



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



Мирослав (Славољуб) Милић

**ХИСТОХЕМИЈСКА,
ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА И
МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА
ПРОМЕНА НА СРЧАНОМ МИШИЋУ
КОД ХЕРОИНСКИХ ЗАВИСНИКА –
АУТОПСИЈСКА СТУДИЈА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2018.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Miroslav (Slavoljub) Milić

**HISTOCHEMICAL,
IMUNOHISTOCHEMICAL AND
MORPHOMETRIC ANALYSIS OF
CHANGES IN HEART MUSCLE
IN HEROIN ADDICTS – AUTOPSY STUDY**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2018.

Захвалница

Неизмерну захвалност дугијем мојој деци Анки и Страхињи и супруги Јелени, који су показали огромно стрпљење и разумевање, што су били и остали извор моје енергеје, у сваком тренутку ми пружали огромну љубав и помогли ми да истрајем.

Захвалност дугујем својим родитељима, који су ми у не тако лаким временима пружили могућност да успем и будем овде где сам сада.

Искрено се захваљујем мом ментору, проф. др Горану Илићу, на указаном поверењу и пруженој прилици, на стручним и конструктивним саветима и помоћи у креирању идеје, изради и писању ове докторске дисертације.

Захваљујем се проф. др Слободану Савићу и проф. др Радовану Караџићу, на подршци током рада и конструктивним саветима приликом израде докторске дисертације.

Захвалност дугујем и свим драгим колегицама, колегама и сарадницима из Завода за судску медицину у Нишу, Института за анатомију и Института за хистологију и ембриологију Медицинског факултета у Нишу, као и Имунохистохемијске лабораторије Центра за патологију Клиничког центра у Нишу, на уложеном труду и утрошеном времену, новим конструктивним идејама, безрезевној подршци у раду и пруженој позитивној енергији током израде ове тезе.

Мирослав Милић

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: Проф. др Горан Илић, редовни професор, Универзитет у Нишу, Медицински факултет

Наслов: Хистохемијска, имунохистохемијска и морфометријска анализа промена на срчаном мишићу код хероинских зависника – аутопсијска студија

Резиме: У циљу расветљавања механизма умирања хероинмана, поред промена на плућима, које су најчешће истраживане, сагледаване су и промене на срчаном мишићу. Сматра се да слабљење контрактилне способности миокарда и умножавање везива у срчаном мишићу представљају основ за развој могућих патогенетских механизма умирања. У циљу дефинисања микроморфолошких промена на миокарду, хистохемијски, имунохистохемијски и морфометријски су одређене квалитативне карактеристике кардиомиоцита и везивног ткива, као и броја запаљењских ћелија у миокарду (леукоцита, моноцита и макрофага, Т-лимфоцита и мастоцита) код 42 кадавера чија је смрт последица злоупотребе хероина, као и код 10 кадавера који су чинили контролну групу. Квантификација наведених параметара извршена је мерењем дебљине миокардиоцита и одређивањем процента заступљености везивног ткива, те бројањем специфичних типова ћелија у 30 видних поља у сваком од 6 узорака миокарда узетих са дефинисаних места. Средње вредности анализираних су статистички. Везивно ткиво је било статистички заступљеније у миокарду зависника од хероина у односу на контролну групу ($p=0,001$). Кардиомиоцити су били статистички значајно дебљи код зависника од хероина за $p=0,005$. Број леукоцита је био код зависника од хероина статистички значајно мањи у левој комори у поређењу са десном комором и међукоморном преградом ($p=0,02$). Статистички значајне разлике између полова и између група које су дефинисане на основу дужине коришћења хероина нису забележене за анализираних параметре. Хипертрофија кардиомиоцита, умноженост везивног ткива, као и заступљеност појединих ћелија имуног одговора, указују да дужа употреба хероина временом може да доведе до дисфункције срчаног мишића и спроводног система срца, што може представљати непосредни узрок умирања хероинских зависника.

Научна област: Медицина
Научна дисциплина: Судска медицина

Кључне речи: обдукција, хероин, миокард, везивно ткиво, морфометрија

УДК: 616.127-091.5:616-056.83

CERIF класификација: B770 Судска медицина

Тип лиценце Креативне заједнице: CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: Goran Ilić, MD, PhD, Full Professor, University of Niš, Faculty of Medicine

Title: Histochemical, imunohistochemical and morphometric analysis of changes in heart muscle in heroin addicts – autopsy study

Abstract: In order to clarify the mechanism of heroin addicts death, besides changes in the lungs, which were most frequently studied, changes in the heart muscle were also observed. The weakening of the contractility of the myocardium and the binding of the connective tissue in the heart muscle are considered to be the basis for the development of possible pathogenetic mechanisms of dying. In order to define micro-morphological changes on the myocardium, histochemical, immunohistochemical and morphometric analysis determines the qualitative characteristics of cardiomyocytes and connective tissue, as well as the number of inflammatory cells in the myocardium (leucocytes, monocytes and macrophages, T-lymphocytes and mastocytes) of 42 cadavers whose death is in relation to the heroin abuse, and 10 cadavers from the control group. The quantification of these parameters was performed by measuring the thickness of the cardiomyocyte and determining the percentage of connective tissue representation, and counting specific cell types in 30 visual fields in each of the 6 myocardial samples taken from the defined sites. The mean values were analyzed statistically. The connective tissue was statistically significantly present in the heroin addicts myocardium in relation to the control group ($p = 0.001$). Cardiomyocytes were statistically significantly thicker in heroin addicts for $p = 0.005$. The number of leukocyte was significantly lower in the left ventricle compared to the right ventricle and the intraventricular septum ($p = 0.02$) for heroin addicts. Statistically significant differences between the sexes and between the groups defined by the length of heroin use were not recorded for the analyzed parameters. Cardiomyocyte hypertrophy, presence of connective tissue, and the presence of certain immune response cells indicate that prolonged use of the heroin over time can lead to dysfunction of the heart muscle and heartbeat system, which may represent the cause of the death of heroin addicts.

Scientific Field: Medicine

Scientific Discipline: Legal medicine

Key Words: autopsy, heroin, myocardium, connective tissue, morphometry

UDC: 616.127-091.5:616-056.83

CERIF Classification: B770 Legal medicine

Creative Commons License Type: CC BY-NC-ND

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

АНП	атријални натриуретски пептид
АТФ	<i>adenosinum triphosphatum</i> (лат.); аденозин трифосфат
Ca^{2+}	(хемијска формула двовалентног калцијума)
CO_2	(хемијска формула угљен диоксида)
ЕЦМ	екстрацелуларни матрикс
F	<i>femininum</i> (лат.); женски пол
H_2O_2	(хемијска формула водоник пероксида)
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> (енг.); вирус хумане имунодефицијенције
IFN- γ	<i>interferon gamma</i> (енг.); интерферон Гама
IL-10	<i>interleukin-10</i> (енг.); интерлеукин 10
K^+	(хемијска формула једновалентног калијума)
LSD	<i>Lyserg-Säure-Diäthylamid</i> (нем.); диетиламид лизергинске киселине
Na^+	(хемијска формула једновалентног натријума)
M	<i>masculinum</i> (лат.); мушки пол
MHC	<i>myosin heavy chain</i> (енг.); тешки ланац миозина
MLC	<i>myosin light chain</i> (енг.); лаки ланац миозина
ММП	матриксне металопроотеиназе
pH	(мера активности водоникових јона у раствору)
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> (енг.); трансформишући фактор раста Бета
TNF- α	<i>tumor necrosis factor -α</i> (енг.); фактор некрозе тумора Алфа

САДРЖАЈ

1. УВОД	9
1.1. Историјат коришћења психоактивних супстанци.....	9
1.2. Опиоиди	12
1.2.1. Фармакокинетичка својства опиоида	13
1.2.2. Фармакодинамска својства опиоида	14
1.2.3. Хероин	17
1.3. Опште анатомске карактеристике срца.....	29
1.4. Хистофизиолошке карактеристике срца	30
1.5. Одговор срца на тровање.....	34
1.5.1. Срчана аритмија.....	35
1.5.2. Хипертрофија срца	36
1.5.3. Срчана инсуфицијенција.....	36
1.5.4. Акутно тровање срца	37
1.5.5. Хронично тровање срца	37
1.5.6. Дегенеративни и регенеративни процеси у миокарду	37
1.5.7. Хипертрофија срца и срчана инсуфицијенција након тровања	40
1.6. Патохистолошке карактеристике миокардитиса.....	43
1.6.1. Технички услови за правилно постављање дијагнозе.....	43
1.6.2. Класификација миокардитиса	44
1.7. Промене на срцу као последица интоксикације хероином	49
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	52
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	53
3.1. Материјал за анализу	53
3.2. Хистохемијска анализа	54
3.2.1. Материјал за хистохемијску анализу	54
3.2.2. Методе хистохемијске анализе.....	56
3.3. Имунохистохемијска анализа	56
3.3.1. Материјал за имунохистохемијску анализу	56
3.3.2. Методе имунохистохемијске анализе.....	57
3.4. Морфометријска анализа.....	58
3.4.1. Микроморфометријска анализа миокарда	58

3.5. Хемијско–токсиколошка анализа	61
3.6. Статистичка обрада података.....	62
4. РЕЗУЛТАТИ	64
4.1. Општи подаци о анализираним случајевима.....	64
4.2. Анализа везивног ткива	66
4.3. Анализа дебљине кардиомиоцита	72
4.4. Анализа броја ћелија запаљења и мастоцита	76
4.4.1. Анализа броја Т–лимфоцита у испитиваним групама	76
4.4.2. Анализа броја леукоцита у испитиваним групама	80
4.4.3. Анализа броја моноцита и макрофага у испитиваним групама	84
4.4.4. Анализа броја мастоцита у испитиваним групама	88
4.4.5. Анализа међузависности броја ћелија запаљења и мастоцита.....	91
4.5. Хемијско–токсиколошка анализа	94
5. ДИСКУСИЈА	96
6. ЗАКЉУЧЦИ	122
7. ЛИТЕРАТУРА	123
БИОГРАФИЈА.....	144
Прилог 1. Изјаве о ауторству	

1. УВОД

1.1. Историјат коришћења психоактивних супстанци

Савремено доба носи свест о томе да се непрекидно мењају начини злоупотребе психоактивних супстанци, да се међу зависницима неометано шири *HIV* и друге инфекције, и да постоји императив постављања ефикасне основе за лечење и превенцију зависности, а ми ћемо моћи да се боримо са тим само ако разумемо природу ове болести. Због тога би требало да 21. век буде период интензивних студија усмерених ка бољем разумевању механизма зависности и патолошких процеса који су последично активирани злоупотребом психоактивних супстанци.

Супстанце које утичу на процесе расположења и размишљања познате су човечанству још од раног доба неолита, тј. 8000 година пре нове ере [*Glennon 1996; Shultes 1976; Wasson и Wasson, 1957*], и није постојала култура у којој супстанца ове врсте није била позната и употребљавана. У принципу, ове супстанце су имале улогу култних супстанци и користиле су се у верским церемонијама, и као лекови. Највероватније је употреба ових супстанци за забаву и за изазивање потпуног личног задовољства у то време била мање важна. На овај начин овакве супстанце су играле важну улогу у опстанку племена, повећавајући његову кохерентност.

Психотропна супстанца која се најчешће користила у Старом свету био је екстракт биљке *Amanita muscaria*, за коју се верује да је коришћена још од неолитских времена, тј. пре око 10 000 година. Верује се да је карактеристичан украс неких неолитских судова представљају делови гљива који плутају у екстракту. Мистериозни напиток богова, који су у Индију донели Аријевски освајачи, највероватније је ова биљка, а култ напитка богова владао је индијском религијом и културом вековима. Његова причесна употреба описана је у Риг Веди [*Ray и Ksir, 1993; Wasson и Wasson, 1957*]. Највероватније је екстракт Аманите био и основа ритуалног напитка Зороастриана "баома", и сматра се је да је амброзија, храна богова, која се користи у дионизијским обредима, раствор екстракта Аманите [*Graves 1958, Wasson и Wasson, 1957*]. Анализа слика "дрво живота" у римским катакомбама навела је да неки људи мисле да је употреба Аманите важна и у културама раног хришћанства [*Allegro 1970*].

Памћење психотропних особина Аманите, која се користила на почетку наше цивилизације, нестало је из цивилизованог света. Међутим, употреба ове гљиве као средства које се користило током шамантских обреда, откривена је у Сибиру 1730.

године. Након тога, утврђено је да се користила у неколико изолованих група угро–финских народа у западном Сибиру и три примитивна племена у североисточном Сибиру [Shultes 1976; Wasson 1967]. Халуциногени принципи Аманите су метаболити иботенске киселине, мускимола и мусказона, а не, као што се раније веровало, мускарин [Shultes 1976]. Мускимол је једина природна халуциногена хемијска супстанца излучена непромењена од тела, па су зато чланови једног племена ритуално пили урин мушкараца који су били опијени печуркама, и тако рециклирали халуциноген. Увид у списа Веда која говоре о церемонијалном испијању урина јача хипотезу да је Аманите заиста била древно пиће богова [Shultes 1976].

Употреба Аманите као потреба верских церемонија свакако је снажно забрањивана коришћењем снажног табуа, и вероватно је такав табу могао да се задржи у подсвести људи до данас, с обзиром на то да се Аманита најчешће сматра врло отровном гљивом, што очигледно није тачно.

Три психоактивне супстанце познате из праисторијског времена преживеле су и задржале важну улогу и у данашњици. Прва од њих, позната око 6000 година (поменута у натписима на клинастом писму на глиненим таблама Сумера) је опијум, а морфијум је његова главна компонента која одређује психотропно деловање. Опијум је одолео времену и наставља да се и данас користи. То је сок семена мака (*Papaver somniferum*). Коришћен је углавном у медицинске, али и у рекреативне сврхе. Док је пре 3500 година на папирусу пронађен савет да се користи да "спречи превелико плакање деце", Јелена Тројанска понудила је своје забринуте госте вином обогаћеним чаробним напитком, како би одагнали своју тугу. Према опису дејства чаробног напитка које је дао Хомер, то може бити само опијум. Гален је осећао да је опијум нека врста лека за све тегобе, а поменуо је и рекреативну употребу у облику колача и слаткиша, који су слободно доступни на улицама римске империје [Scott 1969]. Знање о опијуму је у Европи почело да се губи у мрачном добу, али Арапи, којима је Кураном забрањен било који облик алкохола, користили су опијум (и хашиш) као примарне социјалне дроге и наставили да испитују његове лековите особине. Око 1000. године Бируни је први пут описао зависност од опијата [Hammarneh 1970]. Ирански лекар, најпознатији и најутицајнији научник филозоф ислама Авицена, у својој пракси обимно је користио опијум, а верује се да је умро због пијења прекомерне количине мешавине опијума и вина [Ray и Ksir, 1993]. Па ипак, упркос његовом величању и лековитом дејству, опијум се није сматрао култном супстанцом ни у једној већој религији.

Само препарати направљени од индијске конопље (*Cannabis sativa*) могу да се такмиче са опијумом у односу на његову старост и дуговечност. Географски распон ове биљке је шири од Аманите и мака. У Кини и централној Азији, хашиш, најкоришћенији производ припремљен од биљке конопље, познат је око 5000 година. Најстарији запис о томе је у апотекарској књизи кинеског императора која је написана 2737. године пре нове ере [Ray и Ksir, 1993]. Кинези су говорили о канабису као "ослободиоцу греха" и "одушевљеном даваоцу". Касније се појавио хашиш и у Индији. Посудице које су служиле за пушење хашиша, откривене су у гробницама у Пазирику на Алтајским планинама, и датирају из периода 5–2. века пре нове ере [Shultes 1976]. Око 1000. године конопља је интензивно коришћена, нарочито у области исламске културе, на Блиском истоку и Африци, где је забрањена употреба још једне од најраспрострањенијих супстанци са психотропним профилем – алкохола.

Канабис је почео да се шири у Европи након Наполеонових ратова, када су у Француску хашиш донели ветерани Египатске кампање [Mickel 1969]. Средином 19. века хашиш је постао веома популаран међу француским уметницима у Паризу.

Трећа супстанца позната по злоупотреби из древних времена у Старом свету била је алкохол. Од ове три, то је једина која је и даље задржала свој статус дозвољене супстанце у већем делу света, искључујући религиозне исламске земље. Употреба алкохола је веома распрострањена широм целог света и може се произвести практично од било ког органског материјала, који је подложен дејству квасца. У великој мери коришћен је за забаву, понекад и у верским церемонијама, у свим културама света, изузев на неким острвима Океанија и Индијским племенима Северне Америке. Ова последња изненађујућа чињеница (алкохол је био познат у Латинској Америци) била је узрок дезинтеграције домородачких култура у Северној Америци, када су били изложени овој супстанци која ствара зависност, јер их традиција није научила како да је безбедно користе. Алкохол је коришћен у култне сврхе, посебно код старих Грка током Дионизије. Вино се користи и на јеврејским и хришћанским церемонијама, а вероватно најранији опис последица злоупотребе алкохола за забаву можемо наћи у Библији.

Поред ове три широко распрострањене супстанце које се злоупотребљаване, неколико биљака које садрже друге психоактивне супстанце коришћене су у Старом Свету. Једна од њих, широко распрострањена, била је татула (*Datura stramonium*) која садржи скополамин, атропин и хиосциамине. Ова биљка је веома отровни халуциноген. Биљка је коришћена искључиво у култним ритуалима, а не у забави. У старој Грчкој, Питија је жвакла лишће татуле у Аполоновом храму у Делхију пре него што је

прорицала, а можда су и листови бацани у ватру чији је дим изазивао транс [Ray и Ksir, 1993, Shultes 1970]. Татула је била популарна и у Кини, нарочито међу будистима, и у Индији, где се користила у култу Шиве. У многим деловима Азије, чак и данас, семе татуле често се меша са храном и дуваном и злоупотребљава се нарочито међу лоповима за омамљивање жртава, које могу остати озбиљно опијене до неколико дана [Shultes 1976]. Међутим, ритуално коришћење препарата татуле карактеристичније је за Нови свет, где су га интензивно користили мексички Индијанци.

Древни Грци су користили и халуциноген напитак, кикеон, на крају једног обреда иницијације. Поред екстракта јечма и нане, вероватно је садржао и припремљен ергота са дејством попут LSD-а [Wasson и сар., 1970]. Међу психотропним супстанцама старог света, ибогаин заслужује да се помене. Добијан је из корена афричке биљке *Tabernanthe iboga*, а користио се у церемонијама религије Бвити у централној Африци од стране племена Фанг, посебно у обредима адолесценције. Недавно је ибогаин изазвао значајан интерес због своје способности да инхибира потребу за узимањем дрога [Popik и сар., 1996].

1.2. Опиоиди

Назив "опиоид" односи се на супстанце које имају учинак сличан учинку морфина, а који се може антагонизовати налоксоном. У опиоиде се убрајају и многи лекови чија је структура различита од морфина, попут неких неуропептида и синтетских аналога морфина. Насупрот томе, назив "опијат" је ужи, и односи се само на структуре које имају учинак сличан морфину, али су и структурално сличне морфину. "Опијум" је екстракт сока из главице мака који се примењује већ хиљадама година због изазивања еуфорије и аналгезије; међу многим алкалоидима у овом соку најзаступљенији је морфин [Brunton и сар., 2012; Rang и сар., 2006].

Према фармакодинамским својствима, опиоиди се деле на: снажне агонисте, благе до умерене агонисте, опиоиде са мешаним учинком на рецепторе, и остале опиоиде (попут трамадола).

У односу на хемијска својства сви опиоиди се деле у две велике групе. У првој групи се налазе аналози морфина у које спадају хероин и кодеин (имају структуру сличну морфину), парцијални агонисти у које спада налорфин и антагонисти у које спада налоксон. Другу групу сачињавају синтетски деривати са хемијском структуром која се разликује од структуре морфина и њој припадају фенилпиперидини (меперидин,

фентанил, суфентанил), група метадона (метадон, декстропропоксифен), група бензоморфана (пентазоцин), као и полусинтетски деривати тебаина (бупренорфин).

1.2.1. Фармакокинетичка својства опиоида

Већина опиоидних аналетика добро се апсорбује након пероралне, супкутане или интрамускуларне примене. Због израженог учинка првог пролаза кроз јетру, зарад постизања истоветног терапијског учинка, дозе парентерално примењеног лека (нпр. морфин) су знатно ниже од доза орално унетог препарата. И поред индивидуалних разлика у метаболизму опиоида у јетри, биорасположивост препарата морфина примењених *per os* просечно износи око 25%. Аналетици који подлежу метаболизму првог проласка кроз јетру слабијег интензитета, за разлику од морфина имају вишу биорасположивост, која за кодеин износи скоро 90%, а за оксикодон се креће у распону од 80 до 90%. На тржишту постоје и трансдермални препарати којима се омогућује примена фентанила и бупренорфина.

Унос опиоида у органе и ткива зависи од физичких и хемијских карактеристика. Опиоиди брзо напуштају крвоток и највише концентрације постижу у ткивима која су добро прокрвљена, као што су мозак, плућа, јетра и бубрези. Масно ткиво слабије је прокрвљено, али у њему се високо липофилни опиоиди могу да акумулирају након примене високих доза (нпр. фентанил).

Опиоиди се најчешће метаболишу у поларне метаболите (углавном глукурониде), који се потом излучују путем бубрега. Морфин садржи хидроксилне групе, а најчешће се коњугује у морфин-3-глукуронид, који има неуроексцитацијска својства. Мањи део, око 10%, коњугује се у морфин-6-глукуронид, активни метаболит који има аналетски учинак 4 – 6 пута јачи од морфина. Код уобичајене примене ова два метаболита тешко пролазе крвномождану баријеру и зато не доприносе значајно учинку морфина. Накупљање 3-морфин-глукуронида и 6-морфин-глукуронида могуће је код оштећења бубрежне функције или код примене високих доза морфина. Тада може доћи до ексцитацијског учинка (нпр. конвулзије) или до појачаног и пролонгираног опиоидног учинка. Естри попут ремифентанила брзо се хидролизирају путем естераза. Оксидативни метаболизам у јетри главни је начин разградње фенилпиперидинских опиоида, попут меперидина, фентанила, алфентанила и суфентанила. Накупљање деметилираног метаболита меперидина, нормеперидина, може се догодити код болесника са смањеном бубрежном функцијом или код оних који

примају високе дозе лека. У високим концентрацијама меперидин може узроковати конвулзије. До сада нису регистровани активни метаболити фентанила. Фентанил се метаболише путем изоензима цитохрома *CYP3A4* у јетри, при чему долази до *N*-деалкилације. *CYP3A4* налази се и у зиду цриева и доприноси метаболизму првог пролаза када се фентанил примењује *per os*.

