2 test) testovi za upoređivanje raspodela dve grupe ispitanika. Za poređenje tri i više grupa ispitanika korišćena je analiza varijanse (ANOVA) i Kruskal-Wallis-ov test. Korelacija neprekidnih promenljivih ispitivana je Pearson-ovim koeficijentom korelacije.

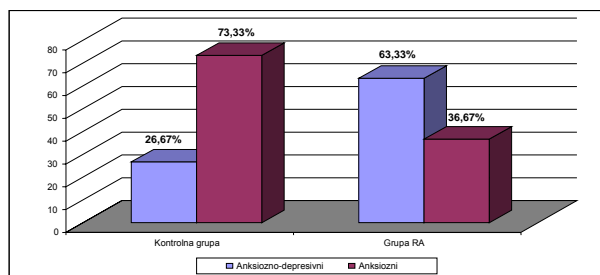
Rezultati

Grupa RA sastojala se od 60 bolesnika sa reumatoidnim artritisom, a grupa KO od 30 zdravih ispitanika koji se nisu statistički značajno razlikovali prema polu, uzrastu, obrazovanju, bračnom statusu – karakteristikama relevantnim za primenjene metode (uzorak homogen, CV < 30%) (tabela 1).

U grupi RA bile su zastupljenije žene, 53 (88,33%). Prosečna starost obolelih od reumatoidnog artritisa bila je $49,87 \pm 7,56$ godine (tabela 1). U grupi KO bilo je 90% žena (tabela 1). Nisu utvrđene statistički značajne razlike u polnoj strukturi ($p = 0,812$) i prosečnoj starosti ($p = 0,333$), bračnom statusu ($p = 0,233$), obrazovanju ($p = 0,917$) između grupa RA i KO.

Prosečna vrednost skora depresivnosti u grupi KO bila je $6,93 \pm 4,49$, a u grupi RA $17,48 \pm 11,74$. Utvrđena je visoko statistički značajna razlika u vrednostima skorova depresivnosti između grupa RA i KO ($p < 0,001$) (tabela 2).

Primenom Spielberger-ovog testa anksioznosti koji meri trenutnu i opštu anksioznost utvrđena je visoko statistički



Sl. 1 – Učestalost simptoma depresivnosti i anksioznosti u grupi bolesnika sa reumatoidnim artritisom (RA) i grupi zdravih osoba (kontrolna grupa)

U grupi anksiozno-depresivnih bolesnika najčešći su bili blagi poremećaji raspoloženja i umerena depresija (po 10/16,67%), a najmanje učestali teža (6/10%) i ekstremna depresija (3/5%) (slika 2).

Najveći broj obolelih od reumatoidnog artritisa pokazivao je visok stepen trenutne anksioznosti 48 (80,00%) i visok stepen generalne anksioznosti 58 (96,67%) (slika 3).

Tabela 1
Demografske karakteristike bolesnika sa reumatoidnim artritisom (grupa RA) i zdravih ispitanika (grupa KO)

Demografske karakteristike	Grupa RA	Grupa KO	<i>p</i>
Starost (godine), $\bar{x} \pm SD$	$49,87 \pm 7,56$	$48,30 \pm 6,42$	0,333
Pol (%)			0,812
muškarci	12	10	
žene	88	90	
Stručna sprema (%)			0,917
niža	37	30	
srednja	55	47	
viša	3	13	
visoka	5	10	
Bračni status (%)			0,233
da	88	83	
ne	5	7	
ostalo	7	10	

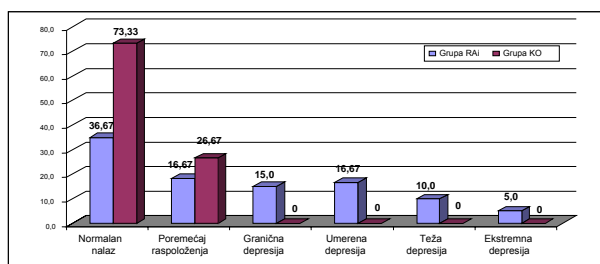
Tabela 2
Rezultati psiholoških testova kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom (grupa RA) i zdravih ispitanika (grupa KO)

Psihološki testovi	Grupa RA ($\bar{x} \pm SD$)	Grupa KO ($\bar{x} \pm SD$)	<i>p</i>
BDI	$17,84 \pm 11,74$	$6,93 \pm 4,49$	< 0,001
STAI-S	$49,45 \pm 6,81$	$40,73 \pm 8,01$	< 0,001
STAI-T	$53,42 \pm 5,55$	$41,63 \pm 7,83$	< 0,001

BDI – Beck Depression Inventory, STAI-S – State-Trait Anxiety Inventory: supskala trenutne anksioznosti, STAI-T – State-Trait Anxiety Inventory: supskala opšte anksioznosti

značajna razlika u vrednostima skorova anksioznosti između grupa RA i KO ($p < 0,001$) (tabela 2).

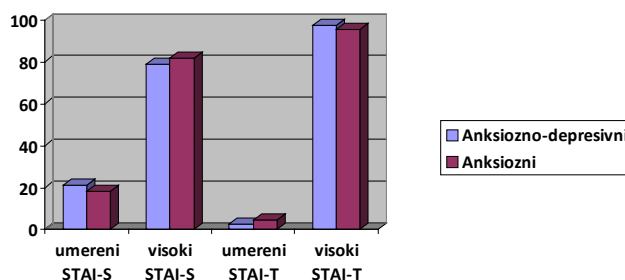
Rezultati detekcije poremećaja emocionalnosti korišćenjem Beck-ove skale depresije (BDI) i Spielberger-ovog testa anksioznosti u grupi RA pokazali su istovremeno prisustvo simptoma anksioznosti i depresivnosti kod 38 bolesnika (63,33%), a postojanje simptoma anksioznosti kod 22 (36,67%) bolesnika (slika 1). U grupi KO, 8 (26,67%) zdravih ispitanika pokazivalo je prisustvo blage anksiozno-depresivne simptomatologije, a 22 (73,33%) ispitanika prisustvo samo anksiozne simptomatologije.



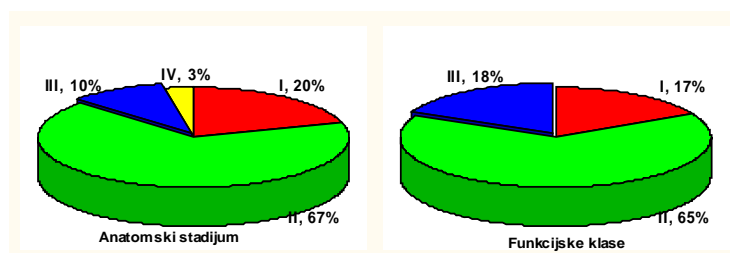
Sl. 2 – Distribucija stepena depresivnosti u grupi bolesnika sa reumatoidnim aratirtisom (RA) i grupi zdravih ispitanika (grupa KO)

Analizom anatomskih stadijuma prema Steinbrocker-u ustanovljeno je da su 52 (86,67%) bolesnika bila u anatomskom stadijumu I i II (slika 4). Najveći broj bolesnika, 39 (65%) pripadao je funkcijskoj klasi II, a skoro podjednak broj bolesnika funkcijskoj klasi I i III prema Steinbrocker-u (slika 4).

umereno aktivnu bolest, a 24 (40%) visoko aktivnu bolest. Rezultati ispitivanja funkcijskih sposobnosti bolesnika metodom upitnika HAQ pokazuju prosečne vrednosti od $0,88 \pm 0,67$ (tabela 3).



Sl. 3 – Distribucija nivoa trenutne (STAI-S) i opšte (STAI-T) anksioznosti u grupi bolesnika sa reumatoidnim artrititsom



Sl. 4 – Anatomski stadijum i funkcijske klase u grupi bolesnika sa reumatoidnim artrititsom po Steinbrocker-u

Mere centralne tendencije ocena aktivnosti bolesti, preko indeksa aktivnosti bolesti, prikazane tabelarno, pokazuju da je prosečna dužina trajanja bolesti $9,28 \pm 7,96$ godina, a prosečna vrednost aktivnosti bolesti – DAS28 u grupi RA $4,93 \pm 0,85$ (tabela 3). Ukupno 36 (60%) bolesnika imalo je

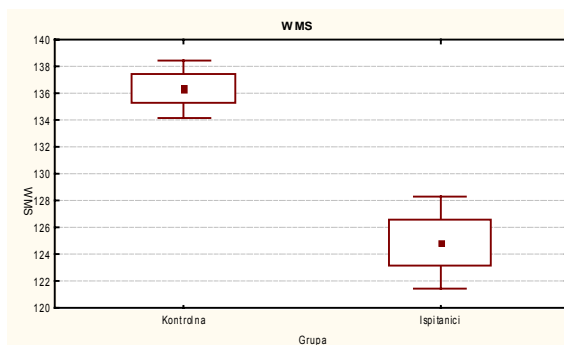
Prosečne vrednosti koeficijenta pamćenja dobijene primenom Wechsler-ove skale pamćenja bile su niže u grupi RA ($124,69 \pm 13,62$), u odnosu na grupu KO ($136,37 \pm 6,06$). Utvrđena je visoko statistički značajna razlika u koeficijentima pamćenja između grupe RA i grupe KO ($p < 0,001$) (slika 5).

Tabela 3

Prosečne vrednosti pokazatelja aktivnosti reumatoidnog artritisa (RA)

Metod za ocenu aktivnosti RA	$\bar{x} \pm SD$
Prosečna dužina trajanja bolesti (godine)	$9,28 \pm 7,96$
Anatomski stadijum	$2,00 \pm 1,71$
Funkcijska klasa	$2,06 \pm 1,71$
Indeks aktivnosti bolesti – DAS28	$4,93 \pm 0,85$
HAQ	$0,88 \pm 0,67$
Intenzitet bola po VAS (mm)	$55,33 \pm 20,95$

*DAS28 – Disease Activity Score 28; HAQ – Health Assessment Questionnaire; VAS – vizuelno analogna skala (0–100 mm)



Sl. 5 – Prosečne vrednosti koeficijentata pamćenja (WMS) u grupi bolesnika sa reumatoidnim artrititsom (ispitanici) i grupi zdravih osoba (kontrolna grupa)
Wechsler Memory Scale – WMS

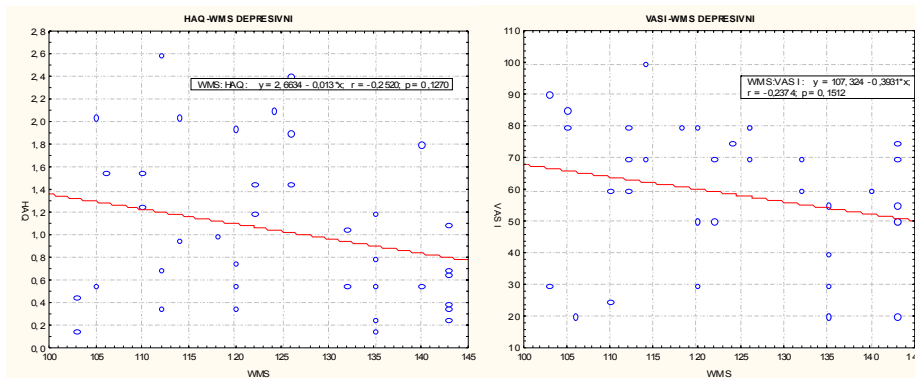
Prosečne vrednosti koeficijenta pamćenja nisu pokazivale statistički značajnu razliku između anksiozno-depresivnih (124,39) i anksioznih (125,68) bolesnika sa reumatoidnim artritisom ($p > 0,1$).

Ispitivanja povezanosti pokazatelja pamćenja sa pokazateljima aktivnosti bolesti ukazuju na slabu inverznu povezanost koeficijenta pamćenja (WMS) sa stepenom funkcijske sposobnosti, određenim HAQ indeksom i intenzitetom bola po VAS skali, kod anksiozno-depresivnih bolesnika ($p > 0,1$) (slika 6).

Korelacije koeficijenta pamćenja i pokazatelja aktivnosti bolesti u grupi RA prikazane su u tabeli 4.

U grupi anksiozno-depresivnih bolesnika ustanovljena je značajna razlika u vrednostima koeficijenta pamćenja u odnosu na intenzitet bola na VAS skali ($p = 0,05$) (slika 8).

Anksiozno-depresivni bolesnici sa najintenzivnijim bolom (VAS > 75 mm) imali su statistički značajno niže vrednosti koeficijenta pamćenja u odnosu na bolesnike sa malim i srednjim intenzitetom bola ($p < 0,05$).



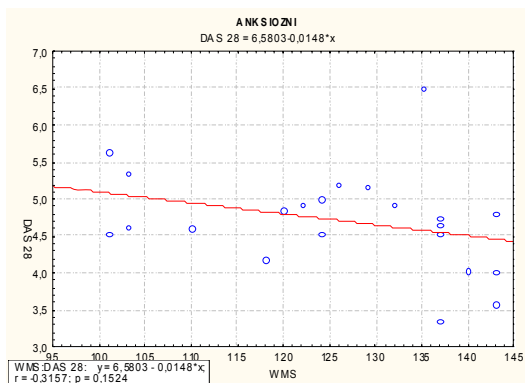
Sl. 6 – Korelacije koeficijenta pamćenja (WMS) sa funkcijom sposobnosti (HAQ) i intenzitetom bola (VAS I) kod anksiozno-depresivnih bolesnika
WMS – Wechsler Memory Scale; HAQ – Health Assessment Questionnaire

Tabela 4
Korelacije pokazatelja aktivnosti bolesti i koeficijenta pamćenja (WMS) kod anksiozno-depresivnih i anksioznih bolesnika sa reumatoidnim artritisom

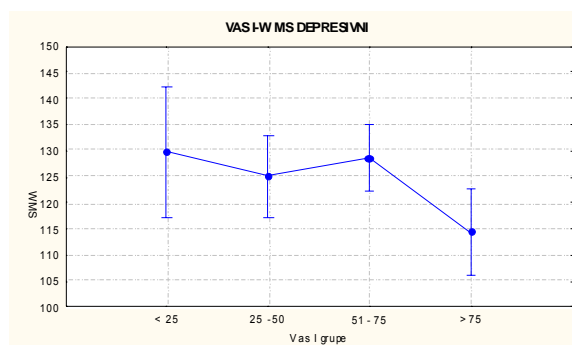
Pokazatelji aktivnosti bolesti	WMS	
	Anksiozno-depresivni	Anksiozni
Dužina trajanja bolesti	0,18	-0,15
Anatomski stadijum	0,00	-0,10
Funkcijska klasa	0,10	-0,03
DAS 28	0,06	-0,32
HAQ	-0,25	0,13
VAS I	-0,24	-0,02

DAS28 – Disease Activity Score 28, HAQ – Health Assessment Questionnaire, VAS – vizuelno analogna skala

Korelacija koeficijenta pamćenja i indeksa aktivnosti bolesti – DAS28 iznosila je $r = -0,3157$ ($p = 0,153$) kod anksioznih bolesnika (slika 7).



Sl. 7 – Korelacija koeficijenta pamćenja (WMS) i indeksa aktivnosti bolesti (DAS28) kod anksioznih bolesnika sa reumatoidnim artritisom
DAS28 – Disease Activity Score 28



Sl. 8 – Prosečne vrednosti koeficijenta pamćenja (WMS) anksiozno-depresivnih bolesnika u odnosu na intenzitet bola (VAS I)
VAS – vizuelno analogna skala; WMS – Wechsler Memory Scale

Primenom analize varijanse nismo ustanovili statistički značajnu razliku u srednjim vrednostima koeficijenta pamćenja ($p = 0,708$) u odnosu na težinu simptoma depresivnosti

kod anksiozno-depresivnih bolesnika u grupi RA. Nije ustanovljen statistički značajan uticaj interakcije težine depresije i intenziteta bola na pamćenje kod anksiozno-depresivnih bolesnika ($p > 0,05$).

Primenom testa najmanje značajne razlike ustanovili smo jedino statistički značajnu zavisnost stepena oštećenja funkcijskih sposobnosti (HAQ) od težine depresije ($p < 0,001$).

Diskusija

Interesovanje za proučavanje kognitivnih funkcija i njihovog kompleksnog odnosa sa bolom i raspoloženjem prisutno je u naučnoj i stručnoj javnosti zbog nekonzistentnih podataka koji postoje u dosadašnjim istraživanjima ovih relacija sa različitim aspektata.

Naše ispitivanje pokazalo je da su oboleli od reumatoidnog artritisa imali viši stepen poremećaja pamćenja u odnosu na zdrave ispitanike. Utvrđena je visoko statistički značajna razlika u koeficijentima pamćenja između obolelih od reumatoidnog artritisa ($124,69 \pm 13,62$) i zdravih ispitanika ($136,37 \pm 6,06$) ($p < 0,001$). Upoređivanjem prosečnih vrednosti sirovih skorova pojedinih supstestova utvrđena je statistički značajna razlika između obolelih od reumatoidnog artritisa i zdravih ispitanika na supstestovima mentalne kontrole, brojanja, vizuelnih reprodukcija ($p < 0,001$), kao i logičkog pamćenja ($p < 0,05$), ali nije ustanovljena razlika na suptestu asocijativnog pamćenja ($p > 0,1$).

Slične rezultate nalazimo u radu Appenzeler-a i sar.¹⁷ koji ukazuju na veću učestalost oštećenja kognitivnih funkcija kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom u odnosu na zdrave ispitanike, statistički značajnu u testovima verbalne fluentnosti, logičkog pamćenja i kratkotrajne memorije ($p < 0,05$), kao i na nepostojanje korelacije kognitivnih funkcija sa dužinom trajanja bolesti i funkcijskim sposobnostima. U skladu sa našim rezultatima su oni iz ispitivanja bolesnika sa reumatoidnim artritisom koje su sproveli Hanly i sar.¹⁸ primenom Weschsler-ove skale inteligencije (WAIS) i skale pamćenja (WMS-R). Oni su ukazali na česte kognitivne deficite kod ovih bolesnika, ali ne i na korelaciju između kognitivnih disfunkcija i aktivnosti bolesti.

Podaci iz literature ukazuju i na kompleksnost odnosa između bola, raspoloženja i kognicije, te na potrebu daljih istraživanja u cilju rasvetljavanja relativnog doprinosa bola kognitivnim disfunkcijama^{2,19}.

Mi smo ispitivali mogući uticaj bola na kognitivne sposobnosti primenom vizuelne analogne skale i Weschler-ove skale pamćenja u grupi RA u zavisnosti od emocionalnih manifestacija. Rezultati našeg ispitivanja nisu ukazali na postojanje statistički značajne razlike kod prosečnih vrednosti koeficijenta pamćenja između anksiozno-depresivnih ($124,39$) i anksioznih ($125,68$) bolesnika sa reumatoidnim artritisom ($p > 0,1$). Dobijeni rezultati nisu u skladu sa nalazima do kojih su došli Muñoz i sar.¹⁴ koji su ispitivanjem memorijskih smetnji kod 149 bolesnika sa hroničnim bolom ukazali na značajnije memorijske smetnje kod depresivnih bolesnika u odnosu na anksiozne i bolesnike koji su imali negativan stav, te preporučili razmatranje kognitivnih dis-

funkcija u zavisnosti od emocionalnih disfunkcija i stava bolesnika.

Kod anksiozno-depresivnih bolesnika ustanovili smo statistički značajnu razliku u vrednostima koeficijenta pamćenja u odnosu na intenzitet bola po vizuelnoj analognoj skali ($p < 0,05$). Koeficijent pamćenja pokazivao je slabu inverznu povezanost sa stepenom funkcijske sposobnosti, određenim pomoću HAQ indeksa i intenziteta bola na vizuelno-analognoj skali kod anksiozno-depresivnih bolesnika. Anksiozno-depresivni bolesnici sa najintenzivnijim bolom (VAS > 75) imali su statistički značajno niže vrednosti koeficijenta pamćenja u odnosu na bolesnike sa malim i srednjim intenzitetom bola ($p < 0,05$).

Slično našem ispitivanju pojedini autori naglašavaju statistički značajnu povezanost intenziteta bola i memorijskih sposobnosti bolesnika sa hroničnim bolom²⁰⁻²².

Savremene studije snimanja doprinose rasvetljavanju odnosa bola i kognicije. Ispitivanja kognitivnih funkcija sprovedena u uslovima bola uz primenu funkcionalne magnetne rezonance (MRI) pokazuju zavisnost kortikalne aktivnosti od jačine bola i težine zadataka²³. Neurokognitivne studije naglašavaju mogućnost istovremene aktivnosti neuronskih mreža koje podržavaju percepciju bola i kogniciju, što objašnjava povezanost kognitivnog deficita i bola koju smo i dokazali našim ispitivanjem^{2,4}. Smatra se da prednji cingularni korteks predstavlja integralnu komponentu neuronskog sistema koji posreduje u interakciji emocionalnog distresa izazvanog bolom i kognitivnog funkcionisanja. Hart i sar.²⁴ razmatraju maladaptivni fiziološki odgovor na stres i disregulaciju hipotalamohipofiznoadrenalne osovine kao mogući uzrok kognitivnih oštećenja, uključujući i poremećaje pamćenja kao posledicu sekundarnog uticaja na hipokampalnu funkciju²⁵. Studije neurosnimanja ukazuju i na smanjen volumen hipokampalne formacije kod obolelih sa major depresijom i poremećajima verbalnog pamćenja²⁶.

Pojedine studije naglašavaju veću povezanost emocionalnog distresa i kognitivnih poremećaja, a manji doprinos senzornodiskriminativnih aspektata bola nastanku i težini kognitivnih poteškoća²⁷⁻²⁹.

Primenom analize varijanse nismo ustanovili statistički značajnu razliku u srednjim vrednostima koeficijenta pamćenja u odnosu na težinu simptoma depresivnosti kod anksiozno-depresivnih bolesnika sa reumatoidnim artritisom ($p = 0,708$). Primenom testa najmanje značajne razlike ustanovili smo jedino statistički značajnu zavisnost stepena oštećenja funkcijskih sposobnosti (HAQ) od težine depresije ($p < 0,001$). Bolesnici sa umerenom, težom i ekstremnom depresijom imali su statistički značajno veće srednje vrednosti HAQ indeksa, tj. značajnija funkcionalna ograničenja. Nismo ustanovili statistički značajnu razliku u srednjim vrednostima intenziteta bola, DAS28, kao ni koeficijentima pamćenja u odnosu na težinu simptoma depresivnosti ($p > 0,05$). Rezultati našeg ispitivanja pokazali su da su anksiozno-depresivni bolesnici bili u proseku stariji u odnosu na anksiozne, lošijih funkcijskih sposobnosti, sa aktivnijom formom bolesti u odnosu na anksiozne ispitanike ($p < 0,05$). U grupi anksiozno-depresivnih bolesnika najčešći su bili prisutni blagi poremećaji raspoloženja i umerena depresija (po

10/16,67%), a najmanje učestali teža (6/10%) i ekstremna depresija (3/5%), što delimično objašnjava rezultate uticaja težine depresije na ispitivane parametre.

Nismo ustanovili statistički značajan uticaj interakcije težine depresije i intenziteta bola na pamćenje kod anksiozno-depresivnih bolesnika ($p > 0,05$).

Prisustvo psiholoških faktora predstavlja teškoće u ispitivanju uticaja bola na memoriju, što je razumljivo s obzirom na to da je kognicija u kompleksnoj neraskidivoj interakciji sa emocionalnim, motivacionim i motoričkim sistemima. Mogući uzrok kognitivnih deficita može biti snižena motivacija i inicijativa bolesnika sa hroničnim bolom koji je povezan sa depresijom. Faktori povezani sa bolom, kao što su depresija i problemi sa spavanjem (nisu bili predmet našeg rada) potencijalno utiču na kognitivne funkcije²⁹⁻³¹.

U istraživanju koje su vršili Brown i sar.³⁰ dokazana je značajna indirektna povezanost bola i kognicije, preko depresije, kod obolelih od reumatoidnog artritisa. Predloženi model kognitivnog funkcionisanja obolelih od reumatoidnog artritisa je kompatibilan sa nalazima kognitivnih disfunkcija kod bolesnika sa hroničnim bolnim stanjima (mišičnoskeletni bol, fibromijalgija), kada fizički i/ili psihološki distres utiču na pažnju koja je potrebna u kognitivno zahtevnim zadacima^{24,30}. Slične nalaze pokazuju ispitivanja povezanosti kako bola, tako i prateće depresije sa lošijim kognitivnim funkcijama kod obolelih sa mišičnoskeletnim bolom^{7,32}.

U toku ispitivanja ustanovili smo srednju inverznu korelaciju koeficijenta pamćenja i indeksa aktivnosti bolesti

(DAS28) ($r = -0,3157$; $p = 0,153$) kod anksioznih bolesnika sa reumatoidnim artritisom. Naše ispitivanje nije pokazalo statistički značajnu povezanost stepena trenutne ($p = 0,497$) i opšte anksioznosti ($p = 0,054$) sa poremećajima pamćenja kod anksioznih bolesnika. To nije u skladu sa ispitivanjem Grace i sar.²¹ koji naglašavaju povezanost opšte anksioznosti, ali ne i depresije sa poremećajima pamćenja. Stepent anticipacije bolnih simptoma koji je teško predvideti naročito kod obolelih sa visokim stepenom anksioznosti, predstavlja stresor koji ponavljano aktivira hipotalamohipofiznoadrenalnu osovinu i prednji cingularni korteks izazivajući kognitivna oštećenja. Objašnjenje za naše rezultate je veličina uzorka, i mala učestalost obolelih sa umerenim nivoom opšte anksioznosti (2/3,77%), pa samim tim i nemogućnost objektivnog upoređivanja sa bolesnicima koji imaju visok stepen anksioznosti.

Zaključak

Oboleli od reumatoidnog artritisa pokazali su u testovima viši stepen poremećaja pamćenja nego zdravi ispitanici.

Pamćenje je bilo jednako kod anksiozno-depresivnih i anksioznih bolesnika. U grupi anksiozno-depresivnih bolesnika sa reumatoidnim artritisom ustanovljena je značajna povezanost koeficijenta pamćenja sa intenzitetom bola.

Velika učestalost emocionalnih disfunkcija, kao i oštećenja memorijskih sposobnosti kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom zahtevaju pravovremenu dijagnostiku i adekvatan tretman.

L I T E R A T U R A

- Ginsburg KS, Wright EA, Larson MG, Fossel AH, Albert M, Schur PH, et al. A Controlled study of the prevalence of cognitive dysfunction in randomly selected patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Reum* 1992; 35(7): 776–82.
- Seminowicz DA, Davis KD. Pain enhances functional connectivity of a brain network evoked by performance of a cognitive task. *J Neurophysiol* 2007; 97(5): 3651–9.
- Roth RS, Geisser ME, Theisen-Goodrich M, Dixon PJ. Cognitive complaints are associated with depression, fatigue, female sex, and pain catastrophizing in patients with chronic pain. *Arch Phys Med Rehabil* 2005; 86(6): 1147–54.
- Dick BD, Rashiq S. Disruption of attention and working memory traces in individuals with chronic pain. *Anesth Analg* 2007; 104(5): 1223–9.
- Iverson GL, McCracken LM. "Postconcussive" symptoms in persons with chronic pain. *Brain Inj* 1997; 11(11):783–90.
- Eccleston C. Chronic pain and attention: a cognitive approach. *Br J Clin Psychol* 1994; 33(Pt 4): 535–47.
- Kenman DG, Vaishampayan N, Zald D, Han B. Cognitive impairment in musculoskeletal pain patients. *Int J Psychiatry Med* 1991; 21(3): 253–62.
- Denney DR, Sworowski LA, Lynch SG. Cognitive impairment in three subtypes of multiple sclerosis. *Arch Clin Neuropsychol* 2005; 20(8): 967–81.
- Smith BW, Zautra AJ. Vulnerability and resilience in women with arthritis: Test of a two-factor model. *J Consult Clin Psychol* 2008; 76(5):799–810.
- Katz PP, Yelin EH. Activity loss and the onset of depressive symptoms: do some activities matter more than other? *Arthritis Rheum* 2001; 44(5): 1194–202.
- Kostić A. Kognitivna psihologija. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2006.
- Patil PG, Apfelbaum JL, Zaccny JP. Effects of a cold-water stressor on psychomotor and cognitive functioning in humans. *Physiol Behav* 1995; 58(6): 1281–6.
- Lapien SJ, Gaudreau S, Tchütaya BM, Maben F, Sharma S, Nair NP, et al. Stress-induced declarative memory impairment in healthy elderly subjects: relationship to cortisol reactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(7): 2070–5.
- Muñoz M, Esteve R. Reports of memory functioning by patients with chronic pain. *Clin J Pain* 2005; 21(4): 287–91.
- Bruce JM, Bhalla R, Westervelt HJ, Davis J, Williams V, Tremont G. Neuropsychological correlates of self-reported depression and self-reported cognition among patients with mild cognitive impairment. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2008; 21(1): 34–40.
- Davidson RJ. Cognitive neuroscience needs affective neuroscience (and vice versa). *Brain Cogn* 2000; 42(1): 89–92.
- Appenzeller S, Bertolo MB, Costallat LT. Cognitive impairment in rheumatoid arthritis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2004; 26(5): 339–43.
- Hanly JG, Fisk JD, McCurdy G, Fougere L, Douglas JA. Neuropsychiatric syndromes in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005; 32(8): 1459–6.
- Seminowicz DA, Davis KD. Interactions of pain intensity and cognitive load: the brain stays on task. *Cereb Cortex* 2007; 17(6): 1412–22.
- Ling J, Campbell C, Heffernan TM, Greenough CG. Short-term prospective memory deficits in chronic back pain patients. *Psychosom Med* 2007; 69(2): 144–8.