Кодеин, оксикодон и хидрокодон метаболишу се у јетри путем *CYP2D6*, што доводи до стварања потентнијег метаболита. Путем тог ензима кодеин се деметилира у морфин. Важно је нагласити да постоји генски полиморфизам гена за *CYP2D6*, што може довести до различитог настанка активних метаболита. У случају оксикодона активни метаболити немају велико значење, односно завршни молекул одговоран је за главнину аналгетског учинка. Оксикодон и његови метаболити могу да се накупљају код болесника са оштећеном функцијом бубрега, што може довести до продуженог учинка и седације. Када је реч о кодеину, потребан је много већи опрез јер кодеин има мали афинитет за опиоидне рецепторе, а претвара се у потентнији морфин. Брзи метаболитатори *CYP2D6* не би смели да узимају овај лек јер може доћи до токсичног учинка морфина. Европска агенција је због случајева смрти код примене кодеина у дечјој популацији ограничила примену кодеина као аналгетика у тој популацији на узраст од 12 година, односно на узраст од 18 година за терапију бола након аденоидектомије или тонзилектомије код болесника с опструктивном апнејом у сну (јер је код таквих болесника највећи ризик од фаталног исхода) [Katzung и сар., 2011].

Поларни коњугати глукуронске киселине излучују се углавном непромењени урином. У урину се могу наћи и врло мале количине непромењеног лека. Коњугати глукуронида могу се наћи и у жучи, с тим да се само мали део елиминацише ентерохепатичком циркулацијом [Brunton и сар., 2012; Katzung и сар., 2011].

1.2.2. Фармакодинамска својства опиоида

Пресинаптички и постсинаптички опиоидни рецептори припадају групи рецептора повезаних са *G*-протеинима. Пресинаптички рецептори затварају волтажно зависне калцијумове канале и редукују отпуштање неуротрансмитера као што су глутамати или ацетилхолин, док постсинаптички рецептори отварају калијумове канале и хиперполаризирају неуроне. Рецептори се деле у три главне групе: μ , κ и δ . Различито су дистрибуирани у нервном систему и имају различите учинке. Учинак остварен преко μ -рецептора се манифестује кроз клиничку слику супраспиналне и спиналне

аналгезије, седације, поремећаја дисања (седација), појаву физичке зависности, успорен рад гастроинтестиналног тракта, измену отпуштања хормона и неуротрансмитера. Преко δ -рецептора остварује се супраспинална и спинална аналгезија, као и измена у отпуштању хормона и неуротрансмитер. Учинак остварен преко κ -рецептора се манифестује у виду супраспиналне и спиналне аналгезије и успореног рада гастроинтестиналног тракта.

Уз примену опиоида везан је појам толеранције: уз поновну примену лека јавља се поступно смањење учинка, због чега је потребно за једнак учинак примењивати све већу дозу лека. Уз толеранцију се јавља и телесна зависност, при чему настаје синдром апстиненције код прекида примене лека или код примене антагониста. Висок степен толеранције јавља се на учинак аналгезије, еуфорије, депресије дисања итд., док се толеранција не јавља на констипацију, конвулзије и миозу. Иако развој толеранције започиње првом дозом опиоида, толеранција постаје клинички приметна тек након 2 до 3 недеље учестале примене уобичајених терапијских доза. Ипак, периперативна примена ултрапотентних опиоидних аналгетика попут ремифентанила може узроковати настанак толеранције већ након неколико сати. Ризик од настанка толеранције смањује се ако се дају ниже дозе лека уз повећан интервал између доза [Brunton и сар., 2012, Katzung и сар., 2011].

Следећи учинци односе се на морфин, али се јављају и код примене других опиоидних агониста, парцијалних агониста и опиоида са мешовитим учинком на рецепторе.

На централни нервни систем, учинци опиоидних агониста се остварују преко μ -рецептора. Аналгетичко дејство опиоидни агонисти остварују тако што делују и на сензитивну и на емоционалну компоненту бола. Код примене морфина јавља се угодан осећај (еуфорија) и смањење тескобе, иако се понекад може срести и дисфорија, односно врло неугодан осећај. Седација је изражена код старијих особа, а комбинација са другим депресорима централног нервног система може узроковати дубок сан. Опиоидни агонисти изазивају депресију дисања која је зависна од дозе. Сви опиоиди могу узроковати депресију дисања инхибицијом центра за дисање у продуженој мождини. Болесници без претходне инсуфицијенције плућне функције могу добро да толеришу блажи пад респираторне функције, али то није случај код болесника са повишеним интракранијалним притиском, астмом или хроничном опструктивном плућном болешћу. Као антитусик најчешће се примјењује кодеин, али и остали опиоиди могу да изазову супресију рефлекса кашља. Сви опиоиди узрокују миозу и с

обзиром на то да на овај учинак нема толеранције, миоза је важна код постављања дијагнозе предозирања. Ригидност трупа је последица супраспиналног учинка опиоида, а може да доведе до сметње у дисању. Најчешће се јавља код брзе интравенске примене високих доза липофилних опиоида, попут фентанила, суфентанила или ремифентанила. Мучнина и повраћање су последица активације хеморецепторске окидачке зоне, док је регулација телесне температуре под контролом ендогених опиоида [Brunton и сар., 2012; Katzung и сар., 2011; Labianca и сар., 2012].

Као периферни учинци, описују се утицаји на све остале системе, сем централног нервног система.

На кардиоваскуларни систем опиоиди делују и преко срца и преко крвних судова. Учинак на ритам срца углавном је брадикардија, али због антимускаринског учинка, меперидин може да узрокује тахикардију. Крвни притисак је обично очуван, али код болесника са хиповолемијом може доћи до хипотензије. Ако под дејством опиоида дође до депресије дисања, пораст парцијалног CO_2 може да узрокује церебралну вазодилатацију и повишен интракранијални притисак.

Међу учинцима опиоида на гастроинтестинални тракт доминира констипација. Како се на овај учинак не јавља толеранција, констипација се неће смањити током дуже примене опиоида. Опиоидни рецептори су бројни у дигестивном тракту, а констипација је последица учинка путем централног нервног и ентеричког нервног система. У подручју дебелог црева смањују се пропулзивни перисталтички таласи, а тонус је повишен. Последица тога је успорење проласка фекалне масе, појачана апсорпција воде и последична констипација. Због овог учинка неки опиоиди који слабо пролазе крвномождану баријеру, попут лоперамида, примјењују се за лечење дијареје. Ако се истовремено са агонистима примене антагонисти опиоидних рецептора који делују само периферно и зато не смањују аналгетски учинак, то омогућава превенцију и/или лечење констипације узроковане опиоидима. Описана је фиксна перорална комбинација опиоидног агониста оксикодона и антагониста налоксона. Опиоидни антагонист налоксон се не апсорбује из пробавног система, већ делује локално на рецепторе на глатким мишићима црева спречавајући констипацију, при чему се не смањује аналгетски учинак оксикодона. Супкутане ињекције метилналтрексона примењују се код болесника код којих се спроводи палијативно лечење опиоидима. Метилналтрексон је селективни антагонист опиоидних μ -рецептора који врло слабо продире у централни нервни систем, па делује периферно у подручју гастроинтестиналног система [Leppert 2010; Rauck 2013]. Приликом дејства опиоида на

билијарни систем може доћи до контракције глатких мишића билијарног стабла, што може изазвати билијарне колике, а може доћи и до контракције Одијевог сфинктера.

Дејством опиоида на уринарни систем може доћи до смањења бубрежне функције, због смањеног протока кроз бубреге. Појачан тонус уретера може погоршати колике код уретеролитијазе, а појачан тонус мокраћне бешике може довести до ретенције урина, нарочито у постоперативном периоду.

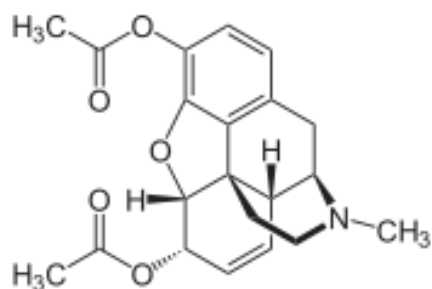
Опиоиди доводе до продуженог порођаја јер долази до релаксације глатких мишића.

Терапијске дозе опиоида могу узроковати црвенило и топлину коже, а понекад се јављају знојење и свраб. Ови учинци су последица директног отпуштања хистамина и учинка путем централног нервног система. Свраб и уртикарија код примене опијата јављају се чешће при парентералној примени [Brunton и сар., 2012; Katzung и сар., 2011; Labianca и сар., 2012].

1.2.3. Хероин

1.2.3.1. Опште информације о хероину

Хероин (грч. *ἥρωίνη* – *heros*, јунак) хемијско једињење диацетилморфин или диаморфин, је полусинтетички, веома снажан опиоид синтетисан из морфина. Хероин је 3,6–диацетил естер морфина (IUPAC (5 α ,6 α)– 7,8–дидехидро– 4,5–епокси– 17–метилморфинан– 3,6–диол диацетат; слика 1). Има изузетно велики потенцијал за стварање зависности код особа које га уносе у организам.



Слика 1. Структурна формула хероина.

Бела кристална форма хероина је најчешће хидрохлоридна со диацетилморфин хидрохлорид, мада је често измењена због разних додатака, тако да нема увек изглед и

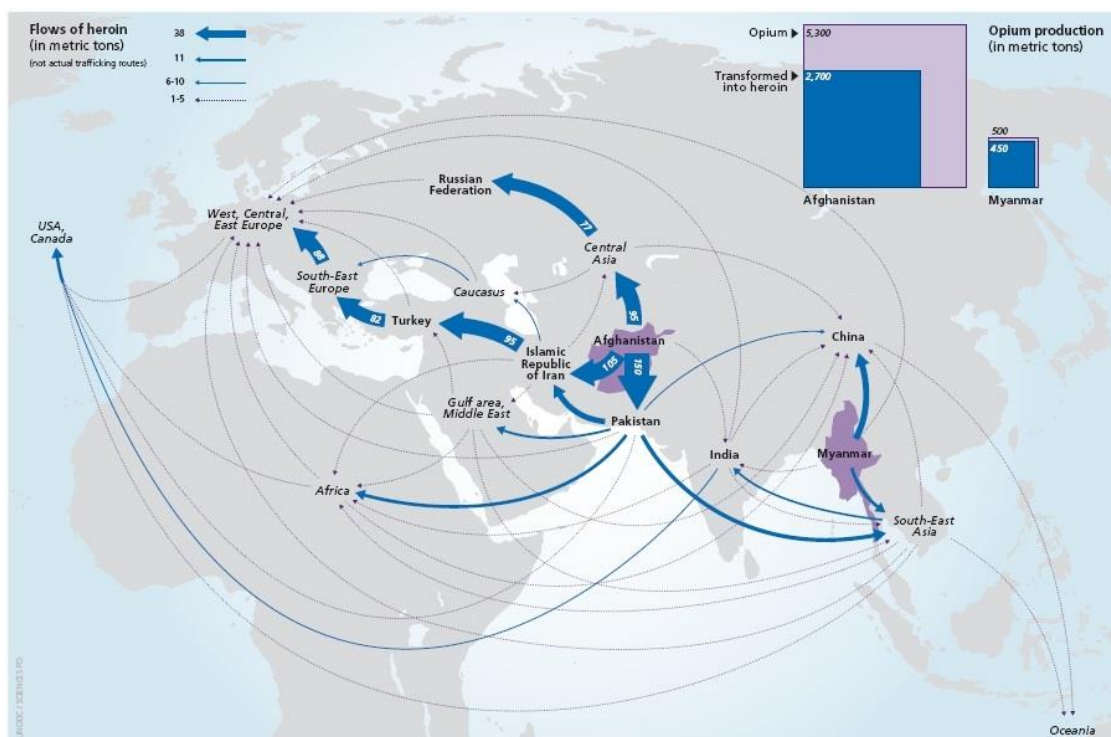
доследност мат белог праха, како обично хероин изгледа у облику слободне базе. Сматра се да је 90% хероина произведено у Авганистану.

Немачка фармацеутска компанија *Bayer* дала је свом новом леку име "Хероин" 1895. године. Име је добило по немачкој речи (*heroisch*) због његовог учинка на корисника. Производио се како би био замена морфину, као лек за сузбијање кашља, мислећи да не ствара зависност. Морфин је тада био популарна дрога која се користила рекреативно, па је *Bayer* настојао да пронађе сличан лек који не ствара зависност. Упркос *Bayer*-овом рекламирању да хероин не ствара зависност, веома брзо многи његови корисници су постали зависници.

Као и други опиоиди, хероин се користи и као аналгетик и као рекреацијска дрога. Често и редовно коришћење је повезано са толеранцијом и физичким зависностима, а које се могу развити у хемијску зависност [*Fernandez* и *Libby*, 2011].

1.2.3.2. Производња и синтеза хероина

Опијум, као основна сировина за производњу хероина, на годишњем нивоу се у светским оквирима продукује у количини од 4000 до 7000 тона. Бурма и Авганистан далеко предњаче у светској производњи опијума (слика 2).



Слика 2. Токови хероина произведеног у Азији (извор: *UNODC – United Nations Office on Drugs and Crime*; <http://www.unodc.org/>)

Кроз Србију пролази део тзв. Балканске руте којом се дистрибуирају наркотици (слика 3).



Слика 3. "Балканска рута" за дистрибуцију наркотица (извор: Министарство унутрашњих послова Републике Хрватске; <https://www.mup.hr/>)

Хероин је ацетилни дериват морфина (диацетил–морфин). Не налази се као састојак природних производа. Добија се само синтетичким путем, процесом диацетиловања анхидридом сирћетне киселине или ацетилхлорида. Ради се о релативно лако изводљивом процесу (морфин се загрева уз додатак потребних супстанци). Употребљава се у облику својих соли са хлороводоничном киселином, која је бели кристалан прах горког укуса, топи се на 230 °С. Раствара се у води у размери 1:2, у етанолу у размери 1:11 и у хлороформу у размери 1:3. Хероин спада међу најјаче наркотичне супстанце [Fernandez и Libby, 2011].

1.2.3.3. Историја употребе хероина

Миленијумима пре 19. века и појаве хероина, у античком свету се узгајао опијумски мак, и то прво у Египту и Месопотамији, а потом и у старој Грчкој. Посебним поступком засецања незрелих махуна мака сакупљан је опијум у виду беличасте течности, чија је трговина била јако развијена, а чије уживање, упркос зависности, било је социјално прихваћено. Главни пут уношења опијума у организам оствариван је пушењем, а због својих ефеката се често користио и у медицинске сврхе,

те га и Хипократ препознаје као „лек за разне болести“ и „наркотик“. Након пресуде, Сократ је за погубљење добио раствор који је садржао мешавину кукуте и опијума (симбола вечног сна), који се тада користио у сврху еутаназије и самоубиства.

У средњовековној Европи опијум се практично није користио, тако да након античког периода Европа долази у контакт са опијумом тек у 16. веку. Хероин тада у Европу стиже преко трговачких путева који је повезују са земљама Далеког истока. У том периоду се открива да опијум може имати и потенцијална лековита својства. Трговина опијумом је била толико интензивна да је директно утицала на тадашњу светску економију и политичка превирања у друштву. Забрана увоза опијума у Кини до те мере је утицала на наведене економско-политичке односе у свету да је у 19. веку довела чак и до ратних сукоба између Енглеске, Француске и Кине у склопу тзв. опијумских ратова. Из ових ратова Кина је изашла као губитник, те је уз ратну одштету огромних размера морала још и да део своје територије (Хонг Конг) преда Великој Британији.

Морфин, као активна супстанца добијена из опијума, откривен је почетком 19. века (1803. године). Тада се сматрало да морфин представља побољшани и усавршени облик опијума, који не доводи да развоја зависности, већ да представља лек са поузданим и дуготрајним дејством и ефектима који одговарају ефектима опијума. По откривању хероина свет ће бити у истој заблуди.

Хероин, односно диацетилморфин синтетисан је по први пут 1874. године од стране енглеског хемичара *C. R. Wrighta*. Новосинтетисана супстанца је већ 1895. године од стране *Bayer*-а прихваћена као једињење које не даје негативне учинке морфина. *Heinrich Dresser*, тада ангажован у *Bayer*-у да тестира ефикасност и сигурност нових лекова, дао је предност истраживању диацетилморфина у односу на ацетилсалицилну киселину, данас познатију као аспирин. У диацетилморфину је видео алтернативу за морфин и сигуран лек за купирање болова и третман респираторних обољења. У то време сматрао је да диацетилморфин не ствара зависност, тако да је новосинтетисану супстанцу, поред животиња, испитивао и на себи и својим сарадницима у *Bayer*-у. Због храбрости да се лично подвргну тестирању, новом једињењу су дали име хероин (потиче од немачке речи *heroisch* која означава храброст).

У време откривања хероина све плућне болести (туберкулоза, упала плућа и сл.), па чак и обичне прехладе, представљале су озбиљна и потенцијално летална обољења. Утицај хероина на умиривање кашља, али и ублажавању болова, допринео је његовом великом успеху, пре свега у групацији пацијената зависних од употребе морфијума.

Међутим, врло брзо су пацијенти почели да развијају толеранцију на хероин, након чега су евидентирани и бројни случајеви зависности. Због наглог губитка популарности препарата и економских губитака *Bayer* напушта пројекат развоја диацетилморфина и враћа се испитивању и развоју ацетилсалицилне киселине, којој даје комерцијално име Аспирин.

Потпуна обустава производње диацетилморфина (хероина) у *Bayer*-у је проглашена 1913. године и од тада се покреће кампања за забрану употребе овог препарата. Пример Европе следе и Сједињене Америчке Државе, где забрана производње и употребе хероина ступа на снагу 1924. године. Једино се у Великој Британији и данас одобрава употреба хероина, али искључиво у медицинске сврхе.

Забрана производње и употребе хероина довела је до појаве великог илегалног тржишта. Ово тржиште створило је конекцију између криминалног миљеа и великог броја зависника који су морфин заменили 3-4 пута јачим хероином. Да је још од тада, па све до данас, проблем хероиноманије актуелан и растући проблем указују и чињенице да се из године у годину континуирано повећава, како број конзумента, тако и број леталних исхода који су у вези са хероиноманијом.

Према подацима Америчке агенције *Drug Policy Alliance*, хероин који се данас продаје у Сједињеним Америчким Државама је много чишћи у просеку од оног који се продавао почетком 1980–их. Наводи се да је 1980. године просечна чистоћа хероина који се продавао у Сједињеним Америчким Државама износила 4%, док је 1998. године просек износио 71%. У истом извештају се наводи да се најчишћи хероин продавао у градовима на истоку Сједињених Америчких Држава, у савезним државама Њујорк, Мариланд, Њу Џерси и Пенсилванија. Као пример се узима да се паковање од 94% чистог хероина могло купити на Менхетну 1995. године по цени од 10\$. Сматра се да су основни разлози за повећање степена чистоће хероина на тржишту већа доступност, софистицираније лабораторије и другачије маркетиншке стратегије продаваца са мање међупосредника. Поред тога, укључење колумбијског нарко–картела у посао око хероина почев од 1991. године је такође потпомогло овом тренду [*Ferreiro* 2003; *Fernandez* и *Libby*, 2011].

1.2.3.4. Метаболизам хероина

Када се узима орално, диацетилморфин пролази опсежни метаболизам првог пролаза путем деацетилације, дајући пред–једињење за системско дејство морфина

[Sawynok 1986]. Међутим, када се дрога унесе директно у крв, она избегава овај ефекат првог пролаза, врло брзо прелази крвно–мождану баријеру због присуства ацетил група, које је чине много више растворљивом у мастима него што је морфин [Klous и сар., 2005]. Хероин се након ињекционе администрације врло брзо (3-5 минута) хидролизује у 6–моноацетилморфин, а потом се знатно спорије метаболише у морфин.

Након што дође до мозга, он се различито деацетилира у неактивни 3–моноацетилморфин и активни 6–моноацетилморфин, а затим у морфин који се веже за μ –опиоидне рецепторе, резултирајући еуфоричним и аналгетичним ефектима и ефекту смањења страха. Сам диацетилморфин показује релативно низак афинитет за μ –рецепторе. За разлику од хидроморфона и оксиморфона, примењен интравенозно, диацетилморфин ствара веће испуштање хистамина, слично као и морфин, што резултује субјективним осећајем "лебдења тела" код неких особа, али и случајеве свраба, код особа које га први пут почињу користити [Inturrisi и сар., 1983].

И морфин и 6–моноацетилморфин су антагонисти рецептора μ –опиоида који се вежу на постојеће рецепторе кроз мозак, кичмену мождину и црева код свих сисара. Рецептор μ –опиоида такође служи за везивање ендогених опиоидних пептида попут β –ендорфина, леу–енкефалина и мет–енкефалина. Понављање коришћења диацетилморфина и морфина резултира бројним физиолошким променама, укључујући смањење повезаности рецептора μ –опиоида са полизомима. Ове физиолошке промене воде до толеранције и зависности, на начин да смањење коришћења диацетилморфина и морфина резултира бројним неугодним симптомима укључујући бол, страх, грчеве у мишићима и инсомнију, што се описује и као синдром "скидања са хероина". У зависности од коришћења, тај процес се дешава у периоду од 4 до 24 сата након узимања последње дозе диацетилморфина. Морфин се такође везује и за δ – и κ –опиоидне рецепторе. С обзиром да хероин и 6–моноацетилморфин имају слаб афинитет према опиоидним рецепторима у мозгу, сматра се да ефекат углавном изазива морфин. Оба метаболита се елиминишу из крви са полувременом елиминације од 3 до 5 минута [Fernandez и Libby, 2011].

1.2.3.5. Последице акутног и хроничног дејства хероина

Хероин се може конзумирати ушмркавањем, када се брзо апсорбује преко слузокоже носа, затим пушењем, када се загрева на алуминијумској фолији, а његове паре удишу, или парентералним путем, односно интравенски. Унос хероина у виду

поткожних или интрамускуларних ињекција повезан је са изузетно јаким болним сензацијама или појавом инфекција на местима апликације. Хероин унет путем дима (пушењем) доспева до мозга за око 7 секунди, док најинтензивнији еуфорични ефект постиже за 5–7 минута. Код интравенског уноса еуфорични ефекат се постиже за 10–20 секунди. У зависности од начина апликације и степена толеранције на хероин зависи и доза која доводи до еуфоричног ефекта и, гледано код хероиномана без створене толеранције, она износи 5–10 mg за интравенску апликацију, односно 15–25 mg за инхалациону апликацију. Ефекат појединачно апликованих доза хероина обично траје око 3 до 5 сати.

Превелике дозе апликованог хероина за последицу веома често могу имати акутно тровање са клиничком сликом којом доминира депресија дисања, сужене зенице, цијаноза, хипотензија, хипотермија и кома. Плућни едем и депресија центра за дисање представљају најчешће разлоге умирања хероиномана. Како је парентерална апликација хероиномана углавном повезана са нехигијенским и нестерилним начином примене (игле и шприцеви који се користе по више пута од стране више зависника), за очекивати је развој бактеријских и вирусних инфекција код зависника (хепатитис В, хепатитис С, *HIV*), а могу настати и енцефалитис и сепса [Barille 2005].

Интензивни иницијални еуфорични ефекат након апликације хероина карактерише се осећајем опуштености и тоpline, сигурности, нестајања боли, тескобе и напетости, нестанком љутње, фрустрације и агресивности. Могу се јавити и осећаји сигурности и љубави према самом себи. По окончању иницијалне еуфорије јавља се угодан, опуштен осећај задовољства и смирености. Понекад, посебно код првих узимања, могућа је мучнина и повраћање.

С обзиром да хероин депресорно делује на централни нервни систем, он успорава рад срца, смањује фреквенцију дисање, снижава крвни притисак, изазива вазодилатацију, успорава перисталтику и узрокује затвор. Поред ризика који, сама по себи, носи превелика узета доза хероина, изузетно је опасно комбиновати хероин са алкохолом или лековима за смирење. У овим случајевима може доћи до синергистичког дејства на инхибицију виталних функција, те због недостатка кисеоника може наступити смрт.

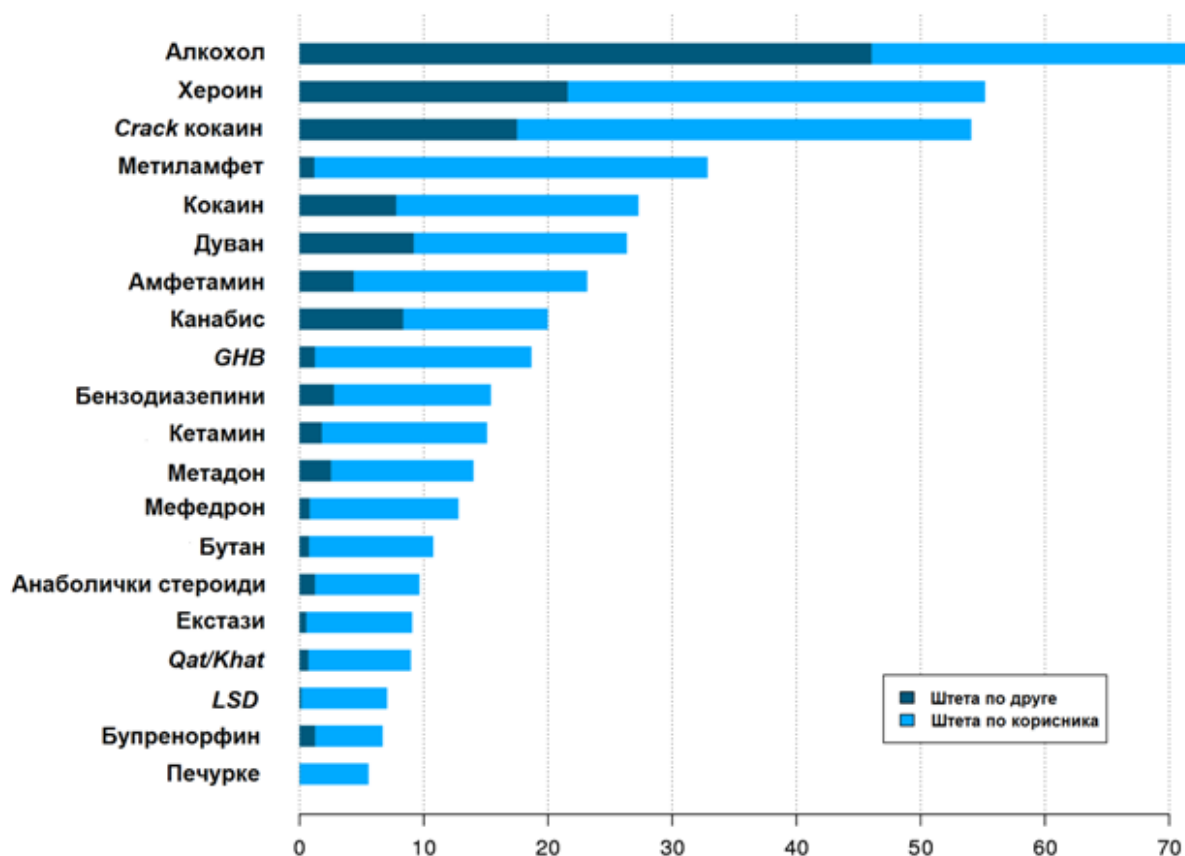
Изражена физичка и психичка зависност је по правилу последица хроничног узимања хероина. Уколико се у року од 24 до 48 сати не узме нова доза хероина, као последица психичке зависности организма, развија се апстиненцијална криза, која се клинички манифестује мидријазом, немиром, болом у мишићима и костима, мучнином,

несаницом, дијарејом, екстремним знојењем, појачаном секрецијом из носа и кијањем, грозницом и повраћањем. Уколико се истраје са апстиненцијом, тегобе обично трају од 7 до 10 дана. Међутим, код дугогодишњих хероиноманских зависника или код хероиномана који су узимали и метадон, оне могу трајати и 3–4 пута дуже.

За разлику од физичке, психичку зависност је теже савладати. Психичка зависност се одликује изразитом жељом за свакодневним узимањем дроге коју је потпуно немогуће контролисати, негирањем проблема и измењеним схватањем стварности. Особа је у тим ситуацијама нерационална и има огромну жељу за дрогом, при чему не сагледава и није свесна икаквих ризика и последица њеног узимања. Хероин постаје једина сврха која доводи до прекида скоро свих осталих активности, а уколико га не узме, осећа се нервозно, раздражљиво и напето.

Толеранција на херион се развија са хроничном употребом, па су хероиноманима потребне све веће количине наркотика за постизање жељене еуфорије. На крају се еуфорија више не може изазвати, а хероин се узима само ради олакшања тегоба и избегавања симптома психичке и физичке зависности. Након апстиненције смањује се праг толеранције на хероин. Ово може бити проблем јер раније постигнуте дозе хероина код навикнутог организма, сада могу представљати леталне и самим тим довести до смрти.

Велики социо-економски проблеми самих хероиномана и њиховог породичног окружења скопчани су са хероинеманијом из разлога што се огромне новчане своте троше на куповину хероина, који се код апликује интравенски 2-4 пута на дан. Ова лилица такође занемарују основне животне навике, те често не узимају довољну количину хране и живе уопште нехигијенским начином живота, што може бити узрок развоја бројних болесних стања. Емотивно, физичко, психичко и социјално пропадање и губитак интереса за било какву комуникацију или активност, осим набављања дроге, јесу опште последице дуготрајне зависности (слика 4). Поред тога што нестерилни прибор за интравенску апликацију хероина представља пут преноса заразних болести: хепатитиса *B* и *C*, *HIV*-а, тетануса и слично, ове болести се преносе и у склопу нештићених сексуалних односа код већ инфицираних хероиномана. Код ушмркавања хероина за очекивати је настанак оштећења слузокоже носа.



Слика 4. Штета узрокована злоупотребом супстанци

(скала процене штете износи од 0 до 100) (извор:

www.economist.com/blogs/dailychart/2010/11/drugs_cause_most_harm)

Велик је ризик од нечистоћа које хероин неизбежно садржи: нпр. отрове (стрихнин), врло опасне инфекције узроковане влакном из филтера (кроз који се раствор хероина увлачи у шприц) који успе да прође кроз иглу, а који се обично прави од филтера за цигарете, честице пренете нечистим прстима, случајна повреда нерава на месту убода иглом, који може да доведе до утрнулости уда (које може да потраје месецима) - или зачепљење ситних капилара ако честице нису потпуно растворљиве у води (узрокује одумирање ћелија на мањим површинама срца, плућа, јетре, бубрега или мозга).

Остале физичке последице укључују ожиљке, болести вена, бактеријске инфекције кардиоваскуларног система, чиреве и друге инфекције и разне типове упале плућа и туберкулозу.

Интравенско узимање хероина (или било које друге супстанце), коришћење нестерилних игала и шприцева и остале опреме води до неколико озбиљних ризика као

што су: ризик од обољевања крвним патогенима као што су *HIV* и хепатитис, ризик од обољевања од бактеријског или гљивичног ендокардитиса и евентуално од венске склерозе, или апсцеса. Сем тога, постоји и ризик од тровања штетним супстанцама које су помешане са разређеним хероином. Фармаколошко дејство хероина води и до појаве хроничног затвора. Дуготрајна употреба води до стварања зависности и повећане толеранције на дроге. Телесна зависност може бити резултат дуготрајног коришћења свих опиоида, што резултује појавом симптома идентичних оним као код престанка коришћења. Јавља се и смањење бубрежне функције (иако тренутно није познато да ли је то због заразних болести) [*Dettmeyer* и сар., 2005].

Многе државе и локалне владе су започеле финансирање програма који снабдева стерилним иглама људе који себи убризгавају илегалне дроге у покушају да се смање потенцијални ризици и посебно ширења болести које се преносе крвљу. *Drug Policy Alliance* извештава да до 75% нових случајева *AIDS*-а међу женама и децом су директно или индиректно последица ињекционог убризгавања дрога.

Антрополози *Philippe Bourgois* и *Jeff Schönberg*, који су десет година радили међу бескућницима који су хероински зависници у Сан Франциску, известили су да су Афроамерички зависници које су посматрали склонији убризгавању дроге директно у вену него убризгавању само испод коже. Убригавање испод коже је далеко више раширено међу зависницима беле пути. На половини њиховог теренског рада, већина белаца је одустала да тражи вену и прешла на методу убризгавања испод коже. Често се ова метода изводи кроз саму одећу. Пример тога је наведен у извештају ових антрополога да овисници сами себи дрогу "забијају" у масно ткиво у подручју стомака. *Bourgois* и *Schönberg* обајашњавају како културолошке разлике између Афроамериканаца и белаца воде до овог контрастног понашања, а такође истичу да ова два начина убризгавања хероина носе са собом различите ризике. Убригавање испод коже чешће изазива апсцесе, а директно убризгавање чешће води до фаталног предозирања, хепатитиса и *HIV*-а [*Bourgois* и *Schönberg*, 2009].

Предозирање хероином се обично лечи опиоидним антагонистом, као што су налоксон или налтрексон, који имају високи афинитет за опиоидне рецепторе, али их не активирају. Они окрећу ефекте хероина и других опиоидних антагониста и изазивају тренутни повратак свести, али могу убрзати симптоме апстиненцијалне кризе. Полувек налоксона је много краћи од већине опиоидних антагониста, тако да се антагонист обично мора примењивати више пута све док опиоид не буде метаболисан од стране организма.

Зависно од интеракције лекова и бројних других фактора, смрт од предозирања може потрајати од свега неколико минута до неколико сати због аноксије јер је рефлекс дисања протиснут од стране μ -опиоида. Предозирање је тренутно реверзибилно ако се да ињекција опиодног антагониста. Хероинска предозирања могу настати због неочекиваног повећања дозе, "чистоће" или смањене опиоидне толеранције. Међутим, већина пријављених предозирања узрокована је због комбинације хероина и других депресантних дрога као што су алкохол и бензодиазепини [Darke и Zador, 1996]. Такође, треба напоменути да хероин може узроковати мучнину и повраћање, па да је значајан број смртних случајева приписаних предозирању узрокован аспирацијом желудачног садржаја од стране жртве која није при свести. Неки извори наводе да летална доза (за 75 kg тешку индивидуу) износи између 75 и 375 mg. Илегални диацетилморфин је широке и непредвидиве чистоће. То значи да корисник може припремити дозу коју он сматра умереном, а заправо узима дозу која је много већа од оне намењене. Такође, толеранција се постепено смањује након периода апстиненције. Ако се то догоди и корисник узме дозу која је приближна дозама које је пре апстиненције користио, може искусити ефекте коју су много већи него очекивани, што може да резултује потенцијално опасном предозирању.

Претпоставља се да је непознат удео смртних случајева везаних за диацетилморфин последица предозирања или алергијске реакције на кинин, који понекад може бити коришћен као средство за разблаживање.

Коначни фактор који придноси предозирању је место примене. Коришћење хероина је ритуално понашање. Док механизам није у потпуности расветљен, дугогодишњи корисници диацетилморфина показују већу толеранцију на дрогу на местима где су је највише примењивали. Када корисник убризгава дрогу на неком другом месту, ова еколошки условљена толеранција се не јавља, резултујући већем ефекту дроге. Типична корисникова доза дроге без одређене толеранције постаје далеко превисока или отровна што може довести до предозирања [Gerevich и сар., 2005].

Мали проценат диацетилморфин пушача, а повремено и интравенски корисници, могу развити симптоме леукоенцафолопатије. Узрок још није познат, али једна од претпоставки је да поремећај изазива један додаток који је само активан када се загреје. Симптоми укључују и неразговетан говор и потешкоће у ходању.

Кокаин се понекад користи у комбинацији са хероином, што је познато под називом "speed ball" када се убризгава, а "moon rocks" када се пуши. Кокаин се понаша као стимуланс, док се хероин понаша као депресив. Мешавина ове две супстанце пружа

интензивну навалу еуфорије, изазвану комбинацијом ефеката дрога изостављајући негативне ефекте као што су седација и анксиозност. Ефекти кокаина много брже спласну, него ефекти хероина, тако да ако се превелика доза хероина користи за компензацију кокаина, крајњи резултат је фатална респираторна депресија.

Хероин може да изазове мучнину и повраћање, па да значајан број смртних случајева приписаних предозирању у ствари буде узрокован аспирацијом желудачног садржаја од стране жртве која није при свести [Hill и сар., 2000; Halloran и сар., 2005; Offiah и Hall, 2008].

1.2.3.6. Апстиненцијална криза

Синдром апстиненције може да наступи у року од 6 до 24 сата од последњег коришћења дроге, међутим овај оквир може да варира због степена толеранције и због количине дроге при последњој употреби. Симптоми су: знојење, слабост, анксиозност, депресија, акатизија, пријапизам, додатна осетљивост гениталија код жена, општи осећај тежине, бол у удовима налик на грчеве, претерано зевање или кијање, сузе, ринореја, потешкоће у спавању (несаница), хладно знојење, језа, тешки болови у мишићима и костима, мучнина и повраћање, дијареја, грчеви и грозница [Olson 2006].

1.2.3.7. Лечење предозирања

Лечење предозирања или акутног тровања хероином и другим опиоидима је могуће само у јединицама интензивне неге. Уколико тровање има повољан ток, лечење се може наставити и у амбулантним условима уз интензиван надзор. Основни принцип у лечењу тровања хероином и опиоидима је обезбеђење дисања и циркулације. Болеснике које су често у коми треба интубирати и применити вештачку вентилацију уз праћење свих виталних функција. Као ефикасан антидот у тровању хероином примењује се специфични антагониста опиоидних рецептора – налоксон, који се може применити у појединачним дозама или у облику инфузије. Налоксон истискује опиоиде са рецептора у мозгу и за 30 до 60 секунди поништава већину њихових токсичних ефеката. Брзо и ефикасно делује на депресију дисања, седацију, односно поремећај свести и миозу. Тако брз и повољан ефекат је од великог значаја за терапију и дијагностику, али и за прогнозу тровања. Повољан ефекат налоксона виђа се само у тровању опиоидима. То је од великог значаја за потврђивање дијагнозе да је узрок тешког општег стања пацијента предозирање опиоидима. Развијени су и нови антидоти

који делују као специфични опиоидни антагонисти: налмефен, налтрексон, налорфин и лофексидин [Olson 2006].

1.3. Опште анатомске карактеристике срца

Срце (*cor*) је централни орган циркулаторног система у чији састав још улазе крвни судови (артерије, вене и капилари) и лимфни систем. Овај орган делује као мишићна пумпа, која ритмичким контракцијама зидова својих шупљина (десне и леве преткоморе – *atrium dextrum et sinistrum*; и десне и леве коморе – *ventriculus dexter et sinister*) и протоком крви кроз артеријске и венске крвне судове малог и великог крвотока омогућује сталан проток крви кроз сва ткива, обезбеђујући размену материја у њима. Нервни регулаторни механизми одржавају срчани ритам и обезбеђују прилагођавање његовог рада тренутним потребама организма [Moorman и сар., 2003].

Срце, заједно са својим овојницама, лежи у средњем делу грудне дупље (*mediastinum medium*) непосредно изнад пречаге (*diaphragma*) између плућних крила (*pulmo dexter et sinister*). Облик, положај, тежина и капацитет срца зависе од великог броја фактора, као што су: конституција, узраст, пол, активност (нпр. спортисти), патолошки процеси у самом срцу, у суседним органима или у целом организму. Немогуће је наћи два савршено идентична срца по својим морфолошким карактеристикама. Без обзира на ове чињенице, анатомска, рентгенолошка и клиничка истраживања дозвољавају да се дају неке опште морфолошке карактеристике срца.

Срце може имати лоптаст, овалан или пирамидалан облик и на њему се разликују три стране – предња (*facies sternocostalis*), доња (*facies diaphragmatica*) и лева (*facies pulmonalis sinistra*), база (*basis cordis*) и врх (*apex cordis*). Облик се мења у зависности од узраста и неких патолошких процеса. Срце облика пирамиде чешће је код мушкараца, а код жена је чешће у форми лопте. Положај срца може бити попречан, кос или вертикалан, што може да зависи и од облика самог грудног коша. Сматра се да величина срца код одраслог човека одговара приближно величини стегнуте песнице дотичне особе.

Просечна маса срца код одрасле особе износи од 200 до 400 грама, односно од 1/175 до 1/200 део укупне тежине тела. Са старашћу, тежина срца се смањује. Капацитет срца је уобичајено око 170 cm^3 , а у патолошким стањима може се повећати и до 500 cm^3 и више.

Постнатално, пошто се одвоји десна половина срца од леве половине, формира се велики и мали крвоток, када долази до наглог задебљавање зидова комора. Нарочито

задебљава зид леве коморе, с обзиром на њену функцију, јер она снагом своје контракције управља циркулацијом у великом (соматском) крвотоку, а десна комора управља циркулацијом у малом (плућном) крвотоку. С обзиром на дебљину, правац пружања и функцију разликују се три врсте мишићних снопова.

Папиларни мишићи (*musculi papilares*) су ваљкасте мишићне творевине и укупно их је пет – три у десној и две у левој комори. Базом су везани за зид коморе, а са њиховог слободног краја одлазе бројне тетиве нити (*chordae tendineae*) које се пружају до листића преткоморнокоморних залистака за које се причвршћују. Другу групу мишићних снопова чине мишићни снопови који иду с једног зида коморе на други, тј. супротан зид. Пролазе кроз шупљину коморе и својом испреплетаношћу формирају мреже које су најгушће у врху десне коморе. У трећу групу спадају мишићни снопови који иду уз унутрашњу површину коморе причвршћени за њу. Они формирају гребене (*trabeculae carnae*). Папиларни мишићи регулишу положај листића преткоморнокоморних залистака за време систоле коморе. Папиларни мишићи се у систоли коморе први контрахују (скраћују) и преко тетивних нити притежу записке један према другоме, па се на тај начин затвори венско ушће. Тек након тога се контрахује остали део зида коморе. У случају дисфункције папиларних мишића може доћи до појаве регургитације крви.

Друге две врсте мишићних снопова имају улогу да омогуће потпуно истискивање крви из комора у току систоле. Наиме, за време систоле, они се утискују једни међу друге и спречавају да остане резидуална крв у комори. Мишићни снопови су распоређени на зиду улазног дела коморе, док је зид око излазног отвора гладак, како би крв за време систоле неометано излазила.

Артеријски одводни отвори су: отвор плућног стабла (*ostium trunci pulmonalis*) и отвор аорте (*ostium aortae*), које затварају по три полумесечаста записка. Полумесечасте записке делују као аутоматски механизми. У току систоле коморе, полумесечасте записке су приљубљени уз зид крвног суда, док се у току дијастоле приводе један другом и спречавају регургитацију крви [Gray 1989].

1.4. Хистофизиолошке карактеристике срца

Срчани мишић, уз нервно ткиво, скелетне мишиће и глатке мишиће, чини ексцитабилно ткиво. Ово ткиво има много заједничких биоелектричних својстава са другим ексцитабилним ткивима, али има и својствене карактеристике које се односе на срчане структуралне и физиолошке специфичности.

Примарна контрактилна јединица у срцу је ћелија срчаног мишића или срчани миоцит – кардиомиоцит. Срчани миоцити се састоје од неколико главних структурних компоненти и органела. Примарна компонента су контрактилни елементи познати као миофибрили. Сваки миофибрил састоји се од бројних мањих филамента (густи и танки миофиламенти). Густи филаменти су посебни склопови протеина миозина, док су танки филаменти састављени првенствено од протеина актина. Срчани миозин је хексамер састављен од једног пара тешких ланаца миозина (*MHC*) и два пара лаких ланаца миозина (*MLC*). Две изоформе *MHC* – α и β , изражене су у срчаном мишићу. Њихова експресија је под развојном контролом и може да се промени под различитим физиолошким, патолошким и фармаколошким стимулусима [*Martin* и сар., 1996; *Metzger* и сар., 1999]. Поред тога, доминантна изоформа изражена у нормалном срчаном ткиву одраслих такође зависи од испитиване врсте. Слично томе, у срцу су изражене две изоформе актина (срчани и скелетни α -актин), а, као и код *MHC*, експресија изотопа актина је под утицајем развојних, физиолошких, патолошких и фармаколошких стимулуса, а примарна изоформа актина која се налази у нормалном срчаном мишићу одраслих, такође зависи од испитиване врсте.

Посматрано електронском микроскопијом, ове основне структурне компоненте миокардних контрактилних протеина приказују измењиве тамне траке ("A" траке, претежно састављене од миозина) и светлосних трака ("I" траке, претежно састављене од актина). По средини "I" траке, видљива је густа вертикална "Z" линија. Подручје између две "Z" линије назива се саркомера и представља основну јединицу контракције мишића. Иако срчани и скелетни мишићи деле многе сличности, главна разлика лежи у организацији срчаних миоцита у функционални синцицијум, где су кардиомиоцити спојени преко својих крајева густим структурама названим интеркалатни дискови. У њима постоје чврсте везе између које омогућавају ширење акционог потенцијала и интерцелуларну комуникацију. Око 50% сваког кардиомиоцита чине миофибрили. Остатак интрацелуларног простора садржи преостале компоненте ћелије: митохондрије (33%), једно или више једара (5%), саркоплазматски ретикулум (2%), лизозоме (врло мало), грануле гликогена, Голџи апарат и цитосол (12%) [*Opie* 1996].