21. *Grace GM, Nielson WR, Hopkins M, Berg MA.* Concentration and memory deficits in patients with fibromyalgia syndrome. *J Clin Exp Neuropsychol* 1999; 21(4): 477–87.
22. *Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK.* Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 2005; 9(4): 463–84.
23. *Gross RT, Collins FL.* On the relationship between anxiety and pain: a methodological confounding. *Clin Psychol Rev* 1981; 1: 375–86.
24. *Hart RP, Wade JB, Martelli MF.* Cognitive impairment in patients with chronic pain: the significance of stress. *Curr Pain Headache Rep* 2003; 7(2): 116–26.
25. *Kozzora E, Thompson LL, West SG, Kotzin BL.* Analysis of cognitive and psychological deficits in systemic lupus erythematosus patients without overt central nervous system disease. *Arthritis Rheum* 2001; 39(12): 2035–45.
26. *Bremner JD.* Does stress damage the brain? *Biol Psychiatry* 1999; 45(7): 797–805
27. *Schnurr RF, MacDonald MR.* Memory complaints in chronic pain. *Clin J Pain* 1995; 11(2): 103–11.
28. *Jamison RN, Sbrocco T, Parris WC.* The influence of problems with concentration and memory on emotional distress and daily activities in chronic pain patients. *Int J Psychiatry Med* 1988; 18(2): 183–91.
29. *Iezzli T, Archibald Y, Barnett, Klinck A, Duckworth M.* Neuro-cognitive performance and emotional status in chronic pain patients. *J Behav Med* 1999; 22(3): 205–16.
30. *Brown SC, Glass JM, Park DC.* The relationship of pain and depression to cognitive function in rheumatoid arthritis patients. *Pain* 2002; 96(3): 279–84.
31. *Cohen RA, Malloy PF, Jenkins MA.* Disorders of attention. In: *Snyder PJ, Nussbaum PD*, editors. *Clinical neuropsychology*. Washington, DC: American Psychological Association; 1998. p. 541–72.
32. *Ellis HC, Moore BA, Varner LJ, Ottaway SA, Becker AS.* Depressed mood, task organization, cognitive interference and memory: irrelevant thoughts predict recall performance. *J Soc Behav Pers* 1997; 12(2): 453–70.

Primljen 4. XII 2009.
Revidiran 16. XI 2010.
Prihvaćen 28. II 2010.



Efekat inaktivacije patogena primenom riboflavina i ultravioletnog zračenja na kvalitet trombocitnih koncentrata

Effectiveness of use of riboflavin and ultraviolet light for pathogen inactivation on quality of platelet concentrates

Zoran Stanojković*, Ana Antić*, Miodrag Stojanović†

*Zavod za transfuziju krvi, Niš, Srbija; †Medicinski fakultet, Institut za javno zdravlje, Niš, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Inaktivacija patogena u krvi i produktima od krvi predstavlja značajan korak u cilju dobijanja bezbedne krvi, što je jedan od prioriteta savremene transfuziološke prakse. Riboflavin (vitamin B2) aktiviran ultravioletnim (UV) zračenjem stvara aktivni kiseonik koji oštećuje ćelijsku membranu i sprečava replikaciju uzročnika bolesti (virusi, bakterije, protozoe) u krvnim komponentama. Cilj ovog rada bio je da se utvrdi uticaj procesa fotoinaktivacije patogena primenom riboflavina i UV zračenja na biohemijske i funkcionalne karakteristike trombocita dobijenih izdvajanjem iz „buffy coat“ (leukocitno-trombocitnog sloja). **Metode.** Ispitivanje je obuhvatilo 80 koncentrata trombocita izdvojenih iz „buffy coat“, dobijenog separacijom cele krvi dobrovoljnih davalaca krvi unutar šest sati od njenog uzimanja. Koncentrati trombocita su pulirani, pulovi filtrirani, a zatim podeljeni na 10 kontrolnih (K) i 10 ispitivanih (I) jedinica (pulova trombocita). Ispitivane jedinice trombocita tretirane su riboflavinom (35 mL) i UV zračenjem (6,24 J/mL, 265–370 nm) na aparatu Mirasol (Caridian BCT Biotechnologies, USA) u prosečnom trajanju od šest minuta. Kontrolnoj jedinici trombocita dodato je 35 mL fiziološkog rastvora. Uzorci za ispitivanje uzeti su iz kontrolnih i ispitivanih jedinica trombocita inicijalno (K₀ i I₀), nakon dodavanja fiziološkog rastvora (K₁), odnosno riboflavina (I₁), nakon izlaganja UV zračenju (I₂), prvog dana (K₃ i I₃) i petog dana skladištenja (K₄ i I₄). Iz uzoraka su određivani broj i

prinos trombocita, koncentracija rezidualnih eritrocita i leukocita, pH, pO₂, pCO₂ i bakteriološka ispravnost. **Rezultati.** Sve vrednosti ispitivanih parametara bile su značajno statistički niže u odnosu na vrednosti parametara iz uzorka K₀ i I₀. Sve vrednosti parametara prvog dana skladištenja trombocita (uzorci K₃ i I₃) bile su značajno statistički niže u odnosu na vrednosti parametara nakon dodavanja fiziološkog rastvora, odnosno riboflavina (uzorci K₁ i I₁). Takođe, sve vrednosti analiziranih parametara petog dana skladištenja (uzorci K₄ i I₄) bile su značajno statistički niže u odnosu na vrednosti parametara iz uzoraka K₁ i K₃, odnosno I₁ i I₃. Poređenjem svih analiziranih parametara petog dana ispitivanja (uzorci K₄ i I₄), nije nađena statistički značajna razlika između kontrolne i eksperimentalne grupe. Svi uzorci trombocita sačuvali su sterilnost do sedmog dana, koliko je praćena bakteriološka ispravnost. **Zaključak.** Trombociti inaktivisani primenom riboflavina i UV zračenja (Mirasol PRT sistem, Caridian BCT, USA) zadržavaju sve karakteristike određene Preporukama za pripremu, upotrebu i obezbeđenje kvaliteta komponenata krvi Saveta Evrope tokom celog perioda skladištenja (pet dana). Rezultati su dosledni podacima prethodnih *in vivo* i *in vitro* ispitivanja i potvrđuju da se trombociti tretirani na ovaj način mogu bezbedno primeniti u rutinskoj transfuziološkoj praksi.

Ključne reči:

krv, konzervacija; trombociti; trombociti, broj; vitamin B2; ultravioletni zraci; bakteriologija.

Abstract

Background/Aim. Pathogen inactivation in blood and blood products is one of the major means to achieve a zero risk blood supply and improve transfusion safety. Riboflavin (vitamin B2) activated by ultraviolet (UV) light, produces active oxygen which damages cell membrane and prevents replication of the carrier of diseases (viruses, bacteria, protozoa) in all blood products. The aim of this study was to establish the influence of the process of pathogens photoinactivation using riboflavin and UV rays on the biochemical and func-

tional characteristics of platelet concentrates prepared from “buffy coat”. **Methods.** The examination included 80 platelet concentrates prepared from “buffy coat”, which was separated from whole blood donated by voluntary blood donors around 6 hours from the moment of collection. Concentrates were pooled, filtered and separated into two groups: one consisted of 10 control units and the other of 10 examined units (pooled platelet concentrates). Examined units of the platelets were treated by riboflavin (35 mL) and UV rays (6.24 J/mL, 265–370 nm) on Mirasol apparatus (Caridian BCT Biotechnologies, USA) in approximate duration of 6 min. A

total of 35 mL of saline solution was added to the control units. The samples for examining were taken from the control and examined units initially (K₀, I₀), after the addition of saline (K₁) and riboflavin (I₁), after illumination (I₂), first day of storage (K₃, I₃) and the fifth day of storage (K₄, I₄). The following parameters were measured: platelet count and platelet yield, residual erythrocyte and leukocyte count, pH, pO₂, pCO₂ and bacterial contamination. **Results.** All the measured parameters showed a statistically significant decrease comparing to K₀ and I₀; all the results of the first day of platelet storage showed statistically significant decrease comparing to K₁ and I₁, and all the results of the fifth day of platelet storage (K₄, I₄) showed a statistically significant decrease comparing to K₁ and K₃ and to I₁ and I₃. There was no the mentioned difference in the measured parameters

between K₄ and I₄ (the end of storage – the fifth day). All the platelet units were sterile till the seventh day, when the investigation ended. **Conclusion.** Platelet concentrates inactivated by riboflavin and UV rays (Mirasol PRT sistem, Caridian BCT, USA) keep all the characteristics assessed by the Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components (Council of Europe), during the whole storage period (five days). The obtained data were correlated with existing up to date literature and demonstrated that Mirasol treated platelets were safe and could be incorporated effectively in the routine blood bank and transfusion setting.

Key words:
blood preservation; blood platelets; platelet count; riboflavin; ultraviolet rays; bacteriology.

Uvod

Transfuzije koncentrata trombocita sastavni su deo lečenja bolesnika sa trombocitopenijom nastalom zbog smanjene produkcije trombocita usled osnovne bolesti ili primene mijelotoksičnih lekova, potrošnje ili dilucije krvi, ali i nekih stanja povezanih sa disfunkcijom trombocita¹. Koncentrati trombocita mogu se dobiti separacijom iz jedinica cele krvi dobrovoljnih davalaca ili primenom separatora krvnih ćelija. Koncentrati trombocita iz cele krvi mogu se pripremati iz prethodno prikupljene plazme bogate trombocitima ili izdvajanjem iz *buffy coat* (leukocitno-trombocitnog sloja). Kvalitet pripremljenih koncentrata trombocita zavisi od velikog broja faktora, kao što su: metoda pripreme, dužina skladištenja, vrsta kese u kojoj se čuvaju, a u novije vreme i tehnika inaktivacije patogena².

Standardi koji se odnose na inaktivaciju patogena u krvnim komponentama, posebno u koncentratima trombocita, jedan su od preduslova bezbedne transfuzije. Inaktivacija patogena u krvnim komponentama ima ulogu uklanjanja odnosno inaktivacije svih uzročnika prenosivih bolesti putem krvi (virusi, bakterije, protozoe, prioni). Ona ne zamenjuje testiranje jedinica krvi dobrovoljnih davalaca na markere transfuzijom prenosivih bolesti, ali smanjuje opasnost od „prozor fenomena“ i deluje i na agense za koje testiranje trenutno nije dostupno, a mogu se preneti putem krvi^{3,4}. Postupci inaktivacije uzročnika transmisivnih bolesti temelje se na vezivanju raznih supstanci (psoralen, riboflavin, metilensko plavo), kao i delovanju ultravioletnog (UV) i gama zračenja, čime se sprečava replikacija nukleotida DNA i RNA, inhibira proliferacija T-limfocita i prevenira bolest kalema protiv domaćina – *Graft-versus-host-disease* (GVHD), suprimira sinteza citokina i opasnost od pojave posttransfuzionih febrilnih reakcija^{5,6}.

Prva metoda inaktivacije patogena koja je ušla u rutinsku transfuziološku praksu u velikom broju evropskih zemalja jeste primena amotosalena u kombinaciji sa UV zračenjem. Danas je najzastupljenija metoda inaktivacije patogena primenom riboflavina i UV zračenja, koja ima oznaku CE za primenu u plazmi i trombocitima⁷.

Riboflavin (vitamin B2) je prirodno prisutno jedinjenje i esencijalni humani hranjivi sastojak. Izuzetno je efikasan u

inaktivaciji patogena, ako se izloži vidljivom ili UV zračenju, jer stvara aktivne forme kiseonika koje oštećuju ćelijsku membranu, čime se sprečava replikacija uzročnika bolesti u svim produktima krvi^{8,9}. Riboflavin je netoksičan, kao i njegovi razgradni produkti, i normalno je prisutan u ljudskom organizmu. On ima planarnu konjugovanu prstenastu strukturu sa lancem šećera koji mu daje hidrosolubilni karakter. Planarni deo molekula umeće se između baza DNA i RNA, a UV zračenje, koje aktivira riboflavin, oksiduje guanin u nukleinskim kiselinama, sprečavajući replikaciju genoma patogena. Riboflavin ne deluje na eritrocite i trombocite, jer te ćelije nemaju jezgro, kao ni na proteine plazme, a ne izdvaja se naknadno iz krvne komponente, jer je normalno prisutan u organizmu i brzo se razgrađuje^{10,11}.

Izlaganje koncentrata trombocita mehaničkim i hemijskim agensima može imati štetan uticaj na ćelijski integritet u smislu pojačanja procesa glikolize, aktivacije morfoloških promena i apoptoze u trombocitima, a postoji i opasnost od stvaranja neoantigena i, time, stvaranja iregularnih antitela čije kliničke posledice još uvek nisu poznate¹².

Cilj ovog rada bio je da se utvrdi uticaj procesa fotoinaktivacije patogena primenom riboflavina i UV zračenja na biohemijske karakteristike trombocita dobijenih izdvajanjem iz *buffy coat*.

Metode

Ispitivanje je obuhvatilo ukupno 80 koncentrata trombocita, prosečne zapremine 59,80 ± 7,20 mL, koji su podvrgnuti procesu inaktivacije na aparatu Mirasol (Mirasol™ Pathogen Reduction Technology System, Caridian BCT Biotechnologies, Lakewood, Colorado, USA) prema unapred utvrđenom protokolu. Koncentrati trombocita dobijeni su izdvajanjem iz *buffy coat*, koji je dobijen separacijom jedinica krvi dobrovoljnih davalaca (prosečne zapremine 450 mL) u roku do šest sati od uzimanja krvi (četvorostruke kese Macopharma CPD/SAGM, Francuska) na automatskom ekstraktoru T-ACE II (Terumo, Japan). Zatim su pulirana po četiri koncentrata trombocita iste krvne grupe (ukupno 20 pulova: A = 8, B = 4, O = 6, AB = 2) i pulovi su ostavljeni 2 sata na tempertauri od oko 22°C bez agitacije. Spojena su po dva

pula trombocita iste krvne grupe (ukupno 10 pulova od po osam koncentrata trombocita: A = 4, B = 2, O = 3, AB = 1), svaki je filtriran (filter za leukoredukciju trombocita – Imugard III-PL, Terumo, Japan), a zatim podeljen na dva pula trombocita jednake zapremine, od kojih je jedna jedinica bila kontrolna (K), a druga ispitivana (I), tretirana Mirasol PRT sistemom (ukupno 10 kontrolnih i 10 ispitivanih pulova trombocita).

Specifikacije trombocita tretiranih Mirasol PRT sistemom podrazumevale su standarde usvojene od proizvođača (Caridian BCT, USA): zapremina produkta 170–360 mL, koncentracija trombocita $0,8\text{--}2,1 \times 10^6$ ćelija/ μL , koncentracija rezidualnih eritrocita $\leq 5 \times 10^9$ po $3,5 \times 10^{11}$ trombocita, koncentracija rezidualnih leukocita $\leq 250 \times 10^9$ po $3,5 \times 10^{11}$ trombocita.

Kontrolnoj jedinici dodato je 35 mL fiziološkog rastvora u kesi za skladištenje trombocita (rok skladištenja 5 dana), a ispitivanoj 35 mL 500 $\mu\text{mol/L}$ rastvora riboflavina u originalnoj kesi za iluminaciju (Mirasol *Platelet Illumination/Storage set*), kako bi se postigla finalna koncentracija riboflavina 65–70 $\mu\text{mol/L}$. Rastvor riboflavina priključen je za kesu za iluminaciju, koja u sebi sadrži trombocite, preko sterilnog konektora (TSCD Terumo, Japan). Ispitivana jedinica potom je postavljena u Mirasol iluminator prema uputstvu proizvođača i podvrgnuta delovanju UV zračenja (6,24 J/mL, 265–370 nm) u prosečnom trajanju od 6 minuta. Obe jedinice (kontrolna i ispitivana) postavljene su horizontalno na agitator (Teknolabo Instruments, Italy) od isteka roka (5 da-

(K₀ – inicijalno, odmah nakon formiranja kontrolnog pula, pre dodavanja fiziološkog rastvora, K₁ – posle dodavanja fiziološkog rastvora, K₃ – prvog dana skladištenja, K₄ – petog dana skladištenja). Iz uzoraka su rađene hematološke analize – koncentracija trombocita, rezidualnih eritrocita i leukocita na aparatu Beckman Coulter AcT diff (Beckman Coulter, USA) i gasne analize – pH, pO₂, pCO₂ na aparatu AVL Compact 3 Blood Gas Analyzer (Roche Diagnostics). Bakteriološka ispravnost trombocita ispitivana je na aparatu BacT/ALERT 3D (Biomérieux, Francuska), za aerobne bakterije BPA bočice, za anaerobne BPN bočice.

Analizirani parametri prikazani su tabelarno, srednjim vrednostima i standardnim devijacijama. Poređenje ponovljenih merenja unutar jedne grupe (kontrolna grupa – K₀, K₁, K₃ i K₄, tj. ispitivana grupa – I₀, I₁, I₂, I₃ i I₄) vršeno je Studentovim *t*-testom za zavisne uzorke, dok je poređenje parametara između kontrolne i ispitivane grupe vršeno Studentovim *t*-testom za nezavisne uzorke. Statistička značajnost je određivana na nivou $p < 0,05$, primenom softverskog paketa SPSS, verzija 18 (SPSS Software GmbH, Germany).

Rezultati

Prosečna zapremina kontrolnog pula trombocita iznosila je $272,7 \pm 15,8$ mL, dok je prosečna zapremina ispitivanog pula trombocita iznosila $278,4 \pm 18,4$ mL. Osnovne karakteristike posmatranih pulova trombocita prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1

Karakteristike pulova trombocita

Red. broj	Broj pula	Masa K (g)	Zapremina K (mL)	Masa I (g)	Zapremina IU (mL)
I	J10010903876600	278	263	294	277
II	J10010903866500	305	288	310	293
III	J10010903876700	286	270	294	277
IV	J10010903876800	296	280	307	290
V	J10010903866600	280	265	282	267
VI	J10010903866700	276	261	280	265
VII	J10010903866800	297	280	303	287
VIII	J10010903866900	286	270	289	273
IX	J10010903867000	290	274	292	276
X	J10010903867100	292	276	295	279
\bar{x}		288,6	272,7	294,6	278,4

K – kontrolni uzorak (trombociti + 35 mL fiziološkog rastvora);

I – ispitivani uzorak (trombociti + 35 mL riboflavina)

na), uz proveru temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) i zaštitu od okolne svetlosti.

Svi pulovi trombocita, prema Preporukama za pripremu, upotrebu i obezbeđenje kvaliteta komponenata krvi Saveta Evrope¹³, kontrolisani su po utvrđenim parametrima, čime se potvrdio kvalitet proizvoda i osigurala bezbednost i efikasnost transfuzije. Iz ispitivane jedinice uzeto je pet uzoraka – I₀–I₄ (I₀ – inicijalno, odmah nakon formiranja ispitivanog pula, pre dodavanja riboflavina, I₁ – posle dodavanja riboflavina, a pre iluminacije, I₂ – posle završene iluminacije, I₃ – prvog dana skladištenja, I₄ – petog dana skladištenja), a iz kontrolne jedinice uzeta su četiri uzorka – K₀–K₁ i K₃–K₄

Rezultati ispitivanih parametara iz uzoraka kontrolne grupe trombocita prikazani su u tabeli 2.

Poređenjem srednjih vrednosti analiziranih parametara u kontrolnoj grupi uočava se statistički značajno smanjenje vrednosti ovih analiziranih parametara tokom perioda skladištenja. Vrednosti svih parametara bile su statistički značajno niže u odnosu na vrednosti parametara iz uzorka K₀; sve vrednosti parametara prvog dana skladištenja trombocita (uzorci K₃) bile su statistički značajno niže u odnosu na vrednosti parametara nakon dodavanja fiziološkog rastvora (uzorci K₁), i sve vrednosti analiziranih parametara petog dana skladištenja (uzorci K₄) bile su statistički značajno niže u odnosu

Tabela 2

Analizirani parametri kontrolne grupe				
	K ₀ ($\bar{x} \pm SD$)	K ₁ ($\bar{x} \pm SD$)	K ₃ ($\bar{x} \pm SD$)	K ₄ ($\bar{x} \pm SD$)
pH	7,17 (0,07)	7,16 \pm 0,07 ^A	7,15 \pm 0,06 ^{A,B}	7,14 \pm 0,04 ^{A,B,C}
pO ₂ (mmHg)	141,69 (11,03)	139,33 \pm 11,43 ^A	133,26 \pm 8,21 ^{A,B}	125,02 \pm 8,19 ^{A,B,C}
pCO ₂ (mmHg)	53,46 (2,32)	49,63 \pm 3,70 ^A	33,71 \pm 4,31 ^{A,B}	25,74 \pm 2,86 ^{A,B,C}
Broj trombocita ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1,08 (0,12)	1,06 \pm 0,12 ^A	0,99 \pm 0,11 ^{A,B}	0,93 \pm 0,09 ^{A,B,C}

^A - $p < 0,05$ vs K₀; ^B - $p < 0,05$ vs K₁; ^C - $p < 0,05$ vs K₁ i K₃

K₀ – kontrolni uzorak inicijalno; K₁ – kontrolni uzorak posle dodavanja fiziološkog rastvora; K₃ – kontrolni uzorak prvog dana ispitivanja; K₄ – kontrolni uzorak petog dana ispitivanja

na vrednosti parametara iz uzoraka K₁ i K₃. Inicijalni prinos trombocita kontrolne grupe iznosio je $2,96 \times 10^{11}$ trombocita, dok je prinos trombocita petog dana skladištenja iznosio $2,53 \times 10^{11}$ trombocita.

Rezultati ispitivanih parametara iz uzoraka ispitivane grupe trombocita prikazani su u tabeli 3.

koji se mogu preneti putem krvi, ali se za sada ne vrši obavezno testiranje na njihovo prisustvo zbog niske prevalencije u opštoj populaciji, nepoznatog stepena transmisije putem transfuzije krvi ili nedostatka adekvatnog testa za otkrivanje tog infektivnog agensa. To mogu biti virusi (kao što su Flavivirusi Den-1-Den-4, virus St. Louis encefalitisa, Togavirusi

Tabela 3

Analizirani parametri ispitivane grupe					
	I ₀ ($\bar{x} \pm SD$)	I ₁ ($\bar{x} \pm SD$)	I ₂ ($\bar{x} \pm SD$)	I ₃ ($\bar{x} \pm SD$)	I ₄ ($\bar{x} \pm SD$)
pH	7,17 \pm 0,07	7,17 \pm 0,07 ^A	7,16 \pm 0,07 ^{A,B}	7,15 \pm 0,05 ^{A,B,C}	7,13 \pm 0,04 ^{A,B,C,D}
pO ₂ (mmHg)	141,39 \pm 9,26	139,20 \pm 8,20 ^A	138,27 \pm 9,16 ^{A,B}	133,11 \pm 8,38 ^{A,B,C}	125,54 \pm 8,35 ^{A,B,C,D}
pCO ₂ (mmHg)	54,00 \pm 2,69	52,94 \pm 3,14	49,11 \pm 3,44 ^{A,B}	28,28 \pm 5,50 ^{A,B,C}	22,92 \pm 4,40 ^{A,B,C,D}
Broj Trombocita ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1,08 \pm 0,12	1,05 \pm 0,12 ^A	1,03 \pm 0,11 ^{A,B}	0,98 \pm 0,10 ^{A,B,C}	0,92 \pm 0,10 ^{A,B,C,D}

^A - $p < 0,05$ vs K₀; ^B - $p < 0,05$ vs K₁; ^C - $p < 0,05$ vs K₁ i K₃

I₀ – ispitivani uzorak inicijalno; I₁ – ispitivani uzorak posle dodavanja riboflavina; I₂ – ispitivani uzorak nakon UV zračenja; I₃ – ispitivani uzorak prvog dana ispitivanja; I₄ – ispitivani uzorak petog dana ispitivanja

Poređenjem srednjih vrednosti analiziranih parametara ispitivane grupe, takođe, uočava se statistički značajno smanjenje tokom perioda skladištenja trombocita, sa istim odnosom kao i u kontrolnoj grupi, sem kod parcijalnog pritiska CO₂, gde nema statistički značajnog smanjenja u grupi I₁ u odnosu na I₀. Inicijalni prinos trombocita ispitivane grupe iznosio je $3,03 \times 10^{11}$ trombocita, dok je prinos trombocita petog dana skladištenja iznosio $2,57 \times 10^{11}$ trombocita.

Poređenjem svih analiziranih parametara petog dana ispitivanja (uzorci K₄ i I₄), ne uočava se statistički signifikantna razlika između kontrolne i ispitivane grupe.

Svi uzorci trombocita sačuvali su sterilnost do sedmog dana, koliko je praćena bakteriološka ispravnost. U uzorcima nije utvrđeno prisustvo rezidualnih leukocita i eritrocita.

Diskusija

Rizik od virusne i bakterijske transmisije transfuzijom produkata od krvi danas je sveden na minimum u većini evropskih zemalja. U rutinsku transfuziološku praksu uvedeni su osetljivi testovi (anti-HIV 1 i 2, anti-HCV, anti-HBe, anti-HTLV I/II) za testiranje krvi dobrovoljnih davalaca, a poslednjih godina u razvijenim zemljama sveta uvedena je NAT (*nucleic acid-based tests*) metoda, što je značajno snizilo rizik prenošenja ovih virusnih agenasa putem transfuzije produkata od krvi (rizik da se prenese uzročnik bolesti putem transfuzije jedinice krvi iznosi 1/1,9 miliona za HIV, 1/1,6 miliona za HCV)^{14,15}. Poseban problem u savremenoj transfuziološkoj praksi, međutim, predstavljaju patogeni agensi

si zapadnog i istočnog konjskog encefalitisa, Chikungunya, respiratorni *Corona* virusi, *Circovirus* TT i SEN, *Deltavirus* Hepatitis D, Epstein-Barrov virus, humani herpes virusi 6, 7 i 8, Parvovirus B19), protozoe (*Babesia microti*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*), bakterije – gram pozitivne i gram negativne (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borelia burgdoferi*) ili prioni (izazivaju Creutzfeldt-Jakobovu bolest)¹⁶⁻¹⁸. Svemu navedenom treba dodati i činjenicu da se svake dve do tri godine pojavljuju novi virusi koji se mogu preneti transfuzijama produkata krvi. S druge strane, koncentracije trombocita pokazuju posebno povećan rizik od bakterijske kontaminacije, s obzirom na uslove skladištenja (temperatura od 22 ± 2 °C). Prema savremenim ispitivanjima, minimum bakterijske kontaminacije trombocita posle pet dana čuvanja na sobnoj temperaturi je oko $10^7/\text{mL}$ ¹⁹.

Inaktivacija patogena u produktima od krvi predstavlja dodatni nivo zaštite, kako od poznatih infektivnih agenasa, tako i od onih koji još uvek nisu prepoznati kao moguća pretnja globalnom snabdevanju krvlju¹⁴. Danas se koriste različite fizičke i hemijske metode inaktivacije patogena, koje zadovoljavaju osnovne propisane kriterijume: redukcija incidencije virusne, bakterijske i parazitarne transmisije transfuzijom produkata od krvi na najmanji mogući nivo, široka efikasnost u smislu prevencije transfuzijom uzrokovane epidemije novog štetnog patogena, laka implementacija u postojeću organizaciju transfuziološke službe, minimalna toksičnost, nepromenjena klinička efikasnost inaktivisanih produ-

kata od krvi, niska cena^{7, 15, 20}. U ovom ispitivanju korišćena je metoda dodavanja riboflavina puliranom koncentratu trombocita i naknadno izlaganje produkta UV zračenju sa obe strane. Kao posledica aktivacije riboflavina pod dejstvom UV zraka dolazi do oksidacije guanina u nukleinskim kiselinama i njihovog ireverzibilnog oštećenja, što sprečava dalju replikaciju patogena. Mnogobrojne studije do sada pokazale su da ova metoda efikasno inaktivira intraćelijski i za ćeliju vezani virus humane imunodeficijencije – HIV (4,46 i 5,93 log₁₀/mL, respektivno), virus zapadnog Nila (5,19 log₁₀/ml), virus Parvo B19 (> 6,5 log₁₀/mL), virus vezikularnog stomatitisa (> 5,3 log₁₀/mL), *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* (5–6 log₁₀/mL), *Escherichia coli* (> 4 log₁₀/mL), *Leishmania donovani infantum* (5–6 log₁₀/mL), a dokazano je i da prevenira infekciju prouzrokovanu bakterijama *Klebsiella pneumoniae* i *Bacillus cere*^{17, 21–23}.

Kvalitet koncentrata trombocita prema usvojenim standardima određuje se na osnovu praćenja određenih parametara: koncentracija i prinos trombocita, pH, pO₂, pCO₂, koncentracija laktata, potrošnja glukoze, ekspresija GMP-140. Dosadašnja ispitivanja funkcije tretiranih trombocita *in vitro* pokazuju da ne postoji značajna promena u prinosu trombocita nakon primene riboflavina i UV zračenja. Morfologija trombocita je dobro očuvana, ali trombociti pokazuju povećanu aktivaciju i ćelijski metabolizam, sa povećanjem potrošnje, odnosno smanjenjem koncentracije glukoze, povećanjem produkcije laktata, blagim padom pH, pojavom mikropartikula i povećanjem ekspresije P-selektina tokom perioda skladištenja^{19, 24}. Ove promene su identične u tretiranim pojedinačnim koncentratima trombocita, tretiranim puliranim koncentratima i tretiranim afereznim koncentratima trombocita^{25, 26}. Ovo ispitivanje pokazalo je da primena riboflavina i UV zračenja ne dovodi do promene broja trombocita, pH, pO₂ i pCO₂ u tretiranim puliranim koncentratima trombocita, kao i da se taj kvalitet zadržava i posle pet dana skladištenja trombocita.

Najnovija ispitivanja pokazala su da su promene opisane u literaturi daleko manje izražene, ako se umesto u plazmi, trombociti resuspenduju u mešavini od 35% plazme i 65% aditivne solucije za trombocite (PAS – *platelet additive*

solution)^{24, 27}. Trombociti koriste glukozu kao glavni izvor energije za stvaranje adenozin-trifosfata (ATP) kroz proces aerobne oksidativne fosforilacije korišćenjem piruvata ili kroz proces anaerobne glikolize. Oksidativna fosforilacija zahteva adekvatnu mitohondrijalnu i enzimsku aktivnost i strukturni integritet²⁸. Picker i sar.²⁹ u najnovijim ispitivanjima pokazali su da primena riboflavina i UV zračenja ne menja mitohondrijalnu dehidrogenaznu aktivnost, odnosno da trombociti ostaju funkcionalni i metabolički aktivni. Potrošnja glukoze direktno korelira sa koncentracijom laktata u tretiranim koncentratima trombocita. Goodrich⁸ i Goodrich i sar.³⁰ u brojnim *in vivo* ispitivanjima pokazali su da povećanje koncentracije laktata najviše korelira sa oporavkom trombocita, a vrednost pH, koja je praćena i u ovom ispitivanju, sa njihovim preživljavanjem.

Dosadašnja ispitivanja pokazala su, takođe, da su bolesnici koji su primili transfuzije trombocita inaktivisanih primenom riboflavina i UV zračenja imali uporedive hemostatske i hematološke parametre nakon transfuzije trombocita sa bolesnicima koji su primili transfuzije netretiranih kontrolnih koncentrata trombocita^{19, 25, 31}. Takođe, nisu zabeležene neželjene reakcije nakon transfuzije u ovoj grupi bolesnika. Neželjene reakcije davaoca protiv primaoca, kao što je transfuzijom uzrokovana bolest „kalem protiv domaćina“ (TAGVHD) nastaju kao posledica prisustva rezidualnih leukocita u proizvodima krvi^{5, 14}. U transfuziološkoj praksi ulažu se veliki naponi da se takve reakcije inhibiraju, a to uključuje leukoredukciju i izlaganje proizvoda krvi UV zračenju, što je upravo deo tehnike inaktivacije.

Zaključak

Trombociti inaktivisani primenom riboflavina i UV zračenja (Mirasol PRT sistem, Caridian BCT, USA) zadržavaju sve karakteristike određene Preporukama za pripremu, upotrebu i obezbeđenje kvaliteta komponenata krvi Saveta Evrope, tokom celog perioda skladištenja (pet dana). Rezultati su dosledni podacima prethodnih *in vivo* i *in vitro* ispitivanja i potvrđuju da se trombociti tretirani na ovaj način mogu bezbedno primeniti u rutinskoj transfuziološkoj praksi.

L I T E R A T U R A

- Balint B, Paunović D, Stanojković Z. Hemotherapy for patients with hemostatic disorders. In: Balint B, editor. Transfusiology. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2004. p. 331–8. (Serbian)
- Maurer-Spurej E, Chipperfield K. Past and future approaches to assess the quality of platelets for transfusion. Transfus Med Rev 2007; 21(4): 295–306.
- Solheim BG. Pathogen reduction of blood components. Transf Apheres Sci 2008; 39(1): 75–82.
- Klein HG, Bryant BJ. Pathogen-reduction methods: advantages and limits. Vox Sang 2009; 4(1): 154–60.
- Klein HG, Anderson D, Bernardi MJ, Cable R, Carey W, Hoch JS, et al. Pathogen inactivation: making decisions about new technologies. Transfusion 2007; 47(12): 2338–47.
- McCullough J. Pathogen inactivation: a new paradigm for preventing transfusion-transmitted infections. Am J Clin Pathol 2007; 128(6): 945–55.
- Corbin F 3rd. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer. Int J Hematol 2002; 76(Suppl 2): 253–7.
- Goodrich RP. The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. Vox Sang 2000; 78(Suppl 2): 211–5.
- Goodrich RP, Edrich RA. The antiviral and antibacterial properties of riboflavin and light: applications to blood safety and transfusion medicine. In: Silva E, Edwards AM, editors. Comprehensive series in photochemistry and photobiology. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 2006.
- Kumar V, Lockertie O, Keil SD, Ruane PH, Platzer MS, Martin CB, et al. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. Photochem Photobiol 2004; 80(1): 15–21.
- Zhenling H, Yuwen M, Qin W, Xun Q, Kaibeng Q. Inactivation of lymphocytes in blood products using riboflavin photochemical

- treatment with visible light. *Photochem Photobiol* 2008; 84(5): 1195–200.
12. *Jansen GA, van Vliet HH, Vermeij H, Beckers EA, Leebeek FW, Sonneveld P*, et al. Functional characteristics of photochemically treated platelets. *Transfusion* 2004; 44(3): 313–9.
 13. *Council of Europe*. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Belgium, Brussels: European Directorate for the Quality of medicines, Recommendations No. R(95)15. 2008.
 14. *Luban NL*. Transfusion safety: Where are we today? *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1054: 325–41.
 15. *Mc Cullough J*. Pathogen inactivation of platelets. *Transf Alt Transf Med* 2006; 2:121–26.
 16. *Irshad M, Joshi YK, Sharma Y, Dhar I*. Transfusion transmitted virus: a review on its molecular characteristics and role in medicine. *World J Gastroenterol* 2006; 12(32): 5122–34.
 17. *Ruane PH, Edrich R, Gamp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP*. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion* 2004; 44(6): 877–85.
 18. *Allain JP, Bianco C, Blajchman MA, Brecher ME, Busch M, Leiby D*, et al. Protecting the blood supply from emerging pathogens: the role of pathogen inactivation. *Transfus Med Rev* 2005; 19(2): 110–26.
 19. *Goodrich RP, Li J, Pieters H, Crookes R, Roodt J, Heyns Adu P*. Correlation of in vitro platelet quality measurements with in vivo platelet viability in human subjects. *Vox Sang* 2006; 90(4): 279–85.
 20. *Goodrich RP, Roberts T, Folléa G*. Clinical evaluation of Mirasol PRT treated apheresis platelets in thrombocytopenic patients. *Transfusion* 2008; 48: 20A.
 21. *Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J*. The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci* 2006; 35(1): 5–17.
 22. *Fast LD, Dileone G, Li J, Goodrich R*. Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment. *Transfusion* 2006; 46(4): 642–8.
 23. *Cardo LJ, Rentas FJ, Ketchum L, Salata J, Harman R, Melvin W*, et al. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani* infantum in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Vox Sang* 2006; 90(2): 85–91.
 24. *Seghatchian J, de Sousa G*. Pathogen-reduction systems for blood components: the current position and future trends. *Transfus Apher Sci* 2006; 35(3): 189–96.
 25. *AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, Taylor H, Whitley P, Li J*, et al. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. *Transfusion* 2005; 45(8): 1335–41.
 26. *Perez-Pujol S, Tonda R, Lozano M, Fuste B, Lopez-Vilchez I, Galan AM*, et al. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion* 2005; 45(6): 911–9.
 27. *Janetzko K, Hinze K, Marschner S, Goodrich R, Klüter H*. Pathogen reduction technology (Mirasol) treated single-donor platelets resuspended in a mixture of autologous plasma and PAS. *Vox Sang* 2009; 97(3): 234–9.
 28. *Vučetić D, Balint B, Taseski J, Mandić-Radić S, Regović V*. Biochemical changes in thrombocyte concentrates stored for 5 days. *Vojnosanit Pregl* 2000; 57(5): 29–36. (Serbian)
 29. *Picker SM, Steisel A, Gathof BS*. Cell integrity and mitochondrial function after Mirasol-PRT treatment for pathogen reduction of apheresis-derived platelets: Results of a three-arm in vitro study. *Transfus Apher Sci* 2009; 40(2): 79–85.
 30. *Goodrich RP, Janssen M, Ghielli M, Li J, Leow S, Edrich R*, et al. Correlation of in vitro parameters and in vivo recovery and survival values for PRT treated platelets in normal human donors. *Transfusion* 2003; 43: 79A–80A.
 31. *Janetzko K, Hinze K, Marschner S, Goodrich R, Klüter H*. Evaluation of Different Preparation Procedures of Pathogen Reduction Technology (Mirasol®)-Treated Platelets Collected by Plateletpheresis. *Transfus Med Hemother* 2009; 36(5): 309–15.
- Primljen 11. XII 2009.
Revidiran 18. I 2010.
Prihvaćen 26. I 2010.



Therapeutic hypothermia and neurological outcome after cardiac arrest

Terapijska hipotermija i neurološki ishod nakon srčanog zastoja

Milovan Petrović*, Gordana Panić*, Aleksandra Jovelić*, Tibor Čanji*,
Ilija Srdanović*, Tanja Popov*, Miodrag Golubović†

Institute of Cardiovascular Diseases of Vojvodina, *Clinic of Cardiology,

†Clinic of Cardiovascular Surgery, Sremska Kamenica, Serbia

Abstract

Introduction/Aim. The most important clinically relevant cause of global cerebral ischemia is cardiac arrest. Clinical studies showed a marked neuroprotective effect of mild hypothermia in resuscitation. The aim of this study was to evaluate the impact of mild hypothermia on neurological outcome and survival of the patients in coma, after cardiac arrest and return of spontaneous circulation. **Methods.** The prospective study was conducted on consecutive comatose patients admitted to our clinic after cardiac arrest and return of spontaneous circulation, between February 2005 and May 2009. The patients were divided into two groups: the patients treated with mild hypothermia and the patients treated conservatively. The intravascular in combination with external method of cooling or only external cooling was used during the first 24 hours, after which spontaneous rewarming started. The endpoints were survival rate and neurological outcome. The neurological outcome was observed with Cerebral Performance Category Scale (CPC). Follow-up was 30 days. **Results.** The study was conducted on 82 patients: 45 patients (age 57.93 ± 14.08 years, 77.8% male) were treated with hypothermia, and 37 patients (age

62.00 ± 9.60 years, 67.6% male) were treated conservatively. In the group treated with therapeutic hypothermia protocol, 21 (46.7%) patients had full neurological restitution (CPC 1), 3 (6.7%) patients had good neurologic outcome (CPC 2), 1 (2.2%) patient remained in coma and 20 (44.4%) patients finally died (CPC 5). In the normothermic group 7 (18.9%) patients had full neurological restitution (CPC 1), and 30 (81.1%) patients remained in coma and finally died (CPC 5). Between the two therapeutic groups there was statistically significant difference in frequencies of different neurologic outcome ($p = 0.006$), specially between the patients with CPC 1 and CPC 5 outcome ($p = 0.003$). In the group treated with mild hypothermia 23 (51.1%) patients survived, and in the normothermic group 30 (81.1%) patients died, while in the group of survived patients 23 (76.7%) were treated with mild hypothermia ($p = 0.003$). **Conclusion.** Mild therapeutic hypothermia applied after cardiac arrest improved neurological outcome and reduced mortality in the studied group of comatose survivors.

Key words:

heart arrest; hypothermia, induced; neurologic manifestations; treatment outcome; mortality.

Apstrakt

Uvod/Cilj. Dokazano je da se blaga hipotermija, primenjena nakon srčanog zastoja, koristi u sprečavanju cerebralnog oštećenja kako za vreme srčanog zastoja, tako i nakon uspostavljanja reperfuzije. Cilj ove studije bio je da se utvrdi uticaj blage hipotermije na neurološki ishod i preživljavanje bolesnika u komi posle srčanog zastoja i spontanog uspostavljanja cirkulacije. **Metode.** U prospektivnu studiju uključeni su konsektivni bolesnici lečeni u našoj ustanovi od 2005. do 2009. godine, koji su bili u moždanoj komi nakon srčanog zastoja, a kod kojih je ponovo uspostavljena spontana cirkulacija. Bolesnici su bili podeljeni u

dve grupe: oni koji su lečeni hipotermijom i oni koji nisu. Korišćen je intravaskularni način hlađenja u kombinaciji sa spoljašnjim ili samo spoljašnje hlađenje u toku 24 časa, nakon čega su spontano zagrevani. Tokom 30 dana praćeno je preživljavanje i neurološki status skalom *Cerebral Performance Category* (CPC). **Rezultati.** Od ukupno 82 bolesnika u komi, 45 ($57,93 \pm 14,08$ godina, 77,8% mušaraca) lečeno je hipotermijom, a 37 ($62 \pm 9,6$ godina, 67,6% muškaraca) nije. U grupi lečenih hipotermijom 21 (46,7%) bolesnik imao je potpun neurološki oporavak (CPC 1), 1 (2,2%) ostao je u komi (CPC 4), a 20 (44,4%) umrlo je nakon perioda provedenog u komi (CPC 5). U drugoj grupi, 7 (18,9%) bolesnika imalo je potpuni neurološki oporavak

(CPC 1), a 30 (81,1%) umrlo je nakon perioda provedenog u komi (CPC 5). Između bolesnika lečenih hipotermijom i kontrolne grupe zabeležena je visoka statistički značajna razlika u neurološkom ishodu između grupa CPC 1 i 5 ($p = 0,003$). U grupi bolesnika lečenih hipotermijom, 23 (51,1%) je preživelo, dok je u kontrolnoj grupi umrlo njih 30 (81,1%) ($p = 0,003$). **Zaključak.** Blaga hipotermija do-

vela je do sniženja mortaliteta i poboljšanja neurološkog ishoda kod bolesnika u komi nakon srčanog zastoja.

Ključne reči:

srce, zastoj; hipotermija, izazvana hladnoćom; neurološke manifestacije; lečenje, ishod; mortalitet.

Introduction

Individually, the most significant clinically relevant cause of global cerebral ischemia is cardiac arrest. The frequency of cardiac arrest is estimated at 40 to 130 cases in 100,000 people per year^{1,2}. Unfortunately, a complete cerebral recovery is still rare. Almost 80% of the patients who experienced the return of spontaneous circulation remain comatose for more than one hour. One year after cardiac arrest only 10%–30% of patients survive with favourable neurological outcome³. Possibility for survival in patients with brain anoxia is dramatically increased by using protective and preservative hypothermia⁴. Therapeutic hypothermia has a long history as a treatment used for different purposes. Hippocrates recommended the use of cooling to stop bleeding. Fay used cooling of extremities in patients with tumors⁵. However, it was not until the 1950s, when effects of hypothermia on oxygen metabolism were studied more extensively, that hypothermia was used more often as a therapeutic method, especially in cardiac surgery. It was used for protection and preservation of the heart and the entire organism during the planned operative ischemia⁶. Soon afterwards, hypothermia was used in resuscitation after cardiac arrest and as a treatment of craniocerebral injuries. In the early 1990s it was found that mild hypothermia applied after cardiac arrest had beneficial effect on the brain protection; prevention of cerebral injury not only during arrest, but also after reperfusion. Similar results were obtained in craniocerebral injuries⁵.

Peter Safar made a significant contribution to the application of hypothermia in resuscitation so it became an important segment in the chain of survival⁵. For this reason, the aim of our study was to evaluate the impact of mild hypothermia on neurological outcome and survival of the patients in coma after cardiac arrest and return of spontaneous circulation.

Methods

The conducted study was prospective, and included the patients treated in our Clinic in the period from February 2005 to May 2009. It included consecutive patients in coma, after out-of-hospital cardiac arrest, who experienced return of spontaneous circulation (ROSC). Cardiopulmo-cerebral resuscitation was conducted by doctors providing emergency medical service according to the protocol of advance life support (ALS). The patients were divided into two groups: those who had been treated with hypothermia and those who had not (the control group). The study in-

cluded the patients able to receive therapeutic hypothermia within 240 minutes after spontaneous circulation having been restored. The study did not include patients with trauma and/or serious bleeding, terminal stage of the disease and/or pregnancy and/or coagulopathy, and the cases with more than 240 minutes after the return of spontaneous circulation. Cooling was performed according the International Liaison Committee on Resuscitation (ILCOR) protocol, which recommends that the body temperature of unconscious patients who experienced spontaneous return of circulation after cardiac arrest should be lowered to 32 to 34°C over a 12–24-hour period, when the initial rhythm was ventricular fibrillation. This manner of cooling is considered efficient in other disorders of heart rhythm leading to cardiac arrest⁷. The procedure applied was either intravascular cooling in combination with external cooling (38 patients) or external cooling (7 patients) with cooling pads (Emcools pads, Emergency cooling systems AG, Vienna, Austria). Through Swan-Ganz catheter placed in the pulmonary artery, infusions of cold saline (4°C) (physiological or Ringer's solution) were administered at dosage of 30 mL/kg at 100 mL/min. Ice packs were applied to body surface in the area of groin, chest, axilla, neck and head. Cooling lasted for 24 h, and after that the patients were spontaneously re-warmed. Analgosedation and myorelaxation were carried out on all the patients, and the patients were on invasive mechanical ventilation with intermittent positive pressure (IPPV Mod). The medicaments used in analgosedation are morphine sulphate 5 mg intravenously, midazolam 15 mg intravenously. Pancuronium 0.1 mg/kg was administered intravenously for myorelaxation. Continuous analgosedation was performed by intravenous infusion of propofol (600 mg). Continuous monitoring of temperature was performed using Swan-Ganz catheter placed in the pulmonary artery. When only external cooling was applied, the pads were placed on the chest, back and limbs. All the patients received invasive manner of measuring arterial pressure and hourly diuresis was monitored, as well. Parameters of pulmonary circulation pressure were checked as well as continuous ECG monitoring. Primary attention was paid to survival rate and neurological status of the patients. Cardiac status was checked by clinical examination, echocardiographically and invasively, using parameters of cardiac microcatheterisation, arterial pressure and coronary angiography⁶. Neurological status was observed by clinical examination and non-invasive diagnostic imaging techniques (CT and NMR), as well as Glasgow Coma Score (GCS)⁸ and Cerebral Performance Category Scale (CPC)⁹. The patients were observed for 30 days.

Cerebral Performance Categories are:

- Favourable neurological outcome: the patient is conscious, able to work and have normal life; may have slight psychological or neurological deficit (mild dysphasia, mild hemiparesis, or minimal dysfunction of cranial nerves);
- Moderate cerebral injury: the patient is conscious, able to work part-time in certain environment, able to perform daily activities (getting dressed, using public transport, and preparing food). The patient may suffer from hemiplegia, ataxia, dysarthria, dysphagia or constant disorder of memory and mental status;
- Serious brain injury: the patient is conscious, needs assistance in performing daily activities. There is a wide range of brain function disorders including memory disorder, dementia, inability to communicate;
- Coma, vegetative state: the patient is not conscious;
- Death: Verified brain death or death verified by means of traditional criteria.

Parameters of descriptive statistics used in the study were arithmetic mean, standard deviation, and relative numbers. Analytical statistical methods applied to this study were the method of identification of empirical distributions and the method of evaluation of significant difference (*t*-test and χ^2 test).

Results

The study included 82 patients. Therapeutic hypothermia was applied to 45 patients, while 37 patients were

not subjected to hypothermia. The average target temperature was 33.3°C. The most important characteristics of the patients at the beginning of the study are presented in Table 1.

After 30 days of observations, in the group of patients who were cooled, a total of 21 (46.7%) patients had good neurological outcome with CPC 1, three (6.7%) patients had almost completely good neurological outcome with CPC 2, one (2.2%) patient remained comatose with CPC 4, whereas 20 (44.4%) of the patients remained comatose and died with CPC 5. Out of all the patients who were not cooled, seven (18.9%) had completely good neurological outcome with CPC 1, whereas 30 (81.1%) patients remained comatose and finally died with CPC 5. Comparing the group of patients treated with hypothermia and the group of patients who were not treated with hypothermia, there was a high statistically significant difference in frequency of different neurological outcomes ($p = 0.006$), and between the CPC 1 and 5 ($p = 0.003$) (Table 2).

In the group with hypothermia 23 (51.1%) patients survived. In the group of normothermic patients seven (18.9%) patient survived, and 30 (81.1%) patients died. Comparing the total number of the patients who survived, 23 (76.7%) were in the group treated with hypothermia ($p = 0.003$) (Table 2).

The patients had no complications during the treatment with therapeutic hypothermia.

Table 1

Baseline characteristics of the patients included in the study

Characteristics	Hypothermia (n = 45)	Normothermia (n = 37)	<i>p</i>
Age (years), ($\bar{x} \pm SD$)	57.9 ± 14.08	62.0 ± 9.6	0.139
Gender [n (%)]			
male	35 (77.8)	25 (67.6)	0.299
female	10 (22.2)	12 (32.4)	
Ejection fraction < 35% [n (%)]	14 (32.6)	18 (48.6)	0.178
Ventricular fibrillation [n (%)]	27 (60)	19 (52.8)	0.693
Glasgow coma score < 7 [n (%)]	40 (88.9)	34 (91.9)	0.648
Time to ROSC*(min), ($\bar{x} \pm SD$)	26.9 ± 4.7	27.6 ± 3.6	0.467
Myocardial infarction [n (%)]	33 (73.3)	28 (75.7)	0.809

*ROSC – return of spontaneous circulation

Table 2

Influence of therapeutic hypothermia on neurological outcome and mortality rate in patients with coma after cardiac arrest returning to spontaneous circulation

Parameters	Patients (%)	
	Hypothermia	Normothermia
Neurological outcome		
CPC 1	46.7	18.9 [†]
CPC 2	6.7	–
CPC 3	–	–
CPC 4	2.2	–
CPC 5	44.4	81.1 ^{*, †}
Mortality rate		
survived	51.1	18.9
died	48.9	81.1

CPC (Cerebral Performance Category Scale) – for explanation see Methods

* $p = 0.003$ vs CPC 1 within the same group; [†] $p = 0.006$ vs corresponding CPC value in the patients with hypothermia

Discussion

The results of clinical studies indicated a significant neuroprotective effect of mild hypothermia (32–34°C) applied in resuscitation^{10,11}. Our study indicates that 46.7% of the cooled patients had good neurological outcome and 51.1% of the patients survived, while 18.9% of the patients who were not treated with hypothermia survived and had a complete neurological recovery. The two largest and most important studies, on the basis of which resuscitative hypothermia was officially recommended for cardiopulmocerebral resuscitation, were published by Bernard et al.¹¹ and Hypothermia After Cardiac Arrest (HACA) Group⁹ and included in the European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2005¹². Bernard et al.¹² published data indicating decrease in mortality rate and improvement of neurological outcome in patients with out-of-hospital cardiac arrest. In this study, cooling was performed in the field by Emergency Medical System team using ice packs. External cooling continued in hospital conditions. Twenty-one patients out of 43 in the examined group survived with good neurological outcome (49%), whereas in the control group 9 (26%) patients survived out of 34 with good neurological outcome. The difference was significant. Hypothermia caused lower cardiac index, increased systemic vascular resistance and hyperglycemia¹².

In the HACA study, 55% of the patients in the examined group had moderate neurological insufficiency or did not have, comparing to 39% in the control group. The difference is statistically significant⁹. During a 6-month period mortality rate was 41% in the hypothermic group comparing to 55% in the normothermic group. In the HACA study, the patients were cooled for more than 8 hours, until the target temperature of 33°C was reached, and it was maintained for the following 24 hours. After that, the patients were spontaneously rewarmed until normothermia^{9,13}. The process of cooling our patients lasted for 24 h, and after that the patients were spontaneously rewarmed. There are still no data based on large studies revealing the optimal period of maintaining mild hypothermia, whether it is 12, 24 or 48 h, but it is clear that the effect of mild hypothermia is more beneficial if the temperature between 32 and 34°C is reached sooner¹⁴. It is still necessary to wait for the results of large studies to prove what manner of cooling is the most optimal (external, combination of external and intravascular or intravascular)¹⁴.

There are several possible mechanisms enabling mild hypothermia to improve neurological outcome after reperfusion. In the normal brain, hypothermia decreases cerebral us-

ability of oxygen by 6% for each degree of decrease in brain temperature when body temperature is higher than 28°C¹⁵. Mild hypothermia is considered to block many chemical reactions associated with reperfusion injury. These reactions involve formation of free oxygen radicals, increased release of amino acids and disorder in intracellular calcium metabolism. All these reactions lead to the damage of mitochondria and apoptosis^{15–17}. Despite its potentially beneficial effects, hypothermia may also cause negative side effects such as arrhythmia, infection and coagulopathy.

No negative side effects of this type of treatment were recorded in our study.

The best results of cooling are achieved when the initial rhythm is ventricular fibrillation. This was proven by Oddo et al.¹⁸ whose study included 109 comatose patients after cardiac arrest with the initial rhythm of ventricular fibrillation. A favourable outcome was recorded in 56% of the patients who were cooled comparing to 26% of the patients who did not have satisfactory outcome and were not cooled. The difference was significant. The difference was not significant when the initial rhythm was pulseless electrical activity or asystole¹⁸. Similar results were obtained in "Cool it" study which included patients with acute myocardial infarction with ST segment elevation who suffered cardiac arrest and who remained comatose after ROSC¹⁹. Primary Percutaneous Coronary Intervention (pPCI) was performed in all the patients. The survival rate was significantly higher when the initial rhythm was ventricular tachycardia/ventricular fibrillation, than in cases where the initial rhythm was pulseless electrical activity or asystole (73% vs. 39%). The difference was significant. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest can be applied together with primary percutaneous coronary intervention in the treatment of acute myocardial infarction⁶. This was proven by Wolfrum et al.²⁰ whose study included 33 comatose patients after cardiac arrest with acute myocardial infarction with ST segment elevation. The initial rhythm was ventricular fibrillation. Primary percutaneous coronary intervention was performed in all these patients, and therapeutic hypothermia only in the study group. A tendency of lower mortality rate was found in the cooled patients (25% vs. 35%), as well as better neurological outcome with CPC 1 or 2 (69% vs. 47%).

Conclusion

In the examined group of patients in coma after cardiac arrest, induced mild therapeutic hypothermia decreases mortality rate and improves neurological outcome.

R E F E R E N C E S

1. *Becker LB, Smith DW, Rhodes RV.* Incidence of cardiac arrest: a neglected factor in evaluating survival rates. *Ann Emerg Med* 1993; 22: 86–91.
2. *de Vreede-Swagemakers JJ, Gorgels AP, Dubois-Arbouw WI, van Ree JW, Daemen MJ, Houben LG, et al.* Out-of-hospital cardiac arrest in the 1990's: a population-based study in the Maastricht area on incidence, characteristics and survival. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30(6): 1500–5.
3. *Paradis N, Halperin H, Novak R.* Cardiac arrest. The science and practice of resuscitation medicine. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996.

4. *Ginsberg MD, Sternau LL, Globus MY, Dietrich WD, Busto R.* Therapeutic modulation of brain temperature: relevance to ischemic brain injury. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1992; 4(3): 189–225.
5. *Tisherman SA, Sterz F.* Preface. In: *Tisherman SA, Sterz F*, editors. *Therapeutic hypothermia*. New York: Springer; 2005. p. 13–4.
6. *Petrović M, Srdanović I, Panić G, Čanji T, Miljević T.* Our experiences with therapeutic hypothermia. *Med Pregl* 2007; 60(9–10): 431–5. (Serbian)
7. *Nolan JP, Morley PT, Hoek TL, Hickey RW.* Advancement Life support Task Force of the International Liaison committee on Resuscitation. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. An advisory statement by the Advancement Life support Task Force of the International Liaison Committee on Resuscitation. *Resuscitation* 2003; 57(3): 231–5.
8. *Teasdale G, Jennett B.* Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 1974; 2(7872): 81–4.
9. *Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group.* Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med* 2002; 346(8): 549–56.
10. *Marion DW, Leonov Y, Ginsberg M, Katz LM, Kochanek PM, Leclouthner A*, et al. Resuscitative hypothermia. *Crit Care Med* 1996; 24(2 Suppl): S81–9.
11. *Bernard SA, Jones BM, Horne MK.* Clinical trial of induced hypothermia in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *Ann Emerg Med* 1997; 30(2): 146–53.
12. *Nolan JP, Deakin CD, Soar J, Böttiger BW, Smith G.* European resuscitation council guidelines for resuscitation 2005. *Resuscitation* 2005; 6751: S39–S86.
13. *Holzer M, Kliegel A, Schreiber W.* Effectiveness and feasibility of rapid endovascular cooling for resuscitative hypothermia. *Circulation* 2002; 106 (Suppl): II–404
14. *Brauner ME, Sayre MR.* Therapeutic hypothermia [cited 2008 December 22]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/812407-overview>
15. *Steen PA, Newberg L, Milde JH, Michenfelder JD.* Hypothermia and barbiturates: individual and combined effects on canine cerebral oxygen consumption. *Anesthesiology* 1983; 58(6): 527–32.
16. *Colbourne F, Sutherland G, Corbett D.* Postischemic hypothermia: a critical appraisal with implications for clinical treatment. *Mol Neurobiol* 1997; 14(3): 171–201.
17. *Safar PJ, Kochanek PM.* Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. *New Engl J Med* 2002; 346(8): 612–3.
18. *Oddo M, Schaller MD, Feibl F, Ribordy V, Liaudet L.* From evidence to clinical practice: effective implementation of therapeutic hypothermia to improve patient outcome after cardiac arrest. *Crit Care Med* 2006; 34(7): 1865–73.
19. *Swanson LA, Edelstein KM, Parham WM, Hokanson JS, Shronts RF, Unger BT*, et al. „Cool it“: Therapeutic hypothermia for recovery of neurologic function in high risk patients following cardiac arrest [cited 2009 March 29]. Available from: www.clinicaltrialsresults.org/Slides/L...
20. *Wolfrum S, Pierau C, Radke PW, Schunkert H, Kurowski V.* Mild therapeutic hypothermia in patients after out-of-hospital cardiac arrest due to acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing immediate percutaneous coronary intervention. *Crit Care Med* 2008; 36(6): 1780–6.

Received on 23. XII 2009.

Revised on 25. V 2010.

Accepted on 20. VII 2010.



Poređenje dva definisana kriterijuma za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma kod prekomerno uhranjene i gojazne dece u Vojvodini

Comparison of the established definition criteria for diagnosing metabolic syndrome between overweight and obese children in Vojvodina

Ivana Vorgučin*, Jovan Vlaški*, Nada Naumović†, Dragan Katanić*

*Institut za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine, Novi Sad, Srbija;

†Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Katedra za fiziologiju,
Novi Sad, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Metabolički sindrom kod dece klinički je termin koji obuhvata gojaznost, stanje insulinske rezistencije, dislipidemiju, hipertenziju, kao i povećan rizik od razvoja dijabetesa melitusa tip 2 i kardiovaskularnih oboljenja u ranom odraslom dobu. Prevalencija metaboličkog sindroma je u porastu i direktno je povezana sa stepenom gojaznosti dece. Cilj istraživanja bio je poređenje postojećih definicija dva kriterijuma za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma u uzorku prekomerno uhranjene i gojazne dece u Vojvodini. **Metode.** Istraživanje je urađeno kao studija preseka koja je obuhvatila 206 ispitanika. U odnosu na indeks telesne mase (ITM), u istraživanom uzorku (25% dece i 75% adolescenata), bilo je 74% gojaznih i 26% prekomerno uhranjenih ispitanika. Na uzorak adolescenata primenjena su dva paketa kriterijuma za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma: kriterijumi za odrasle koji su specijalno prilagođeni za dečju populaciju i kriterijumi Internacionalne dijabetesne federacije (IDF) za decu i adolescente. Ispitanicima su određeni: ITM, obim struka, krvni

pritisak, trigliceridi, lipoproteini velike gustine (HDL holesterol), glikemija i insulinemija tokom oralnog testa tolerancije glukoze (OGTT). **Rezultati.** Primenom specifičnih kriterijuma za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma kod dece i adolescenata utvrđeno je postojanje metaboličkog sindroma kod 41% ispitanika, a primenom kriterijuma IDF kod 22% ispitanika. Analizom kriterijuma metaboličkog sindroma utvrđeno je da su među specifičnim kriterijumima najzastupljeniji bili povišeni ITM i patološki nalaz OGTT, a najređi, snižen HDL holesterol. Među kriterijumima IDF, najzastupljeniji bili su povećan obim struka i povišen krvni pritisak, a najređi povišena glikemija našte. **Zaključak.** Metabolički sindrom kod prekomerno uhranjene i gojazne dece u Vojvodini utvrđen je značajno češće primenom definicije sa specifičnim kriterijumima za decu i adolescente, nego korišćenjem kriterijuma koje definiše IDF.