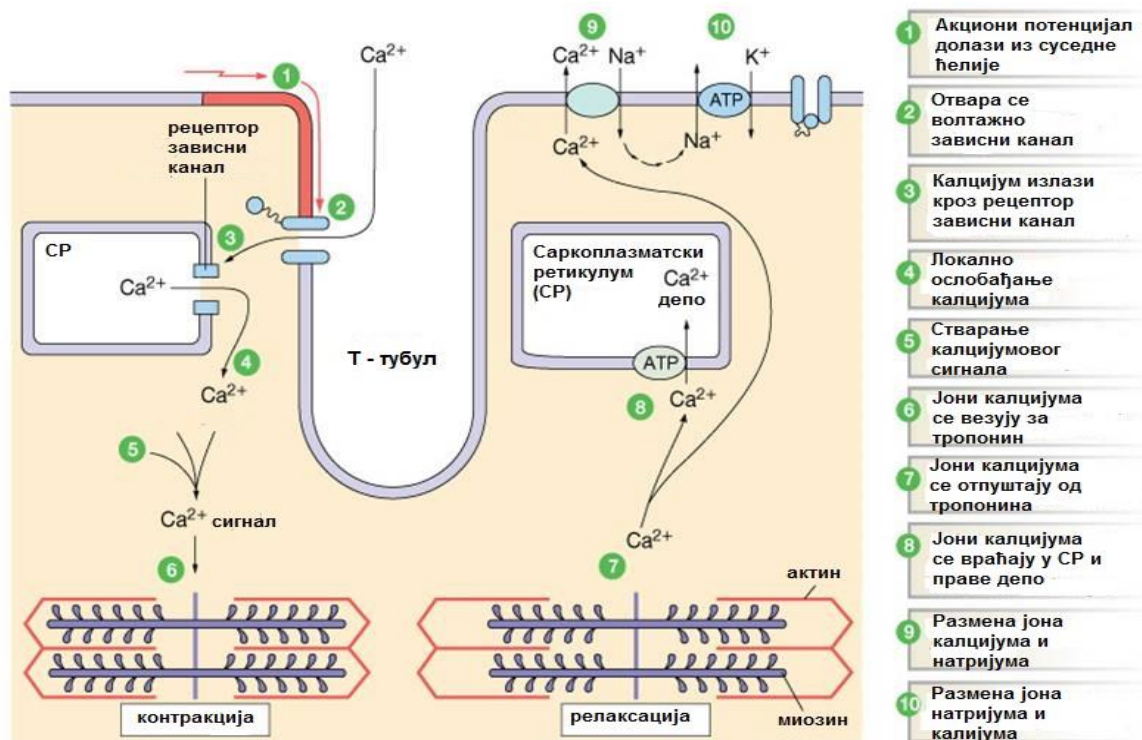
Кардиомиоцити су највеће ћелије у срцу и доприносе већини срчане масе. Међутим, кардиомиоцити чине само једну четвртину свих ћелија у срцу. Фибробласти срца, васкуларне ћелије, Пуркињеове ћелије и друге ћелије везивног ткива чине већину броја ћелија у срцу. Фибробласти срца чине приближно 90% свих "немишићних" ћелија. Кардиомиоцити су се генерално сматрали терминално диференцираним. Овај

став је подвргнут испитивању последњих година. Ове ћелије могу бити мултинуклеарне, али се не могу делити након рођења, осим у одређеним околностима код неких врста као што су мишеви [Anversa и сар., 2006]. Срце пролази кроз знатно повећање величине и масе у току раста организма, а то повећање величине и масе срца настаје процесом проширења (или хипертрофија) пре–постојећих кардиомиоцита [Li и сар., 1996]. Током периода развића, хипертрофија срца у овом смислу, сматра се нормалним физиолошким процесом. У патолошким условима, хипертрофија кардиомиоцита је обележје срчане ремоделације након оштећења миокарда, као што је инфаркт миокарда. Фибробласти срца могу наставити да пролиферишу након рођења, нарочито као одговор на оштећење. Фибробласти срца такође доприносе ремоделацији срца након инфаркта миокарда и верује се да промовишу фиброзу и стварају ожиљак на месту оштећеног срчаног ткива. Из токсиколошке перспективе, срце је подложно оштећењима због ограниченог пролиферативног капацитета кардиомиоцита и промовисања пролиферације фибробласта срца и ремоделирања након повреде.

Електрофизиологија срца описује биоелектричност срца и његове физиолошке функције. Биоелектричност је резултат пуњења насталих од кретања позитивно и негативно наелектрисаних јона у ткивима. У кардиомиоцитима, главни велики позитивно наелектрисани јони значајно доприносе биоелектричности срца: јони калцијума (Ca^{2+}), натријума (Na^{+}) и калијума (K^{+}). Сваки од јона има специфичне канале и транспортере (пумпе) на мембрани кардиомиоцита. Кретањем ових јона преко ћелијске мембране акциони потенцијал се генерише и пропагира из једне ћелије у другу, тако да се електрична проводљивост производи у самом срцу.

Кардиомиоцити, попут других мишићних ћелија, имају јединствену функционалну особину, контрактилност. Контракција кардиомиоцита се јавља када акциони потенцијал узрокује отпуштање Ca^{2+} из саркоплазматског ретикулума, као и улазак екстрацелуларног Ca^{2+} у ћелију. Ово повећање Ca^{2+} у плазми изазвано променом потенцијала и контракција кардиомиоцита назива се ексцитационо–контракционо спајање. Повећање концентрације Ca^{2+} у ћелији омогућава Ca^{2+} да се веже за тропонин и тропомиозин, што доводи до неких конформационих промена у контрактилној јединици кардиомиоцита – у танким филаментима. Ова конформациона промена дозвољава интеракцију између актина и миозина преко унакрсних мостова (главице миозина). Аденозин три фосфат (АТФ) се хидролизује од стране АТФазе која је присутна у унакрсним мостовима како би се ослободила енергија за кретање унакрсних мостова

на начин који је уједначен. Ова акција повећава преклапање филамента актина и миозина, што резултира скраћивањем саркомера и контракцијом миокарда (слика 5).

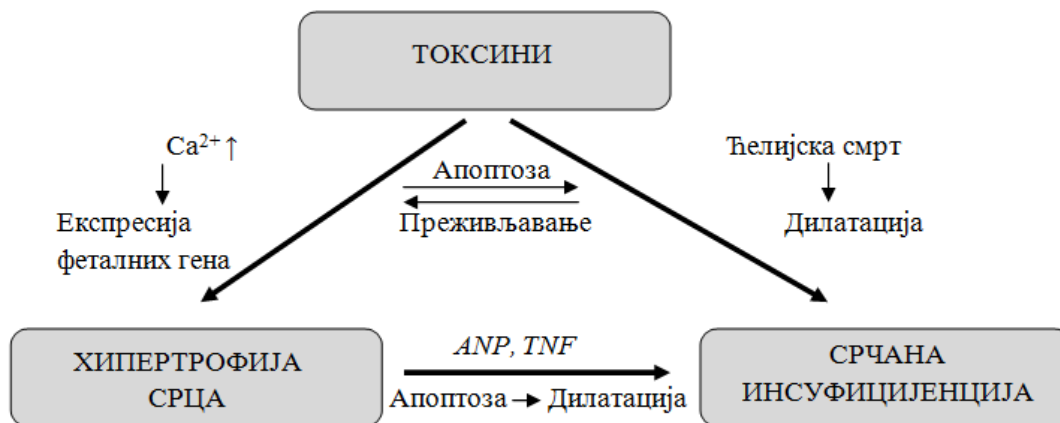


Слика 5. Механизам контракције кардиомиоцита

Миокард као целина мора да синхронизује контракцију и релаксацију појединачних миоцита како би извршио своју функцију пумпе. Ово се постиже посебном карактеристиком интеракције између ћелија, електронском спојем између ћелија – пукотинастим спојем. Кроз пукотинасти спој пролази велики јонски флуks између суседних кардиомиоцита, што омогућава електричну синхронизацију контракције. Сваки појединачни пукотинасти спој се састоји од 12 јединица конексина 43 ($Cx43$), састављених из два хексамерска конексона (хемиканала). Конексини се међусобно комбинују са другим протеинима унутар ћелије, тако да конексини нису важни само за повезивање ћелија, већ су укључени и у ћелијску сигнализацију и регулацију запремине. Важна карактеристика конексонског електротоничног повезивања ћелија је ток електрона који ублажава разлике у трајању акционог потенцијала појединачних кардиомиоцита [Opie 1996; Anversa и сар., 2006].

1.5. Одговор срца на тровање

Крајња функционална манифестација срчаних токсичних појава је смањење количине крви које срце испумпава и последична хиперперфузија периферног ткива, а овај процес је последица промена у биохемијским путевима, енергетском метаболизму, структури и функцији ћелија, електрофизиологији и контрактилности срца. Ове морфолошке и функционалне промене изазване токсичном изложеношћу називају се токсиколошка кардиомиопатија. Критични ћелијски догађај који доводи до токсиколошке кардиомиопатије је смрт кардиомиоцита и ремоделовање екстрацелуларног матрикса (ЕЦМ). Препознавање улоге апоптозе у развоју срчане инсуфицијенције знатно је повећало и променило поимање смрти ћелија миокарда [James 1994; Haunstetter и Izumo, 1998; Sabbah и Sharov 1998].



Слика 6. Модел одговора срца на дејство токсина

Манипулација генима одговорним за срчану функцију почела је средином деведесетих година прошлог века [Robbins 2004]. Најважнији закључак ових студија јесте да трајна експресија било којег појединачног мутираног гена од значаја за рад срца, било у његовом функционалном облику или у смислу губитка функције, може довести до значајног фенотипа, често у облику срчане хипертрофије и срчаног оштећења [Robbins 2004; Olson 2004]. Међутим, тешко је применити ово знање на пацијентима: прво, стечена срчана болест, као што је срчана инсуфицијенција, резултат је интеракције између фактора животне средине и генетске осетљивости, што указује на улогу полиморфизама, а друго, спољашњи и унутрашњи чиниоци производе лезије које се не могу објаснити само једним геном или једним сигналним путем, што указује на сложеност односа између дејства штетних фактора и одговора срца. Специфичан

одговор срца на токсичне ефекте представља патофизиолошке процесе у миокарду који се дешавају након дејства фактора из спољашње средине.

За боље разумевање токсикологије срца, на слици 6 представљен је модел одговора срца на дејство токсина. Овај модел представља сложеност интеракције између стреса из спољашње средине и срца, као и равнотежу између заштите миокарда и делимичне дозе и временских ефеката токсина. Важна је чињеница да токсини могу да доведу до срчане инсуфицијенције без хипертрофије срца. Сем тога, токсини могу да доведу до активирања и заштитних и деструктивних реакција у миокарду. Дуготрајно дејство токсина често узрокује маладаптивну хипертрофију, која прави услове за малигну аритмију, што доводи до изненадне смрти или уводи у срчану инсуфицијенцију.

У проучавању одговора срца на токсине користе се манифестације дејства токсина код људи и животињских модела. Ове манифестације се испољавају у облику срчане аритмије, хипертрофије и срчане инсуфицијенције. Ове патолошке промене одражавају измењену функцију миокарда насталу услед акутног и хроничног тровања срца. Иако су неке промене, као што је хипертрофија срца, посматране као компензациони одговор на хемодинамске промене, новије студије сугеришу да је срчана хипертрофија маладаптивни процес срца као одговор на унутрашње и спољашње стресове (*Van Empel* и сар., 2004; *Berenji* и сар., 2005; *Dorn* и *Force*, 2005). Срчана хипертрофија је фактор ризика за изненадну срчану смрт и има велики потенцијал да напредује до очигледне инсуфицијенције срца. Зато је уочавање разлике између компензационих и маладаптивних одговора срца критично за лечење пацијената са токсиколошком кардиомиопатијом.

1.5.1. Срчана аритмија

Срчани ритам под физиолошким условима условљавају ћелије предводника рада срца које су уобичајено способне за развој спонтане деполаризације и одговорне за стварање срчаног ритма, тзв. аутоматизованог ритма. Срчани ритам који одступа од нормалног аутоматског ритма се назива срчана аритмија, и често се манифестује у облику тахикардије (убрзани пулс). Постоји неколико облика тахикардије: синусна тахикардија, атријална (преткоморна) тахикардија, вентрикуларна (коморна) тахикардија и "*torsade de pointes*" (по живот опасна вентрикуларна тахикардија). Осим тога, поткласе као што су атријална фибрилација, атријални флатер и убрзани

идиовентрикуларни ритам омогућавају детаљније описивање манифестација аритмије. Према узроцима, тахикардија је подељена на абнормалну аутоматску аритмију и изазвану аритмију.

1.5.2. Хипертрофија срца

Постоје два основна облика срчане хипертрофије. Први облик је концентрична хипертрофија, која се често примећује током преоптерећења притиском и карактерише се новим јединицама контрактилних протеина које су постављене паралелно, што доводи до релативног повећања ширине појединачних срчаних миоцита [De Simone 2003]. Други облик је ексцентрична хипертрофија, која се карактерише састављањем нових контрактилно–протеинских јединица у серијама што резултује релативно већим повећањем дужине него ширине појединачних кардиомиоцита, а јавља се код људи и животињских модела са дилатираном кардиомиопатијом [Kass и сар., 2004]. Токсична кардиомиопатија се често манифестује у облику ексцентричне хипертрофије. Развој хипертрофије миокарда може се поделити у три фазе: (1) развој хипертрофије, током којег периода срчано оптерећење превазилази срчану излазну фракцију; (2) компензациона хипертрофија, у којој се однос нормалног односа радног оптерећења / масе и нормалне срчане излазне фракције одржава; (3) декомпензациона хипертрофија, у којој се развија вентрикуларна дилатација и излазна фракција срца прогресивно опада, а јавља се очигледна срчана инсуфицијенција [Richei и Brown, 1998].

1.5.3. Срчана инсуфицијенција

Традиционална дефиниција срчане инсуфицијенције је неспособност срца да одржи срчану излазну фракцију довољном да задовољи метаболичке потребе периферних ткива и њихове потребе за кисеоником. Ова дефиниција недавно је измењена тако да укључује промене у систолној и дијастолној функцији која одражава специфичне промене у вентрикуларној функцији и абнормалности у различитим субцелуларним процесима [Piano и сар., 1998]. Због тога, детаљна анализа која омогућава разликовање десне вентрикуларне инсуфицијенције од леве, може обезбедити боље разумевање природе срчане инсуфицијенције и предвиђање прогнозе.

1.5.4. Акутно тровање срца

Акутно тровање срца је одговор срца на једнократну изложеност високој дози кардиоактивних токсичних хемикалија. Често се манифестује срчаном аритмијом. Међутим, апоптоза у миокарду такође је активна током акутног тровања срца. Није тешко дефинисати акутно тровање срца, али понекад је тешко квантификовати овај процес. Конкретно, утицај акутног тровања срца на крајњи исход срчане функције није често лако препознатљив. На пример, појединачна велика доза арсена може довести до срчане аритмије и изненадне срчане смрти [*Goldsmith и From, 1980*]. Међутим, једна орална доза моненсина (*20 mg/kg*) доводи до смањене функције срца која напредује до срчане инсуфицијенције и захтева дуготрајно посматрање; често и неколико месеци за клиничке знаке срчане инсуфицијенције [*van Vleet и сар., 1983; Litvak и сар., 2005*], па би овај процес било тешко квантификовати на неки начин. Као што је приказано на слици 3, изложеност срца токсину може директно довести до срчане инсуфицијенције, што се разликује од често забележеног хипертрофичног одговора, који може или не може да напредује до срчане инсуфицијенције.

1.5.5. Хронично тровање срца

Хронично тровање срца је одговор срца на дуготрајну изложеност токсинима, а често се манифестује срчаном хипертрофијом која прелази у срчану инсуфицијенцију. Кардиомиопатија код око 25% болесника категорисана је као идиопатска. Један део ових болесника са идиопатском кардиомиопатијом има болест због изложености токсинима. Од недавно је описана кардиомиопатија до које је довела изложеност честицама из ваздуха у спољашњој средини [*Dockeri 2001; Gordon и Reinman, 2002*]. Препознавање хроничног тровања срца у патогенези кардиомиопатије је од клиничког значаја, а ово знање може да се користи за превенцију и лечење болесника са токсиколошком кардиомиопатијом.

1.5.6. Дегенеративни и регенеративни процеси у миокарду

Дегенерација миокарда је крајњи одговор срца на токсичну експозицију, која се може мерити и преко морфолошких, али и преко функционалних дегенеративних промена. Дегенеративне промене у миокарду не треба сматрати неповратним одговором на токсине. Некада се сматрало да је срце неспособно за регенерацију, тако да су

оштећења миокарда у виду губитка ћелија или формирања оживљеног ткива сматрани трајним. Међутим, неки докази сада потврђују регенеративне процесе у миокарду и опоравак од кардиомиопатије. Токсичне реакције или оштећења срца су сада подељене на повратне и неповратне.

Смрт кардиомиоцита, фиброза (формирање оживљеног ткива) и контрактилна дисфункција се сматрају дегенеративним реакцијама, што може довести до срчане аритмије, хипертрофије и срчане инсуфицијенције. Ако акутна интоксикација срца не утиче на капацитет регенерације миокарда, дегенеративне промене су реверзибилне. И акутне и хроничне интоксикације могу довести до неповратне дегенерације, у зависности од тога да ли су механизми репарације срца преоптерећени или не. Ћелијска смрт је најчешћи облик дегенеративне промене миокарда. И апоптоза и некроза се јављају у процесу смрти миокардне ћелије. Смрт кардиомиоцита праћена је хипертрофијом преосталих срчаних ћелија, тако да се у хипертрофичном срцу укупан број кардиомиоцита смањује, али се величина или запремина појединачних ћелија повећава.

Током ремоделирања миокарда после смрти ћелије, не само да постоји повећање величине срчаних миоцита, већ се јавља и срчана фиброза. Фиброза миокарда је резултат акумулације ЕЦМ-а, који се углавном састоји од колагена. Мрежа акумулираног ЕЦМ-а, тј. везивног ткива резултат је побољшане синтезе или смањења разарања матрикса или оба процеса. Колаген, претежно тип I и тип III, главни су влакнасти протеини у ЕЦМ-у и њихова синтеза може се повећати као одговор на токсична оштећења. Деградација ЕЦМ-а зависи од активности матриксних металопроотеиназа (ММП). У складу са специфичностима супстрата, ММП су подељене у пет категорија: колагеназе (ММП-1, ММП-8 и ММП-13), желатиназе (ММП-2 и ММП-9), стромелизине (ММП-3, ММП-7, ММП-10 и ММП-11), мембранске ММП (ММП-14, ММП-15, ММП-16, ММП-17, ММП-24 и ММП-25) и металоеластазе (ММП-12). Ове ММП су специфичне за орган, тако да нису све присутне у срцу. Активности ових ензима се мењају током процеса фиброгенезе и фибринолизе. У условима токсичног стреса, неравнотежа између фиброгенезе и фибринолизе доводи до појачане фиброгенезе и акумулације колагена, односно фиброзе.

Основа терапије срчаних обољења је усредсређена на концепт да је срце терминално диференциран орган и да срчани миоцити нису способни за умножавање. Због тога, смрт ових ћелија доводи до трајног губитка укупног броја кардиомиоцита. Међутим, овај став је недавно стављен на проверу због идентификације прогениторских

ћелија срца [Anversa и сар., 2006]. Ове ћелије су окарактерисане и предложене као одговорне за репарацију срца јер ове ћелије могу да се диференцирају у миоците и васкуларне структуре. Ове ћелије поседују основна својства матичних ћелија, па се такође називају и срчане матичне ћелије. Оне су самообновљиве, клонogene и мултипотентне, што се показало реконституцијом инфаркта срца интрамиокардијалном ињекцијом срчаних прогениторских ћелија или локалном активацијом ових ћелија факторима раста. Важно је напоменути да токсиколошке студије срчаних прогениторских ћелија нису спроведене и врло је важно да буде одређен потенцијал срчаних матичних ћелија како би се помогао опоравак након токсичних оштећења. Ефекат хемикалија на срчане прогениторске ћелије није познат. Једно нагађање је да када дође до великог оштећења прогениторских ћелија срца, потенцијал за опоравак од тешке повреде срца би био ограничен. Сматрало се да је уклањање ожиљних ткива или фиброзе у миокарду немогуће. Иако не постоје студије које су показале да ожиљно ткиво може да се уклони, у животињским моделима хипертензивних болести срца миокардна фиброза се показала као реверзибилна [Veber 2005].

Васкуларизација миокарда је потребна за регенерацију миокарда. Многа токсична оштећења утичу на капацитет ангиогенезе у миокарду, тако да се јавља срчана исхемија. Комбинација срчане исхемије и директних токсичних оштећења кардиомиоцита представља синергистичко оштећење срца. Током регенерације, коронарне артериоле и капиларне структуре су формиране да премосте мртво ткиво (ожиљно ткиво) и дају хранљиве материје за опстанак регенерисаних кардиомиоцита. Постоји уредна организација миоцита унутар миокарда и добро дефинисана веза између миоцита и капиларне мреже. Овај проценат се мења под условима срчане интоксикације – или долази до токсиколошке хипертрофије или смањење капиларне формације доводи до хипоперфузије миоцита у миокардиу. Нажалост, разумевање токсичних ефеката на ангиогенезу миокарда је још увек врло ограничено.

Сматрано је да се кардиомиопатија није реверзибилан процес, али постоје кумулативни докази који показују реверзибилност кардиомиопатије. Питање које се односи на то да ли је токсиколошка лезија срца реверзибилна или није, није још увек истражено. Међутим, свакако би могло да се претпостави да је могуће да срце има могућности и за реверзибилне и за иреверзибилне одговоре на токсична оштећења.

1.5.7. Хипертрофија срца и срчана инсуфицијенција након тровања

Прилагођавање миокарда односи се на општи процес којим се вентрикуларни миокард мења у структури и функцији. Овај процес се често назива "преуређивање". Током сазревања, преуређивање миокарда је нормална карактеристика за прилагођавање повећаним захтевима. Међутим, као одговор на патолошке стимулусе, као што је изложеност токсичним супстанцама из животне средине, ремоделирање миокарда је краткорочно адаптивно, али је дуготрајно маладаптивно и често доводи до даље дисфункције миокарда. Главна карактеристика ремоделовања миокарда је повећање миокардне масе повезане са променом облика комора [Frei и Olson, 2003]. На ћелијском нивоу, повећање миокардне масе се одражава хипертрофијом кардиомиоцита, која се карактерише побољшаном синтезом протеина, повећаном организацијом саркомера и евентуалним повећањем величине ћелије. На молекуларном нивоу, фенотипске промене у срчаним миоцитима повезане су са поновним увођењем тзв. програма феталних гена, који карактеришу обрасци експресије гена који симулирају оне који се виде током ембрионалног развоја. Ове ћелијске и молекуларне промене се примећују и у адаптивним и маладаптивним одговорима, због чега се по овој карактеристици тешко разликују адаптивни од маладаптивних одговора.

Постоје и физиолошка хипертрофија и патолошка хипертрофија срца. Физиолошка хипертрофија се сматра адаптивним одговором, што је прилагођавање срчане функција на повећан захтев срчане излазне фракције. Таква адаптивна хипертрофија је повећање срчане масе након рођења и као одговор на вежбање. Хистолошка карактеристика адаптивне хипертрофије је да акумулација колагена у миокарду не прати хипертрофију. Функционално, повећана маса је повезана са повећаном контрактилошћу и срчаном излазном фракцијом. Као одговор на токсиколошки стрес, срце такође често повећава своју масу, што се посматра и као адаптивни одговор. Међутим, најновије докази показују да је срчана хипертрофија маладаптивни процес као одговор на унутрашње и спољашње факторе.