Ključne reči:

metabolički sindrom x; deca; adolescenti; gojaznost; rizik; procena; telesna masa, indeks.

Abstract

Background/Aim. Metabolic syndrome is a clinical term, which encompasses obesity, insulin resistance, dyslipidemia, hypertension, as well as an increased risk of the development of diabetes mellitus type 2 and cardiovascular disorders in early adulthood. The prevalence of metabolic syndrome is increasing and directly related to the obesity rate among children. The aim of the research was to compare the established definition of the criteria for diagnosing metabolic syndrome in a sample group consisting of overweight and obese children in Vojvodina. **Methods.** The research was performed as a cross study analysis of 206 examinees. In terms of the sample group (25% children and 75% adolescents), 74% were obese and 26% overweight ac-

cording to the body mass index (BMI). Two sets of criteria for diagnosing metabolic syndrome were applied in the sample of adolescents: the criteria for adults, specifically adapted for children, and the criteria defined by the International Diabetes Federation (IDF) for children and adolescents. The research included the analysis of the following criteria: BMI, waist circumference, blood pressure, triglycerides, HDL cholesterol, glycemia and insulinemia during the oral glucose tolerance test (OGTT). **Results.** By applying the specific criteria for diagnosing the metabolic syndrome in children and adolescents on the whole sample, it was established that the metabolic syndrome was present in 41% of the examinees, while the application of the criteria defined by the IDF confirmed the diagnosis in 22% of the examinees. An analysis of the metabolic syndrome risk fac-

tors established that among the defined specific criteria the most frequent factors present were elevated BMI and the pathological results of the OGTT, while the least frequent was low HDL cholesterol. Among the criteria listed by the IDF, the most frequent metabolic syndrome factors were waist circumference and increased blood pressure, while the least frequent was elevated fasting glucose. **Conclusion.** Metabolic syndrome in overweight and obese children in

Vojvodina was diagnosed much more often when the specific criteria for children and adolescents were applied than it was the case when the criteria defined by the International Diabetes Federation were applied.

Key words: metabolic syndrome x; child; adolescent; obesity; risk assessment.

Uvod

Metabolički sindrom kod dece je klinički termin koji obuhvata gojaznost, stanje insulinske rezistencije, dislipidemiju, hipertenziju, kao i povišen rizik od razvoja dijabetesa melitusa tip 2, rane ateroskleroze, cerebrovaskularnih i kardiovaskularnih oboljenja u ranom odraslom dobu. Prevalencija metaboličkog sindroma je u porastu i direktno je povezana sa stepenom gojaznosti dece. Gojaznost i metaboličke komplikacije koje je prate predstavljaju predmet interesovanja u istraživanjima poslednjih osamdeset godina. Reaven¹ je još 1988. godine opisao sindrom X i ukazao na značaj insulinske rezistencije za nastanak ateroskleroze i udruženost ovog poremećaja sa gojaznošću, dislipidemijom i nastankom dijabetesa. Definicije za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma potom su dale Svetska zdravstvena organizacija (WHO), eksperti Nacionalnog obrazovnog programa za obrazovanje o holesterolu (NECP-ATP), Evropska grupa za studiju insulinske rezistencije (EGIR) i Američko udruženje kliničkih endokrinologa (AACE). Važeću definiciju metaboličkog sindroma kod odraslih predložio je konsenzus eksperta Internacionalne dijabetesne federacije (IDF) u aprilu 2005. godine². Za danas klinički prihvaćeni termin metabolički sindrom ranije su se u literaturi pojavljivali mnogi termini: dismetabolički sindrom, sindrom X, kardiometabolički sindrom, sindrom insulinske rezistencije, *Deadly Quartet*, plurimetabolički sindrom, CHAOS sindrom, *Beer Belly Syndrome*, Ravenov sindrom, *Diabesity* i *Globesity*.

U nedostatku definicije metaboličkog sindroma za decu i adolescente, u velikom broju studija dijagnoza metaboličkog sindroma kod dece utvrđivana je korišćenjem kriterijuma za odrasle koji su specifično prilagođeni i modifikovani za dečju populaciju. Pokazano je da se primenom kriterijuma specifičnih za decu, u znatno većem procentu utvrđuje postojanje metaboličkog sindroma kod dece³⁻⁹. Po toj definiciji metabolički sindrom ima dete kod kojeg se utvrdi postojanje tri ili više od sledećih pokazatelja: indeks telesne mase (ITM) > 97 percentila za pol/godine, krvni pritisak > 95 percentila za pol/godine, trigliceride seruma > 95 percentila za pol/godine, lipoproteine velike gustine (HDL holesterol) < 5 percentila za pol/godine, poremećaj metabolizma ugljenih hidrata (hiperglikemija, poremećaj tolerancije glukoze, hipersulinemija, insulinska rezistencija ili dijabetes)^{10, 11}. S obzirom na to da su sve navedene definicije bile namenjene odraslim osobama, i zbog uniformnosti i lakše primenjivosti javila se potreba za utvrđivanjem posebne definicije metaboličkog sindroma kod dece i adolescenata kojom bi bile uzete u obzir razvojne karakteristike i specifičnosti za dob i pol. In-

ternacionalna dijabetesna federacija je, inspirisana definicijom kriterijuma za odrasle, 2007. godine predložila novu definiciju metaboličkog sindroma kod dece i adolescenata koja je jednostavna i lako primenjiva u kliničkoj praksi¹². U toj definiciji kriterijuma metaboličkog sindroma uvedene su uzrasne kategorije. Deca mlađa od 6 godina su isključena iz definicije, a kod dece starije od 16 godina savetuje se primena kriterijuma za odrasle. U uzrastu dece od 6 do 10 godina, po toj definiciji nije moguće postaviti dijagnozu metaboličkog sindroma, ali ukoliko je obim struka \geq 90 percentila i ako postoji pozitivna porodična anamneza za metabolički sindrom, dijabetes melitus tip 2, dislipidemiju, kardiovaskularno oboljenje, hipertenziju i/ili gojaznost, potrebno je uraditi dopunsko ispitivanje. U uzrastu 10–16 godina metabolički sindrom ima dete čiji je obim struka \geq 90 percentila (ili primeniti kriterijume za odrasle ukoliko su strožiji) uz dva ili više od navedenih parametara: trigliceridi \geq 1,7 mmol/L, HDL holesterol < 1,03 mmol/L, povišen krvni pritisak (sistolni \geq 130 mmHg, dijastolni \geq 85 mmHg), glikemija našte \geq 5,6 mmol/L (ukoliko je viša vrednost glikemije preporučuje se oralni test tolerancije glukoze OGTT). Rano postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma značajno je za područje Vojvodine, zbog velikog broja prekomerno uhranjene i gojazne dece što omogućuje pravovremenu primenu mera prevencije, odgovarajuće dijeta i terapiju.

Cilj istraživanja bio je poređenje postojećih definicija dva kriterijuma za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma u uzorku prekomerno uhranjene i gojazne dece u Vojvodini.

Metode

Istraživanje je urađeno kao studija preseka u periodu 2004–2008. Ispitivani uzorak činila su deca i adolescenti iz cele Vojvodine koji se zbog prekomerne uhranjenosti i gojaznosti kontrolišu i leče na Odeljenju za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma i u Endokrinološkoj ambulanti Instituta za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine u Novom Sadu. Istraživani uzorak činilo je 206 ispitanika: 51 dete i 155 adolescenata. Ispitanici su na osnovu vrednosti ITM bili podeljeni u dve grupe: prekomerno uhranjena deca (ITM od 85 do 95 percentila) i gojazna deca (ITM preko 95 percentila)^{13, 14}. Svaka grupa bila je, zatim podeljena u odnosu na uzrast: grupa dece do 10 godina i grupa adolescenata. Svim ispitanicima su određeni: ITM, obim struka, krvni pritisak, trigliceridi, HDL holesterol, glikemija i insulinemija tokom OGTT. Na uzorak adolescenata primenjene su obe definicije, odnosno dva paketa kriterijuma za postavljanje dija-

gnoze metaboličkog sindroma, kriterijumi za odrasle koji su specijalno prilagođeni za dečju populaciju i kriterijumi IDF za decu i adolescente. Tokom fizičkog pregleda mereni su telesna masa, telesna visina na Harpendenovom stadiometru, obim struka nerastegljivom trakom u visini pupka i izračunavan je ITM kao količnik telesne mase u kilogramima i kvadrata telesne visine izražene u metrima (kg/m^2).

Laboratorijska analiza triglicerida, HDL holesterola (u okviru lipidnog statusa – enzimskim kolorimetrijskim testom – Roche/Hitachi 902) i 2 h OGTT (glikemija – metod heksokinaze-Roche/Hitachi 902, insulinemija – imunometrijskom metodom ADIVA, Centaur XP), rađena je nakon 12-satnog gladovanja. Na osnovu rezultata OGTT, ulazni kriterijum za patološki nalaz OGTT, odnosno poremećaj metabolizma ugljenih hidrata bili su nalaz hiperglikemije, poremećaja tolerancije glukoze, hiperinsulinemije, insulinske rezistencije ili dijabetesa (dihotomno određeno: pozitivan/negativan nalaz)^{15,16}.

Krvni pritisak meren je standardnom auskultacionom sfigmomanometrijom uz korišćenje živinog manometra i adekvatne manžetne. Ulazni kriterijum za dijagnozu metaboličkog sindroma bilo je postojanje povišenog pritiska – sistolnog, dijastolnog ili oba.

Kontrolna grupa nije formirana, jer za sve ispitivane parametre postoje nomogrami za pol i uzrast urađeni na velikom uzorku dece. Korišćeni su nomogrami indeksa telesne mase¹⁷, obima struka¹⁸, krvnog pritiska¹⁹, vrednosti HDL holesterola i triglicerida²⁰.

Primenjeni su kriterijumi metaboličkog sindroma za odrasle koji su specijalno prilagođeni za dečju populaciju^{10,11}: metabolički sindrom ima dete kod kojeg se utvrdi postojanje tri ili više od navedenih pokazatelja – ITM > 97 percentila za pol/godine, krvni pritisak > 95 percentila za pol/godine, trigliceride seruma > 95 percentila za pol/godine, HDL holesterol < 5 percentila za pol/godine, patološki nalaz OGTT – poremećaj metabolizma ugljenih hidrata (hiperglikemija, poremećaj tolerancije glukoze, hiperinsulinemija, insulinska rezistencija ili dijabetes).

Takođe, primenjeni su i kriterijumi IDF za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma; kod dece uzrasta 10–16 godina, metabolički sindrom ima dete čiji je obim struka \geq 90 percentila (ili po kriterijumima za odrasle, ukoliko su strožiji) uz dva ili više od navedenih parametara: trigliceridi \geq 1,7 mmol/L, HDL holesterol < 1,03 mmol/L, povišen krvni pritisak (sistolni \geq 130 mmHg, dijastolni \geq 85 mmHg), glikemija našte \geq 5,6 mmol/L; kod dece mlađe od 10 godina nije postavljana dijagnoza metaboličkog sindroma, a dodatno ispitivanje je rađeno ukoliko je postojala pozitivna porodična anamneza; kod dece starije od 16 godina primenjivani su kriterijumi za odrasle.

Roditelji i deca su obavesteni o prirodi i razlozima istraživanja i potpisali su pristanak da se podaci o detetu uvrste u istraživanje.

Nakon sprovedenog istraživanja izvršena je adekvatna statistička obrada podataka. Atributivne (binarne) i numeričke varijable obrađene su standardnim procedurama deskriptivne statistike koje su upotrebljene za određivanje mere za učestalost (frekvencija) i relativne odnose (procenti). Potom

su upotrebljene metode komparativne statistike za upoređivanje pojedinih parova obeležja u vidu z-testa za utvrđivanje razlike proporcija između pojedinih parova atributivnih varijabli. U svim primenjenim testovima rezultati kod kojih je nivo značajnosti bio 95% ($p < 0,05$) tumačeni su kao statistički značajni, a oni sa nivoom značajnosti 99% ($p < 0,01$) kao statistički visoko značajni.

Rezultati

U uzorku od 206 ispitanika bilo je 51 dete (25%), uzrasta $7,34 \pm 1,98$ godina, i 155 adolescenata (75%), uzrasta $13,62 \pm 2,08$ godina. U istraživanom uzorku bilo je 104 dečaka (50,5%) i 102 devojčice (49,5%). U odnosu na vrednosti ITM, bilo je 153 gojaznih (74%) i 53 prekomerno uhranjenih ispitanika (26%). Po uzrastima bilo je 6 prekomerno uhranjene (11,3%) i 45 gojazne dece (88,2%) i 47 prekomerno uhranjenih (30,3%) i 108 gojaznih adolescenata (69,7%).

Statističkim testom razlike proporcija utvrđeno je da se primenom specifičnih kriterijuma za decu i adolescente registruje postojanje metaboličkog sindroma kod statistički visoko značajnijeg procenta adolescenata nego korišćenjem kriterijuma prema definiciji IDF, tj. da je korišćenje specifičnih kriterijuma za decu i adolescente efikasnije u pogledu broja utvrđenih slučajeva ($p < 0,01$).

U grupi adolescenata kod kojih su primenjeni specifični kriterijumi za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma kod dece i adolescenata i postavljena dijagnoza metaboličkog sindroma, 56 (89%) imalo je ITM > 97 percentila, vrednost krvnog pritiska > 95 percentila imalo je 54 bolesnika (85,7%), vrednost triglicerida > 95 percentila imalo je 38 bolesnika (60,3%), a kod 16 bolesnika (25,4%) vrednost HDL holesterola bila je < 5 percentila; patološki nalaz OGTT utvrđen je kod 57 bolesnika (90,5%).

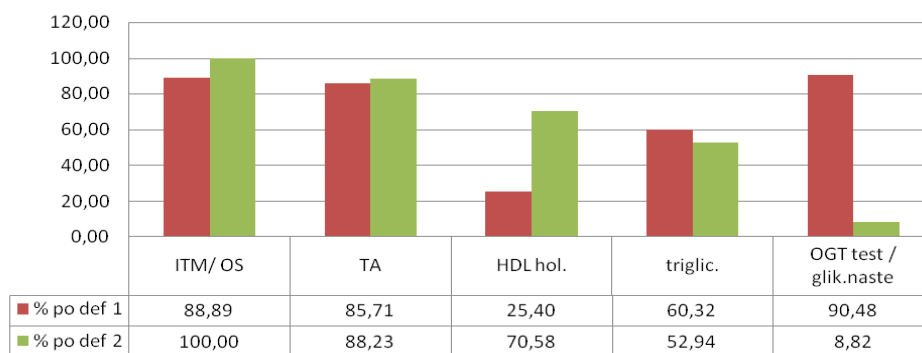
Kriterijumi IDF primenjivani su na poduzorku adolescenata koji imaju metabolički sindrom. Svih 34 adolescenta (100%) sa metaboličkim sindromom imali su obim struka \geq 90 percentila za pol/godine; vrednost krvnog pritiska \geq 130/85 mmHg imalo je 30 adolescenata (88,2%); vrednost HDL holesterola \leq 1,03 mmol/L (kod adolescenata uzrasta preko 16 godina primenjeni su kriterijumi za odrasle) imalo je 24 adolescenata (70,6%); povišenu vrednost triglicerida \geq 1,7 mmol/L imalo je 18 adolescenata (53%); povišenu vrednost glikemije našte \geq 5,6 mmol/L imala su 3 adolescenata (8,82%).

Primenom definicije sa specifičnim kriterijumima za decu i adolescente kod 29% ispitivane dece postavljena je dijagnoza metaboličkog sindroma. Po definiciji IDF ne predviđa se postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma kod dece mlađe od 10 godina i ako se nađu patološke vrednosti nekog od ispitivanih kriterijuma, sprovode se dodatna ispitivanja i procene.

Na poduzorku adolescenata ($n = 155$) urađena je uporedna analiza kriterijuma obe definicije. Primenom specifičnih kriterijuma utvrđen je metabolički sindrom kod 41% adolescenata, dok je primenom kriterijuma IDF metabolički sindrom utvrđen kod 22% adolescenata. Analizom kriterijuma metaboličkog sindroma utvrđeno je da su po procentualnom

uticaju među specifičnim kriterijumima najzastupljeniji bili povišen ITM i patološki nalaz OGTT, a najređi, snižen HDL holesterol. Među kriterijumima po definiciji IDF najzastupljeniji bili su povećan obim struka i povišen krvni pritisak, a najređe, povišena glikemija našte (slika 1).

rasle koji su specijalno prilagođeni i modifikovani za dečju populaciju. Pokazano je da se primenom kriterijuma specifičnih za decu, u znatno višem procentu utvrđuje postojanje metaboličkog sindroma kod dece. Korišćenjem kriterijuma za odrasle po preporukama WHO i NECP-ATP utvrđuje se



Sl. 1 - Zastupljenost pojedinih kriterijuma za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma kod prekomerno uhranjenih i gojaznih adolescenata primenom dve različite definicije (definicija 1 – specifični kriterijumi; definicija 2 – kriterijumi Internacionalne dijabetesne federacije)

ITM – indeks telesne mase; OS – obim struka; TA – krvni pritisak; HDL – hipoproteini velike gustine; OGTT – oralni test tolerancije glukoze

Diskusija

Gojaznost dece je jedan od glavnih problema današnjice sa svim rizicima od razvoja metaboličkih komplikacija, dijabetesa i kardiovaskularnih oboljenja u adolescenciji i ranom odraslom dobu. Prevalencija metaboličkog sindroma je u porastu i u direktnoj je vezi sa stepenom gojaznosti dece. U Vojvodini je visok procenat populacije gojaznih osoba sa pratećim zdravstvenim komplikacijama, a poseban problem čine gojazna deca. Postoji potreba istraživanja gojaznosti dece, utvrđivanja faktora rizika od metaboličkog sindroma i kvantifikovanje problema radi njegovog lakšeg praćenja.

Intrauterini događaji, perinatalni period i rani razvoj deteta mogu predisponirati gojaznost i metabolički sindrom. Naglo povećanje telesne mase i dužine u prvih šest meseci života povezano je sa povećanim rizikom od gojaznosti u uzrastu od tri godine. Promene u masi u periodu odojčeta mogu uticati na kasniju gojaznost znatno više nego telesna masa na rođenju. Gestacijski dijabetes majke i niska porođajna masa takođe, mogu ukazati na kasniji rizik.

Savremeno društvo, modernizacija i tehnički napredak doprineli su promeni načina života, manjoj fizičkoj aktivnosti, energetsom izobilju i sve većem broju gojazne dece.

Na osnovu ITM istraživani uzorak podeljen je na prekomerno uhranjenu decu (ITM od 85 do 95 percentila) i gojaznu decu (ITM preko 95 percentila)^{13, 14, 19}. Indeks telesne mase je primenjen jer je već prihvaćen kao najbolji kriterijum za utvrđivanje gojaznosti kod dece, dobro koreliše sa ukupnom količinom masti u organizmu, s visinom krvnog pritiska i koncentracijom lipida u serumu. Novija istraživanja pokazala su korelaciju ITM i ukupnog procenta masti, i potvrđena je primena ITM kao parametra gojaznosti kod dece i adolescenata²¹⁻²⁴.

U nedostatku definicije metaboličkog sindroma za decu i adolescente, u mnogo studija dijagnoza metaboličkog sindroma kod dece utvrđivana je korišćenjem kriterijuma za od-

postojanje metaboličkog sindroma kod 12,2% i 13,7% gojazne dece, dok se u istoj grupi dece primenom kriterijuma specifičnih za decu utvrđuje postojanje metaboličkog sindroma kod 31% gojazne dece¹¹. Prevalencija metaboličkog sindroma kod dece i adolescenata Španije je 29,9%, na osnovu kriterijuma Cooka i sar.³, dok je prevalencija 50% po kriterijumima De Ferrantija i sar.⁴.

Statističkim testom razlike proporcija u istraživanju je utvrđeno da se primenom specifičnih kriterijuma za decu i adolescente utvrđuje postojanje metaboličkog sindroma kod statistički visoko značajnijeg procenta adolescenata, nego korišćenjem kriterijuma definicije IDF, tj. da je korišćenje specifičnih kriterijuma za decu i adolescente efikasnije u pogledu broja utvrđenih slučajeva.

Kriterijumi definicije IDF za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma kod dece i adolescenata inspirisani su definicijom kriterijuma za odrasle, pojednostavljeni su i nedovoljno specifični za uzrast. Iz ove definicije isključena su deca uzrasta ispod šest godina, deci uzrasta ispod 10 godina ne može se postaviti dijagnoza metaboličkog sindroma, ali ukoliko je pozitivna porodična anamneza, potrebno je njihovo praćenje, a savetuje se sniženje telesne mase. Utvrđivanje metaboličkog sindroma kod 29% dece primenom specifičnih kriterijuma pokazalo je da su gojaznost i početne metaboličke promene danas problem dečjeg uzrasta i da je evidentno pomeranje starosnih granica kada se govori o problemu gojaznosti. Za decu stariju od 16 godina primenjuju se kriterijumi za odrasle, uz primenu percentilnih kriva samo za obim struka. Uzrasne karakteristike i razvojne specifičnosti navode na važnost primene percentilnih kriva i za ostale kriterijume, zbog bolje efikasnosti u utvrđivanju slučajeva metaboličkog sindroma. Radi kliničke jednostavnosti, kao ulazni kriterijum za poremećaj metabolizma ugljenih hidrata u definiciji IDF uzima se glikemija našte $\geq 5,6$ mmol/L.

Analizom kriterijuma metaboličkog sindroma utvrđeno je da su po procentualnom učešću među specifičnim kriterijumima najzastupljeniji povišen ITM i patološki nalaz OGTT, a najređi, snižen HDL holesterol. Među kriterijumima definicije IDF najzastupljeniji su povećan obim struka i povišen krvni pritisak, a najmanje zastupljen kriterijum je povišena glikemija našte.

Primarni uzrok u nastanku metaboličkog sindroma je gojaznost sa svim pratećim metaboličkim komplikacijama, te je očekivano da su najzastupljeniji kriterijumi povišen ITM i obim struka, posebno što je u pojedinim definicijama pokazatelj gojaznosti uslovni kriterijum. Istraživanja pokazuju da su najčešće karakteristike metaboličkog sindroma povećan obim struka i hipertenzija, dok su markeri koji se najređe sreću dislipidemija i povišena glikemija našte²⁵.

Na poduzorku adolescenata, uporednom analizom kriterijuma obe definicije, primenom specifičnih kriterijuma utvrđen je metabolički sindrom kod 41% adolescenata, dok je primenom kriterijuma IDF metabolički sindrom utvrđen kod 22% adolescenata. Takođe, ustanovljeno je najizraženija razlika u broju utvrđenih slučajeva sniženih vrednosti HDL holesterola, kojih je bilo značajno više korišćenjem kriterijuma IDF. Patološki nalaz OGTT bio je statistički visoko značajno zastupljeniji faktor nego povišena glikemija našte.

Kod ispitanika sa metaboličkim sindromom utvrđeno je postojanje poremećaja metabolizma ugljenih hidrata –

statistički značajno povećanje patološkog nalaza OGTT uprkos održavanju uredne glikemije našte. U jednoj studiji u Velikoj Britaniji kod 46% gojazne dece otkriven je poremećaj metabolizma ugljenih hidrata, hiperinsulinizam kod 40%, poremećaj glikozne tolerancije kod 11%, a poremećena glikemija našte kod samo 0,8%²⁶. Otkrivena je snažna korelacija insulinske rezistencije sa povišenim vrednostima triglicerida u serumu²⁷. Postojanje hiperinsulinizma i insulinske rezistencije, uprkos održavanju uredne glikemije našte, nameću potrebu za detaljnijim ispitivanjem metabolizma ugljenih hidrata jer, zahvaljujući reverzibilnosti stanja, postoji mogućnost pravovremene terapije.

Rano otkrivanje metaboličkog sindroma kod dece i pravovremeno lečenje značajni su jer mogu da ublaže posledice gojaznosti, kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa tip 2. Promena načina života, uz fizičku aktivnost i pravilnu ishranu, osnove su prevencije i lečenja metaboličkog sindroma.

Zaključak

Postojanje metaboličkog sindroma kod prekomerno uhranjene i gojazne dece u Vojvodini utvrđeno je kod značajno većeg broja ispitanika primenom definicije sa specifičnim kriterijumima za decu i adolescente nego korišćenjem kriterijuma po definiciji IDF.

L I T E R A T U R A

1. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37(12): 1595–607.
2. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366(9491): 1059–62.
3. Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003; 157(8): 821–7.
4. de Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld EJ, Newburger JW, Rifai N. Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 2004; 110(16): 2494–7.
5. Cruz ML, Weigensberg MJ, Huang TT, Ball G, Shaibi GQ, Goran MI. The metabolic syndrome in overweight Hispanic youth and the role of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(1): 108–13.
6. Weiss R, Dzujura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, et al. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 2004; 350(23): 2362–74.
7. Ford ES, Ajani UA, Mokdad AH. National Health and Nutrition Examination. The metabolic syndrome and concentrations of C-reactive protein among U.S. youth. *Diabetes Care* 2005; 28(4): 878–81.
8. Goodman E, Daniels SR, Morrison JA, Huang B, Dolan LM. Contrasting prevalence of and demographic disparities in the World Health Organization and National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III definitions of metabolic syndrome among adolescents. *J Pediatr* 2004; 145(4): 445–51.
9. Rääkkönen K, Matthews KA, Salomon K. Hostility predicts metabolic syndrome risk factors in children and adolescents. *Health Psychol* 2003; 22(3): 279–86.
10. Invitti CMC, Maffei C, Gilardini L, Pontiggia B, Mazzilli G, Morabito F, et al. Prevalence of metabolic syndrome in obese children: an analysis using children-specific criteria. *Diabetes* 2003; 52(Suppl 1): A70.
11. Singh R, Shaw J, Zimmet P. Epidemiology of childhood type 2 diabetes in the developing world. *Pediatr Diabetes* 2004; 5(3): 154–68.
12. Zimmet P, Alberti G, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents. *Lancet* 2007; 369(9579): 2059–61.
13. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Gno SS, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Mei Z, et al. 2000 CDC Growth Charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat* 11. 2002; 246: 1–190.
14. Ogden CL, Flegal KM, Carroll MD, Johnson CL. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999–2000. *JAMA* 2002; 288(14): 1728–32.
15. Heinze E, Holl RW 2003 Tests of β -cell function in childhood and adolescence. In: Ranke MB, editor. *Diagnostics of endocrine function in children and adolescents*. Basel: Karger; 2003. p. 318–38.
16. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27(Suppl 1): 5–10.
17. CDC. National Center For Health Statistics (NCHS) Growth Chart in collaboration with the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. 2002 [cited 2003 Aug 15]; Available from: <http://www.cdc.gov/growthcharts>
18. Fernández JR, Redden DT, Pietrobello A, Allison DB. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr* 2004; 145(4): 439–44.
19. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents.

- The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics* 2004; 114(2 Suppl 4th Report): 555–76.
20. *Nicholson JF, Pesce MA*. Reference ranges for laboratory tests and procedures. In: *Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB*, editors. *Nelson Textbook of Pediatric*. 17th ed. Philadelphia: Saunders; 2003. p. 2396–426.
 21. *Donoboue PA*. Obesity. In: *Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB*, editors. *Nelson Textbook of Pediatric* 17th. Philadelphia: Saunders; 2003. p. 173–7.
 22. *Dietz WH, Robinson TN*. Use of the body mass index (BMI) as a measure of overweight in children and adolescents. *J Pediatr* 1998; 132(2): 191–3.
 23. *Mei Z, Grummer-Strawn LM, Pietrobelli A, Goulding A, Goran MI, Dietz WH*. Validity of body mass index compared with other body-composition screening indexes for the assessment of body fatness in children and adolescents. *Am J Clin Nutr* 2002; 75(6): 978–85.
 24. *Freedman DS, Sherry B*. The validity of BMI as an indicator of body fatness and risk among children. *Pediatrics* 2009; 124(Suppl 1): pp. 23–34.
 25. *Bueno G, Bueno O, Moreno LA, García R, Tresaco B, Garagorri JM*, et al. Diversity of metabolic syndrome risk factors in obese children and adolescents. *J Physiol Biochem* 2006; 62(2): 125–33.
 26. *Viner RM, Segal TY, Lichtarowicz-Krynska E, Hindmarsh P*. Prevalence of the insulin resistance syndrome in obesity. *Arch Dis Child* 2005; 90(1): 10–4.
 27. *Caceres M, Teran CG, Rodriguez S, Medina M*. Prevalence of insulin resistance and its association with metabolic syndrome criteria among Bolivian children and adolescents with obesity. *BMC Pediatr* 2008; 8: 31.

Primljen 26. I 2010.
Revidiran 21. VII 2010.
Prihvaćen 29. VII 2010.



Procena efikasnosti primene lasera male snage u terapiji alveolarnog osteitisa

Assessment of the effectiveness of low level laser in the treatment of alveolar osteitis

Goran Jovanović*, Nikola Burić*, Nebojša Krunic†, Miloš Tijanić*,
Simona Stojanović‡

Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, Klinika za stomatologiju, *Odeljenje za oralnu
hirurgiju, †Odeljenje za stomatološku protetiku, ‡Doktorske studije, Niš, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Alveolarni osteitis (AO) je poremećaj zarastanja ekstrakcione rane, praćen intenzivnim bolom. Laser male snage stimuliše ćelijski metabolizam i mikrocirkulaciju, ima izražen analgetski, antiedematozni i antiinflamatorni efekat i ubrzava proces zarastanja rana. U radu su predstavljeni rezultati kliničkog istraživanja koje je imalo za cilj da ispita dejstvo lasera male snage na smanjenje bola i zarastanje ekstrakcionih rana sa alveolarnim osteitisom u donjoj vilici nastalim drugog dana posle vađenja zuba. **Metode.** Istraživanje je obuhvatilo 60 osoba podeljenih na studijsku i kontrolnu grupu. Kod svih je izvršena obrada ekstrakcione rane, s tim što je u studijskoj grupi posle toga primenjeno svakodnevno lečenje laserom male snage sa ukupno osam seansi zračenja, dok je u kontrolnoj grupi u ekstrakcione rane stavljan zavoj cink-oksida eugenola koji je menjan na 48 sati do prestanka bola. Merenje bola vršeno je vizuelno-analognom skalom 10 minuta pre obrade ekstrakcionih rana i svakodnevno u narednih osam dana. Procena dejstva lasera male snage na zarastanje ekstrakcionih rana vršena je osmog dana od njihove obrade. **Rezultati.** Petog dana posle tretiranja ekstrakcionih rana sa alveolarnim osteitisom kod ispitanika studijske grupe registrovana je niža prosečna vrednost bola u odnosu na ispitanike kontrolne grupe. Ova razlika uvećavala se u narednom periodu. Ekstrakcione rane u studijskoj grupi zarasle su uspešnije i brže u odnosu na kontrolnu grupu. **Zaključak.** Istraživanje je pokazalo da je sniženje bola bilo izraženije kod ispitanika sa alveolarnim osteitisom čije su ekstrakcione rane bile podvrgnute zračenju laserom male snage nego kod ispitanika u čije ekstrakcione rane je stavljen zavoj cink-oksida eugenola.