Иако токсична хипертрофија индукована стресом може да нормализује напетост зидова, она је фактор ризика за изненадну смрт и има велики потенцијал да напредује до манифестне инсуфицијенције срца. Разлика између адаптивне и маладаптивне хипертрофије је да ли је хипертрофија неопходна за компензациону функцију срца у условима физиолошког и патолошког стреса. Многе студије користе генетски измењене моделе мишева, било у облику појачања функције или губитка функције, подржале су

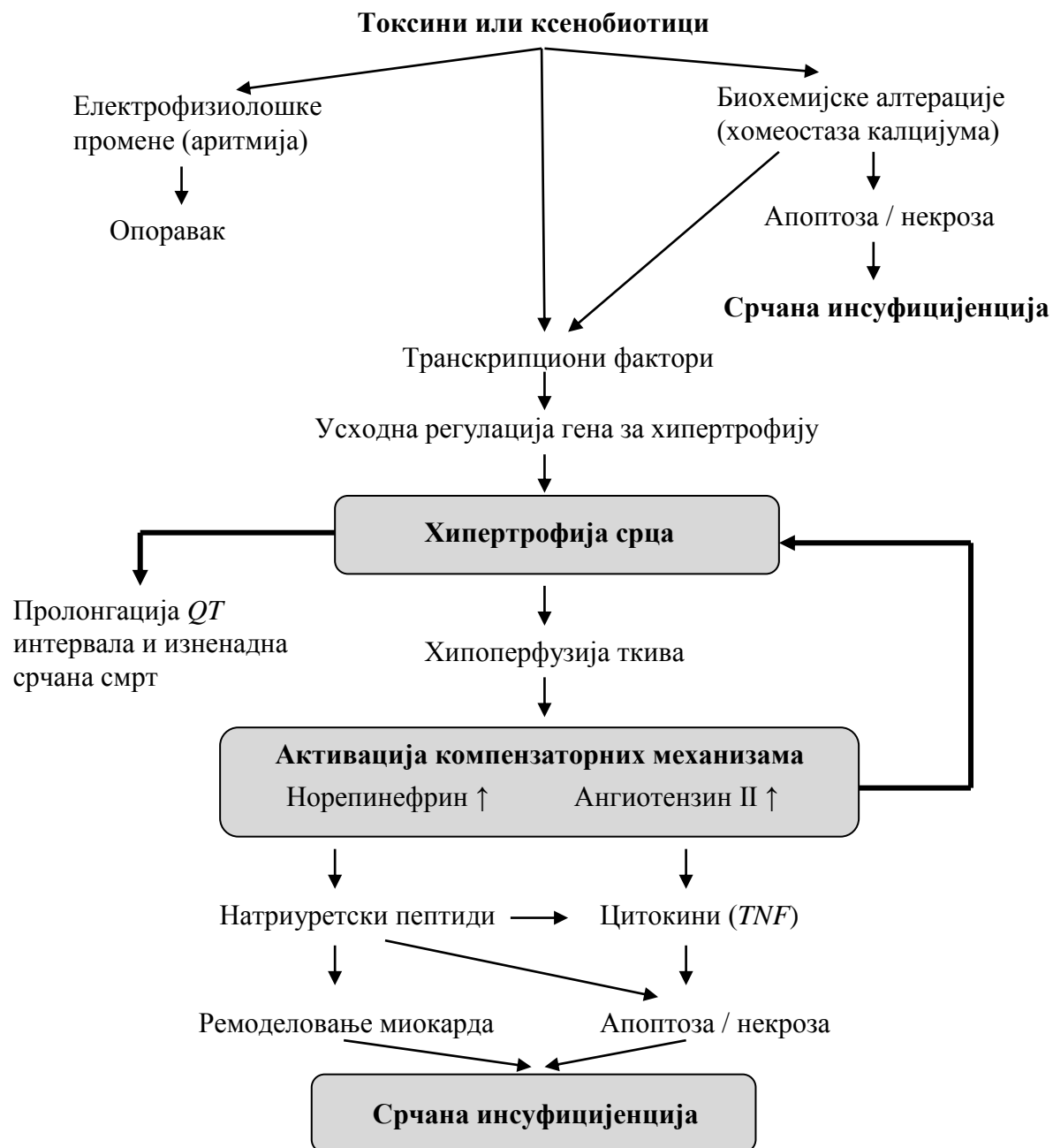
хипотезу да срчана хипертрофија није ни потребна ни нужно компензациона. На пример, присилна експресија доминантног негативног калцинеуринског мутанта обезбеђује заштиту од хипертрофије и фиброзе након абдоминалне конструкције аорте [Zou и сар., 2001]. Такође, елиминација хипертрофије код животиња помоћу калцинеурина није изазвала компромитоване хемодинамске промене током периода од неколико недеља [Hill и сар., 2000]. Због тога, у овим експерименталним приступима, хипертрофни раст може бити прекинут у присуству континуалног оптерећења притиска, а компензаторни одговор не би био угрожен. Интересантно је запажање да је готово потпуни недостатак срчане хипертрофије у одговору на групу са интервенцијом на аорти у трансгенском моделу миша, праћен знатно споријим темпом погоршања систолне функције [Esposito и сар., 2002].

Ове опсервације указују на то да хипертрофија срца у одговору на спољашњи и унутрашњи стрес није компензациони одговор. Међутим, хипертрофија срца повећава ризик од малигне аритмије и срчане инсуфицијенције, па се тиме посматра као маладаптивни одговор.

Патолошка хипертрофија је фактор ризика за малигну аритмију и срчану инсуфицијенцију. Критични ћелијски догађај ове транзиције је миокардијална апоптоза изазвана упалним цитокинима, као што је $TNF-\alpha$, а неурохормонални фактори, попут атријалног натриуретског пептида (АНП), доводе до дилиране кардиомиопатије и погоршања срчане функције. Токсиколошка експозиција може проузроковати дилатирану кардиомиопатију или срчану инсуфицијенцију без посредне хипертрофичне фазе. Смрт миокардне ћелије такође игра кључну улогу у директној патогенези дилатације срца. Слика 7 илуструје процес транзиције од срчане хипертрофије до срчане инсуфицијенције изазван ксенобиотиком.

Промене биохемијских реакција у миокарду често се јављају убрзо након излагања токсичним супстанцама из животне средине. То укључује измене у јонској хомеостази, као што су промене у интрацелуларним концентрацијама калцијума, које се јављају у већини експозиција токсичним супстанцама [Simanski и Gettes, 1993]. Метаболизам вишка енергије је још један рани одговор на токсине у срцу, што доводи до смањења производње и/или повећане потрошње ATP -а [Abas и сар., 2000]. Промене у ензимским реакцијама су често описане код реакције срца на токсично деловање [Depre и Taegtmeyer, 2000]. Рани сигнални путеви који доводе до токсичних реакција миокарда су фокус истраживања у срчаној токсикологији [Piano 1994]. Детаљи ових сигналних путева и њихова улога у кардиотоксичности тек треба да се истраже.

Вероватно је да је активирање сигналних путева критичан одговор ћелија миокарда на околна токсична оштећења [Cheng и сар., 1999]. Укрштена комуникација између сигналних путева одређује крајњи исход одговора миокарда на токсине.



Слика 7. Срчана инсуфицијенција након акутне и хроничне изложености и прелаз од хипертрофије срца до срчане инсуфицијенције

Физиолошке промене настају као рани одговори на токсине и као последични догађаји у касном развоју кардиомиопатије. Најочигледнија дисфункција миокарда која се јавља у раним одговорима на токсине је срчана аритмија [Peters и сар., 2000] и често

је резултат промена у интрацелуларним концентрацијама калцијума и другим биохемијским чиниоцима, што доводи до погрешне комуникације између ћелија и погрешне проводљивости електричних импулса [Rosen 1995]. Ове промене, ако нису праћене кардиомиопатијом, не укључују смрт миокарда и могу бити реверзибилне. Насупрот томе, касна фаза срчане дисфункције и аритмије, међутим, често је резултат кардиомиопатије.

Промене у морфологији миокарда дешавају се када је срце оптерећено јаким токсичним оштећењем и/или изложено јаким токсичним утицајем [He и сар., 1996]. Хипертрофија срца често се посматра као последица дуготрајних токсичних оштећења. Од срчане хипертрофије до срчане инсуфицијенције, долази до активације компензационих механизма, укључујући симпатички нервни систем и ренин–ангиотензин систем [Holtz 1993]. Компензаторни одговор заузврат активира контрарегулаторне механизме као што је усходна регулација експресије АНП–а [Francis и Chu, 1995] и повећање цитокина, као што је *TNF- α* . Велике биохемијске, физиолошке и молекуларне промене доводе до ремоделирања миокарда и изненадне ћелијске смрти, што доводи до срчане инсуфицијенције [Svinghedauv 1999].

1.6. Патохистолошке карактеристике миокардитиса

На основу патохистолошких карактеристика миокардитиса, у Даласу су постављени критеријуми за дијагнозу миокардитиса у узорцима након биопсије ендомиокардијума [Aretz и сар., 1987]. Ову класификацију је предложило осам патолога који се баве патолошким променама на срцу (панел Даласа) у покушају да се успоставе јединствени критеријуми за дијагнозу миокардитиса у узорцима након биопсије ендомиокардијума.

Систем класификације у Даласу установљен је да лекарима који се баве праксом буде омогућен једноставан, изводљив и лако применљив систем за постављање дијагнозе миокардитиса на основу узорака биопсије ендомиокарда. На следећим састанцима, чланови панела у Даласу су се сложили да је класификација корисна и примењива у свакодневној патолошкој пракси.

1.6.1. Технички услови за правилно постављање дијагнозе

Миокардитис може бити фокалан и адекватно узорковање је од највеће важности да би се смањио број лажно негативних биопсија. Предложено је да се

обезбеди најмање пет одвојених биопсираних узорака [*Spiegelhalter* и *Stovin*, 1983], посебно ако се у клиничкој пракси користи неки од мањих биоптома или се користи феморални приступ. Већина, ако не и сви ткивни пресеци треба да се припреме за микроскопирање користећи пажљиве технике фиксирања и сечења. Због тога што су ткивни узорци мали, треба избегавати додатна сечења да би се смањила могућност појаве артефаката, а ткивом треба да се манипулише фином иглом, а не форцепсом.

Специјална испитивања нису обавезна, при чему се мисли на имунохистохемијска (на присуство имуноглобулина или подтипизацију интерстицијалних типова ћелија) и електрономикроскопско испитивање. Ако су узорци ткива издвојени за ово испитивање, треба их испитати светлосном микроскопијом. Замрзнути делови се боје одговарајућом ткивном бојом, а један пресек ткива 1 μm дебљине, издвојен за ултраструктурно испитивање, треба испитати пре него се донесе коначна дијагноза.

После фиксације и обраде, парафински блок се пресеца у више трака на разним нивоима, а у овом тренутку се припремају додатни необрађени пресеци за посебна бојења како би се избегло прекомерно губљење ткива. Хематоксилин–еозин бојење и бојење везивног ткива треба користити рутински као и трихромно бојење које не одређује само присуство фиброзе, већ помаже и у откривању некрозе миоцита.

Да би се избегла евентуална пристрасност након увида у историју болести, узорак би требало анализирати на почетку без знања о клиничкој историји [*Aretz* и сар., 1987; *Edwards* 1984]. Ако је инфламаторни инфилтрат присутан и миокардитис је врло вероватан или јасно утврђен морфолошки, историја болести је неопходна да би се разјаснио узрок миокардног инфламаторног процеса [*Aretz* и сар., 1987].

1.6.2. Класификација миокардитиса

За прву биопсију и наредне биопсије користе се две одвојене класификације (табела 1).

Далас панел је мислио да тренутно постојеће научне и клиничке информације не дозвољавају патологу да са сигурношћу дијагностикује миокардитис у току или стари миокардитис одмах приликом прве биопсије. Ове дијагнозе се зато могу користити само у случајевима у којима је претходно дијагностикован недвосмислени миокардитис.

Табела 1. Класификација миокардитиса

Прва биопсија
Миокардитис са или без фиброзе
Гранични миокардитис
Без миокардитиса
Накнадна биопсија
Перзистентни миокардитис са или без фиброзе
Миокардитис у лечењу са или без фиброзе
Излечени миокардитис са или без фиброзе

1.6.2.1. Прва биопсија

По дефиницији, дијагноза миокардитиса може бити постављена само ако се може доказати некроза или дегенерација миоцита или обе појаве уз инфламаторни инфилтрат поред дегенеративних или некротичних миоцита [Aretz и сар., 1987].

Оштећење миокарда може бити у облику некрозе или других дегенеративних промена, као што је вакуолизација и прекид миоцита. Конфигурација миоцита може се изменити и на начин да се инфламаторне ћелије могу појавити као "интрацелуларне" [Edwards 1984] што омогућава да се лакше препозна грешка у контракцији која на пресеку може да имитира вакуолизацију миоцита. Неповезани миокард најчешће показује неколико патолошких промена и јавља се у потпуности нормално у многим случајевима. Интерстицијски едем није критеријум који се може користити за дијагнозу миокардитиса у примерима ендомиокардијалне биопсије, јер раздвајање миоцита може да симулира едем.

У дијагностичким случајевима инфламаторни инфилтрат често се лако препознаје при микроскопском прегледу малог увећања. Ово је посебно важно за фокалне акумулације инфламаторних ћелија. Заједничко оштећење ендокарда и суседног миокарда је карактеристичан образац код миокардитиса. Количина инфламаторног инфилтрата треба да буде квантификована као блага, умерена или тешка, а његова дистрибуција треба да буде окарактерисана као фокална, конфлуентна или дифузна [Aretz и сар., 1987; Edwards 1984]. Квантитативност дифузних инфламаторних инфилтрата, као што су предложили неки аутори, није препоручио панел [Edwards и сар., 1982; Edwards 1984].

Дијагноза не би требало да се заснива на идентификацији једног или два круга ћелија као што су лимфоцити. Многе интерстицијалне ћелије могу бити тешко уочљиве

микроскопијом, а нормални састојци, као што су мастоцити, једра фибробласта (посебно ако се пресече попречни пресек), перицити и ендотелне ћелије, могу изгледати као лимфоцити. Састав инфламаторног инфилтрата помаже у разликовању примарног (или идиопатског) облика миокардитиса од секундарног процеса који има познати узрок. Иако идиопатски облик миокардитиса обично карактерише искључиво лимфоцитни инфламаторни инфилтрат, он такође може да садржи полиморфонуклеарне леукоците, нарочито у свом раном току, као и гигантске ћелије. Полиморфонуклеарни леукоцити видљиви близу ивице биопсије су често део адхерентног угрушка везаног за поступак биопсије и доводили су до погрешне дијагнозе акутне миокардне некрозе. Неке од диференцијалних дијагноза које су предложене на основу ћелијских компоненти инфламаторног инфилтрата резимиране су у табели 2.

Табела 2. Инфламаторни инфилтрати и диференцијална дијагноза миокардитиса

Лимфоцити	Идиопатски миокардитис
	Вирусни миокардитис
	Токсични миокардитис
	Колагена васкуларна болест
	Саркоидоза
	Лимфом
Неутрофили	Идиопатски (рани) миокардитис
	Вирусни (рани) миокардитис
	Пресор ефекат
	Исхемија
	Бактеријска инфекција
Еозинофили	Хиперсензитивност
	Паразитоза
	Хипереозинофилни синдром
	Идиопатски миокардитис
Гигантске ћелије	Идиопатски миокардитис
	Саркоидоза
	Хиперсензитивност
	Реуматска грозница
	Реуматоидна болест
	Грануломатозне инфекције

Ако је фиброза присутна, треба је описати као интерстицијалну, ендокардијалну или прелазни тип, а њен степен мора бити квантификован као блага, умерена или тешка.

Табела 3. Лезије које личе на миокардитис

Лезија	Инфламаторни инфилтрат	Миоцити	Везивно ткиво
Миокардитис узрокован лековима; Хиперсензитивност	Наглашена еозинофилија; интерстицијални инфилтрат; гигантске ћелије; атипични лимфоцити	Ретка некроза	Без фиброзе
Токсични миокардитис	Мешовити наглашени инфилтрати доминантно зрелих лимфоцита; полиморфонуклеарни леукоцити могу бити присутни	Некроза често присутна; лезије различите старости	Општа фиброза
Пресор лезија	Мешовити мали фокални инфилтрати са наглашеним садржајем полиморфонуклеарних леукоцита	Мали фокуси некрозе или дегенерације удружени са инфламаторним инфилтратом	Без фиброзе
Инфаркт у организацији	Гранулационо ткиво са мешаним инфилтратом често са плазма ћелијама и макрофагима делимично наглашено на периферији некротичног подручја	Коагулациона некроза, често конфлуентна; оскудна у нивоу близу ендокарда	Фиброза као део гранулационог ткива и оздрављења
Хематолошки малигнитети	Атипичне ћелије (бласт форме, атипични лимфоцити); ендокардијални и делимично периваскуларни инфилтрат	Без некрозе	Без фиброзе
Идиопатска дилатирана кардиомиопатија	Хронични, често лимфоцитни инфилтрат, углавном растурен	Наглашена хипертрофија са бизарним једрима; удружена миоцитоза	Често наглашена, општа ендокардијална и интерстицијална фиброза
Организација места претходне биопсије	Гранулационо ткиво заузима ендокардијум инкорпорирајући фибрин	Наглашена неуређеност миоцита у нивоу руба биопсије; у околини нормалан миокард	Фиброза као део оздрављења места биопсије

Неке од лезија које су сличне миокардитису наведене су у табели 3. Иако је ова табела само водич и није никакво свеобухватно правило, намера је да подсети на пажљиво испитивање свих морфолошких особина, чак и ако се чини да је дијагноза миокардитиса очигледна.

О избору израза гранични миокардитис може да се полемише, али он подразумева да је инфламаторни инфилтрат превише редак, да оштећење миоцита није могуће доказати и да се не може дати јасна дијагноза миокардитиса. Миокардијум у позадини у овим околностима може да изгледа нормално, као и у многим случајевима недвосмисленог миокардитиса или може показати фиброзу. Иако хистопатологија решавања миокардитиса повремено може изгледати слична граничном миокардитису, таква дијагноза, као што је већ поменуто, треба да постоји само када је претходно дијагностикован миокардитис. Када се види гранична лезија, треба тражити додатне нивое пресека узорка. Узорци биопсије који показују фокални миокардитис често не садрже промене граничног миокардитиса у подручјима далеко од дијагностичких жаришта. Ако клиничка сумња остаје јака, лекар може изабрати да изврши друге биопсије на таквим болесницима [Dec и сар., 1986]. Важно је да се ова категорија не злоупотребљава за нормалне или неспецифичне узорке биопсије како би се умирио лекар, већ би требало да буде резервисана за случајеве у којима се снажно сумња на миокардитис на морфолошкој основи.

Уколико миокардитис није присутан, треба дати описну дијагнозу. Миокардијум може бити у потпуности нормалан, а могу да постоје неспецифичне промене, као што је блага хипертрофија и блага фиброза, или могу да постоје хроничне промене миокарда класично повезане са хроничном идиопатском дилатираном кардиомиопатијом. Ако миокардитис није очигледан, узорак треба пажљиво испитати за друге могуће узроке представљања срчаних симптома, најчешће конгестивне срчане инсуфицијенције.

1.6.2.2. Касније биопсије

Као и у иницијалној биопсији, адекватно узорковање ткива је важно у наредним биопсијама јер оно често служи као водич за третман пацијента.

Израз миокардитис у току или перзистентни миокардитис користи се ако перзистира миокардитис са удруженим оштећењем миоцита и некрозом. Морфолошке промене треба описати јер повремено природа инфилтрата, степен инфилтрата или степен фиброзе могу да се разликују од претходних налаза биопсије.

Током оздрављења или лечења миокардитиса, инфламаторни инфилтрат се значајно смањује и није блиско повезан са некротичним миоцитима, али се виде репаративне промене.

Након што инфламаторни инфилтрат више није присутан, може се дати дијагноза излеченог миокардитиса. Међутим, треба запамтити да се лимфоцити могу видети повремено у централном делу излеченог или ожиљног подручја након потпуне резолуције и такав опис не подразумева тренутни миокардитис. Због тога што не разумемо у потпуности природну историју миокардитиса, прогностичка важност састава инфламаторног инфилтрата или степен фиброзе није позната. Према томе, ове промене треба описати тачно и квантитативно да би се добиле такве информације. Понекад болесници у клиничкој пакси, након потпуне хистопатолошке резолуције миокардитиса, показују рекурентни миокардитис у наредним биопсијама. У таквим случајевима, биопсију треба сматрати првом биопсијом, тј. дијагнозу миокардитиса са или без фиброзе. Ова биопсија постаје референтна тачка за наредне биопсије [Aretz 1987].

1.7. Промене на срцу као последица интоксикације херином

Опиоиди су снажно ослобађају хистамин и истраживања показују да најчешће злоупотребљаване супстанце, морфин и кокаин, ослобађају хистамин из мастоцита у присуству оксидативних ензима, који су додатни фактор ризика приликом предозирања херином и кокаином [Di Bello и сар., 1998]. Током испитивања смрти 48 особа које су умрле због предозирања херином [Fineschi и сар., 2001], анафилактични шок је сагледаван као могући узрок смрти. Едем плућа који компликује предозирање херином, сматра се главним механизмом који доводи до смрти код зависника од хериона. Патогенетски механизам смртог исхода није у потпуности схваћен, али се претпоставља се да постоји оштећење миокардне контрактилности. Разматрани су и други механизми: повећање плућне капиларне пермеабилности изазване хипоксијом, централно изазвана респираторна депресија, примарни токсични ефекти на алвеоларне капиларе и акутни анафилактички шок [Dettmayer и сар., 2000].

Посебан интерес заслужују измене миокарда укључујући благе инфламаторне процесе у присуству инфекција, посебно хепатитиса *B* и *C*. Ове промене могу довести до срчане инсуфицијенције која доводи последично до едема плућа. Студије које су користиле стандардна хистолошка бојења нису показале разлике у променама миокарда у односу на контролне групе, нити су могле да повежу фиброзу миокарда и

миокардитис са концентрацијом морфијума или *б-МММ* у крви [Dettemayer и сар., 2009]. Кардијалне лезије код зависника од хероина изгледа да имају различите узрочне факторе: инфекције, токсични утицај, преосетљивост, утицај катехоламина и општу хипоксију.

Описани су и случајеви акутног инфаркта миокарда након интоксикације хероином. Стварни механизам инфаркта миокарда изазваног хероином није тачно описан. Студије на животињама су показале да хероин може имати системски ефекат [Paterna и сар., 1991] или директну токсичност [Schwartzfarb и сар., 1977] на срце. Хипотеза о оштећењима миокарда повезаним са хероином може да укључи и рабдомиолизу миокарда, хипоксију, ацидозу, вазоконстрикторне супстанце које се ослобађају због некрозе мишића или реакцијама преосетљивости које су повезане са хероином [Melandri и сар., 1991]. Schwartzfarb и сар. [1977] су описали рабдомиолизу миокарда код 28-годишњег зависника од хероина. Опажене промене миокарда, сличне онима у скелетном мишићу, састоје се од фокалне миолизе са моноклеарним и инфилтратима ћелија плазме. Sztajzel и сар. [1994] су описали 25-годишњу женску особу која је развила акутни инфаркт предњег зида миокарда након злоупотребе хероина; њена коронарна ангиографија показала је оклузију на предњој међукоморној артерији. Инфаркт је описан као последица интравенозне злоупотребе хероина. Они су тврдили да хероин може да има директни токсични ефекат на коронарне артерију и да изазове акутну коронарну оклузију, било изазивањем локалног коронарног спазма или упале.

Претходни извештаји сугерирали су да је хероин деловао директно на вазомоторни центар и тако повећао парасимпатичку активност, смањио симпатички тонус и стимулисао ослобађање хистамина из мастоцита. Ови ефекти на кардиоваскуларни систем могу довести до брадикардије и хипотензије [Lipski и сар., 1973; Schwartz 1998]. Описан је и вазоспазам изазван хероином након ушмркавања хероина [Silverman и Turner 1991; Bartolomei и сар., 1992; Adle-Biassette и сар., 1996]. Неки аутори тврде да вазоспазам након интравенозних ињекција хероина може да настане због самог хероина или других компоненти у "хероинском праху", међутим, Bartolomei и Adle-Biassette су показали да ушмркавање пречишћеног хероина може изазвати коронарни или моздани вазоспазам. Ови налази показују да би вазоспазам могао изазвати сам хероин [Bartolomei и сар., 1992; Adle-Biassette и сар., 1996]. Повећана парасимпатичка активност такође има улогу у иницирању коронарног спазма

[*Suematsu* и сар., 1987]. Некардиогени плућни едем је такође описан након превелике дозе хероина [*Ghuran* и *Nolan* 2000; *Yeh* и сар., 2001; *Wang* и сар., 1994].

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Узимајући у обзир литературне податке о оштећењу миокарда код хроничних хероиномана и наша искуства стечена у свакодневној судско-медицинској пракси, неопходно је утврдити морфолошке промене на срчаном мишићу и њихов значај за настанак смрти хероиномана, те су циљеви овог истраживања:

1. да се морфометријском анализом утврди да ли злоупотреба хероина утиче на умножавање везивног ткива у миокарду;
2. да се морфометријском анализом утврди да ли код особа чија је смрт у вези са злоупотребом хероина постоји хипертрофија миокардиоцита;
3. да се морфометријском анализом дефинише врста и број запаљењских ћелија (леукоцита, Т лимфоцита, моноцита и макрофага) у миокарду особа умрлих због злоупотребе хероина у односу на лица из контролне групе;
4. да се утврди да ли број и врста запаљењских ћелија у миокарду хероиномана одговара Далас критеријумима токсичног миокардитиса;
5. да се морфометријском анализом утврди број и дистрибуција мастоцита у миокарду хероиномана у односу на контролну групу;
6. да се утврди корелација свих напред наведених параметара у односу на део срца из кога су исечци за микроскопску и морфометријску анализу узети;
7. да се утврди корелација свих наведених параметара у односу на пол, старосну структуру и дужину хероиноманског стажа;
8. да се у односу на резултате морфометријске анализе промена на срчаном мишићу хероиномана покушају да објасне могући механизми умирања.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Материјал за анализу

Истраживање је спроведено на узорцима ткива 52 хумана кадавера, дисекована у Заводу за судску медицину Медицинског факултета у Нишу. Испитивање је вршено у току судскомедицинских обдукција у периоду 2009–2014. године. За потребе истраживања бележени су пол и старост обдукованих особа, као и дужина хероиноманског стажа у испитиваној групи. Анализирана ткива узоркована су са кадавера оба пола различите старости. Истраживање је укључило 11 кадавера женског и 41 кадавер мушког пола (старости од 18 до 47 година; $29,27 \pm 6,08$ год.).

Испитивана група лица чија се смрт доводи у везу са употребом хероина обухватала је укупно 42 кадавера. Према токсиколошким анализама, у већини случајева смрт је резултат комбинованих интоксикација као узрочног фактора смртних случајева са преминацијом високих доза хероина.

Контролна група се састојала из 10 кадавера код којих нису постојали икакви подаци о злоупотреби опојних средстава, а рутинским токсиколошким анализама искључено је присуство леталних, па чак и токсичних доза било ког лека или друге штетне супстанце. Смрти случајеви из контролне групе углавном су настали услед политраума задобијенх у саобраћајним незгодама.

Све обдукције су извршене у оквиру 48 сати након смрти.

По шест узорака за хистохемијску и имунохистохемијску анализу миокарда узето је из сваког срца са стандардизованих локација (са предњег, задњег и бочног зида леве коморе; са предњег и задњег зида десне коморе и са гоње трећине интервентикларног септума).

Делови ткива органа (мозак, плућа, срце, бубрег са мокраћном бешиком, јетра са жучном кесом, желудац и црева са садржајем), крв и мокраћа су рутински узороковани за токсиколошку анализу.

3.2. Хистохемијска анализа

3.2.1. Материјал за хистохемијску анализу

3.2.1.1. Употребљени реагенси и раствори (произвођач)

- Алуминијум–калијум–сулфат додекахидрат – $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (*Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, USA*)
- Алцијан плаво – *Alcian blue 8GX* (*Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, USA*)
- Амонијум хидроксид – NH_4OH (*Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, USA*)
- Апсолутни алкохол (Ветпром хемикалије, Београд, Србија)
- Концентрована хидрохлорна киселина (*Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, USA*)
- Кисели фуксин (*Carlo Erba reagents, Milan, Italy*)
- Ксилол (Ветпром хемикалије, Београд, Србија)
- Натријум јодат – $NaIO_3$ (*Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, USA*)
- Паралдехид (*Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, USA*)
- Сирћетна киселина (*Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, USA*)
- Фосфоволфрамова киселина – $H_3PW_{12}O_{40}$ (*Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, USA*)
- Фосфомолибденска киселина – $H_3PMo_{12}O_{40}$ (*Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, USA*)
- Фуксин (*Carlo Erba reagents, Milan, Italy*)
- Хематоксилин (*Merck KGaA, Darmstadt, Germany*)
- Шафран – *safran du Gatinais* (*Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, USA*)

Припрема раствора:

Раствор алцијан плавог је направљен растварањем 1 g алцијан плавог у 100 ml 3% воденог раствора сирћетне киселине и титриран до постизања pH 2,5.

Раствор алдехид фуксина је направљен растварањем 1 g фуксина у 100 ml 60% воденог раствора етанола који је садржао 2 ml паралдехида и 2 ml концентроване хидрохлорне киселине.

Модификовани Мајеров (*Mayer*) хематоксилин је направљен растварањем 50 g алуминијум–калијум–сулфат додекахидрата у 1 l дестиловане воде, након чега је додат 0,2 g натријум јодата и 1 g хематоксилина.

0,5% раствор киселог фуксина је раствор једнаких запремина 1% воденог раствора сирћетне киселине и 1% воденог раствора киселог фуксина.

Раствор хетерополикиселина је раствор једнаких запремина 2,5% воденог раствора фосфомолибденске киселине и 2,5% воденог раствора фосфоволфрамове киселине.

1% алкохолни раствор шафрана је направљен растварањем 1 g шафрана у 100 ml апсолутног етанола. Ова суспензија је инкубирана 48 сати на 55–60°C, а затим је охлађена на собној температури и филтрирана.

Алкалинизовани 95% етанол је направљен растварањем 5 ml амонијум хидроксида у 95 ml 95% етанола и титриран до постизања pH 8.

Модификована Моватова пентахромска (*Movat Pentachrome*) хистохемијска метода [*Petrović* и сар., 2011]:

Препарати се најпре депарафинишу и испирају дестилованом водом. Након тога, врши се петоминутно излагање 0,1 mol/L раствору лимунске киселине. Затим се препарати испирају чесменом водом у трајању од 5 минута. Након тога, препарати се потапају у раствор алцијан плавог 20 – 30 минута на 60°C. Након тога се поново испирају чесменом водом у трајању од 5 минута. Затим се препарати постављају на држаче и преливају раствором алкалинизованог 95% етанола 5 минута и након тога испирају 70% етанолом, па остављају у овом раствору 2 минута. Након тога, врши се бојење раствором алдехид фуксина у трајању од 2 минута, па се поново испирају дестилованом водом. Након тога следи бојење модификованим Мајеровим хематоксилином у трајању од 10 до 20 секунди, након чега се врши диферентовање у текућој чесменој води од 1 до 2 минута. Затим се препарати испирају у дестилованој води, па боје 0,5% раствором киселог фуксина до 30 секунди. Након овог бојења, препарати се испирају дестилованом водом, па се врши диферентовање боја у раствору хетерополикиселина у трајању од 5 до 10 минута. Затим се препарати испирају 1% сирћетном киселином од 2 до 3 минута. Након тога се додатно испирају три пута 100% етанолом, након чега се потапају у 1% алкохолни раствор шафрана и остављају потопљени од 1 до 5 минута. Затим се препарати испирају три пута 100% етанолом, а онда потапају у две различите посуде са ксилолом и то по 3 минута у свакој. На крају се врши монтирање препарата канада–балзамом.

Тумачење резултата модификованог Моватовог пентахромског бојења:

Плаво до плаво–зеленкасто (алцијан плаво) боје се неутрални и кисели мукополисахариди екстрацелуларног матрикса. Јарко љубичасто (алдехид фуксин) се боје еластична влакна. Тамно љубичасто–плаво (хематоксилин) пребојавају се једра. Црвено (кисели фуксин) се боје мишићне ћелије и еритроцити. Светло до тамне нијансе

жуте (алкохолни раствор шафрана) пребојени су снопови колагених влакана. Тиркизно пребојавање (алцијан плаво) боје се сулфатисане структуре гликозаминогликана из гранула мастоцита.

3.2.2. Методе хистохемијске анализе

У Заводу за судску медицину у Нишу и на Катедри за хистологију и ембриологију Медицинског факултета у Нишу, извршене су хистохемијске анализе. Ткиво миокарда је сечено попречним резovima тако да дужина исеченог ткива не буде дужа од 5 mm.

Ткивни материјал је даље био подвргнут рутинској обради до парафинских калупа, која је подразумевала употребу дехидратационе линије растућих концентрација етанола, просветљавање ксилолом и инфилтрацију парафином. Од сваког калупа, микротомом (*Leica RM2255, Leica Microsystems, Nussloch, GmbH, Germany*) су сечени ткивни узорци дебљине до 5 μm и наносени на обична хистохемијска предметна стакла (*Isolab, Germany*).

У оквиру хистохемијских метода ткивни пресеци су третирани: 1) хематоксилин–еозином (за морфометријску анализу) и 2) модификованом Моватовом пентахромском методом (за морфометријску и дескриптивну морфолошку анализу).

Од свих хистохемијских препарата начињена је фотодокументација под увећањима од 40x до 400x тако да су под свим увећањима фотографисани сви делови ткивног пресека. Препарати су фотографисани дигиталном камером *Olympus Pex Lite E-PL3* и *Leica DFC295 (Leica Microsystems, Germany)* која је монтирана на микроскопу *Olympus BX50 (Olympus, Japan)* и којом је управљано програмом *LAS Software* верзија 4.4.0 (*Leica Microsystems, Germany*).

3.3. Имунохистохемијска анализа

3.3.1. Материјал за имунохистохемијску анализу

За имунохистохемијску анализу коришћена су следећа антитела:

- *CD45R0*, клон *UCHL1*; моноклонално мишје антитело (*Dako, Denmark*)
- *CD45*, клон *2B/11* и *PD/26*; моноклонално мишје антитело (*Dako, Denmark*)
- *CD68*, клон *PG-M1*; моноклонално мишје антитело (*Dako, Denmark*)

Метода имунохистохемијске анализе:

1. Депарафинација узорка у ксилолу
2. Рехидратација узорка у опадајућим концентрацијама етанола, а затим у дестилованој води
3. Претретман цитратним пуфером pH 6,0 у микроталасној пећници (20 минута за *CD45R0* и 30 минута за *LCA* и *CD68*)
4. Хлађење на собној температури (око 20 минута)
5. Испирање у дестилованој води (5 минута)
6. Третирање помоћу 3% H_2O_2 ради блокирања ендogene пероксидазе
7. Третирање фосфатним пуфером (*PBS*; pH 7,1) (5 минута)
8. Наношење примарних антитела у влажном комору на собној температури и инкубација (30 минута)
9. Наношење секундарног антитела
10. Третирање диаминобензидином (*DAB*) као хромогеном
11. Бојење хематоксилином (1 минут)
12. Дехидратисање кроз серију етанола са растућом концентрацијом
13. Просветљавање у ксилолу
14. Монтирање коришћењем канада–балзама и покровних љуспица

Тумачење резултата:

- *CD45R0* антитело је коришћено за обележавање Т–лимфоцита;
- *LCA (CD45)* антитело је коришћено за обележавање леукоцита;
- *CD68* антитело је коришћено за обележавање моноцита и макрофага, односно ћелија које имају порекло мононуклеарних фагоцита.

3.3.2. Методе имунохистохемијске анализе

У Заводу за судску медицину у Нишу и Центру за патологију и патолошку анатомију Клиничког центра Ниш, извршене су и имунохистохемијске анализе. Ткиво миокарда је сечено и обрађивано до парафинских калупа истим поступком као за хистохемијску обраду ткива. Од сваког калупа, микротомом (*Leica RM2255, Leica Microsystems, Nussloch, GmbH, Germany*) су сечени ткивни узорци дебљине до 5 μm и наношени на имунохистохемијска предметна стакла (*Isolab, Germany*).

У оквиру имунохистохемијских метода ткивни пресеци су третирани по поступцима који су предвиђени за антитела *CD45R0*, *LCA (CD45)* и *CD68*.

Од свих имунохистохемијских препарата начињена је фотодокументација под увећањима од 40x до 400x тако да су под свим увећањима фотографисани сви делови ткивног пресека. Препарати су фотографисани истом дигиталном камером и у истом програмском окружењу као и у поступку за хистохемијским препаратима.

Свих шест исечака миокарда сваког случаја анализирано је на миокардитис према *Dallas* критеријумима [Aretz 1987] тако што је квантификација типова ћелија извршена бројањем специфичног типа ћелија у 30 видних поља за сваки узорак миокарда.

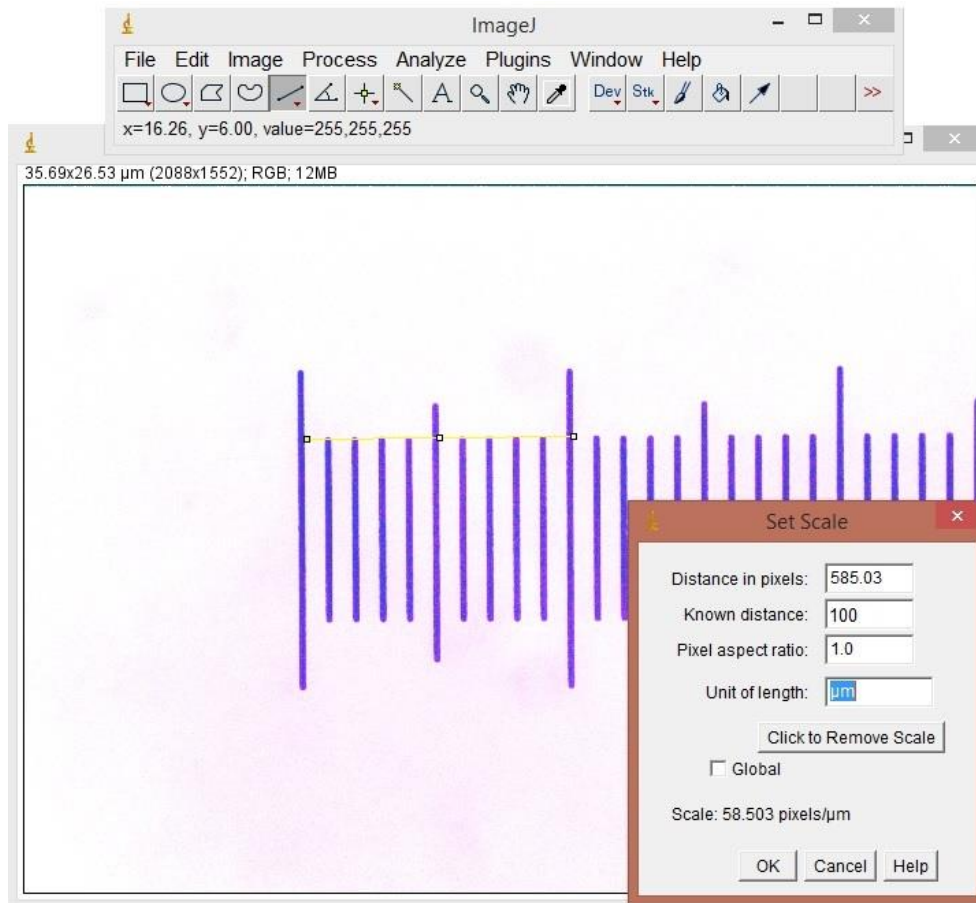
3.4. Морфометријска анализа

Морфометријска анализа вршена је у програму за анализу и обраду дигиталних фотографија *ImageJ* верзија 1.50 (*Wayne Rasband, National Institute of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>*).

3.4.1. Микроморфометријска анализа миокарда

Спацијална калибрација *ImageJ* система вршена је помоћу дигиталне фотографије објектног микрометра. Објектни микрометар је фотографисан под идентичним условима и адекватним увећањима као и хистохемијски и имунохистохемијски препарати.

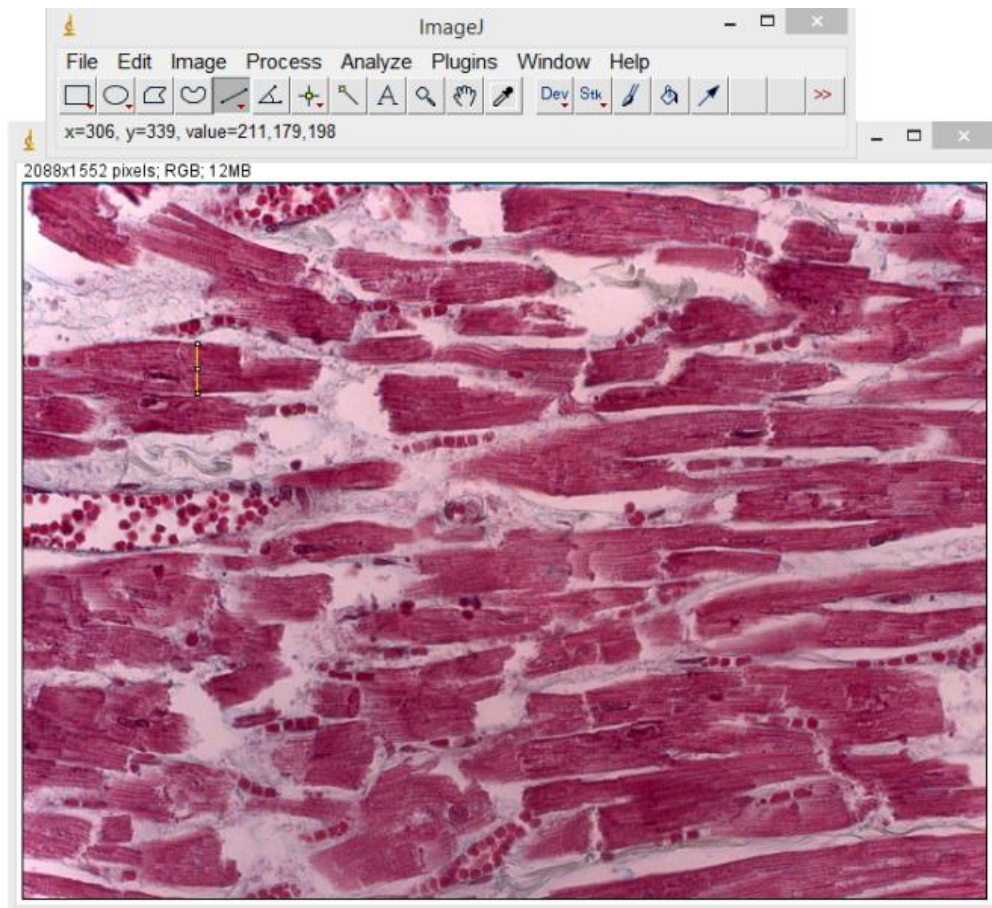
Калибрација *ImageJ* система вршена је посебно за све фотографије које су настале под истим микроскопским увећањем. У програму *ImageJ* отворане су дигиталне фотографије објектног микрометра, хистохемијских и имунохистохемијских препарата које су фотографисане под истим увећањем, након чега су повезиване у адекватни низ помоћу опције *Image* → *Stacks* → *Images to Stack*. Након тога је вршена калибрација *ImageJ* система. Обележавана је дистанца између две дуже суседне линије на фотографији објектног микрометра која је износила 100 μm да би преко опције *Analyze* → *Set Scale* софтвер прерачунавао аутоматски број пиксела по једном микрометру. Обележавањем појединачних параметара од интереса, преко опције *Analyze* → *Measure*, софтвер је прерачунавао вредности од интереса у микрометрима (слика 8).



Слика 8. Калибрација програма *ImageJ* по објектном микрометру

На хистохемијским препаратима мерена је дебљина кардиомиоцита и удео везивног ткива на површини пресека.

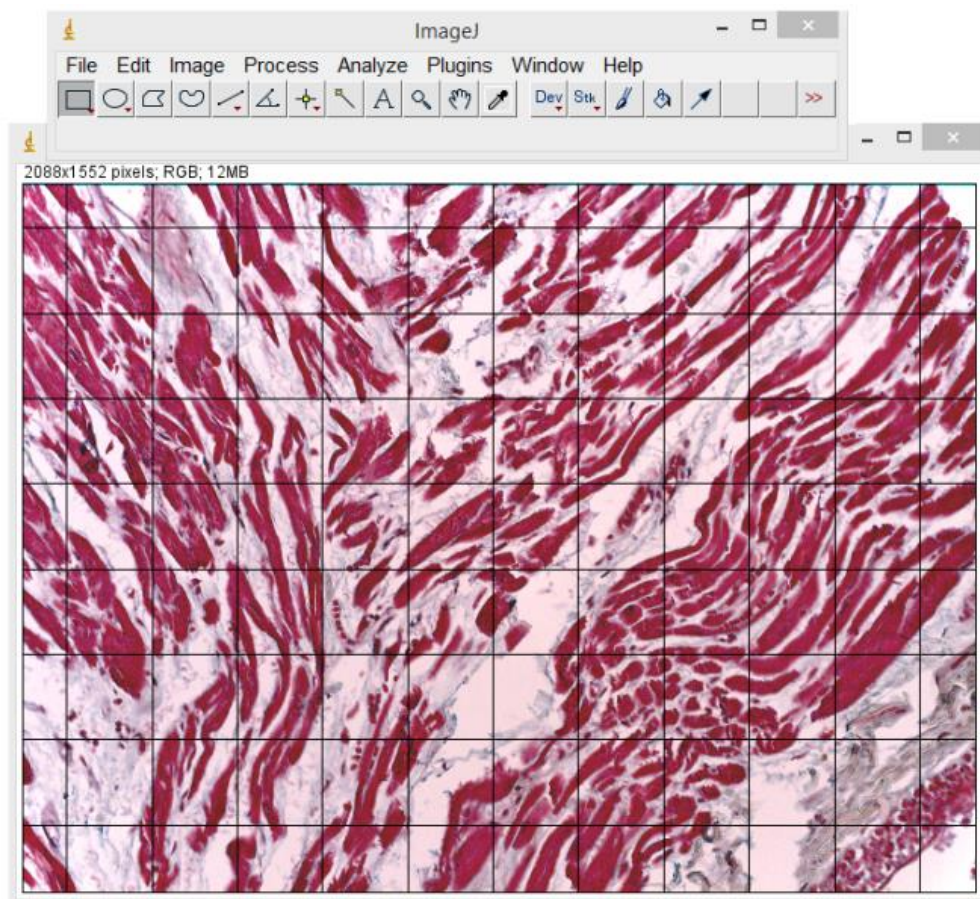
Након калибрације система, вршено је мерење. Дебљина кардиомиоцита означавања је под правим углом у односу на дужинску осу кардиомиоцита и на средини кардиомиоцита (слика 9). Након обележавања дужинског параметра, бирањем опције *Analyze* → *Measure*, програм је израчунавао тражену вредност у микрометрима.