Ključne reči:

zub, ekstrakcija; postoperativne komplikacije; alveolitis; laseri male snage; cink oksid-eugenol pasta; bol, merenje.

Abstract

Background/Aim. Alveolar osteitis (AO) is the extraction wound healing disorder with a presence of severe pain. Low level laser therapy stimulates cell metabolism and microcirculation, has pronounced analgesic, antiedematous and anti-inflammatory effect and speeds up wound healing process. The aim of this study was to present results of clinical research that examined the effectiveness of low level laser in pain relief and healing of extraction wounds with alveolar osteitis in the lower jaw which was formed on the second day after tooth extraction. **Methods.** The study was conducted on 60 subjects divided into the study and the control group. In both groups extraction wounds were processed in similar way, except that in the study group was applied daily treatment of low level laser with a total of eight sessions of radiation, while in the control group extraction wounds were dressed with zinc oxide eugenol paste, which was changed every 48 hours up to the pain cessation. Measurement of pain intensity was done with a visual analogue scale (VAS) 10 min prior to processing of extraction wounds and daily for the next eight days. Assessment of the effectiveness of low level laser on healing of extraction wounds was performed on the day eight of the treatment. **Results.** On the day five after beginning of the treatment of extraction wounds with alveolar osteitis in the patients of the study group a lower average value of pain as compared to the control group was registered. This difference was increased within the following days. Extraction wounds healing in the study group was more successful and faster than in the control group. **Conclusion.** This study suggested that the reduction of pain was more pronounced in the patients with alveolar osteitis whose extraction wounds were subjected to low level laser radiation in comparison to those in which extraction wounds were treated with zinc oxide eugenol paste.

Key words:

tooth extraction; postoperative complications; dry socket; laser therapy, low-level; zinc oxide-eugenol cement; pain measurement.

Uvod

Alveolarni osteitis (AO) prvi put je opisao Crawford¹ 1896. kao poremećaj zarastanja ekstrakcione rane koji je praćen intenzivnim bolom. Učestalost AO iznosi 1–4% posle rutinskih ekstrakcija zuba i 5–30% posle ekstrakcija impaktiranih donjih trećih molara, što AO delimično dovodi u vezu sa težinom hirurške traume². Kliničku sliku AO karakterišu: prazna alveola dva do tri dana posle ekstrakcije zuba, jak bol koji se širi i intenzivira noću i halitoza^{3,4}. Retko se javlja povećanje telesne temperature⁴ i regionalna limfadenopatija. Smatra se da veliku ulogu u nastanku AO imaju izražena fibrinolitička aktivnost u alveoli izvađenog zuba, ishemija rane i poremećaj lokalnog metabolizma alveole⁵. Često se spominje anaerobna bakterija *Treponema denticola* kao uzročnik AO zbog svoje fibrinolitičke aktivnosti⁶.

U prevenciji AO, sistemski ili lokalno, primenjavani su: antibiotici, antiseptici, antifibrinolitički, steroidni antiinflamatorni lekovi, obtundent paste, cink-oksidi eugenol zavoj, kao i materijali za podršku stvaranja zdravog koaguluma^{5,7–10}. Međutim, opšte je prihvaćen stav da za AO ne postoji idealno sredstvo koje bi sprečilo njegov nastanak¹¹.

Terapija AO podrazumeva uklanjanje debrisa iz postekstrakcione rane, uklanjanje sekvestara i stranih tela, ako su prisutni i omogućavanje stvaranja zdravog koaguluma. Lokalnom aplikacijom različitih medikamentata sa analgetičkim i antiseptičkim dejstvom, kao što je npr. cink-oksidi eugenol pasta, obezbeđuje se smanjenje intenziteta akutnog bola².

Laser male snage (LMS) svojim primarnim i sekundarnim biostimulativnim dejstvom stimuliše ćelijski metabolizam i mikrocirkulaciju, mitotsku aktivnost makrofaga, enzimsku aktivnost ćelija i ubrza reprodukciju ćelija^{12,13}. Takođe, LMS ima izražen analgetski¹⁴, antiedematozni¹⁵ i antiinflamatorni efekat i ubrza proces zarastanja rana¹⁶.

Alveolarni osteitis često se objašnjava izrazitom fibrinolitičkom aktivnošću u alveoli ekstrahovanog zuba⁵. Usled inflamacije stvorene traumom ili infekcijom okolna kost oslobada aktivatore fibrinolize, tj stimuliše pretvaranje plazminogena u plazmin¹⁷. Pored toga što vrši fibrinolizu, plazmin stimuliše pretvaranje kininogena u kinin. Kinin je jedan od najpoznatijih medijatora bola¹⁸. Efekat lasera na zapaljenje sastoji se u stimulaciji nespecifične humoralne odbrane i porastu sinteze komplemenata, lizozoma i interferona. Realno je pretpostaviti da smanjenje inflamacije može imati uticaja na smanjenje bola prouzrokovanog AO. Laser male snage blokira sintezu prostaglandina i prostaciklina, stimuliše neutrofilnu, makrofagnu i lizozomnu aktivnost, što deluje izrazito antiinflamatorno^{19,20}. Imajući u vidu navedene podatke, cilj rada bio je da se analizira uticaj LMS na smanjenje bola i zarastanje ekstrakcionih rana sa AO.

Metode

U ispitivanje je bilo uključeno 60 ispitanika oba pola, starosti od 21 do 49 godina, koji su posle rutinskog vadenja zuba upućeni u kliniku bez prethodnog hirurškog tretmana ekstrakcione rane. Kod svih ispitanika dijagnostikovano je AO u donjoj vilici na osnovu simptoma koje su Fridrih i Olson³

predložili kao patognomonične. Pre primenjene terapije sproveden je klinički pregled kod svih ispitanika pri čemu su korišćeni anamneza, objektivni nalaz i periapikalna radiografija. Pri tom, ni u jednom slučaju nije registrovano postojanje sistemskog oboljenja i nije utvrđeno prisustvo perikoronitisa u usnoj duplji. U istraživanje su bili uključeni samo oni ispitanici kod kojih se AO javio drugog dana posle ekstrakcije zuba.

Ispitanici su bili podeljeni na studijsku (SG) i kontrolnu (KG) grupu. Kod ispitanika obe grupe sproveden je sledeći postupak: lokalna anestezija za *n. alveolaris inferior* primenom anestetika lidokaina sa adrenalinom u koncentraciji 1:80 000 (Lidokain 2%-adrenalin, Galenika, Beograd) u količini od 2 mL i uklanjanje koštanih fragmenata, blaga kiretaža i irigacija ekstrakcione rane mlakim 0,9% fiziološkim rastvorom u količini od 10 mL²¹. Ispitanici za vreme ispitivanja nisu koristili druge medikamente i antibiotike. Svi ispitanici bili su saglasni sa predloženim lečenjem AO, u skladu sa Helsinškom deklaracijom²².

Studijsku grupu činilo je 30 ispitanika kod kojih je primenjen LMS. Primenjen je GaAlAs laser snage 20 mW, talasne dužine 670 nm, kontinuiranog režima rada. Ispitanici su zračeni neposredno posle obrade rane i narednih sedam dana tako da je ukupno sprovedeno osam seansi zračenja. Svakodnevno je tkivu po tački prečnika 0,5 cm predavana energija od 4 J/cm² u trajanju od 200 s, tako da je ukupno zračenje pri svakoj seansi iznosilo 12 J/cm² u trajanju od 600 s. Zračenja su tri polja: površina formiranog koaguluma, vestibularna i bukalna gingiva oko alveole.

Kontrolnu grupu (KG) činilo je 30 ispitanika kod kojih je, posle obrade ekstrakcione rane, u površni deo rane stavljen cink-oksidi eugenol zavoj koji je pripreman tako što su cink-oksidi i eugenol pomešani sa sterilnom vatom zbog bolje konzistencije. Zavoj je menjan na 48 sati do prestanka bola.

Intenzitet doživljenog bola utvrđivan je primenom vizuelna analogne skale (VAS), horizontalno nacrtane duži od 100 mm. Svi ispitanici na skali su označavali jačinu svog bola koji su osetili u njegovom najvećem intenzitetu. Merenjem milimetrskog rastojanja od nultog položaja do obeleženog mesta dobijan je približan intenzitet bola. Zatim je preračunavana njegova srednja vrednost. Merenje bola vršeno je 10 min. pre tretiranja rana sa AO i u narednom periodu, svakodnevno, u sledećih osam dana.

Dejstvo LMS na zarastanje ekstrakcionih rana procenjavano je osmog dana od obrade rana po sledećoj skali: potpuna epitelizacija ekstrakcione rane, delimična epitelizacija ekstrakcione rane, odsustvo epitelizacije, alveola ispunjena raspadnutim koagulomom, ili potpuno prazna.

Rezultati

Nisu utvrđene statistički značajne razlike prema polu i prosečnoj starosti ispitanika SG i KG (tabela 1).

Alveolarni osteitis kod 25 ispitanika registrovan je u predelu ekstrakcionih rana donjih drugih molara, kod 21 ispitanika u predelu donjih prvih molara i kod 14 ispitanika u predelu donjih trećih molara.

Tabela 1.

Bolesnici	Ispitivane grupe	
	SG	KG
Pol [(n/%)]		
muški	13 (43,33)	12 (40)
ženski	17 (56,67)	18 (60)
Prosečna starost (god), $\bar{x} \pm SD$	34,63 \pm 7,18	38,33 \pm 8,84

SG – studijska grupa (tretirana laserom male snage)

KG – kontrolna grupa (tretirana cink-oksidi eugenolom)

Svi ispitanici 10 min. pre tretiranja ekstrakcionih rana sa AO opisali su doživljeni bol kao veoma jak. Bol je bio približno jednak kod ispitanika obe grupe (tabela 2). Prosečna vrednost bola merenog pomoću VAS tokom ispitivanog perioda opadala je u obe grupe. Petog dana Studentovim *t*-testom nezavisnih uzoraka ustanovljena je statistički značajno niža prosečna vrednost bola u SG nego u KG ($p < 0,01$), a nivo statističke značajnosti razlike 6, 7. i 8. dana porastao je i bio maksimalan ($p < 0,001$).

ispitanika SG. Kasnije se ta razlika uvećala ($p < 0,001$) tako da su ispitanici SG imali značajno manje bolove što je svakako rezultat ubrzanog zarastanja rana usled delovanja LMS.

Primena VAS u ispitivanju bola je česta pošto omogućava jednostavno opisivanje bola i pruža relativno tačne podatke o njegovom intenzitetu.

U literaturi nema dovoljno radova na temu dejstva LMS na AO. Zimmermann²³ je ukazao na biostimulativni efekat He-Ne lasera u redukciji bola i ubrzanje zarastanja rana kod

Tabela 2.

Intenzitet bola izražen vizuelnom analognom skalom (VAS)

Trajanje terapije u danima	VAS (mm)	
	SG ($\bar{x} \pm SD$)	KG ($\bar{x} \pm SD$)
10 minuta pre terapije	93,90 \pm 4,03	94,27 \pm 4,39
1	58,67 \pm 8,60	56,83 \pm 6,36
2	57,27 \pm 7,26	57,17 \pm 6,39
3	41,30 \pm 6,46	39,13 \pm 6,60
4	33,67 \pm 6,56	31,17 \pm 3,87
5	26,33 \pm 6,01	30,17 \pm 3,07*
6	16,77 \pm 4,68	28,17 \pm 3,59 [†]
7	7,43 \pm 4,16	22,17 \pm 3,64 [†]
8	2,07 \pm 2,00	11,93 \pm 2,70 [†]

* $p < 0,01$; [†] $p < 0,001$ vs KG

SG – studijska grupa (tretirana laserom male snage)

KG – kontrolna grupa (tretirana cink-oksidi eugenolom)

Iz podataka navedenih u tabeli 3 evidentno je da je proces zarastanja bio značajno bolji u SG nego u KG ($\chi^2 = 6,30$, $p = 0,0429$). Potpuna epitalizacija bila je statistički značajno zastupljenija u SG nego u KG ($\chi^2 = 4,39$, $p = 0,0361$).

AO. Fikackova i sar.²⁴, u sličnom istraživanju registrovali su ubrzano zarastanje rana, ali odsustvo analgetskog efekta LMS. Međutim, ta pilot studija izvedena je na svega dva ispitanika. Neugebauer i sar.²⁵, na 100 ispitanika i 130 vilica,

Tabela 3.

Zarastanje ekstrakcionih rana posle 8 dana

Proces zarastanja	Ispitivane grupe [n (%)]	
	KG	SG
Potpuna epitalizacija ekstrakcione rane	13 (43,3)	22 (73,3)*
Delimična epitalizacija ekstrakcione rane	12 (40,0)	7 (23,4)
Odsustvo epitalizacije	5 (16,7)	1 (3,3)*
Alveola ispnjena raspadnutim koagulumom ili je prazna	–	–
Ukupno rana	30 (100)	30 (100)

* $p < 0,05$ vs KG

SG – studijska grupa (tretirana laserom male snage)

KG – kontrolna grupa (tretirana cink-oksidi eugenolom)

Diskusija

U ovoj studiji postignuto je smanjenje bola kod ispitanika sa AO kod kojih je primenjen LMS. U prva četiri dana registrovan je sličan intenzitet bola u obe ispitivane grupe, da bi se petog dana pojavila statistički značajna razlika ($p < 0,01$) kod

registrovali su izraženo dejstvo LMS na AO, ali u kombinaciji sa antimikrobnom fotodinamskom terapijom.

Primena LMS ubrzava proces zarastanja rana^{26, 27}. To pokazuju i rezultati naše studije, tj. potpuna epitalizacija ekstrakcione rane bila je statistički značajno zastupljenija u SG nego u KG ($p < 0,05$). Osnovni cilj terapije AO je formiranje

vitalnog, elastičnog i kompaktnog koaguluma koji će smanjiti bol i čijom će organizacijom doći do normalnog zarastanja ekstrakcione rane. Laser male snage stimulira pretvaranje ADP u ATP, povećava intracelularnu energiju i ubrzava ćelijski metabolizam²⁸. Primenom LMS povećava se sinteza DNA i stimulira razmnožavanje ćelija, tako da je u oblasti laserskog zračenja ubrzana diferencijacija i deoba epitelnih, vezivotkivnih i koštanih ćelija^{16,29,30}. Kako AO predstavlja poremećaj u zarastanju ekstrakcione rane, tj. poremećene faze formiranja i organizacije koaguluma, ubrzanje ovih procesa može rezultirati bržim zarastanjem rane i smanjenjem bola.

Nasuprot tome, cink-oksidi eugenol zavoj usporava proces zarastanja ekstrakcione rane⁵. To može biti objašnjenje za dobijeni statistički slabiji rezultat u pogledu smanjenja bolova u KG. Pored toga, nedostatak cink-oksidi eugenol zavoj je i moguća nekroza tkiva sa kojim je u dodiru i vrlo jak karakterističan miris koji često smeta bolesnicima.

Alveolarni osteitis gotovo se nikad ne javlja kod parodontopatičnih zuba ili male dece zbog dobre prokrvljenosti vilica. Poznato je da u ekstrakcionim ranama koje ostaju neispunjene krvlju češće nastaje AO i da se ishemija rane dovodi u direktnu vezu sa postekstrukcionim bolom. Primena LMS u zračenom području izaziva aktivnu hiperemiju što za posledicu ima resorpciju zapaljenskog infiltrata i redukciju edema^{15,31}. Bolja prokrvljenost rane znači ubrzanje njenog metabolizma, što je osnovni cilj u lečenju AO, a to je postignuto u ovom istraživanju.

Odnos muškaraca i žena sa AO u našoj studiji bio je 58,3% prema 41,7% u korist žena. O češćoj zastupljenosti

AO kod žena govore i druge studije^{9,32}, mada AO može biti i podjednako zastupljen kod oba pola³³. Prosečna starost bolesnika sa AO iznosila je 34,63 godine u SG i 38,33 godine u KG, dok je u ostalim studijama prosečna starost bila nešto niža^{9,34}. Kod 41,7% bolesnika AO nastaje posle ekstrakcije donjih prvih molara, kod 35% posle ekstrakcije donjih drugih i kod 23,3% posle ekstrakcije donjih trećih molara. Poznato je da se AO najčešće javlja posle hirurških ekstrakcija impaktiranih donjih trećih molara^{2,3,15,31}. Kako se naša studija bavila AO nastalim posle rutinskih ekstrakcija zuba, jasno je zašto postoji ovakva razlika u rezultatima.

Redukcija bola bila je izraženija kod ispitanika sa AO čije su ekstrakcione rane zračene pomoću LMS u odnosu na ispitanike čije su ekstrakcione rane tretirane medikamentno, primenom cink-oksidi eugenol zavoj. Ekstrakcione rane koje su bile izložene LMS zarasle su uspešnije i brže od netretiranih. Negativni efekti LMS prilikom ovog istraživanja nisu registrovani. Negativni efekti cink-oksidi eugenol zavoj odnosili su se najčešće na primedbe bolesnika u pogledu njegovog veoma oštrog mirisa i neznatnog bola koji se javljao prilikom ekstirpacije zavoj iz alveole.

Zaključak

Istraživanje je pokazalo da je sniženje bola bilo izraženije kod ispitanika sa alveolarnim osteitisom čije su ekstrakcione rane bile podvrgnute zračenju laserom male snage nego kod ispitanika u čije ekstrakcione rane je stavljen zavoj cink-oksidi eugenola.

L I T E R A T U R A

1. Crawford JY. Dry socket. Dent Cosmos 1896; 38: 929.
2. Noroozi AR, Philbert RF. Modern concepts in understanding and management of the "dry socket" syndrome: comprehensive review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; 107(1): 30–5.
3. Fridrich KL, Olson RA. Alveolar osteitis following surgical removal of mandibular third molars. Anesth Prog 1990; 37(1): 32–41.
4. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. A textbook of oral pathology. Philadelphia: W.B. Saunders; 1983.
5. Blum IR. Contemporary views on dry socket (alveolar osteitis): a clinical appraisal of standardization, aetiopathogenesis and management: a critical review. Int J Oral Maxillofac Surg 2002; 31(3): 309–17.
6. Nitzgan DW. On the genesis of "dry socket". J Oral Maxillofac Surg 1983; 41(11): 706–10.
7. Bloomer CR. Alveolar osteitis prevention by immediate placement of medicated packing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000; 90(3): 282–4.
8. Poor MR, Hall JE, Poor AS. Reduction in the incidence of alveolar osteitis in patients treated with the SaliCept patch, containing Acemannan hydrogel. J Oral Maxillofac Surg 2002; 60(4): 374–9.
9. Hedström L, Sjögren P. Effect estimates and methodological quality of randomized controlled trials about prevention of alveolar osteitis following tooth extraction: a systematic review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007; 103(1): 8–15.
10. Rutkowski JL, Fennell JW, Kern JC, Madison DE, Johnson DA. Inhibition of alveolar osteitis in mandibular tooth extraction sites using platelet-rich plasma. J Oral Implantol 2007; 33(3): 116–21.
11. Alexander RE. Dental extraction wound management: a case against medicating postextraction sockets. J Oral Maxillofac Surg 2000; 58(5): 538–51.
12. Masse JF, Landry RG, Rochette C, Dufour L, Morency R, D'Aoust P. Effectiveness of soft laser treatment in periodontal surgery. Int Dent J 1993; 43(2): 121–7.
13. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. J Clin Periodontol 1996; 23(5): 492–6.
14. Jovanović G, Burić N, Kesic Lj. Effects of soft laser in pain therapy after root resection. J Oral Laser Applic 2003; 3: 83–6.
15. Marković A, Todorović Lj. Effectiveness of dexamethasone and low-power laser in minimizing oedema after third molar surgery: a clinical trial. Int J Oral Maxillofac Surg 2007; 36(3): 226–9.
16. Posten W, Wrono DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. Dermatol Surg 2005; 31(3): 334–40.
17. Serrati S, Margheri F, Bruschi S, D'Alessio S, Pucci M, Fibbi G, et al. Plasminogen activators and inhibitor type-1 in alveolar osteitis. Eur J Oral Sci 2006; 114(6): 500–3.
18. Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. Kinins in pain and inflammation. Pain 2000; 87(1): 1–5.
19. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. Int Dent J 1994; 44(2): 181–9.
20. Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T, et al. Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched

- human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 1995; 74(7): 1382–8.
21. *Turner PS*. A clinical study of "dry socket". *Int J Oral Surg* 1982; 11(4): 226–31.
22. Helsinki Deklaration. 2007; 1–2. Available from: URL: <http://WWW.onlineethics.org/reseth/helsinki.html> [accessed 2007 May 2].
23. *Zimmermann M*. Studies on the therapeutic efficacy of a HeNe laser. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 1990; 14(4): 313–9. (German)
24. *Fikackova H, Navratilova B, Dylensky I, Navratil L, Jirman R*. Assessment of the effect of non invasive laser on the process of healing of an extraction wound by infrared thermography: preliminary study. *J Applied Biomed* 2003; 1(3): 175–80.
25. *Neugebauer J, Jožsa M, Kübler A*. Antimicrobial photodynamic therapy for prevention of alveolar osteitis and post-extraction pain. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2004; 8(6): 350–5. (German)
26. *Nayak BS, Maiya A, Kumar P*. Influence of Helium-Neon Laser Photostimulation on Excision Wound Healing in Wistar Rats. *OnLine J Biol Sci* 2007; 7(2): 89–92.
27. *Hopkins JT, McLoda TA, Seegmüller JG, David Baxter G*. Low-Level Laser Therapy Facilitates Superficial Wound Healing in Humans: A Triple-Blind, Sham-Controlled Study. *J Athl Train* 2004; 39(3): 223–9.
28. *Berns MW, Bewley W, Sun CH, Templin P*. Free electron laser irradiation at 200 microns affects DNA synthesis in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(7): 2810–2.
29. *Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K*. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials* 2005; 26(17): 3503–9.
30. *Nikola RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco M, Reis LM, Zangaro R*. Effect of low power GaAlAs laser (660nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. *J Lasers Med Sci* 2005; 20: 11–20.
31. *Aras MH, Güngörmüş M*. The effect of low-level laser therapy on trismus and facial swelling following surgical extraction of a lower third molar. *Photomed Laser Surg* 2009; 27(1): 21–4.
32. *Hermesch CB, Hilton TJ, Biesbrock AR, Baker RA, Cain-Hamlin J, McClanahan SF*, et al.. Perioperative use of 0.12% chlorhexidine gluconate for the prevention of alveolar osteitis: efficacy and risk factor analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(4): 381–7.
33. *Delilbasi C, Saracoglu U, Keskin A*. Effects of 0.2% chlorhexidine gluconate and amoxicillin plus clavulanic acid on the prevention of alveolar osteitis following mandibular third molar extractions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94(3): 301–4.
34. *Bonine FL*. Effect of chlorhexidine rinse on the incidence of dry socket in impacted mandibular third molar extraction sites. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79(2): 154–7.

Primljen 21. VII 2010.
Revidiran 11. X 2010.
Prihvaćen 19. X 2010.



Prognostic value of apoptotic activity in muscle-invasive bladder cancer

Prognostička vrednost apoptoze kod mišićnoinvazivnog karcinoma mokraćne bešike

Ana Ristić*, Ljubinka Janković Veličković*,
Dragana Stokanović†

School of Medicine, *Institute of Pathology, †Institute of Pharmacology,
Niš, Serbia

Key words:

urinary bladder neoplasms; apoptosis; tumor markers, biological; cystectomy.

Ključne reči:

mokraćna bešika; neoplazme; apoptoza; tumorski markeri, biološki; cistektomija.

Introduction

Transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder is a common malignancy worldwide that is associated with significant morbidity and mortality. The increasing number of patients diagnosed with urothelial cancer, year after year, and obvious limitations in standard diagnostic, therapeutic and prognostic approaches, created a strong interest in applying immunohistochemistry in the field of uropathology.

A hallmark of bladder cancer is its variable prognosis. However, aggressive behavior is generally restricted to those tumors that are high grade, that have penetrated the lamina propria extensively and that are accompanied by carcinoma *in situ* either nearby to the tumor or at distant sites¹⁻³.

Conventional clinical and pathologic parameters such as tumor grade, stage, size, multifocality, as well as vascular and lymphatic extension provide important diagnostic and prognostic information⁴. The presence or absence of numerous histological parameters, such as thickness of urothelium, polarity, cytoplasmic clearing, nuclear size, nuclear crowding, nuclear chromatin distribution, nucleoli, mitoses, accompanying inflammation and neovascularity, undoubtedly, helps coming to the proper diagnosis for a given case^{5,6}. Yet, they have a limited ability to predict the clinical outcome of many patients with bladder cancer and extensive efforts have been made to identify markers that could foretell recurrence and progression of the disease, development of metastases, response to treatment and patient survival². To become of clinical use, new prognostic markers must add some predictive capability beyond what current clinical and pathologic parameters offer⁴.

Prognostic mystery of muscle-invasive urothelial cancer

It has been established that patients with high-grade, muscle-invasive tumors at primary diagnosis or recurrence have poor prognosis⁷. Fifty percent of these patients develop distant metastases within two years and 60% die within five years of initial treatment. Thus, new questions are being proposed: How do we best monitor patients for recurrence and progression of disease? How do we identify patients who need adjuvant therapy after radical cystectomy? Which patients will have benefit from adjuvant therapy?

Radical cystectomy with pelvic lymph-node dissection is currently the mainstay of treatment for patients with muscle-invasive cancer. However, 10-year survival rates for individuals treated by radical cystectomy are only 37%–45%^{8,9}. It is widely accepted that presence of the clinically undetectable micrometastases is the main reason of the above statistics. In theory, the use of preemptive or neoadjuvant chemotherapy should, therefore, offer a chance to control distant disease and improve long-term survival. Nevertheless, the results of numerous clinical trials have been more disappointing than promising, no approach for treating advanced bladder cancer has proved to be optimal, with a large meta-analysis failing to show any survival benefit. Most recently, an international multicentre trial of 976 patients comparing radical treatment with or without neoadjuvant cisplatin, methotrexate and vinblastine showed only a 5.5% absolute difference in survival at 3 years, which was less than the 10% that was required for introduction into clinical use^{10,11}.

The latest large international cohort which included 4,257 patients treated with radical cystectomy for bladder TCC presented that a 5-year recurrence-free and cancer specific survival was only 29%. Patients with pT4 bladder urothelial carcinoma had very variable outcomes. Furthermore, Tilki et al.¹² pointed out that female patients with pT4 bladder TCC had worse outcome than male patients with the same stage of the disease.

These findings represent a step forward but there is a doubt whether all patients should be exposed to the toxic effects of chemotherapy. Perhaps, the answer could be found in the patient selection which, in fact, might be the best way of improving treatment outcome in the future^{9,10}.

Controversial expression of members bcl-2 family proteins in muscle-invasive bladder cancer

Bladder cancer can occur at any age, but it is generally a disease of the middle-aged and elderly population, with a median age at diagnosis of 66 years¹³. Like other malignancies that arise in later life, bladder cancer is a result of acquired alterations in DNA, which may manifest as induction of oncogenes, loss of tumor-suppressor genes, impairment of normal DNA repair mechanisms or interruption of cell cycle homeostasis¹⁴.

The most recent studies have indicated that the entire apoptotic cascade in bladder cancer suffer genetic changes^{9,14,15}.

Many of the proteins that conduct apoptosis are constitutively expressed in viable cells, but under favorable growth conditions, their pro-apoptotic activities are held in check by bcl-2 and its pro-survival relatives¹⁶⁻²⁰. Some members of the bcl-2 family, such as bcl-2 and bcl-xL, are mighty inhibitors of apoptosis, whereas other family members, such as bak and bax, promote this cell death process²⁰⁻²².

In histologically normal urothelium, weak bcl-2 immunostaining is detected in basal cell compartment which reflects the need of the progenitor cells for bcl-2 protection against apoptosis in order to ensure survival of the entire epithelium. Bcl-2 oncoprotein absence in the suprabasal layers of normal urothelium demonstrates that bcl-2 is not necessary during completion of the differentiation process²³. Since bcl-2 expression was found to be absent in the normal adjacent bladder tissues examined, the hypothesis that this gene expression may have large impact on bladder carcinogenesis has been proposed²⁴. Some earlier studies suggested that bcl-2 expression was an independent prognostic factor associated with favorable clinical outcome in some human cancers including urinary tract cancers, but not in the invasive bladder cancer²³. Thus, although bcl-2 itself does not appear to have a major prognostic importance in invasive bladder cancer, a persistent presence of excess bcl-2 protein might be associated with a poor prognosis to some extent.

Over expression of the bcl-2 protein protects against a wide variety of apoptotic attacks including radiation and nearly all chemotherapeutic drugs. This over expression of bcl-2 in cancer cells has been reported to interfere with the therapeutic effect of cisplatin through an inhibition of the

apoptotic pathway. The bax protein acts as a determinant of an intrinsic chemosensitivity and a gradual enrichment of the bax-negative tumor cells gives a selective survival advantage presenting them more resistant to a chemotherapy-induced apoptosis after radical cystectomy²⁵.

In 2006, Maluf et al.²⁶ presented a study evaluating the expression of bcl2, p53 and MDM2 proteins in patients with muscle invasive TCC treated with cisplatin based neoadjuvant therapy. In this study, altered expression of p53 and bcl2 was seen in approximately half of the tumors with a poor outcome and a 5-year survival of 25% and a median survival of 1.1 years^{26,27}.

On the contrary, Shiina et al.²⁸ found no significant correlation between bcl-2 expression and overall survival in 77 patients who received cystectomy. In an analysis of 109 patients with invasive bladder carcinoma treated with preoperative radiation therapy without concurrent chemotherapy, Pollack et al.²⁹ demonstrated that bcl-2 over expression was significantly associated with disease progression and upstaging of the tumor during radiation therapy. However, bcl-2 over expression had no significant effect on response to a combination of platinum-based chemotherapy and radiation therapy.

Li et al.²³ in their study did not find any relation between bcl-2 expression and the histological stage of progression, lymphovascular infiltration or node invasion. However, when they analyzed the data by individual case, a higher proportion of loss of bcl-2 expression was found in superficial or lower-grade TCC cases than those in muscle-invasive or high-grade TCC cases. They also showed that p53 over expression was changing from negative in dysplasia to positive in carcinoma, which was opposite from bcl-2 expression.

Bax inhibits the function of bcl-2 by inducing a bax-bcl-2 complex or by competing with other bcl-2 targets. When the bax expression was higher than the bcl-2 expression, the results seemed to be protective against an early relapse at an early stage of the disease. According to some studies, a greater expression of bax and a lower expression of bcl-2 lead to a favorable ratio of bcl-2/bax which would induce a greater protection from a recurrence of a bladder cancer^{25,30}.

The Bladder Tumor Marker Network also evaluated a series of 109 patients with G2 or G3, T2 to T3 TCC bladder disease and found no prognostic value of bax and p53 staining. In a study of 109 patients with pT2N0M0 bilharzial-related bladder cancer, bax, along with MIB-1(Ki-67), bcl-x, and p53, was an independent predictor of progression-free survival in the urothelial carcinoma group^{4,30,31}.

Diagnostic achievements using not only one marker

The number of simultaneously altered apoptosis markers is an important prognostic indicator for disease recurrence and bladder cancer-specific survival in patients treated by radical cystectomy. The fact that many steps in the cascade need to be altered to achieve inhibition of apoptosis seems intuitive. However, supporting data to this proposition are scarce. On the contrary, cell-cycle regulators have al-

ready been shown to have superior predictive value for both disease recurrence and disease-specific survival when studied in combination rather than when assessed as single markers^{9, 32, 33}.

Several proliferation and metastasis-associated molecules, such as Ki-67, Rb, EGFR, E-cadherin, MSH2, cyclins, p21WAF1, Kip1, survivin and p53 and other apoptosis-related molecules have shown potential in providing prognostic information related to tumor grade, tumor growth, metastasis, recurrence, and overall survival and cancer specific survival in urothelial carcinomas. The results of many studies are still contradictory and there is no exact marker yet^{4, 34, 35}.

It has been established that p53 expression cannot be used solely for a definite prognosis or a selection for either sensitivity or resistance to anticancer treatments. Similarly, other proteins involved in apoptosis, such as bcl-2, bax, CD95 or specific caspases, cannot currently be used for determining sensitivity or resistance to anticancer therapy³⁶.

Karam et al.⁹ showed that only a combined expression of the apoptosis markers bcl-2, caspase-3, p53 and survivin was in association with oncological outcomes of patients treated by radical cystectomy and bilateral lymphadenectomy for TCC of the bladder. Their results showed that altered expression of bcl-2, caspase-3, p53, and survivin were present in more than two thirds of patients with muscle-invasive

TCC of the bladder. The altered status of each of the four markers was associated with advanced pathological stage. P53 and caspase-3 were associated with high tumor grade, p53 and survivin with lymphovascular invasion and all three markers were related to lymph-node metastases^{9, 37, 38}.

In accordance with rapid development of diagnostic medicine, it is clear that genomics and proteomics represent powerful and promising tools in current cancer research and it is only a question of time when all those new findings will enter clinical practice and be available to every patient^{39, 40}. A major challenge will be the integration of proteomics, genomics and immunohistochemistry with current available prognostic markers. This would surely enable the best patient selection for the concomitant therapy after radical cystectomy.

Conclusion

So far, no marker has proven itself to be sufficient in providing reliable prognosis and being a mainstay for therapy decision-making in patients with muscle invasive TCC of the bladder. The prognosis based on apoptotic status can be best provided through immunohistochemical staining of a number of apoptotic markers simultaneously. As we are faced with very inconvenient disease in prognostic and therapeutic sense, more studies on this issue are needed.

R E F E R E N C E S

1. Knowles MA. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol* 2001; 54(4): 215–21.
2. Malats N, Bustos A, Nascimento CM, Fernandez F, Rinas M, Puente D, et al. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol* 2005; 6(9): 678–86.
3. Helpap B, Schmütz-Dräger BJ, Hamilton PW, Muzzonigro G, Galosi AB, Kurth KH, et al. Molecular pathology of non-invasive urothelial carcinomas (part I). *Virchows Arch* 2003; 442(4): 309–16.
4. Habuchi T, Marberger M, Droller MJ, Hemstreet GP, 3rd, Grossman HB, Schalken JA, et al. Prognostic markers for bladder cancer: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005; 66(6 Suppl 1): 64–74.
5. Montironi R, Lopez-Beltran A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *Int J Surg Pathol* 2005; 13(2): 143–53.
6. Montironi R, Mazzucchelli R, Scarcelli M, Lopez-Beltran A, Cheng L. Morphological diagnosis of urothelial neoplasms. *J Clin Pathol* 2008; 61(1): 3–10.
7. Kausch I, Böhle A. Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol* 2002; 41(1): 15–29.
8. Hautmann RE, Gschwend JE, de Petriconi RC, Kron M, Volkmer BG. Cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: results of a surgery only series in the neobladder era. *J Urol* 2006; 176(2): 486–92.
9. Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Roehrborn CG, et al. Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy. *Lancet Oncol* 2007; 8(2): 128–36.
10. Cooke PW, James ND, Ganesan R, Burton A, Young LS, Wallace DM. Bcl-2 expression identifies patients with advanced bladder cancer treated by radiotherapy who benefit from neoadjuvant chemotherapy. *BJU Int* 2000; 85(7): 829–35.
11. Rosenberg JE, Hahn WC. Bladder cancer: modeling and translation. *Genes Dev* 2009; 23(6): 655–9.
12. Tilki D, Svatek RS, Karakiewicz PI, Isbarn H, Reich O, Kassouf W, et al. Characteristics and outcomes of patients with pT4 urothelial carcinoma at radical cystectomy: a retrospective international study of 583 patients. *J Urol* 2010; 183(1): 87–93.
13. Zivković S, Velicković L, Tasić-Dimov D, Kostov M, Stojanović N. Bladder tumors in young people. *Vojnosanit Pregl* 2003; 60(5): 621–4. (Serbian)
14. Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawachi S, Furuya T, Liu XP, Ikegami K, et al. Biological characteristics in bladder cancer depend on the type of genetic instability. *Clin Cancer Res* 2006; 12(9): 2752–8.
15. Korkolopoulou P, Lazaris AC, Konstantinidou AE, Kavantzis N, Patsouris E, Christodoulou P, et al. Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas. Relationship with apoptotic rate and survival. *Eur Urol* 2002; 41(3): 274–83.
16. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 2007; 12(9): 1543–68.
17. McKnight JJ, Gray SB, O'Kane HF, Johnston SR, Williamson KE. Apoptosis and chemotherapy for bladder cancer. *J Urol* 2005; 173(3): 683–90.
18. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495–516.
19. Kelly JD, Williamson KE, Irvine AE, Hamilton PW, Weir HP, Anderson NH, et al. Apoptosis and its clinical significance for bladder cancer therapy. *BJU Int* 1999; 83(1): 1–10.
20. Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* 2006; 13(8): 1378–86.
21. O'Neill J, Manion M, Schwartz P, Hockenbery DM. Promises and challenges of targeting Bcl-2 anti-apoptotic proteins for cancer therapy. *Biochim Biophys* 2004; 1705(1): 43–51.

22. Er E, Oliver L, Cartron PF, Juin P, Manon S, Vallette FM. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757(9–10): 1301–11.
23. Li B, Kanamaru H, Noriki S, Yamaguchi T, Fukuda M, Okada K. Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder. *Urol Res* 1998; 26(4): 235–41.
24. Gazzaniga P, Gradilone A, Vercillo R, Gandini O, Silvestri I, Napolitano M, et al. Bcl-2/bax mRNA expression ratio as prognostic factor in low- grade urinary bladder cancer. *Int J Cancer* 1996;69(2):100–4.
25. Babk JY, Lee J, Chung HS, Lee HY, Chung BC, Park MS, et al. Anticancer effect of deuterium oxide on a bladder cancer cell related to Bcl-2 and Bax. *J Ind Eng Chem* 2007; 13(4): 1–7.
26. Maluf FC, Corcon-Cardo C, Verbal DA, Satagopan JM, Boyle MG, Herr H, et al. Assessing interaction between MDM2, p53, Bcl2 as prognostic variables in muscle invasive bladder cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by locoregional surgical treatment. *Ann Oncol* 2006; 17(11): 1677–86.
27. Macoskaa JA, Adsule S, Tantivejkul K, Wang S, Pienta KJ, Lee C. –(–)Gossypol promotes the apoptosis of bladder cancer cells in vitro. *Pharmacol Res* 2008; 58(5–6): 323–31.
28. Shiina H, Igawa M, Urakami S, Honda S, Shirakawa H, Ishibe T. Immunohistochemical analysis of bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol* 1996; 49: 395–9.
29. Pollack A, Wu CS, Czerniak B, Zagars GK, Benedict WF, McDonnell TJ. Abnormal bcl-2 and pRb expression are independent correlates of radiation response in muscle invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1823–9.
30. Giannopoulou I, Nakopoulou L, Zervas A, Lazaris Ac, Stravodimos C, Giannopoulos A et al. Immunohistochemical study of pro-apoptotic factors Bax, Fas and CPP32 in urinary bladder cancer: prognostic implications. *Urol Res* 2002; 30(5): 342–5.
31. Haitel A, Posch B, El-Baz M, Mokhtar AA, Susani M, Ghoneim MA, et al. Bilharzial related, organ confined, muscle invasive bladder cancer: prognostic value of apoptosis markers, proliferation markers, p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor and c-erbB-2. *J Urol* 2001; 165(5): 1481.
32. Krüger S, Mahnen A, Kausch I, Feller AC. Value of clusterin immunoreactivity as a predictive factor in muscle-invasive urothelial bladder carcinoma. *Urology* 2006; 67(1): 105–9.
33. Krupski T, Moskaluk C, Boyd JC, Theodorescu D. A prospective pilot evaluation of urinary and immunohistochemical markers as predictors of clinical stage of urothelial carcinoma of the bladder. *BJU Int* 2000; 85(9): 1027–32.
34. Fromont G, Roupret M, Amira N, Sibony M, Vallancien G, Validire P, et al. Tissue microarray analysis of the prognostic value of E-cadherin, Ki-67, p53, p27, survivin and MSH2 expression in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Eur Urol* 2005; 48(5): 764–70.
35. Jankovic Velickovic L, Hattori T, Visnjic M, Dimov I, Sojanovic M, et al. E-cadherin expression in upper urothelial carcinoma in Balkan endemic nephropathy and non-endemic regions. *Pathol Res Pract* 2009; 205(10): 682–9.
36. Duffy MJ. Predictive Markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem* 2005; 51(3): 494–503.
37. Schultze IJ, Witjes JA, Swinkels DW, de Kok JB. Bladder cancer diagnosis and recurrence prognosis: Comparison of markers with emphasis on survivin. *Clin Chim Acta* 2006; 368(1–2): 20–32.
38. Margulis V, Lotan Y, Shariat SF. Survivin: a promising biomarker for detection and prognosis of bladder cancer. *World J Urol* 2008; 26(1): 59–65.
39. Beaudet AL, Belmont JW. Array-based DNA diagnostics: let the revolution begin. *Annu Rev Med* 2008; 59(1): 113–29.
40. Stojnev S, Pejic M, Dolicanin Z, Jankovic Velickovic LJ, Dimov I, Stefanovic V. Challenges of genomics and proteomics in nephrology. *Ren Fail* 2009; 31(8): 765–72.

Received on March 30, 2010.

Accepted on October 11, 2010.



Focal neuroendocrine differentiation in prostatic gland carcinoma with basaloid pattern

Bazalnoćelijski karcinom prostate sa neuroendokrinom diferencijacijom

Jasmina V. Gligorijević*, Ljubinka V. Veličković*, Snežana A. Jančić†, Zoran Radovanović‡, Miljan S. Krstić*, Vuka V. Katić*

University of Niš, School of Medicine, *Institute of Pathology, †Institute of Radiology, Niš, Serbia; University of Kragujevac, School of Medicine, ‡Institute of Pathology, Kragujevac, Serbia

Abstract

Introduction. Prostatic gland basal cell proliferations exhibit morphological continuum ranging from basal cell hyperplasia to basal cell carcinoma. In the following report, we described clinical features, morphological spectrum, neuroendocrine differentiation and histogenesis of prostatic gland basal cell carcinoma in our patient. **Case report.** Hematoxylin-eosin (HE), Alcian blue-periodic acid schiff (AB-PAS) at pH 2.5 stained sections and the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC), were performed on prostate gland paraffin-embedded tissue. Monoclonal antibodies directed against cytokeratin (34βE12) which selectively stains basal cells, prostate specific antigen (PSA), chromogranin A, neuron-specific enolase (NSE), synaptophysin and CD56, were used. Basal cell proliferations exhibited a morphological continuum ranging from basal cell hyperplasia to prostatic gland carcinoma. In these prostatic lesions, positive reactivity was demonstrated for 34βE12 and CD56. These findings indicate that the basaloid cells of basal cell hyperplasia, florid basal cell hyperplasia, atypical basal cell hyperplasia and basal cell carcinoma are derived from basal cells of the normal prostate gland suggesting a continuum in the progression of hyperplasia to benign and then malignant neoplasia. The presence of CD56 protein in the discovered lesions may be related to their neuroendocrine differentiation. **Conclusion.** The fact, that our patient was well six years after the radical prostatectomy supports the belief of some authors that basal cell carcinoma represents a low grade carcinoma with an excellent prognosis.

Key words:

prostatic neoplasms; prostatic hyperplasia; antigens, differentiation; histological techniques; immunohistochemistry.

Apstrakt

Uvod. Proliferacija bazalnih ćelija žlezda prostate pokazuje morfološki kontinuum od hiperplazije do karcinoma bazalnih ćelija. Prikazali smo kliničke odlike, morfološki spektar, bazalnoćelijsku proliferaciju, neuroendokrinu diferencijaciju i histogenezu karcinoma bazalnih ćelija žlezda prostate. **Prikaz bolesnika.** Preseci parafinskih blokova tkiva prostate bojeni su metodom hematoksilin/eozin (HE), *alcian blue* (AB) – *Periodic acid Schiff* (PAS) pri pH 2,5 i *avidin-biotin complex* (ABC). Upotrebljena su monoklonska antitela usmerena prema citokeratinu (34βE12) koja selektivno boje bazalne ćelije, prostata specifični antigen (PSA), hromogranin A, neuron-specifična enolaza (NSE), sinaptofizin i CD56. Proliferacija bazalnih ćelija pokazala je morfološki kontinuum od hiperplazije bazalnih ćelija do karcinoma prostate. U identifikovanim lezijama prostate prikazana je pozitivna reakcija za 34βE12 i CD56. Ovi nalazi ukazuju na to da bazaloidne ćelije u hiperplaziji, floridnoj hiperplaziji bazalnih ćelija, atipičnoj hiperplaziji bazalnih ćelija i karcinomu bazalnih ćelija nastaju iz bazalnih ćelija normalnih žlezda prostate ukazujući na kontinuum u progresiji hiperplazije ka benignim i malignim neoplazmama. Prisustvo CD56 proteina u otkrivenim lezijama može biti posledica njihove neuroendokrine diferencijacije. **Zaključak.** Činjenica da je prikazani bolesnik u dobrom stanju šest godina posle radikalne prostatektomije u saglasnosti je sa mišljenjem nekih autora da karcinom bazalnih ćelija prostate predstavlja malignu neoplazmu niskog gradusa malignosti sa odličnom prognozom.

Ključne reči:

prostata, neoplazme; prostata, hipertrofija; antigeni diferencijacije; histološke tehnike; imunohistohemija.

Introduction

Prostatic basal cell carcinoma is an uncommon neoplasm accounting for less than 0.01% of all prostatic gland carcinomas, composed of prostatic basal cells¹⁻¹⁴. In addition, the gross patterns have been reported for fewer than 10 cases¹⁵. It is believed that a subset of basal cells are prostatic epithelial stem cells, which can give rise to a spectrum of proliferative lesions ranging from basal cell hyperplasia (BCH) to basal cell carcinoma (BCC)¹⁻⁴. The distinction between these forms of BCH (including the variant with florid BCH) and BCC depends on morphological, immunohistochemical criteria and on the degree of cell proliferation²⁻⁸. Prostatic BCC is characterised by proliferation of cells arranged in various architectural patterns. Two morphological variants of BCC can be recognised in the prostate^{8,9}. Islands and cords of epithelial cells with peripheral palisading characterise the first type, morphologically similar to BCC of the skin. The second type, also called adenoid cystic carcinoma, is composed of nests of infiltrating tumor cells with an adenoid cystic pattern, morphologically similar to adenoid cystic carcinoma of the salivary glands^{8,9}. Neuroendocrine differentiation has been reported only in typical and small cell prostatic carcinoma. It takes several forms. Pure neuroendocrine carcinoma is rare and includes carcinoid tumor¹⁰⁻¹³. Immunohistochemistry clearly indicates that basal cell proliferations have the same immunophenotype as the basal cells present in normal ducts and acini. The cells are positively and strongly stained for high-molecular weight cytokeratin (34 β E12) and p63, consolidated markers for basal cells in the prostate^{4,7}. We reported a case with prostatic BCC, pointing out its neuroendocrine differentiation and an excellent prognosis.

Case report

A 58-year-old man presented in April 2001 with a 16-month history of increasing urinary obstructive symptoms. Diffuse enlargement of the prostate was documented by

transrectal ultrasound and digital rectal examination. The preoperative total serum prostate-specific antigen (PSA) concentration was 2.5 μ g/mL. The patient had radical prostatectomy. After diagnosing basal cell carcinoma of the prostate, a metastatic workup for tumor had normal results. The patient was alive without evidence of disease six years after the prostatectomy. Twelve blocks of prostate from a prostatectomy specimen were examined. Formalin-fixed, paraffin-embedded sections, 5 μ m in thickness, were classically processed and stained with hematoxylin-eosin (HE) slides, also were stained with Alcian blu (AB) –periodic acid schiff (PAS) at pH 2.5. For immunoperoxidase studies on the formalin fixed, paraffin wax embedded tissues, antibodies to the following antigens were used: 34 β E12 to highlight the basal cells (Dako Cytomation), rabbit anti PSA to mark prostatic secretory cells and, rabbit anti-chromogranin A, synaptophysin, and CD56 (to discover neuroendocrine differentiation of the prostatic gland BCPs). Selected sections of the prostate were stained by means of the labeled streptavidin – biotin method (Dako Cytomation; 1 : 100). The immunohistochemical staining of cells was recorded as either positive or negative one. At least 500 cells were counted on each slide.

Gross and microscopical pathology

The surgical specimen weighted 120 g and measured 4 \times 3.5 cm. The cut surface was white and nodular. At one end of the specimen an ovoid area was identified. The parenchyma was otherwise gray-white with occasional small cysts (Figure 1a). The surrounding prostate tissue was grossly and histologically unremarkable.

Microscopically, basal cell proliferations (BCPs) exhibit a morphological continuum ranging from ordinary BCH to prostatic gland BCC (Figures 1b–2d). The nests were composed of small, ovoid, basaloid cells having scanty cytoplasm and uniform nuclei with finely dispersed chromatin. Nucleoli were absent (Figures 1b and 1c). These cells stained

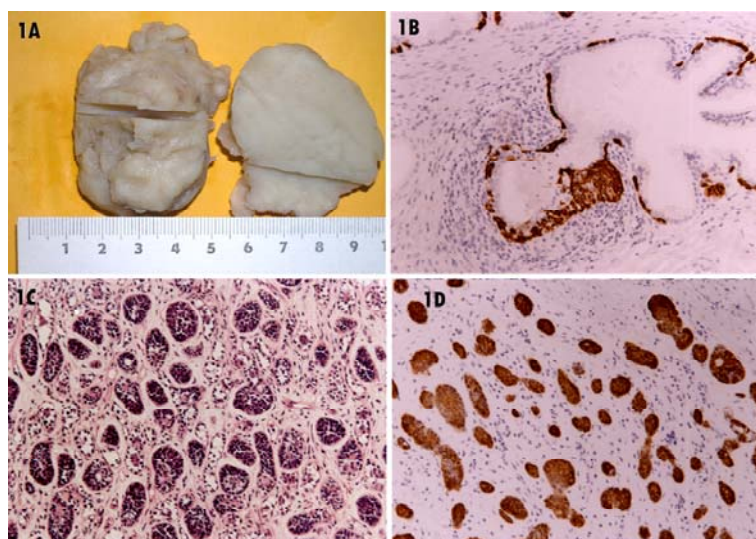


Fig. 1: A – macroscopic pattern; B – origin of solid nest from normal basal cells (immunostain for 34 β E12, \times 300); C – BCH (solid clusters of basaloid cells, HE \times 200); D – immunostain for 34 β E12 cytokeratin demonstrating strong positive reactivity (ABC \times 200).

BCH – basal cell hyperplasia; HE – hematoxylin-eosin; ABC – avian-biotin complex

positively for 34 β E12 and negatively for PSA (Figures 1d, 2a). Neuroendocrine markers-chromogranin, neuron-specific enolase (NSE) and synaptophysin could not mark neuroendocrine cells. The only marker that was able to detect these cells was CD56 (Figure 2b). The basal cells of the florid BCH contained minimal cytoplasm, moderate nuclear pleomorphism, prominent nucleoli and mitosis. The prostatic gland BCC was characterized by infiltrative growth and large irregular nests punctuated by cribriform spaces filled with small globules of dense eosinophilic material surrounded by basal cells. This material was AB-positive mucin in some areas and intensive PAS-positive hyaline material in others; peripheral palisading pattern also was evident, as well as myxoid stroma (Figure 2c). Some dense cords and islands of basaloid cells showed a significant nuclear hyperchromasia and higher mitotic activity (Figure 2d).

BCC from florid/atypical BCH is also very important, including extensive infiltration between normal prostatic gland, extension out of the prostate gland, perineural invasion or necrosis, as well as rare distant metastasis²⁻¹¹.

Prostatic neuroendocrine cells most likely derive from local stem cells and represent terminal differentiation in benign prostate tissue. A frequent occurrence of neuroendocrine (NE) differentiation in prostatic adenocarcinoma (author's experience) obviously reflects the differentiation repertoire of its stem cells^{12, 13}. Pure neuroendocrine differentiation is rare and includes carcinoid tumor¹². However, to the best of the authors knowledge, the neuroendocrine differentiation has not been described in prostatic BCC, by using chromogranin, neuron-specific enolase and synaptophysin, that we also have confirmed. But, by using CD56 (neural cell adhesion molecule), neuroendocrine marker for

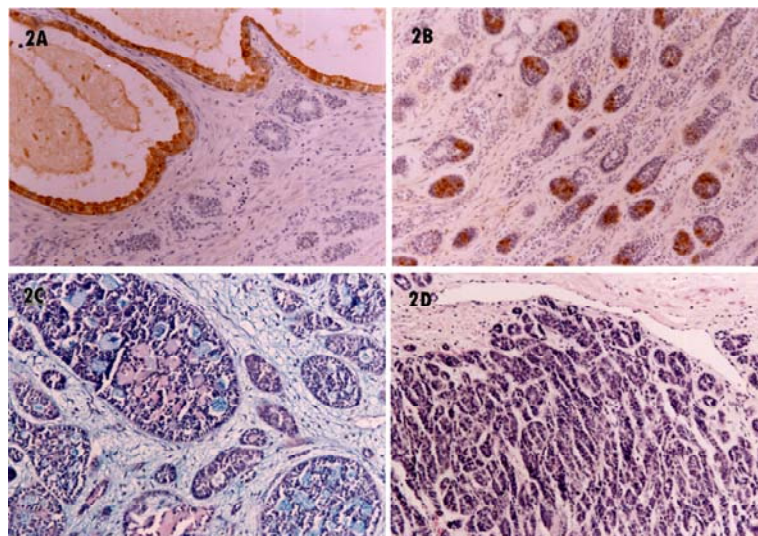


Fig. 2: A – BSH (positive PSA activity in normal ductal epithelium and negative in basaloid nests arrows, ABC \times 200); B – positive CD54 activity in hyperplastic basaloid nests (ABC \times 200); C – ACC (classic pattern of ACC; note nests having multiple lumina with mixoid stroma containing both AB and PAS positive material, AB-PAS \times 300); D – BCC (atypical basal cells infiltrate prostatic surrounding stromal tissue, HE \times 200).

PSA – prostate-specific antigen; ABC – avidin-biotin complex; ACC – adenoid cystic carcinoma; AB – Alcian blu; PAS – periodic acid scuff; BCC – basal cell carcinoma; HE – hematoxylin-eosin

Discussion

Prostatic gland BCH is an uncommon proliferative lesion whose major importance is possible confusion with prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and poorly differentiated (mostly Glison's 5) adenocarcinoma^{2, 9, 13}. The distinction between these two carcinomas depends on the following morphological and immunohistochemical features: small nests of basaloid cells have scanty cytoplasm, uniform nuclei, finely dispersed chromatin and occasional small nucleoli, with multilayered positively staining of the basal cells for 34 β E12 and, negatively for PSA¹²⁻¹⁴. The distinction of

both lung and prostatic small cell carcinomas and natural killer cells¹⁴, we found a strong expression of CD56 inside BCHs.

Conclusion

Prostatic gland basal cell proliferations range from ordinary BCH, to florid BCH and to BCC. Diagnosis of these lesions depends on morphological and immunohistochemical criteria. CD56 is an excellent marker for detection of neuroendocrine differentiation of BCHs.

REFERENCES

1. *Rionx-Leclercq NC, Epstein JI.* Unusual morphologic patterns of basal cell hyperplasia of the prostate. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(2): 237-43.
2. *Montironi R, Mazzucchelli R, Stramazzotti D, Scarpelli M, López Beltran A, Bostwick DG.* Basal cell hyperplasia and basal cell carcinoma of the prostate: a comprehensive review and discus-

- sion of a case with c-erbB-2 expression. *J Clin Pathol* 2005; 58(3): 290–6.
3. *Hudson DL*. Prostate epithelial stem cell culture. *Cytotechnology* 2003; 41(2–3): 189–96.
 4. *Yang XJ, Tretiakova MS, Sengupta E, Gong C, Jiang Z*. Florid basal cell hyperplasia of the prostate: a histological, ultrastructural, and immunohistochemical analysis. *Hum Pathol* 2003; 34(5): 462–70.
 5. *Epstein JI*. Precursor lesions to prostatic adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2009; 454(1): 1–16
 6. *Bhat S, Thomas A, Nazir M, Joseph GC, Dharmaj*. Basal cell hyperplasia of prostate - an entity a urologist must know. *Indian J Urol* 2000; 17(1): 61–2.
 7. *Arbab HB, Parwani AV*. Atypical adenomatous hyperplasia (adenosis) of the prostate: a case report with review of the literature. *Diagn Pathol* 2008; 3: 34.
 8. *Epstein JI, Armas OA*. Atypical basal cell hyperplasia of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1992, 16(12): 1205–14.
 9. *Mastropasqua MG, Pruneri G, Renne G, De Cobelli O, Viale G*. Basaloid cell carcinoma of the prostate. *Virchows Arch* 2003; 443(6): 787–91.
 10. *Egan AJM, Youngkin TP, Bostwick DG*. Mixed carcinoid-adenocarcinoma of the prostate with spindle cell carcinoid: the spectrum of neuroendocrine differentiation in prostatic neoplasia. *Pathol Case Rev* 1996; 1(2): 65–9.
 11. *Iczkowski KA, Ferguson KL, Grier DD, Hossain D, Banerjee SS, McNeal JE*, et al. Adenoid cystic/basal cell carcinoma of the prostate: clinicopathologic findings in 19 cases. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(12): 1523–9.
 12. *Mittal BV, Amin MB, Kinare SG*. Spectrum of histological lesions in 185 consecutive prostatic specimens. *J Postgrad Med* 1989; 35(3): 157–61.
 13. *Bonkhoff H*. Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status. *Ann Oncol* 2001; 12(Suppl 2): S141–4.
 14. *Yao JL, Madeb R, Bourne P, Lei J, Yang X, Tickoo S*, et al. Small cell carcinoma of the prostate: an immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(6): 705–12.

Received on November 23, 2009.

Revised on March 15, 2010.

Accepted on Jun 2, 2010.



Gastric adenomyoma

Adenomiom želuca

Mirko D. Kerkez*, Nebojša S. Lekić*, Djordje M. Čulafić†, Zoran J. Ražnatović*,
Igor I. Ignjatović*, Dragana D. Lekić‡, Dragana D. Mijač†

University of Belgrade, School of Medicine, Clinical Center of Serbia, *Clinic of Surgery,
†Clinic of Gastroenterology and Hepatology, Belgrade, Serbia; ‡Institute for Mother and
Children Health Care, Belgrade, Serbia

Abstract

Background. Gastric adenomyoma is a rare, hamartomatous tumor localized most frequently in the gastric antrum. Review of the available literature shows only sporadic reports or smaller series. **Case reports.** We presented a 72-year-old woman admitted due to epigastric pain with dyspeptic difficulties. Biochemical parameters and tumor markers were within the referential limits. Diagnostic procedures (upper endoscopy, endoscopic ultrasonography and computerized tomography) revealed an intramural tumor prominence with intact mucosa on the posterior wall of gastric antrum, not accessible for biopsy. Surgical treatment was performed with total extirpation of the tumor. Histopathological examination verified adenomyoma with focal low grade epithelial dysplasia. Cytologic immunophenotype was consistent with smooth muscle stromal and epithelial tumor (CK₇ and CK₂₀ ++ immunophenotype). Stromal component revealed low proliferative index (Ki-67 protein immunorexpression level 3%), and p53 less than 0.1% in both epithelial and stromal components. Following the operation, the patient remained in good condition. **Conclusion.** Uncertain malignant potential of the gastric adenomyoma in the presented case indicates that timely diagnostics with adequate surgical treatment is crucial for an adequate treatment.

Key words:

adenomyoma; stomach neoplasms; diagnosis; treatment outcome.