Слика 9. Пример мерења дебљине кардиомиоцита

На фотографије хистохемијских препарата најпре је унесен тестни мрежни систем преко опције *Plugins* → *Analyse* → *Grid* (слика 10). За свако анализирано видно поље бројане су тачке пресека тестног система које падају на везивно ткиво да би био израчунат удео везивног ткива.

Волуменска густина испитиваног параметра (везивног ткива) израчуната је по формули $V_{vf} = P_f / P_t$ где је V_{vf} волуменска густина испитиване фазе, P_f број тачака које падају на испитивану фазу, а P_t укупан број тестних тачака [Kališnik 1985]. Вредности су изражаване као процентуална заступљеност везивног ткива у миокарду. Мерење заступљености везивног ткива у миокарду вршено је на фотографијама препарата под увећачем 40x.



Слика 10. Пример постављеног тестног система за мерење заступљености везивног ткива у миокарду (увеличање 40x)

Број ћелија које су обележене хистохемијским и имунохистохемијским бојењем (мастоцити, Т–лимфоцити, леукоцити, моноцити са макрофагима) бројани су у сваком испитиваном видном пољу преко опције *Plugins* → *Analyse* → *Cell Counter*. За ову анализу коришћене су фотографије препарата под увеличањем 400x.

3.5. Хемијско–токсиколошка анализа

Хемијско–токсиколошка анализа извршена је применом техника *head space* гасне хроматографије са пламенојонизујућим детектором (*HS-GC/FID*) и *head space* гасне хроматографије са масеним детектором (*HS-GC/MS*).

Идентификација је извршена поређењем масеног спектра узорка са масеним спектрима библиотека *Willy 7* и *Pfleger Maurer Weber*, а квантификација методом интерног стандарда.

3.6. Статистичка обрада података

Анализа података добијених након мерења, вршена је у програму *IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.*

Испитивање нормалности расподеле вредности у оквиру дефинисаних група вршено је употребом Колмогоров–Смирновљевог (*Kolmogorov–Smirnov*) теста за дефинисане групе које су имале више од 50 случајева, односно Шапиро–Вилковог (*Shapiro–Wilk*) теста за дефинисане групе које су имале мање од 50 случајева. Нормалност расподеле је потврђена ако је испуњен услов да је $p > 0,05$.

За анализу вредности параметара између група које су одступале (или је бар једна одступала) од нормалне расподеле коришћени су непараметарски тестови.

Непараметарски Ман–Витнијев (*Mann–Whitney*) тест који пореди медијане група, коришћен је за испитивање две независне групе на непрекидној скали. Статистички значајна веза постоји ако је $p < 0,05$. Статистички показатељ величине утицаја (r) рачунат је као $r = z / (N)^{1/2}$, где је N укупан број случајева. Величина утицаја је описана на следећи начин: 0,1 – мали утицај; 0,3 – средњи утицај; 0,5 – велики утицај.

Непараметарски Крускал–Волисов (*Kruskal–Wallis*) тест који пореди медијане група, коришћен је за испитивање три или више независних група на непрекидној скали. Статистички значајна веза постоји ако је $p < 0,05$. Ако би Крускал–Волисов тест дефинисао да постоји групна статистички значајна разлика међу поређеним групама, накнадно је рађен Ман–Витнијев тест за поређење појединачних парова група.

Једнофакторска анализа варијансе (*One Way ANOVA*) са *Tukey post hoc* тестом, коришћена је за поређење варијанси између више од две групе које су имале нормалан распоред анализираних вредности, док је за анализу две групе коришћен Т–тест. Приказиване су F вредност и p вредност, при чему је сматрано да постоји статистички значајна разлика ако је $p < 0,05$. За процену јачине везе коришћен је *Cohen d* (ета квадрат). Овај коефицијент је рачунат на следећи начин: $\text{ета квадрат} = t^2 / [t^2 + (n_1 + n_2 - 2)]$ где су n_1 и n_2 број случајева у првој и другој анализираној групи. Величина утицаја је тумачена на следећи начин: 0,01 – мали утицај; 0,06 – средњи утицај; 0,14 – велики утицај.

Коефицијент Пирсонове (*Pearson*) линеарне корелације (r) коришћен је да би се одредила јачина и смер линеарне везе између две непрекидне променљиве. Смер везе је одређен на основу позитивне или негативне вредности коефицијента Пирсонове

линеарне корелације. Јачина корелације је тумачена тако што је апсолутна вредност r описивана на следећи начин: $r = 0,1 - 0,29 \rightarrow$ мала корелација; $r = 0,3 - 0,49 \rightarrow$ средња корелација; $r = 0,5 - 1 \rightarrow$ велика (јака) корелација. Као графички приказ ове анализе коришћен је дијаграм растурања [Pallant 2009].

Резултати морфолошке, морфометријске и статистичке анализе приказани су табеларно и графички помоћу програма *IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.* и *Microsoft 2007. Microsoft Excel. Redmond, Washington: Microsoft.*

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Општи подаци о анализираним случајевима

У табели 4 дат је преглед општих карактеристика – пола и старости, испитиване групе и контролне групе, као и дужина коришћења хероина за испитивану групу. Хероиномани су подељени у три групе на основу дужине употребе хероина и то на групу која је користила хероин ≤ 5 година; групу која је користила хероин 5 – 10 година; и групу која је користила хероин ≥ 10 година. За 11 корисника хероина није било података о дужини употребе хероина.

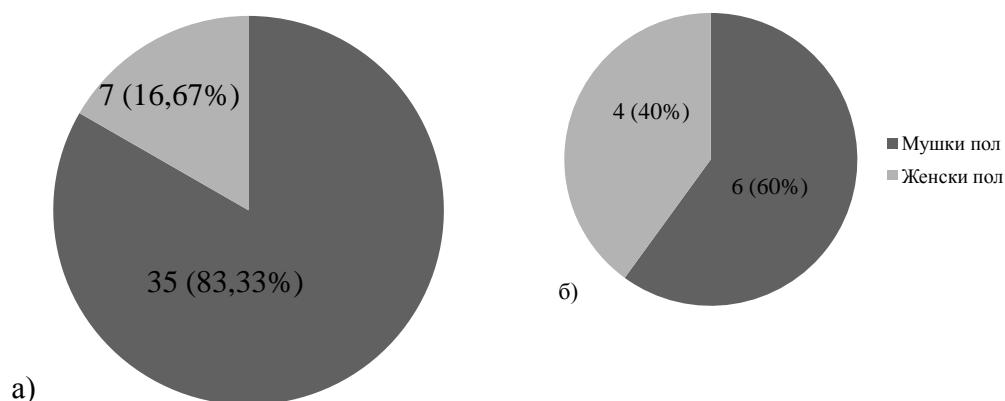
Табела 4. Опште карактеристике анализираних случајева

Редни број	Хероиномани			Контролна група	
	Пол	Старост [год.]	Дужина употребе хероина [год.]	Пол	Старост [год.]
1.	<i>M</i>	21	≤ 5	<i>M</i>	31
2.	<i>F</i>	27	5 – 10	<i>F</i>	27
3.	<i>M</i>	42	≥ 10	<i>F</i>	23
4.	<i>M</i>	28	5 – 10	<i>F</i>	25
5.	<i>M</i>	31	≥ 10	<i>F</i>	35
6.	<i>M</i>	26	/	<i>M</i>	26
7.	<i>M</i>	26	/	<i>M</i>	24
8.	<i>M</i>	26	≤ 5	<i>M</i>	28
9.	<i>M</i>	22	≤ 5	<i>M</i>	22
10.	<i>M</i>	33	5 – 10	<i>M</i>	26
11.	<i>M</i>	40	≥ 10		
12.	<i>M</i>	24	≤ 5		
13.	<i>F</i>	40	/		
14.	<i>M</i>	31	≥ 10		
15.	<i>M</i>	33	≤ 5		
16.	<i>M</i>	34	≤ 5		
17.	<i>F</i>	34	/		
18.	<i>M</i>	28	5 – 10		
19.	<i>M</i>	33	≥ 10		
20.	<i>M</i>	35	/		
21.	<i>M</i>	26	/		
22.	<i>M</i>	28	/		
23.	<i>M</i>	30	≤ 5		

24.	<i>M</i>	25	≥ 10		
25.	<i>M</i>	40	5 – 10		
26.	<i>M</i>	33	≤ 5		
27.	<i>M</i>	27	/		
28.	<i>M</i>	30	≤ 5		
29.	<i>M</i>	25	≥ 10		
30.	<i>M</i>	42	/		
31.	<i>M</i>	20	≤ 5		
32.	<i>F</i>	27	≤ 5		
33.	<i>F</i>	18	≤ 5		
34.	<i>M</i>	32	≥ 10		
35.	<i>M</i>	47	≥ 10		
36.	<i>M</i>	28	5 – 10		
37.	<i>M</i>	26	≤ 5		
38.	<i>M</i>	32	5 – 10		
39.	<i>F</i>	28	/		
40.	<i>M</i>	24	≤ 5		
41.	<i>F</i>	30	/		
42.	<i>M</i>	23	≤ 5		
\bar{X}		29,88			26,7
<i>SD</i>		6,38			3,89

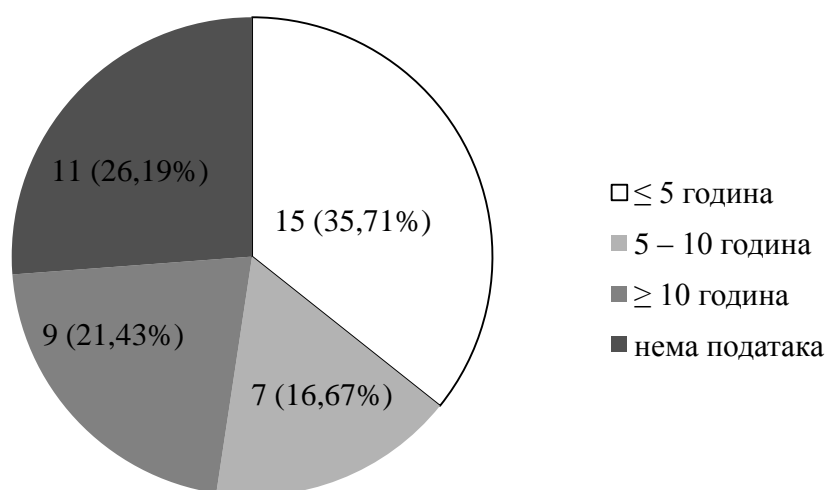
Просечна старост хероиномана у испитиваној студији износила је $29,88 \pm 6,38$ година, док је просечна старост контролне групе износила $26,7 \pm 3,89$ година. Т–тестом за независне узорке утврђено је да међу анализираним групама није постојала статистички значајна разлика у годинама старости ($F = 2,679$; $p = 0,138$).

Процентуална заступљеност полова, приказана је на графикону 1.



Графикон 1. Процентуална заступљеност полова у анализираним групама: хероиномани (а), контролна група (б)

Број и процентуална заступљеност хероиномана по групама формираним на основу дужине употребе хероина, приказани су на графикону 2.



Графикон 2. Број и процентуална заступљеност хероиномана по групама формираним на основу дужине употребе хероина

4.2. Анализа везивног ткива

Анализом процентуалне заступљености везивног ткива нису утврђене статистички значајне разлике између узорака који су узети из зида десне коморе, узорака који су узети из зида леве коморе и узорака ткива миокарда који су узети из међукоморне преграде, тако да су рачунате просечне вредности по сваком случају и приказане у табели 5.

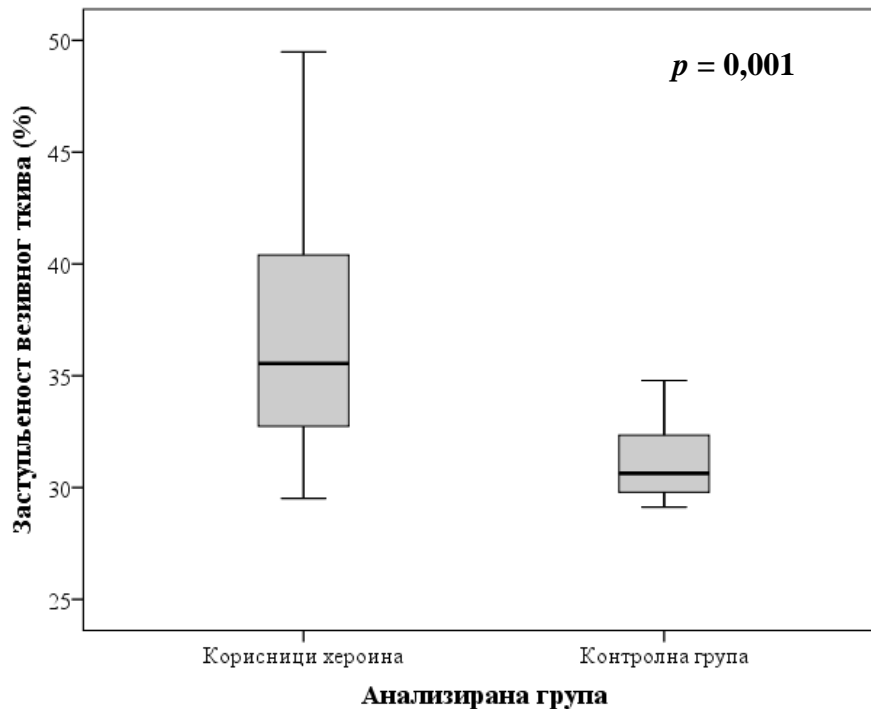
Табела 5. Просечне вредности процентуалне заступљености везивног ткива у миокарду код анализираних случајева

Редни број	Заступљеност везивног ткива у миокарду [%]	
	Хероиномани	Контролна група
1.	41,45	33,88
2.	33,63	32,34
3.	35,38	34,79
4.	40,4	30,42
5.	39,03	30,85
6.	38,18	31,73
7.	44,29	29,79
8.	43,63	30,01

9.	40,3	29,15
10.	36,18	29,13
11.	40	
12.	38,16	
13.	29,52	
14.	31,66	
15.	49,48	
16.	40,53	
17.	40,09	
18.	44,6	
19.	45,06	
20.	40,68	
21.	45,81	
22.	44,44	
23.	30,63	
24.	32,82	
25.	33,53	
26.	35,67	
27.	31,75	
28.	34,06	
29.	31,07	
30.	35,43	
31.	33,13	
32.	31,59	
33.	33,1	
34.	30,45	
35.	35,2	
36.	30,54	
37.	38,8	
38.	29,87	
39.	32,74	
40.	31,97	
41.	33,68	
42.	37,8	
\bar{X}	36,82	31,21
<i>SD</i>	5,19	1,95

Ман–Витнијевим тестом утврђено је да постоји статистички значајна разлика у процентуалној заступљености везивног ткива у срчаном мишићу хероиномана у односу на контролну групу (графикон 3). Хероиномани су имали статистички значајно већу заступљеност везивног ткива у миокарду ($z = -3,413$; $p = 0,001$; $r = 0,473$), односно

употреба хероина доводила је до значајног умножавања везивног ткива у срчаном мишићу.

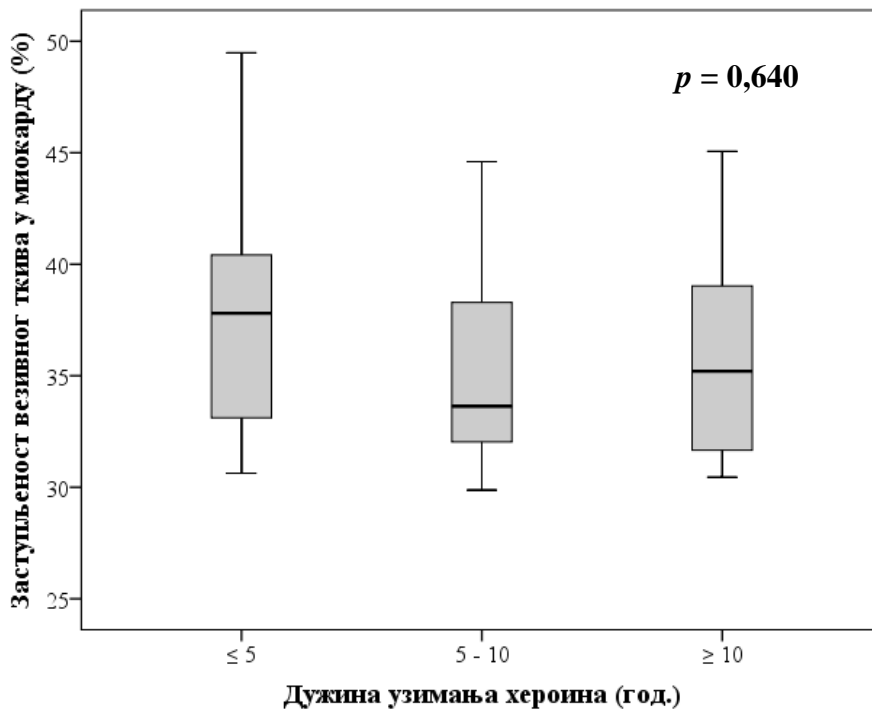


Графикон 3. Поређење средњих вредности процентуалне заступљености везивног ткива међу испитиваним групама

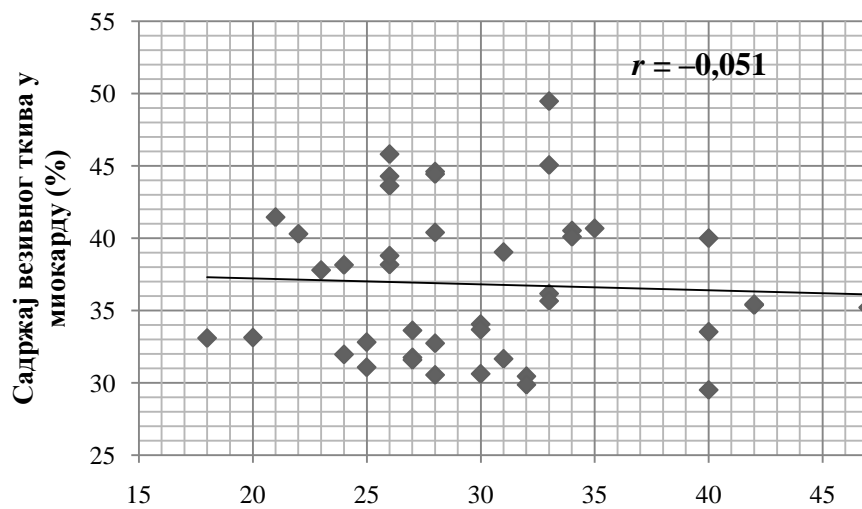
Употребом једнофакторског *ANOVA* теста, није утврђена статистички значајна разлика у заступљености везивног ткива међу групама формираним на основу дужине употребе хероина ($F = 0,456$; $p = 0,640$), односно утврђено је да дужина употребе хероина не утиче на значајну промену удела везивног ткива у миокарду хероиномана (графикон 4).

На графикону 5 приказана је међузависност вредности процентуалне заступљености везивног ткива и година старости корисника хероина. Корелационом анализом утврђена је мала негативна корелација међу овим параметрима ($r = -0,051$).

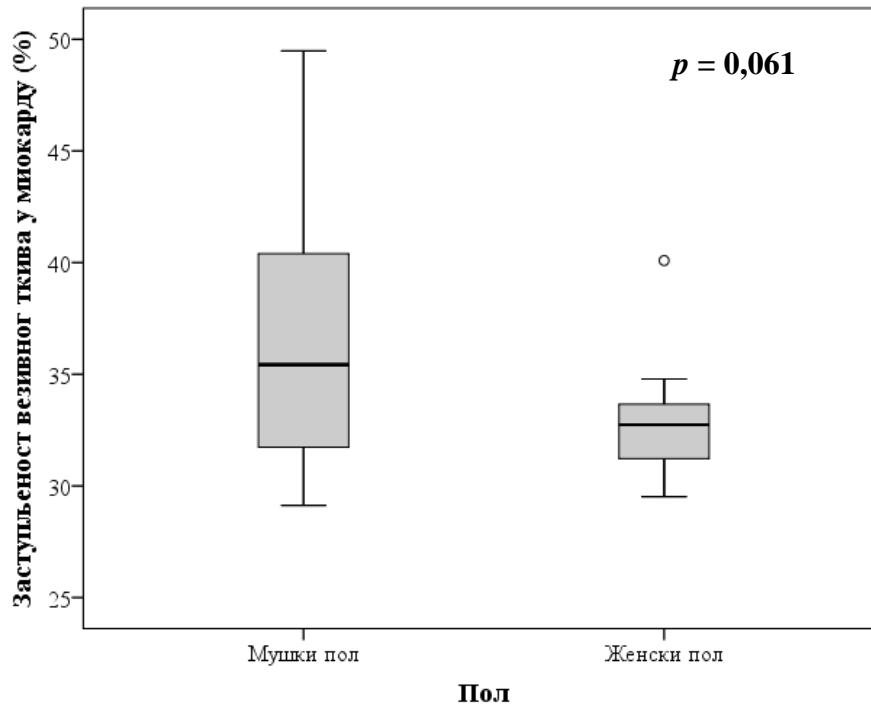
Ман–Витнијевим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у процентуалној заступљености везивног ткива у срчаном мишићу хероиномана у односу на пол ($z = -1,873$; $p = 0,061$; $r = 0,260$) (графикон 6).