Apstrakt

Uvod. Adenomiom želuca predstavlja redak hamartomatozni tumor, lokalizovan najčešće u antrumu. Do danas su opisani samo sporadični slučajevi ili manje serije bolesnika sa ovim entitetom. **Prikaz bolesnika.** Prikazali smo bolesnicu, staru 72 godine, koja je primljena u bolnicu zbog bolova u epigastrijumu i dispeptičnih tegoba. Laboratorijske analize bile su u granicama referentnih vrednosti uključujući i tumorske markere. Urađenim dijagnostičkim procedurama (ezofagogastroduodenoskopija, endoskopski ultrazvuk i kompjuterizovana tomografija abdomena), utvrđeno je postojanje intramuralne prominencije na zadnjem zidu antruma sa intaktnom mukozom. Operativnim zahvatom urađena je ekscizija *in toto* tumorske mase. Patohistološkom analizom utvrđeno je postojanje adenomioma, sa niskostepenom epitelijalnom displazijom, sačinjenog od kombinovanog epitelijalno-mezenhimalnog tumora. Imunofenotipizacija je pokazala postojanje stromalnog (lejomiomskog) i epitelijalnog tumora sa displazijom (CK₇ i CK₂₀ ++), Ki₆₇ indeksom 3% i p53 indeksom manjim od 0,1%. Postoperativni tok je protekao uredno i bolesnica je otpuštena u dobrom opštem stanju. **Zaključak.** Nejasni maligni potencijal adenomioma sa displazijom kod ove bolesnice pokazuje da je za uspešno lečenje neophodno brzo postavljanje dijagnoze i adekvatno hirurško zbrinjavanje.

Ključne reči:

adenomiom; želudac, neoplazme; dijagnoza; lečenje, ishod.

Introduction

Gastric adenomyoma is a rare hamartomatous tumor. It is a combined epithelial-stromal proliferation most frequently localized in the gastric antrum (85%), about 4 cm from the pylorus or rarely in peripyloric region (15%)^{1, 2}.

Delvaux classified submucosal epithelial lesions as follows: hamartoma, gastric glandular heterotopy, submucosal glandular cysts, gastritis cystica profunda and adenoma³.

Histologically, adenomyoma is composed of hypertrophic smooth muscle fibers of the stroma surrounded by epithelial elements in the form of individual glandular struc-

tures, Brunner's glands, pancreatic ducts and acini². If tumor is predominantly composed of pancreatic tissue, the most adequate term would be heterotopic or residual pancreatic tissue¹.

We present the case of gastric adenomyoma, with focal epithelial dysplasia with uncertain malignant potential.

Case report

A 72-year-old female patient was admitted to the Department of Digestive Surgery due to epigastric pains, followed by dyspeptic difficulties.

Routine laboratory tests conducted at the time of referral to the hospital were within the normal ranges including inflammatory parameters. In addition, tumor markers were also within physiological ranges (CEA 2.1 ng/mL, CA 19-9 15.5 ng/mL). Physical examination failed to reveal significant abnormalities; there were no intraabdominal masses and no supraclavicular lymph nodes were palpable.

The patient underwent upper endoscopy demonstrating a submucosal mass in the distal antrum. Multiple biopsies were taken, but histology was inconclusive about the nature of the lesion, showing moderate superficial gastritis with foveolar hyperplasia, while *Helicobacter pylori* status was negative.

Endoscopic ultrasonography confirmed the intramural, extramucous prepyloric tumor 25 mm × 15 mm in diameter (Figure 1).

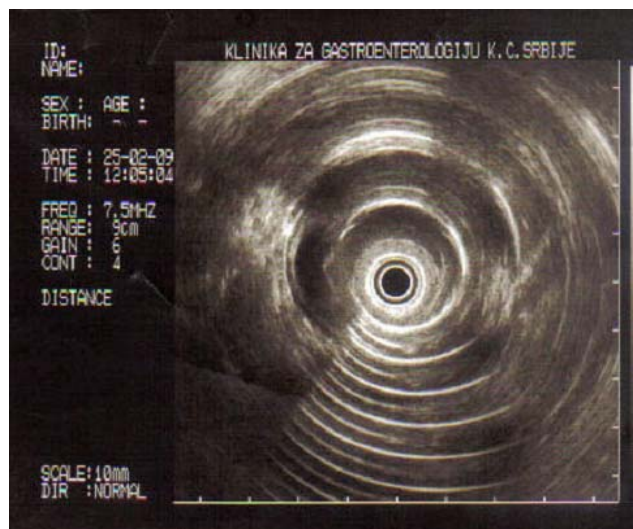


Fig. 1 – Endoscopic echosonography revealed the intramural, extramucous change of 25 × 15 mm in size on the gastric antrum posterior wall

Abdominal CT scan with contrast enhancement revealed the intramural, well-defined, solid-cystic lesion in the distal antrum.

Due to the clinical impression of gastric stromal tumor, a wedge resection was performed (Figure 2). Macroscopic examination revealed the mixed cystic-solid submucosal mass (25 × 15 × 10 mm) with an intact overlying mucosa.

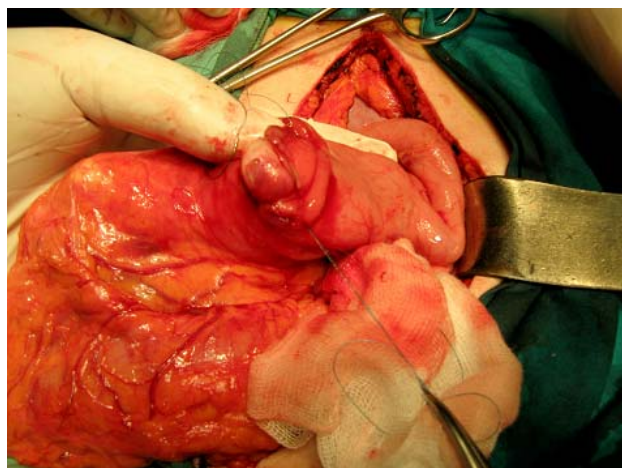


Fig. 2 – The oval, extramucous tumor verified intraoperatively on the posterior wall of the gastric antrum, and extirpated *in toto*

Microscopic examination with hematoxylin eosin staining verified the adenomyoma combined of the epithelial and mesenchymal cells of the distal antrum with epithelial focal low grade dysplasia. According to the cytologic immunophenotype the lesion was consistent with enteral (epithelial) and leiomyogeloma (stromal) tumor (Figure 3). Epithe-

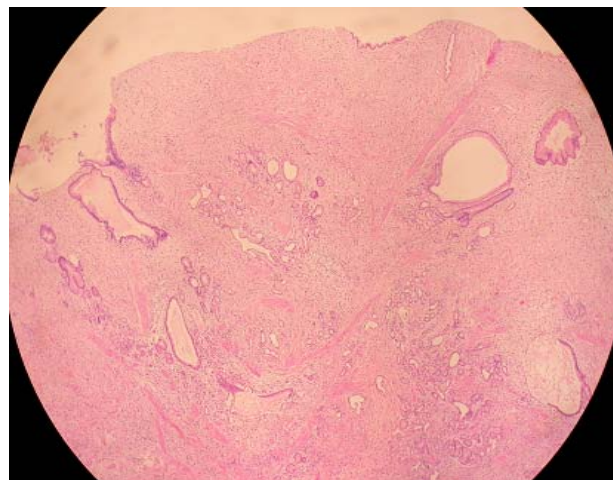


Fig. 3 – Epithelial and stromal overgrowth in a characteristic mixture revealed adenomyoma

lial component revealed CK7 and CK20 positive immunoppression, with Ki₆₇ index of 3 % and p53 less than 0.1% in stromal component. Stromal component manifested low cellularity and low cellular anaplasia with extremely low mitotic index of 0/50 HPF. There was no tumor invasion to adjacent structures and tumor necrosis, while the surface of the lesion, showed some focal pseudocystic degeneration (Figure 4).

Postoperative course was uneventful. Peroral intake started on the 4th postoperative day, and the patient was discharged on the 9th postoperative day.

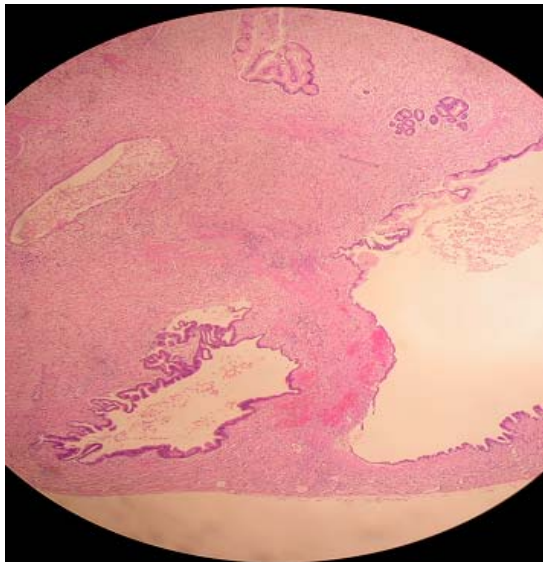


Fig. 4 – Focal low grade dysplasia of adenomyoma with pseudo-invasive features

Discussion

Gastric adenomyoma is an extremely rare benign tumor described also as: myoglandular hamartoma, adenomyomatous hamartoma, gastric adenomyoma, adenomyosis or heterotopy.

The first tumor description dated back in 1903, when Magnus Alsleben presented 5 gastric adenomyomas based on autopsy results. Many years later, in 1955, Cimmino described the gastric adenomyoma as an individual entity hypothesizing that adenomyomas result exclusively from changes in a gastric wall including aberrant pancreas, Brunner's glands and non-defined myoepithelial growth.

Although gastric adenomyomas are generally accepted to be rare gastric tumors with only sporadic cases described in the literature to date, it has recently been suggested that they may be more common. Ling and Situ⁴ reported 9 cases, and Barnert et al.⁵ presented a single case of gastric adenomyoma. The largest series so far, having involved 33 patients with gastric adenomyoma, was published by Vandelli et al.⁶ in 1993.

While gastric adenomyomas are very rare, pancreatic heterotopy is found in postmortem material in 0.55–5.7% of the autopsies. It is most commonly localized in the projections of the antrum, pylorus, beginning of the duodenum or jejunum⁷.

Histogenesis of the gastric adenomyoma is unknown, but it is believed that it results from developmental abnormalities. It is commonly diagnosed from fourth to sixth decade of age (66%), although there have been some cases de-

scribed even in 8 months old infants, while the oldest patient was 81 years old⁶.

Although gastric adenomyoma should be considered to have uncertain malignant potential, cases with aggressive behaviour have been reported. Chapple et al.¹ were first to describe an extremely rare case of simultaneous presentation of adenomyoma and gastric adenocarcinoma. Kanehira et al.⁸ presented the case of associated adenomyoma and superficial adenocarcinoma centered in adenomyoma. Agresta and Della Libera⁹ described the synchronous manifestation of adenomyoma and gastric antrum adenocarcinoma together with Hodgkin's lymphoma of the cardia. Nevertheless, the aforementioned sporadic reports cannot support the fact of the adenomyoma-based cancer. Descriptions of the individual cases of gastric adenomyoma associated with gastric malignancy have underlined that the development of neoplasm had been diagnosed long before adenomyoma was detected^{1, 8, 9}. Although relation between these two pathological entities remains indefinite, the possibility of malignant alteration of adenomyoma cannot be ruled out with certainty.

The majority of described cases was diagnosed by gastroduodenal contrast medium radiography, in lesser number of cases using an esophagogastroduodenoscopy, and a number of cases was diagnosed during surgery incidentally or at post-mortem examination.

Adenomyomas often appear as a roundish or oval-shaped mass in the submucosal tissue simulating a lipoma, a neurofibroma or a polypoid formation^{10, 11}. Endoscopic biopsy of the mucosa fails to diagnose this benign tumor^{12, 13}. Therefore, Hedembroa et al.¹³ believe that gastric resection and extirpation of a tumor mass *in toto* is mandatory in order to distinguish the nature of a submucosal lesion.

Treatment of the gastric adenomyoma should be exclusively surgical including a laparoscopic resection. So far, no recurrence after a successful surgical resection has been recorded. Radical surgical treatment should be reserved only for cases in who benign nature of the tumor is not confirmed².

In our case, the upper endoscopy showed the submucosal mass with intact mucosa in distal antrum. However, unless a concern for an alternative diagnosis, the use of biopsy is not recommended in this setting, as most of the lesions, including our case, are localized in the submucosal layer.

Conclusion

Epithelial dysplasia in the presented case indicates that timely and proper diagnostics as well as adequate surgical treatment are crucial for a successful treatment of gastric adenomyoma.

R E F E R E N C E S

1. Chapple CR, Muller S, Newman J. Gastric adenocarcinoma associated with adenomyoma of the stomach. *Postgrad Med J* 1988; 64(756): 801–3.
2. Reardon PR, Schwartz MR, Fagan SP, Reardon MJ, Brunnicardi FC. Completely laparoscopic resection of a rare pyloric tumor with laparoscopically sutured gastroduodenostomy. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 1999; 9(2): 147–54.

3. *Delvaux S, Ectors N, Geboes K, Desmet V.* Gastric gland heterotopia with extensive lymphoid stroma: a gastric lymphoepithelial cyst. *Am J Gastroenterol* 1996; 91(3): 599–601.
4. *Ling CH, Situ ZX.* Gastric adenomyoma: with report of 9 cases. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1985; 23(7): 424–5, 446. (Chinese)
5. *Barnert J, Kamke W, Frosch B.* Adenomyoma of the stomach (pancreatic heterotopia)--case report and review of the literature. *Leber Magen Darm* 1985; 15(4): 152–6. (German)
6. *Vandelli A, Cariani G, Bonora G, Padovani F, Saragoni L, Dell'Amore D.* Adenomyoma of the stomach. Report of a case and review of the literature. *Surg Endosc* 1993; 7(3): 185–7.
7. *Erberich H, Handt S, Mittermayer C, Tietze L.* Simultaneous appearance of an adenomyoma and pancreatic heterotopia of the stomach. *Virchows Arch* 2000; 436(2): 172–4.
8. *Kanehira E, Kawaura Y, Ohta Y, Tanaka I, Kawada N, Nonomura A.* Adenomyoma in association with early gastric carcinoma. *Gan No Rinsho* 1990; 36(14): 2475–9. (Japanese)
9. *Agresta F, Della Libera D.* Malignant transformation of an adenomyoma of the cardia and malignant Hodgkin gastric lymphoma. An unusual coexistence. *Minerva Chir* 2000; 55(1–2): 49–52.
10. *Portale TR, Mosca F, Vicari S, Pulvirenti G, Fichera S, Salomone E, et al.* Myoepithelial hamartoma of the stomach simulating a gastric carcinoma. A case report. *Tumori* 2007; 93(2): 220–2.
11. *Kagawa S, Fujimura T, Nishizaki M, Naomoto Y, Hiroshi I, Tanaka N.* Adenomyoma of the stomach presenting as localized peritonitis. *Dig Dis Sci* 2007; 52(11): 3184–7.
12. *Zarling EJ.* Gastric adenomyoma with coincidental pancreatic rest: a case report. *Gastrointest Endosc* 1981; 27(3): 175–7.
13. *Hedenbro JL, Ekelund M, Wetterberg P.* Endoscopic diagnosis of submucosal gastric lesions. The results after routine endoscopy. *Surg Endosc* 1991; 5(1): 20–3.

Received on February 10, 2010.

Revised on Jun 5, 2010.

Accepted on Jun 13, 2010.



Occupational contact allergic dermatitis in dentistry

Profesionalni alergijski kontaktni dermatitis u stomatologiji

Ivan Mikov*, Ivan Turkalj*, Marina Jovanović†

*University of Novi Sad, School of Medicine, Institute of Occupational Health, Novi Sad, Serbia; †Clinical Center of Vojvodina, Clinic for Dermatovenerology, Novi Sad, Serbia

Abstract

Introduction. Dental professionals may be at increased risk of developing occupational allergic diseases specially to methacrylates that can permeate protective disposable. **Case report.** We presented a case of occupational allergic contact dermatitis in a 28-year-old dental technician. The patient had complained of itching and cracking of fingers for 6 months. The dermatitis improved over weekends. Skin erythema and scaling were present with primarily involvement of the fingertips. Patch testing with dental series gave positive vesicular reaction to methyl methacrylate. Follow-up after 6 months of allergen avoidance showed a complete regression of dermatitis. **Conclusion.** Methacrylates serve as bases for acrylic resins which are used in prosthetics. Methyl methacrylate as a small molecular acrylate can permeate thin protective disposable gloves. Using adequate personal protective equipment, like nitrile rubber gloves, is the most important preventive measure in this occupation. Health practitioners should recognize possible occupational hazards in dentistry and implement appropriate preventive measures to protect health of workers.

Key words:

dermatitis, contact; hand; occupational exposure; methylmethacrylate; dentistry.

Apstrakt

Uvod. Zaposleni u stomatologiji mogu biti pod povećanim rizikom od nastanka profesionalnih alergijskih oboljenja, posebno na metakrilate koji mogu da prodru kroz tanke rukavice. **Prikaz bolesnika.** Prikazali smo profesionalni alergijski kontaktni dermatitis kod zubnog tehničara starosti 28 godina, koji se žalio na svrab i ragade na prstima zadnjih šest meseci. Dermatitis se smanjivao tokom vikenda. Nađeno je prisustvo eritema i deskvamacije sa prvenstvenim zahvatanjem vrhova prstiju. „Patch“ testiranjem sa zubarskom serijom dobijena je pozitivna vezikularna reakcija na metil metakrilat. Nakon prekida kontakta sa alergenom, praćenje u narednih šest meseci ukazalo je na potpunu regresiju dermatitisa. **Zaključak.** Metakrilati se nalaze u sastavu akrilatnih smola koje se koriste u protetici. Metil metakrilat, kao mali molekularni akrilat lako prodiru kroz jednokratne tanke rukavice. Korišćenje adekvatnih ličnih zaštitnih sredstava, kao što su nitrilne gumene rukavice, najvažnija je preventivna mera na ovim poslovima. Zdravstveni radnici treba da prepoznaju moguće profesionalne štetnosti u stomatologiji i primene odgovarajuće preventivne mere radi zaštite zdravlja radnika.

Ključne reči:

dermatitis, kontaktni; šaka; profesionalna izloženost; metilmetakrilati; stomatologija.

Introduction

Occupational skin diseases are among the most frequent work-related diseases in industrialized countries. They are often chronic, affect mostly workers in their prime working age and the impact on the individual and society is considerable. Contact dermatitis is the most common occupational skin disease^{1,2}.

Dental personnel are increasingly exposed to a large number of sensitizing chemicals, and may be at increased risk of developing occupational allergic diseases³⁻⁵. Dental professionals often assume that skin reactions on their hands are due to gloves, *ie* they assume that they have latex allergy⁴.

Case report

A 28-year-old female had been treated for eczema without success. The patient had worked as dental laboratory technician for 10 years, in a municipality health care centre. Her work had involved making of acrylic prostheses. Irritant factors included mechanical friction and wet work. She performed her tasks in a small workroom that had no mechanism for control of air pollution, and she wore disposable medical examination gloves regularly.

There are numerous chemical hazards in prosthesis production: solvents, mineral acids, gases and vapors released during polymerization, as well as dust coming from plaster, metal alloys, ceramics and acrylic resins. Also, the meas-

urement in a dental laboratory revealed concentrations of methacrylate monomer up to 2.4 times higher than maximal allowable concentration (MAC), which 410 mg/m is in our country^{3,6}.

The patient had complained of itching and cracking of fingers for 6 months, and had been treated for eczema for 4 months (ointment mometasone furoate, Solcoseryl gel®) prior to her admission to our Institute. The patient had no significant medical history. Her dermatitis improved over weekends. Physical examination revealed skin erythema and scaling. The fingertips were primarily involved (Figure 1).



Fig. 1 – Palms skin erythema and scaling with primarily fingertips involvement

Patch tests were applied to the back for 48 h. Readings were made after 48 h and 72 h according to the – to +++ scale recommended by the International Contact Dermatitis Research Group. Patch testing after 48 h and 72 h gave positive vesicular reaction (+++) to methyl methacrylate. Patch tests to other allergens of dental series (potassium dichromate, cobalt nitrate, nickel sulphate, formaldehyde, hexamethylene tetramine, epoxy resin, phthalic anhydride, mercury precipitate, colophony, balsam of Peru, benzoyl peroxide, tinctura benzoica, ethylene glycol, copper sulphate, benzocaine, hydroquinone) were negative. Complete blood cell count, urinalyses, pulmonary function tests and chest radiography were within normal limits. Pulmonary function tests and chest radiography were done due to exposure to air pollution at workplace.

Occupational allergic contact dermatitis was confirmed in the presented dental technician. Avoidance of allergen was strongly suggested to the employer. After that, the patient has started to work as a dental nurse. The prognosis was favorable. Follow-up after 6 months showed complete regression of the dermatitis.

Discussion

Effective treatment of occupational skin disease requires a complete and accurate diagnosis. Methacrylates are frequently used in dentistry (fillings, coating of teeth and in

prosthetics, in dental plates and dentures). Methyl methacrylate as the residual acrylic monomer in the self-cured portion of denture may be present in concentrations sufficient to cause reactions on the skin and the oral mucosa in sensitized individuals (stomatitis, burning mouth syndrome)^{7,8}. Also, methyl methacrylate is found in bone cement and adhesives^{9–11}.

Glues and artificial nails are a relatively common occupational source of sensitization to methacrylates and acrylates in addition to dental restorative materials^{12,13}. Recently, the number of cases of contact allergic dermatitis

among beauticians specialized in sculpting artificial nails, as well as in their clients has increased^{14,15}.

In studies reporting patch test results, the prevalence of contact allergy to methyl methacrylate have been reported to be about 1%^{16,17}. Reports on occupational contact dermatitis in dental personnel showed that acrylates caused allergy in 22% and 25% of all examined patients in Sweden and Poland, respectively and allergy to methyl methacrylate was detected in 15% and 9% of patients respectively^{18,19}. In 55 dental laboratory technicians with suspected occupational skin disease in Germany, methyl methacrylate as allergen was identified in 16%²⁰.

Procedures to minimize risk should be planned and implemented. Risk perception is an initial step in developing procedures to minimize occupational risks²¹. Regular medical surveillance of workers is important for detection of occupational dermatoses. Engineering control of air pollution in the workplace and use of personal protective equipment are the most important measures for the prevention of skin diseases in this occupation⁶.

Thin disposable medical examination gloves are used regularly as protective personal equipment. Dental technicians often omit to wear personal protective devices, because they impede their precise work operations⁶. Even when these protective gloves give good protection against microbes, as well as most skin irritants or allergens, small molecular acrylates can permeate them quite rapidly. To prevent acrylate allergy, which may lead to a change of occupation,

direct skin contact should be avoided. It is important to develop no-touch techniques to avoid skin exposure to these chemicals. Also, protection can be improved by using nitrile rubber gloves or double gloving²². Instructing workers about the safety regulations and environmental hazards reduces workers' unsafe behavior²³.

Conclusion

There is an ever-growing need for health practitioners to be aware of the work processes in dentistry, to recognize possible hazards, and to implement appropriate preventive measures to protect the workers' health.

R E F E R E N C E S

1. *Lushniak BD*. Occupational contact dermatitis. *Dermatol Ther* 2004; 17(3): 272–7.
2. *Susitaival P, Fihvholm MA, Meding B, Kanerva L, Lindberg M, Svensson A*, et al. Nordic Occupational Skin Questionnaire (NOSQ-2002): a new tool for surveying occupational skin diseases and exposure. *Contact Dermat* 2003; 49(2): 70–6.
3. *Kanerva L, Lahtinen A, Toikkanen J, Fors H, Estlander T, Susitaival P*, et al. Increase in occupational skin diseases of dental personnel. *Contact Dermat* 1999; 40(2): 104–8.
4. *Hamann CP, Rodgers PA, Sullivan K*. Allergic contact dermatitis in dental professionals: effective diagnosis and treatment. *J Am Dent Assoc* 2003; 134(2): 185–94.
5. *Leggat PA, Smith DR*. Prevalence of hand dermatoses related to latex exposure amongst dentists in Queensland, Australia. *Int Dent J* 2006; 56(3): 154–8.
6. *Torbica N, Krstev S*. World at work: Dental laboratory technicians. *Occup Environ Med* 2006; 63(2): 145–8.
7. *Chen AY, Zivnus MJ*. Denture stomatitis. *Skinmed* 2007; 6(2): 92–4.
8. *Marino R, Capaccio P, Pignataro I, Spadari F*. Burning mouth syndrome: the role of contact hypersensitivity. *Oral Dis* 2009; 15(4): 255–8.
9. *Richter-Hintz D, Rieker J, Rauch L, Homey B*. Sensitivity to constituents of bone cement in a patient with joint prosthesis. *Hautarzt* 2004; 55(10): 987–9. (German)
10. *Saccabusi S, Boatto G, Asproni B, Pau A*. Sensitization to methyl methacrylate in the plastic catheter of an insulin pump infusion set. *Contact Dermat* 2001; 45(1): 47–8.
11. *McGrath EJ, Darvay A, Lovell CR*. Nail dystrophy and fingertip dermatitis as a manifestation of methyl methacrylate allergic contact dermatitis in a cow hoof trimmer. *Contact Dermat* 2009; 60(6): 344.
12. *Aalto-Korte K, Alanko K, Kuuliala O, Jolanki R*. Occupational methacrylate and acrylate allergy from glues. *Contact Dermatitis* 2008; 58(6): 340–6.
13. *Constadt L, Hecke EV, Naeyaert JM, Goossens A*. Screening for contact allergy to artificial nails. *Contact Dermat* 2005; 5(6): 73–7.
14. *Roche E, De la Cuadra J, Alerge V*. Sensitization to acrylates caused by artificial acrylic nails: review of 15 cases. *Actas Dermosifiliogr* 2008; 99(10): 788–94. (Spanish)
15. *Lazarov A*. Sensitization to acrylates is a common adverse reaction to artificial fingernails. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21(2): 169–74.
16. *Marks JG Jr, Besito DV, DeLeo VA, Fowler JF Jr, Fransway AF, Maibach HI*, et al. North American Contact Dermatitis Group. North American Contact Dermatitis Group patch-test results, 1998 to 2000. *Am J Contact Dermat* 2003; 14(2): 59–62.
17. *Wetter DA, Davis MD, Yiannias JA, Cheng JF, Connolly SM, el-Azhary RA*, et al. Patch test results from the Mayo Clinic Contact Dermatitis Group, 1998–2000. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53(3): 416–21.
18. *Wrangsjö K, Swartling C, Meding B*. Occupational dermatitis in dental personnel: contact dermatitis with special reference to (meth)acrylates in 174 patients. *Contact Derm* 2001; 45(3): 158–63.
19. *Kiec-Swierczyńska M, Krecisz B*. Allergic contact dermatitis in dentists and dental nurses. *Exog Derm* 2002; 1(1): 27–31.
20. *Rustemeyer T, Frosch PJ*. Occupational skin diseases in dental laboratory technicians. *Contact Dermat* 1996; 34(2): 125–33.
21. *Ovek Z, Soyler MT, Aksan AD, Hassoy H, Manangat SS*. Risk perception of occupational hazards among dental health care workers in a dental hospital in Turkey. *Int Dent J* 2008; 58(4): 199–207.
22. *Mäkelä EA, Väinänen V, Alanko K, Jolanki R, Estlander T, Kanerva L*. Resistance of disposable gloves to permeation by 2-hydroxyethyl methacrylate and triethyleneglycol dimethacrylate. *Occup Hyg* 1999; 5(2): 121–9.
23. *Nasab HS, Ghojranipour F, Kazemnejad A, Khavanin A, Tavakoli R*. Evaluation of Knowledge, Attitude and Behavior of Workers towards Occupational Health and Safety. *Iranian J Publ Health* 2009; 38(2): 125–9.

Received on March 12, 2010.

Revised on March 25, 2010.

Accepted on April 4, 2010.



Dilemmas in diagnostics and therapy of rolandic epilepsy

Dileme u dijagnostici i terapiji rolandične epilepsije

Fadil Škrijelj*, Dragoslav Sokić†

*State University of Novi Pazar, Novi Pazar, Serbia; †University of Belgrade, School of Medicine, Clinical Center of Serbia, Institute of Neurology, Belgrade, Serbia

Abstract

Introduction. It is considered that around 20%–30% of patients of all ages and in all continents have wrong epilepsy diagnoses. Diagnostic and consequential therapeutic errors appear, most often, when an adequate diagnostics is not applied. Benign focal epilepsy of childhoods with centrotemporal spikes-rolandic epilepsy, brings very often to diagnostic and therapeutic problems because of persistence of epileptic-forms changes in an electroencephalography (EEG) recording, several years after establishment of good control over seizures. **Case report.** We presented 8.5 years-old girl, with the first and the only epileptic seizure at the age of 5, during her sleep. With a clear correlation of EEG record, benign rolandic epilepsy was diagnosed, so the therapy with valproate was introduced. There were no seizures after three years of its implementation. Because of epileptic-forms changes that still persisted in EEG record during her sleep, it was suggested to further use valproate. However, after reconsidering all circumstances it was concluded that the AED should be slowly reduced up to its exclusion. After a complete stoppage of the therapy, the patient did not have any epileptic seizure for nine months, although EEG still remained pathologically changed during her sleep. **Conclusion.** A changed EEG record in a patient with rolandic epilepsy must not be a predictor of continuation of antiepileptic drugs therapy, after 2–3 years of successful seizures remission.

Key words:

epilepsy; child; epilepsy, rolandic; diagnosis; electroencephalography; therapeutics.

Apstrakt

Uvod. Smatra se da oko 20–30% bolesnika svih uzrasta i na svim kontinentima ima pogrešnu dijagnozu epilepsije. Dijagnostičke i, posledično, terapijske greške najčešće nastaju kada se ne sprovede adekvatna dijagnostika. Benigna fokalna epilepsija u detinjstvu sa centrotemporalnim šiljcima – rolandična epilepsija, često dovodi do dijagnostičkih i terapijskih problema zbog perzistiranja epileptiformnih promena na elektroencefalogramu (EEG zapisu), nekoliko godina nakon uspostavljanja dobre kontrole napada. **Prikaz bolesnika.** Prikazana je devojčica stara 8,5 godina, koja je u petoj godini, tokom spavanja, dobila prvi i jedini epileptički napad. Uz jasnu korelaciju sa EEG nalazima zaključeno je da se radi o benignoj rolandičnoj epilepsiji i uvedena je terapija valproatom, zahvaljujući kojoj u sledeće tri godine nije bilo napada. Zbog epileptiformnih promena koje su i dalje perzistirale na EEG snimku, tokom spavanja, predložen je nastavak uzimanja valproata. Međutim, posle ponovnog razmatranja svih okolnosti odlučeno je da se postepeno obustavi dalja primena antiepileptika. Po ukidanju terapije devojčica nije imala niti jedan epileptični napad u narednih 9 meseci, iako je njen EEG tokom sna i dalje bio abnormalan. **Zaključak.** Izmenjen EEG nalaz kod bolesnika sa rolandičnom epilepsijom ne sme biti prediktor nastavka antiepileptičku terapije, nakon 2–3 godine uspešne remisije napada.

Ključne reči:

epilepsija; deca; epilepsija, rolandična; dijagnoza; elektroencefalografija; lečenje.

Introduction

It is considered that approximately 20%–30% of patients of all ages, in all continents, have wrong epilepsy diagnoses^{1,2}. Within most of patients the diagnosis of epilepsy can be set by a precise and detailed anamnesis of epileptic seizures. It is necessary to add an additional diagnosis to the detailed seizures anamnesis; electroencephalography (EEG) while being awake and during sleeping, a detailed cytochemi-

cal analyses of the blood and urine, and, sometimes, video EEG telemetry, and also neuroradiological methods of a neurosystem image: computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), etc. Juvenile myoclonic epilepsy – Janz syndrome, brings very often to diagnostic and therapeutic errors, and the introduction of carbamazepine, antiepileptic drug (AED) for partial seizures, brings to deterioration in epileptic seizures³. A benign focal epilepsy of childhood with centrotemporal spikes (BECTS) also creates often diagnostic

and therapy dilemmas. It is the most common one of all idiopathic benign focal epilepsies in the childhood. Prevalence goes around 16% of children with epileptic seizures that start from 1 to 15 years of life. Until the end of fifties of the last century, focal epilepsies were considered as synonym for symptomatic epilepsies. However, in 1958, the first scientific papers appeared describing clinical manifestations of the focal epilepsy with children of a regular neurological analysis, and in 1965 genetic predisposition of this disease was emphasized. Genetic researches suggest polygenetic type of inheritance with the most presented aberrations onto chromosomes 15q14, then 4p15, Xp, etc, and also opinions that etiology and a way of inheritance are much more complicated and complex than it used to be thought of, originally⁴. Epileptic seizures start most often between 5–8 years of life, and it more often affected boys (60%) than girls (40%), and they appear in the first, and stop in the second decade of life, during puberty. The seizures appear most often while sleeping or during waking up. Ictal semiology makes partial seizures with typical sensor and/or sensory-motor manifestations in oropharyngeal region in the sense of unilateral paresthesia of the inner cheek sides, lips, jaws, tongue; unilateral tonic, clonic or tonic-clonic contractions including cheeks, eyelid, lips, tongue, pharyngeal and laryngeal muscles; disorders, anartries and hypersalivation⁵. BECTS seizure usually lasts one to two minutes, and during this period the consciousness is completely kept. Besides focal seizures, in younger patients, there is often secondary generalization that is often being declared as the only seizure type, if focal seizures are of weak intensity. During seizures, there is often a complete speech inability (anarthria) or the speech is not clear enough. Postictal reversible Todd's paralysis is met within younger patients where the seizures lasted longer than several minutes, to half an hour, but there is never a persistent postictal neurological deficit. Epileptic seizures appear very seldom (less than 3–4 times annually) within 65% of patients and around 10% of patients have only one seizure during the entire duration of the disease. There is about 1% of atypical BECTS forms within children, with often presented cognitive and/or neurological deficit, that can evaluate as heavier epileptic syndromes (Landau-Kleffner syndrome, epilepsy with bilateral continuous spike-waves during slow wave sleeping). Interictal EEG features normal rhythmic activities and it characterizes centrotemporal peak of spike-waves, bi or three phases (1, 5–3 Hz). Spikes or sharp waves are characteristics of BECTS; they are a bit longer, and last longer, of the amplitude between 50–200 μ V, they are usually grouped in lines of different lasting, with a repeating tendency; they also appear unilaterally, and seldom bilaterally. Ictal EEG features an appearance of monomorphic sequence of sharp waves or rhythmical spikes above the centrotemporal regions on the opposite side in relation to clinical manifestations side. There is no significant depression before the beginning of seizures, attenuation, or basic activities. Low epileptogenicity of Roland's spikes within BECTS is shown in their easy wiping by small doses application of benzodiazepines, intravenously. BECTS treatment lasts for two years, counting from the day of the last seizure. For the children with one seizure or for most children

with seldom and short night seizures, antiepileptic drug (AED) treatment is not necessary. If seizures start in early childhood, the disease period is longer, and, therefore, the treatment is extended to 8 or 10 years. Abnormality persistence in EEG is not a reason for postponing a decision on treatment interruption, since normalization of EEG appears a bit later in comparison to clinical remission. The treatment should be limited to application of only one AED, mostly carbamazepine or valproate. Within atypical BECTS forms, the application of carbamazepine is not recommended, since it improves bilateral synchronization of epileptic-form of activity and deterioration of epileptic seizures⁶. BECTS prognosis is very satisfactory, since after 16 years of life, seizures stop within 98%–99% of patients. In less than 1% of adults, who had BECTS in their childhoods, generalized tonic-clonic seizures and complex focal seizures appear⁵.

Case report

The patient was a 8.5-year-old girl from a regular, first term pregnancy, of regular early psychomotor development, of a negative heredity for epileptic seizures, of febrile convulsion, traumatic and inflammatory disease of the central nervous system, and also of other heredity-degenerative disease, of a regular intellectual status. The girl had her first and only seizure during sleep in her 5th year, a simple focal seizure with secondary generalization. The mother was awakened by a sound of "choking", with unilateral face muscles clonisms, that reminded on "grimaces", difficult talk, a lot of saliva, and later on, it had come to tonic-clonic contraction of the entire body extremities. After 2–3 minutes, the seizure calmed, there was no vomiting, the talk was still unclear with saliva, and after half an hour, the situation completely became normal. EEG was done, during the following day, and also EEG during her sleep that in correlation with semiology of the night seizure pointed onto benign rolandic epilepsy. Although it was only one night seizure, the therapy by valproate syrup was applied, where three years later, there was no seizure. Daily dose of valproate was 10 mg per kg of body mass, and it was regularly corrected, according to the body weight increase during the treatment period. At her last control, interictal EEG was regular, and in EEG during her sleep, there were bilateral abnormalities kept, in the sense of increased activation of unilateral rolandic sharp waves, until the appearance of bilateral, synchronic, rhythmical, higher voltage theta waves, or spike-slow wave (S-W) complexes. Due to changed EEG result during her sleep, a decision was made to further extension of AED, with a suggestion on increase of valproate dose to 20 mg/kg. The girl's parents were not satisfied with this suggestion on further extension and increase of AED dose. There was a consultation with the other epileptologist who after reconsidering all circumstances concluded that AED should be slowly reduced up to its exclusion. Valproate was reduced to 30% each week from the entire dose, and after a complete stoppage of the AED, the patient did not have any epileptic seizures for nine months. EEG still remained pathologically changed during her sleep, while the patient did not have any seizures.

Discussion

Besides a significant improvement in diagnostics and epilepsy treatment, there are numerous errors in this process and there is a great number of patients' review where epilepsy has been wrongly set or there have been errors in therapy protocol. In this case review of the patient, with rolandic epilepsy, there was an error in the decision itself on application of AED therapy, after her first epileptic seizure. Within benign epileptic syndromes in childhood, where rolandic epilepsy also belongs to, only one epileptic seizure appears very often (around 10%–30%) and in that case, there should not be applied any AED therapy. Also, it is advisable, if the seizures are seldom, last for a short time and appear only at night, that even in this case, there should not be applied AED. In the case of the presented patient, there was no time to wait to, and AED was applied after her first night epileptic seizure. Within benign focal epileptic seizures syndrome in the childhood, AED therapy is not applied regularly, after the first epileptic seizure⁵. Application of AED after the first seizure is very common in clinical practice; however, a more rational approach means application of AED only after the second seizure, unprovoked one.

After the first error made in the treatment of the presented patient, there was another error, in the sense of the decision brought on extension of the AED therapy, after three years without epileptic seizures. Since rolandic epilepsy is followed by persistent EEG abnormalities for several months, or for several years, after a stable remission of epileptic seizures, there should have not been brought a decision on extension of AED therapy. EEG result is very often a stumbling stone during setting diagnoses, and also with the choice of epilepsy therapy. Therefore, it is necessary, very carefully, in a sophisticated way, to approach to any EEG result, and surely not exceed or underestimate its significance⁶. During therapy protocol of AED treatment of benign

epileptic syndrome in childhood, it should always start with gradual stoppage of antiepileptic drugs therapy, after two years of seizures remission. New researches point out the existence of patient (28%–53%) with BECTS who significantly express neuropsychological disorders in the speech sphere, cognition and behavioural, and these disorders stop in most cases during the disease remission⁷. Concerning etiology of these disorders, there are still dilemmas today and opposite opinions, where ones reconsider that these disorders are in correlation with a number and distribution of interictal EEG paroxysms⁸, and the others that this correlation is not clearly separated⁹. BECTS should be treated if the seizures are frequent, last longer, and especially if they are followed by speech, cognitive and behavioural disorders. Carbamazepine is most often applied AED in BECTS therapy, and latest research point out the results of oxcarbazepine¹⁰ and levetiracetam application¹¹. A solution of current dilemmas related to diagnostics and therapy of BECTS implements a need for new, larger, controlled studies.

Conclusion

Errors in diagnostic-therapy process of epilepsy treatment are very often and can make a serious harm and influence negatively onto the quality of life. A significant number of epilepsies and epileptic syndromes in the childhood have benign nature and are characterized by a good clinic flow and a satisfactory prognosis. One of such syndromes is benign rolandic epilepsy (BECTS), where after a two-three-year period of treatment without seizures, it is necessary to exclude antiepileptic drugs therapy, regardless of persistence of epileptic-forms changes in EEG. In rolandic epilepsy, EEG result should not use as a guide or decision on its application, either during the stoppage of antiepileptic therapy. Epilepsy is a clinical diagnosis firstly, so epileptic-forms which change EEG record must not be treated, but the patient oneself.

R E F E R E N C E S

1. *Kanner AM*. Common errors made in the diagnosis and treatment of epilepsy. *Semin Neurol* 2008; 28(3): 364–78.
2. *Cross HJ*. Pitfalls in the diagnosis and differential diagnosis of epilepsy. *Pediatrics Child Health* 2009; 19(5): 199–202.
3. *Camfield P, Camfield C*. Monitoring for adverse effects of anti-epileptic drugs. *Epilepsia* 2006; 47 (Suppl 1): 31–4.
4. *Rudolf G, Valenti MP, Hirsch E, Szepietowski P*. From rolandic epilepsy to continuous spike-and-waves during sleep and Landau-Kleffner syndromes: insights into possible genetic factors. *Epilepsia* 2009; 50(Suppl 7): 25–8.
5. *Panayiotopoulos CP*. The Epilepsies: Seizures, Syndromes and Management. Oxfordshire (UK): Bladon Medical Publishing; 2005.
6. *Crespel A, Velizarova R, Genton P, Coubes P, Gélisse P*. Wicket spikes misinterpreted as focal abnormalities in idiopathic generalized epilepsy with prescription of carbamazepine leading to paradoxical aggravation. *Neurophysiol Clin* 2009; 39(3): 139–42.
7. *Chabine LM, Mikati MA*. Benign pediatric localization-related epilepsies. *Epileptic Disord* 2006; 8(4): 243–58.
8. *Baglietto MG, Battaglia FM, Nobili L, Tortorelli S, De Negri E, Calevo MG, et al*. Neuropsychological disorders related to interictal epileptic discharges during sleep in benign epilepsy of childhood with centrotemporal or Rolandic spikes. *Dev Med Child Neurol* 2001; 43(6): 407–12.
9. *Bulgheroni S, Franceschetti S, Vago C, Usilla A, Pantaleoni C, D'Arigo S, et al*. Verbal dichotic listening performance and its relationship with EEG features in benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes. *Epilepsy Res* 2008; 79(1): 31–8.
10. *Tzitziridou M, Panou T, Ramantani G, Kambas A, Spyrglou K, Pantelias C*. Oxcarbazepine monotherapy in benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes: a clinical and cognitive evaluation. *Epilepsy Behav* 2005; 7(3): 458–67.
11. *Kossoff EH, Los JG, Boatman DF*. A pilot study transitioning children onto levetiracetam monotherapy to improve language dysfunction associated with benign rolandic epilepsy. *Epilepsy Behav* 2007; 11(4): 514–7.

Received on April 12, 2010.

Revised on February 11, 2010.

Accepted on February 19, 2010.



OSIROMAŠENI URANIJUM metode detekcije, saniranje neposrednih efekata i prevencija kasnih posledica

Autori: Branka Đurović, Vesna Spasić-Jokić,
Slobodan Petković, Dragutin Fortuna,
Vesna Selaković-Mićunović, Nedeljka Atlagić

Izdavač: doc. dr Branka Đurović

Mesto i godina izdanja: Beograd, 2011.

Štampa: Drasler Partner, Društvo za grafičku delatnost i
trgovinu, DOO, Beograd

Tiraž: 500.



Sredinom maja ove godine izišla je iz štampe knjiga „Osiromašeni uranijum – metode detekcije, saniranje neposrednih efekata i prevencija kasnih posledica“, grupe autora, stručnjaka različitih profila, koji su uspeali da sveobuhvatno sagledaju probleme vezane za upotrebu osiromašenog uranijuma (OU). U vreme Zalivskog rata, a kasnije i bombardovanja tadašnje Savezne Republike Jugoslavije (SRJ) od strane NATO, ova tema bila je predmet brojnih rasprava u stručnoj i široj javnosti, ali ono što ovu knjigu izdvaja od tada objavljenih jeste vremenska distanca u odnosu na te događaje, tokom koje su se mogli kritički sagledati ne samo neposredni, nego i pozni efekti upotrebe oružja sa OU, kao i problemi vezani za sistem organizovanja stručnih službi uključenih u rešavanje ovog problema.

Knjiga je podeljena u šest poglavlja: 1) Municija sa projektilima od osiromašenog uranijuma, 2) Osiromašeni uranijum, 3) Detekcija radiokativne konatminacije nastale

primenom municije sa projektilima (kalibra 30 mm) od urana osiromašenog u izotopu ^{235}U u poljskim uslovima, 4) Metode određivanja aktivnosti radionuklida u uzorcima iz životne sredine, 5) Određivanje sadržaja OU u biološkim materijalima, i 6) Zdravstveni efekti OU.

Pored teorijskih razmatranja vezanih za OU i njegovu primenu u vojne svrhe, zakonsku regulativu te oblasti, načine detekcije i merenja radioaktivnosti, generalno, a posebno one nastale od OU, i potencijalno štetnih efekata po zdravlje eksponiranih osoba, uključujući efekte kako akutne, tako i hronične ekspozicije, autori daju i originalne rezultate svojih istraživanja sa terena izloženih dejstvu projektila sa OU tokom NATO bombardovanja SRJ 1999. godine. Upravo, ovaj spoj dosadašnjih saznanja, prikupljenih iz relevantne stručne literature, i sopstvenih, daju ovoj knjizi ekskluzivnost koja je čini jedinstvenom publikacijom iz ove oblasti.

Kao vrsni poznavaoi oblasti o kojoj se govori u knjizi, a sagledavajući što je do sada učinjeno, a što ne, autori daju i predlog mera koje je neophodno preduzeti imajući u vidu, pre svega, moguće kasne posledice OU na zdravlje stanovništva koje živi na područjima kontaminiranim ovim radionuklidom. Stoga, ova knjiga ima, kako navode njeni recenzenti, prof. dr Boris Ajdinović, prof. dr Ivan Župunski i dr sc. Rajko Spaić „...izuzetan značaj, ne samo za buduće aktivnosti u ovoj oblasti, već i šire, za nacionalnu strategiju očuvanja životne sredine i zdravlja stanovništva Srbije“.

Knjiga obiluje i brojnim, korisnim i interesantnim prilogima, npr: Pregled lokacija dejstva aviona A-10 municijom sa OU (posebno su dati podaci jedinica Vojske SRJ, a posebno oni od strane NATO), Privremeno uputstvo za radiološku dekontaminaciju zemljišta kontaminiranog projektilima od OU, Zakonska metrologija jonizujućih zračenja, Osiguranje kvaliteta i kontrola kvaliteta u monitoringu radionuklioda u životnoj sredini, Uputstvo za zaštitu osoblja na terenu kontaminiranom OU.

Spisak literature korišćen za pripremu ove knjige sadrži preko 200 referenci čiji su autori najpoznatija imena iz ove oblasti uključujući i same autore knjige čije su biografije date u prilogu.

Knjiga je namenjena širokom krugu stručnjaka: fizičarima, fizikohemičarima, tehnolozima, zdravstvenim radnicima, pripadnicima vojske, predstavnicima regulatornih tela, ali i studentima Vojne akademije, kao i studentima tehničkih i medicinskih fakulteta jer će oni, u vremenu koje dolazi, biti nosioci aktivnosti za dugoročno rešavanje problema sa OU. S tim u vezi, treba istaći da je Katedra vojnohemijskog inženjerstva Vojne akademije Univerziteta odbrane u Beogradu, već preporučila ovu knjigu kao udžbenik za kadete specijalnosti ABH službe, nastavnike i spoljone saradnike katedre, kao i ostale zainteresovane starešine Vojne akademije.

prof. dr Silva Dobrić
Vojnomedicinska akademija,
Institut za naučne informacije

UPUTSTVO AUTORIMA

Vojnosanitetski pregled (VSP) objavljuje radove koji ranije nisu nigde publikovani, niti predati za publikovanje redosledom koji određuje uređivački odbor. Uz rad, na posebnom listu, treba dostaviti: izjavu da rad do sada nije objavljen ili prihvaćen za štampu u drugom časopisu; potpise svih koautora; ime, tačnu adresu, brojeve telefona (fiksne, mobilne, faks), e-mail adresu, kao i kopiju dokaza o pretplati na časopis za sve autore (i koautore). Za objavljene radove VSP zadržava autorsko pravo. **Od januara 2011. godine primaće se samo radovi napisani na engleskom jeziku.**

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

U VSP-u se objavljuju **uvodnici, originalni članci, prethodna ili kratka saopštenja**, revijski radovi tipa **opšteg pregleda** (uz uslov da autori navođenjem najmanje 5 autocitata potvrde da su eksperti u oblasti o kojoj pišu), **aktuelne teme** ili **metaanalize, kazuistika**, članci iz **istorije medicine**, lični stavovi, naručeni komentari, pisma uredništvu, izveštaji sa naučnih i stručnih skupova, prikazi knjiga, referati iz naučne i stručne literature i drugi prilozii. Radovi tipa originalnih članaka, prethodnih ili kratkih saopštenja, metaanalize i kazuistike objavljuju se uz apstrakte na srpskom i engleskom jeziku.

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

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

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

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

Priprema rada

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

1. Naslovna strana

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

b) Ispisuju se puna imena i prezimena autora.

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

2. Apstrakt i ključne reči

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

3. Tekst članka

Tekst sadrži sledeća poglavlja: **uvod, metode, rezultate i diskusiju. Zaključak** može da bude posebno poglavlje ili se iznosi u poslednjem pasusu diskusije. U **uvodu** ponovo napisati naslov rada, bez navođenja autora. Navesti hipotezu (ukoliko je ima) i ciljeve rada. Ukratko izneti razloge za studiju ili posmatranje. Navesti samo strogo relevantne po-

datke iz literature i ne iznositi opširna razmatranja o predmetu rada, kao ni podatke ili zaključke iz rada o kome se izveštava.

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

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

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

Literatura

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

Primeri oblika referenci:

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

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

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

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

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12]; 102(6): [about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Tabele

Sve tabele štampaju se sa proredom 1,5 na posebnom listu hartije. Obeležavaju se arapskim brojevima, redosledom pojavljivanja, u desnom uglu (**Tabela 1**), a svakoj se daje kratak naslov. Objašnjenja se daju u fus-noti, ne u zaglavlju. Za fus-notu koristiti sledeće simbole ovim redosledom: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, Svaka tabela mora da se pomene u tekstu. Ako se koriste tuđi podaci, obavezno ih navesti kao i svaki drugi podatak iz literature.

Ilustracije

Slikama se zovu svi oblici grafičkih priloga i predaju se u tri primerka i na disketi (CD). Fotografije treba da budu oštre, na glatkom i sjajnom papiru, do formata dopisnice. Slova, brojevi i simboli treba da su jasni i ujednačeni, a dovoljne veličine da prilikom umanjivanja budu čitljivi. Na svakoj slici treba na poleđini, tankom grafitnom olovkom, označiti broj slike, ime prvog autora i gornji kraj slike. Slike treba obeležiti brojevima, onim redom kojim se navode u tekstu (**Sl. 1; Sl. 2** itd.). Ukoliko je slika već negde objavljena, obavezno citirati izvor.

Legende za ilustracije pisati na posebnom listu hartije, koristeći arapske brojeve. Ukoliko se koriste simboli, strelice, brojevi ili slova za objašnjenje pojedinog dela ilustracije, svaki pojedinačno treba objasniti u legendi. Za fotomikrografije navesti unutrašnju skalu i metod bojenja.

Skraćenice i simboli

Koristiti samo standardne skraćenice, izuzev u naslovu i apstraktu. Pun naziv sa skraćenicom u zagradi treba dati kod prvog pominjanja u tekstu.

Detaljno uputstvo može se dobiti u redakciji ili na sajtu:
www.vma.mod.gov.rs/vsp/download/uputstvo_za_autore.pdf

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Vojnosanitetski pregljed (VSP) publishes only previously neither published nor submitted papers in any other journals in the order determined by the Editorial Board. The following should be enclosed with the manuscript: a statement that the paper has not been submitted or accepted for publication elsewhere; a consent signed by all the authors that the paper could be submitted; the name, exact address, phone number, and e-mail address of the first author and co-authors. VSP reserves all copyrights.

Papers should be sent to: Military Medical Academy, Institute for Scientific Information, Crnotravska 17, 11040 Belgrade, Serbia & Montenegro, for "Editorial Board of VSP."

VSP publishes: **editorials, original articles, short communications, reviews/meta-analyses, case reports**, from the **medical history** (general or military), personal views, invited comments, letters to the editor, reports from scientific meetings, book reviews, extensive abstracts of interesting articles from foreign language journals, and other contributions. Original articles, short communications, meta-analyses and case reports are published with abstracts in both English and Serbian.

General review papers type will be accepted by the Editorial Board only if the authors prove themselves as the experts in the fields they write on by citing not less than 5 self-citations.

Papers should be written on IBM-compatible PC, using 12 pt font, and double spacing, and printed on the laser, or other high-quality printer without any corrections, on white bond paper ISO A4 (212×297 mm) with at least 4 cm left margin. **Bold** and *italic* letters should be avoided. Observational and experimental articles, reviews and meta-analyses, should not exceed 16 pages (including tables and illustrations); case reports – 6; short communications – 5; letters to the Editor, reports on scientific meetings and book reviews – 2.

All measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Standard, internationally accepted terms should be used. Papers should be submitted on a diskette (CD) in triplicate (original and two copies).

Authors are requested to submit the final version of manuscript approved for publishing with tables and illustrations on a 3.5" virus free diskette or a CD. **MS Word for Windows** (97, 2000, XP, 2003) is recommended for word processing; other programs are to be used only exceptionally. Illustrations should be made using standard **Windows** programs. Avoid the use of colors in graphs.

Papers are reviewed anonymously by at least two editors and/or invited reviewers. Remarks and suggestions are sent to the author for final composition. Galley proofs are sent to the first author for corrections that should be returned within 5 days. Manuscripts accepted for publication are not being returned.

Preparation of manuscript

Parts of the manuscript are: **Title page; Abstract with key words; Text; References.**

1. Title page

a) The title should be concise but informative. Subheadings should be avoided;

b) full name of each author;

c) name and place of department(s) and institution(s) of affiliation, clearly marked by standard footnote signs.

2. Abstract and key words

The second page should carry a structured abstract with the title for original articles, meta-analyses and case reports. The abstract should state the purposes of the study or investigation, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals; observational and analytical methods), main findings (giving specific data and their statistical significance, if possible), and the principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations. **Structure** abstract should contain typical subtitles: *background/aim, methods, results and conclusion*. The abstract for meta-analyses and original papers should have up to 450 words, and up to 150 words for case reports (with subtitles *background, case report, conclusion*). Below the abstract authors should provide, and identify as such, 3–10 key words or short phrases that will assist indexers in cross-indexing the article and will be published with the abstract.

3. Text

The text of original articles is divided into sections with the headings: **Introduction, Methods, Results, and Discussion**. Long articles may need subheadings within some sections to clarify their content.

In the **Introduction** repeat the title of the article, excluding the names of authors. State the purpose of the article and summarize the rationale for the study or observation. Give only strictly pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported.

Methods. Describe your selection of the observational or experimental subjects (patients or experimental animals, including controls) clearly. Identify the methods, apparatus (manufacturer's name and address in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Give references to established methods, including statistical methods. Identify precisely all drugs and chemicals used, with generic name(s), dose(s), and route(s) of administration. State the approval of the Ethics Committee for the tests in humans and animals.

Results should be presented in logical sequence in the text, tables and illustrations. Emphasize or summarize only important observations.

Discussion is to emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that result from them. Relate the observations to other relevant studies. Link the conclusions with the goals of the study, but avoid unqualified statements and conclusions not completely supported by your data.

References

References should be superscripted and numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. **The references must be verified by the author(s) against the original document.** List all authors, but if the number exceeds 6, give 6 followed by et al. Do not use abstracts, secondary publications, oral communications, unpublished papers, official and classified documents. References to papers accepted but not yet published should be designated as "in press". Information from manuscripts not yet accepted should be cited in the text as "unpublished observations". References are cited according to the **International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. Ann Intern Med 1997; 126: 36–47. Updated October 2001.**

Examples of references:

Jurhar-Pavlova M, Petlichkovski A, Trajkov D, Efinanska-Mladenovska O, Arsov T, Strezova A, et al. Influence of the elevated ambient temperature on immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses in sera of Wistar rats. *Vojnosanit Pregl* 2003; 60(6): 657–612.

DiMaio VJ. Forensic Pathology. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2001.

Blinder MA. Anemia and Transfusion Therapy. In: Ahy NS, Flood K, Paranjothi S, editors. *The Washington Manual of Medical Therapeutics*, 30th edition. Boston: Lippincot, Williams and Wilkins; 2001. p. 413–28.

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

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12]; 102(6): [about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Tables

Type each table double-spaced on a separate sheet. Number tables consecutively in the order of their first citation in the text in the upper right corner (**Table 1**) and supply a brief title for each. Place explanatory matter in footnotes, using the following symbols, in this sequence: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, Each table has to be mentioned in the text. If you use data from another source, acknowledge fully.

Illustrations

Figures are submitted in triplicate, and for the final version also on diskette/CD. Photos should be sharp, glossy black and white photographic prints, not larger than 203 × 254 mm. Letters, numbers, and symbols should be clear and even throughout and of sufficient size that when reduced for publication, each item will still be legible. Each figure should have a label on its back indicating the number of the figure, author's name, and top of the figure. If a figure has been published, acknowledge the original source.

Legends for illustrations are typed on a separate page, with arabic numerals corresponding to the illustrations. Identify and explain each one clearly in the legend symbols, arrows, numbers, or letters used to identify parts of the illustrations. Explain the internal scale and identify the method of staining in photomicrographs.

Abbreviations and symbols

Use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstracts. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text.

Detailed Instructions are available at the web site: www.vma.mod.gov.rs/vsp/download/instructions_to_authors.pdf.



VOJNOSANITETSKI PREGLED
VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA
Crnotravska 17, 11040 Beograd, Srbija
Tel/Fax: +381 11 2669689
vmaini1@EUnetr.rs
vmavsp@hotmail.com

Časopis „Vojnosanitetski pregled“ izlazi godišnje u 12 brojeva. Godišnja pretplata za 2011. godinu iznosi: 4 000 dinara za građane Srbije, 8 000 dinara za ustanove iz Srbije i 150 € za strane državljane i ustanove. Sredstva se uplaćuju na tekući račun Vojnomedicinske akademije Beograd kod Uprave za javna plaćanja u Beogradu broj: **840-941621-02 VMA (za Vojnosanitetski pregled ili za VSP), PIB 102116082**. Uplatnicu (dokaz o uplati) dostaviti lično ili poštom (pismom, faksom, *e-mail*-om). Za zaposlene u MO i Vojsci Srbije moguća je i pretplata u 12 mesečnih rata putem trajnog naloga, tj. „odbijanjem od plate“. Popunjen obrazac poslati na adresu VSP-a.

PRIJAVA ZA PRETPLATU NA ČASOPIS „VOJNOSANITETSKI PREGLED“

Ime i prezime ili naziv ustanove	
Jedinstveni matični broj građana	
Poreski identifikacioni broj (PIB) za ustanove	
Mesto	
Ulica i broj	
Telefon / telefaks	
Pretplata na časopis „Vojnosanitetski pregled“ (zaokružiti):	
1. Lično. Dokaz o pretplati dostavljam uz ovu prijavu.	
2. Za pripadnike MO i Vojske Srbije: Dajem saglasnost da se prilikom isplate plata u Računovodstvenom centru MO iz mojih prinadležnosti obustavlja iznos mesečne rate (preplate).	
3. Virmanom po prijemu profakture.	
Datum _____	Potpis _____



VOJNOSANITETSKI PREGLED
VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA
Crnotravska 17, 11040 Beograd, Srbija
Tel/Fax: +381 11 2669689
vmaini1@EUnetr.rs
vmavsp@hotmail.com

Časopis „Vojnosanitetski pregled“ izlazi godišnje u 12 brojeva. Godišnja pretplata za 2011. godinu iznosi: 4 000 dinara za građane Srbije, 8 000 dinara za ustanove iz Srbije i 150 € za strane državljane i ustanove. Sredstva se uplaćuju na tekući račun Vojnomedicinske akademije Beograd kod Uprave za javna plaćanja u Beogradu broj: **840-941621-02 VMA (za Vojnosanitetski pregled ili za VSP), PIB 102116082**. Uplatnicu (dokaz o uplati) dostaviti lično ili poštom (pismom, faksom, *e-mail*-om). Za zaposlene u MO i Vojsci Srbije moguća je i pretplata u 12 mesečnih rata putem trajnog naloga, tj. „odbijanjem od plate“. Popunjen obrazac poslati na adresu VSP-a.

PRIJAVA ZA PRETPLATU NA ČASOPIS „VOJNOSANITETSKI PREGLED“

Ime i prezime ili naziv ustanove	
Jedinstveni matični broj građana	
Poreski identifikacioni broj (PIB) za ustanove	
Mesto	
Ulica i broj	
Telefon / telefaks	
Pretplata na časopis „Vojnosanitetski pregled“ (zaokružiti):	
1. Lično. Dokaz o pretplati dostavljam uz ovu prijavu.	
2. Za pripadnike MO i Vojske Srbije: Dajem saglasnost da se prilikom isplate plata u Računovodstvenom centru MO iz mojih prinadležnosti obustavlja iznos mesečne rate (preplate).	
3. Virmanom po prijemu profakture.	
Datum _____	Potpis _____