Графикон 4. Поређење средњих вредности процентуалне заступљености везивног ткива међу групама хероиномана на основу дужине узимања хероина

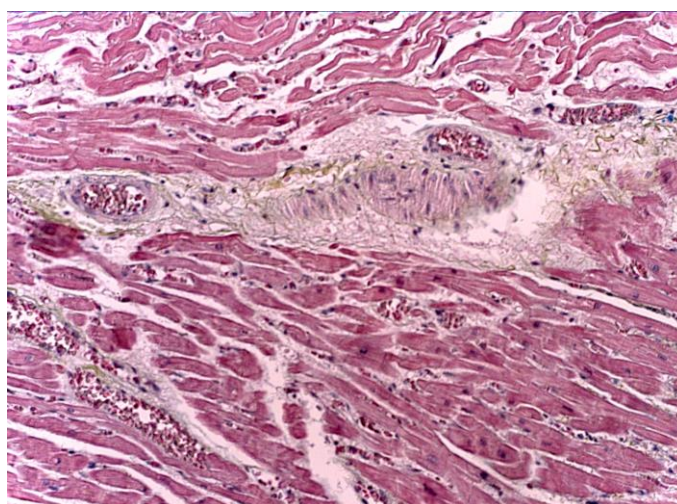


Графикон 5. Међузависност вредности процентуалне заступљености везивног ткива и година старости хероиномана

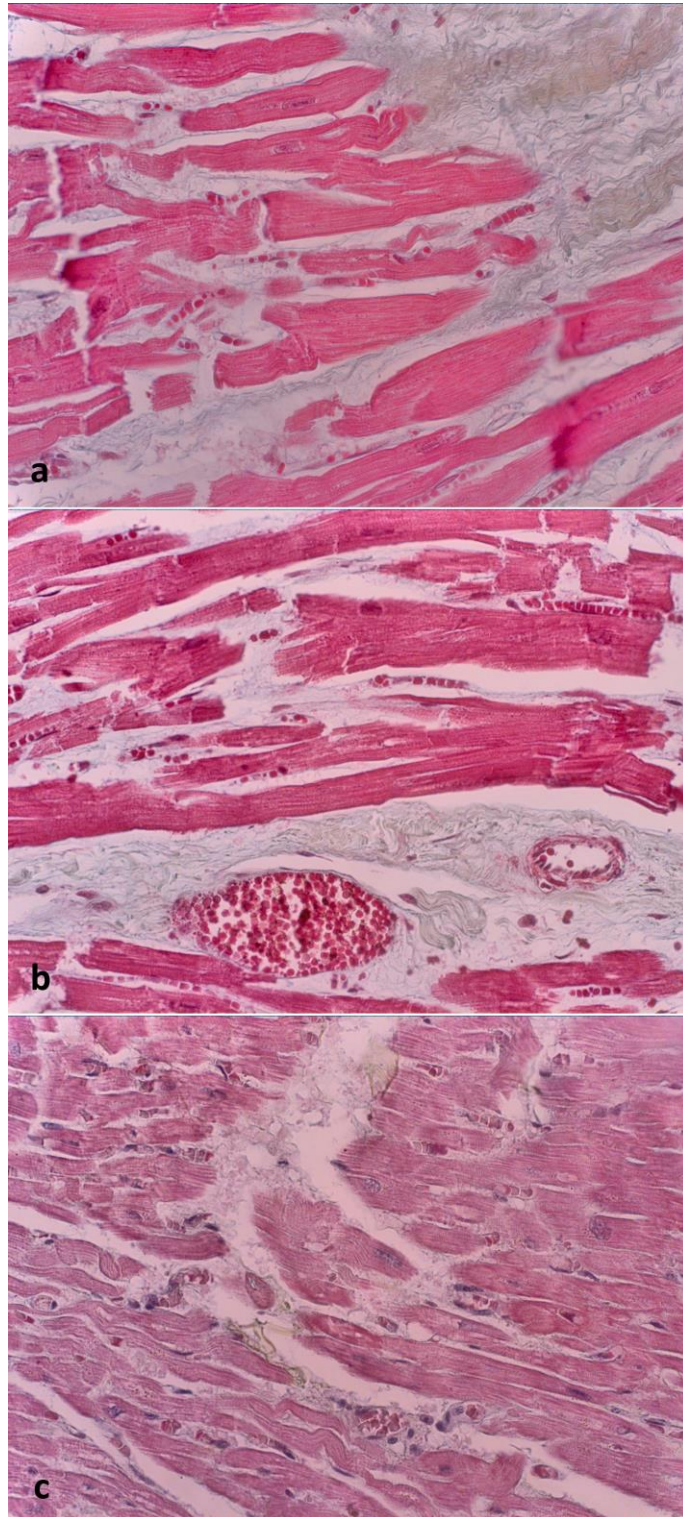


Графикон 6. Поређење средњих вредности процентуалне заступљености везивног ткива међу групама хероиномана на основу пола

Код свих хероиномана забележена је интерстицијална фиброза миокарда која је била разасута по миокарду и местимично уобличена у већа фиброзна поља (слика 12), а у 30 (71,43%) случајева хероиномана је забележена и периваскуларна фиброза (слика 11 и 12b).



Слика 11. Периваскуларна фиброза миокарда код хероиномана (модификовано Моватово пентахромско бојење, увећање 200x)



Слика 12. Фиброза миокарда код хероиномана:

- а) поље сливене фиброзе миокарда; б) поље периваскуларне фиброзе миокарда;
с) дифузна фиброза миокарда са зоном хипертрофичних (десно) и атрофичних кардиомиоцита (лево) (модификовано Моватово пентахромско бојење, увећање 400х)

4.3. Анализа дебљине кардиомиоцита

Анализом дебљине кардиомиоцита, нису утврђене статистички значајне разлике између зида десне коморе, зида леве коморе и међукоморне преграде, тако да су рачунате просечне вредности по сваком случају и приказане у табели 6.

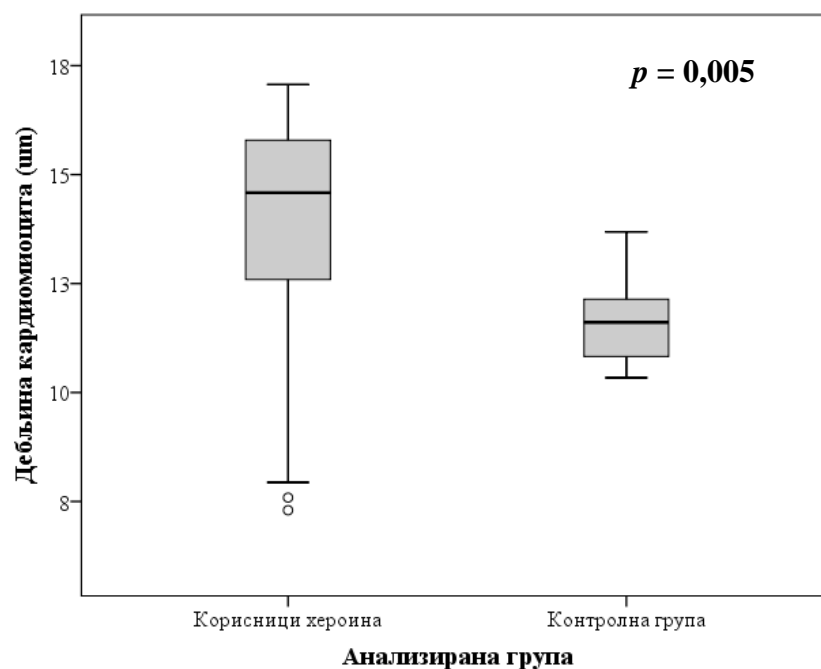
Табела 6. Просечне вредности дебљине кардиомиоцита код анализираних случајева

Редни број	Дебљина кардиомиоцита [μm]	
	Хероиномани	Контролна група
1.	14,414	13,686
2.	14,814	12,018
3.	14,265	12,18
4.	15,789	11,234
5.	16,994	12,142
6.	16,298	10,828
7.	14,245	11,985
8.	15,452	10,816
9.	15,958	11,169
10.	15,819	10,34
11.	12,644	
12.	8,022	
13.	7,588	
14.	10,774	
15.	14,376	
16.	12,592	
17.	7,936	
18.	9,209	
19.	7,298	
20.	11,006	
21.	15,144	
22.	16,488	
23.	15,06	
24.	15,725	
25.	15,421	
26.	14,439	
27.	15,652	
28.	13,547	
29.	15,323	
30.	14,731	
31.	14,389	

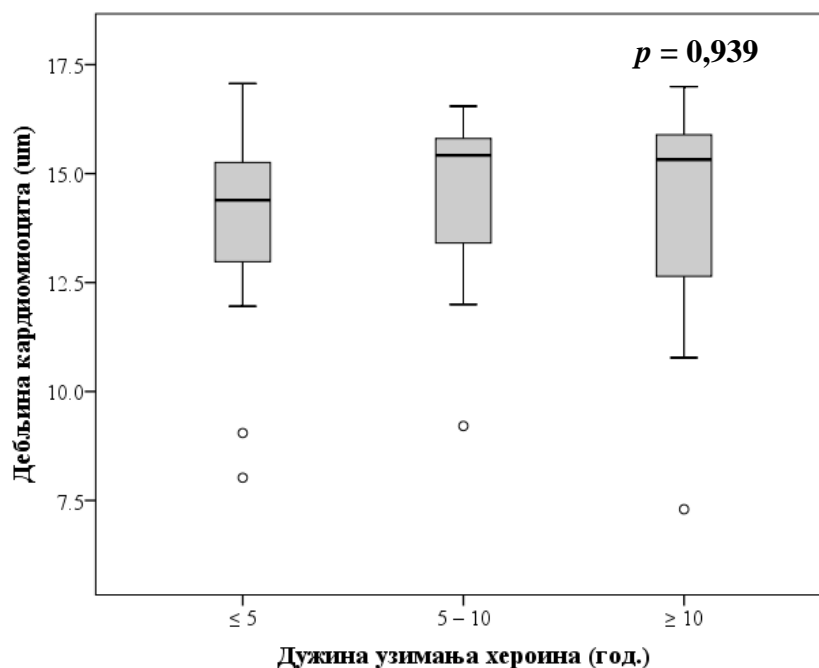
32.	17,06	
33.	13,365	
34.	15,891	
35.	15,987	
36.	16,547	
37.	17,068	
38.	11,998	
39.	15,589	
40.	11,956	
41.	12,657	
42.	9,047	
\bar{X}	13,776	11,64
SD	2,793	0,967

Ман–Витнијевим тестом утврђено је да код хероиномана постоје статистички значајно дебљи кардиомиоцити у односу на контролну групу ($z = -2,786$; $p = 0,005$; $r = 0,386$) (графикон 7).

Употребом једнофакторског *ANOVA* теста за поређење вредности дебљине кардиомиоцита код хероиномана, а међу групама формираним на основу дужине употребе хероина, доказано је да се дебљина кардиомиоцита не мења статистички значајно са повећањем дужине употребе хероина на више од 5 година ($F = 0,063$; $p = 0,939$) (графикон 8).

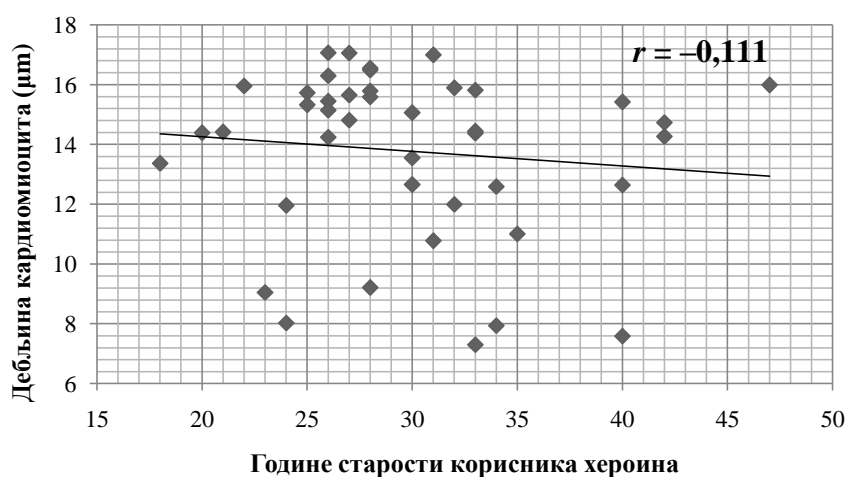


Графикон 7. Поређење средњих вредности дебљине кадиомиоцита међу испитиваним групама



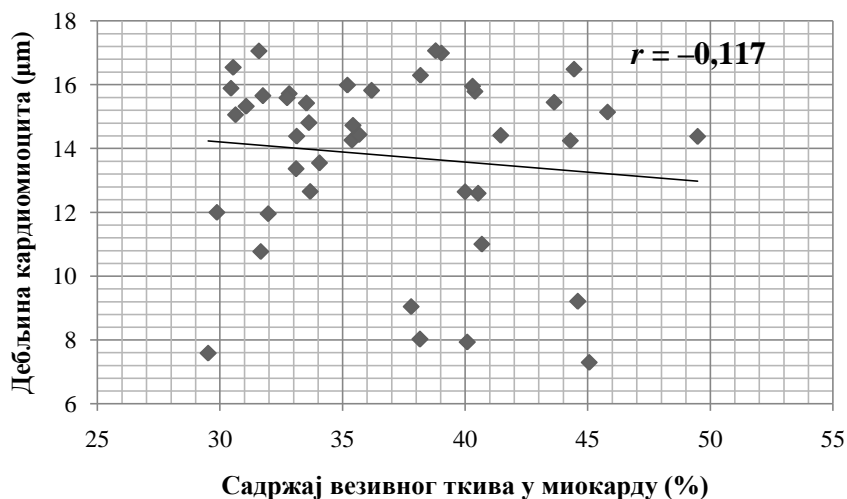
Графикон 8. Поређење средњих вредности дебљине кадиомиоцита међу групама формираним на основу дужине употребе хероина

На графикону 9 приказана је међузависност вредности дебљине кардиомиоцита и година старости корисника хероина. Корелационом анализом утврђена је мала негативна корелација међу овим параметрима ($r = -0,111$), односно да се са старошћу хероиномана дебљина кардиомиоцита дискретно смањује.



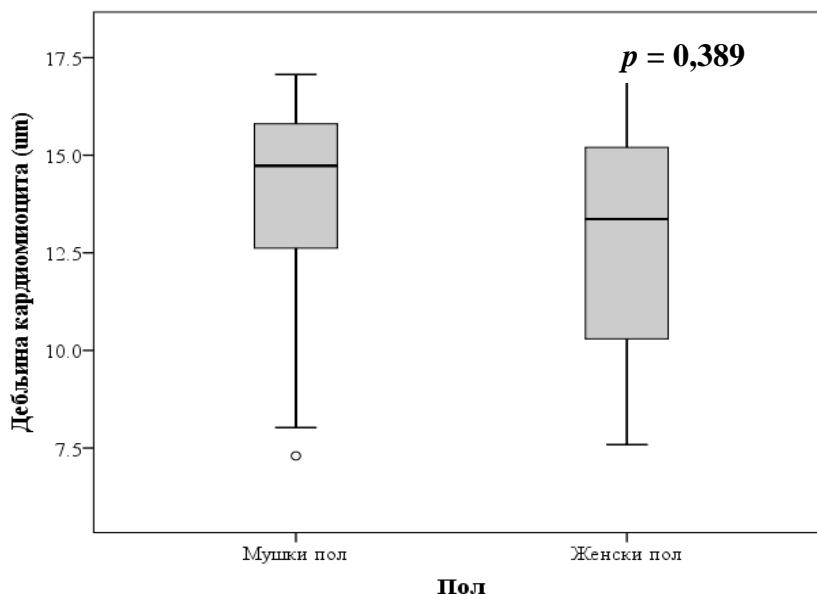
Графикон 9. Међузависност вредности дебљине кардиомиоцита и година старости хероиномана

На графикону 10 приказана је међузависност вредности дебљине кардиомиоцита и садржаја везивног ткива у миокарду код корисника хероина. Корелационом анализом утврђена је и међу овим параметрима, мала негативна корелација ($r = -0,117$), односно да се са повећањем садржаја везивног ткива у миокарду дебљина кардиомиоцита дискретно смањује.



Графикон 10. Међузависност вредности дебљине кардиомиоцита и садржаја везивног ткива у миокарду код хероиномана

Ман–Витнијевим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у процентуалној заступљености везивног ткива у срчаном мишићу хероиномана у односу на пол ($z = -0,861$; $p = 0,389$; $r = 0,119$) (графикон 11).

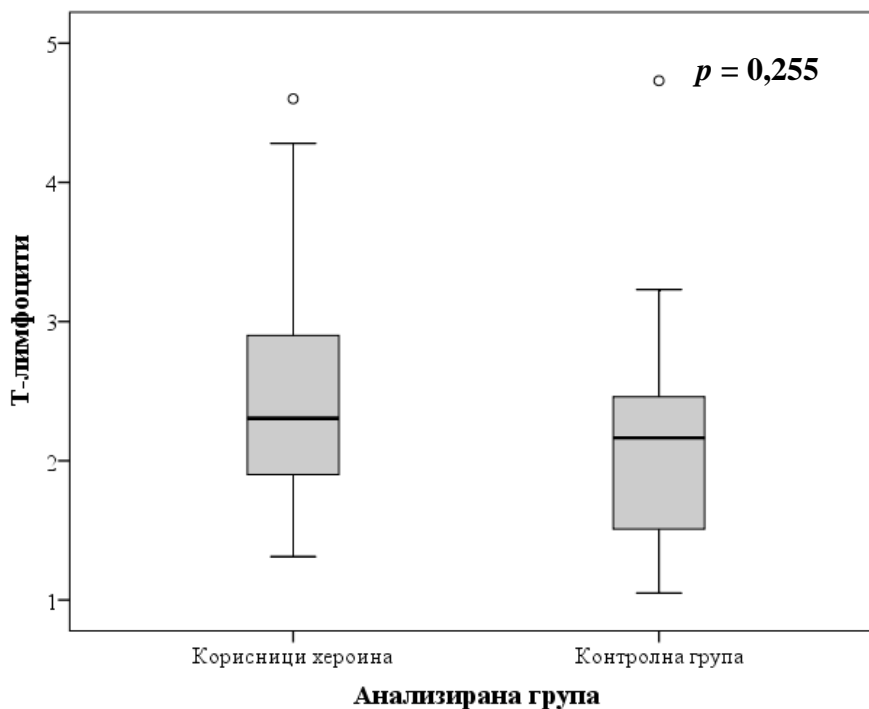


Графикон 11. Поређење средњих вредности дебљине кадиомиоцита у односу на пол хероиномана

4.4. Анализа броја ћелија запаљења и мастоцита

4.4.1. Анализа броја Т–лимфоцита у испитиваним групама

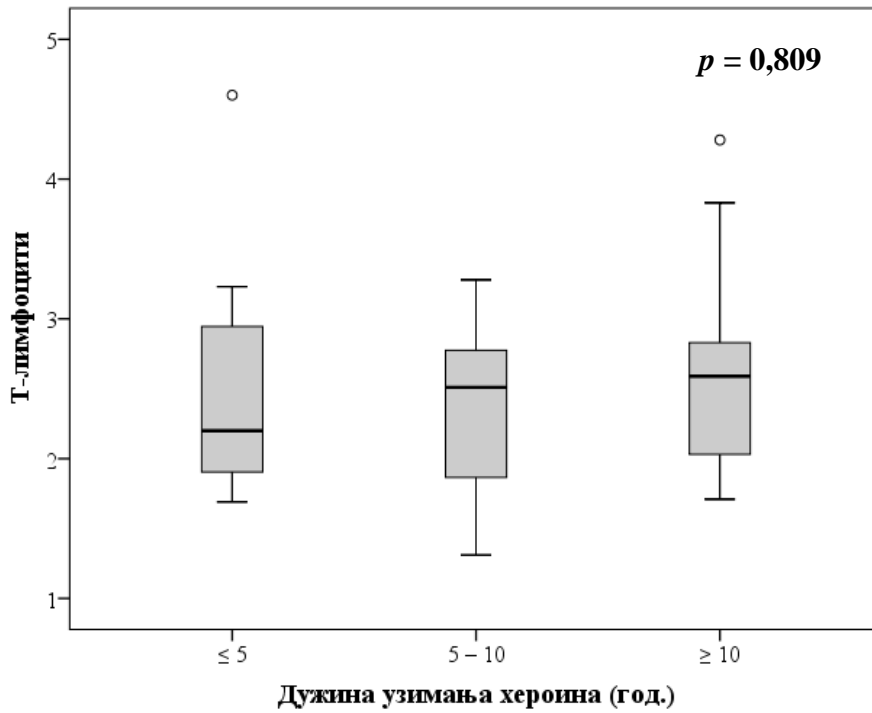
Ман–Витнијевим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у броју Т–лимфоцита у мишићу срца код корисника хероина у односу на контролну групу ($z = -1,138$; $p = 0,255$; $r = 0,035$), односно да употреба хероина не доводи до значајног повећања броја Т–лимфоцита у миокарду (графикон 12).



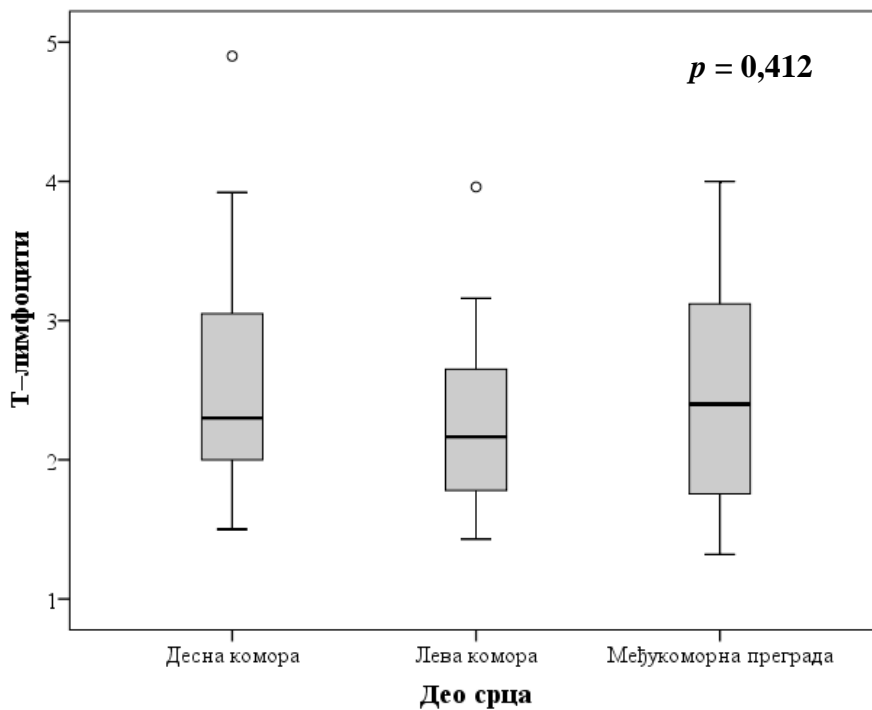
Графикон 12. Поређење средњих вредности броја Т–лимфоцита међу испитиваним групама

Крускал–Волисовим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у броју Т–лимфоцита у мишићу срца код дефинисаних група корисника хероина у односу на дужину узимања хероина ($p = 0,809$), односно да се са петогодишњим повећањем дужине употребе хероина, број Т–лимфоцита у мишићу срца не повећава значајно (графикон 13).

Истим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у броју Т–лимфоцита у различитим деловима срца (десној комори, левој комори и међукоморној прегради срца) код хероиномана ($p = 0,412$), односно да не постоји део срца у коме би било израженије накупљање овог типа запаљењских ћелија (графикон 14).

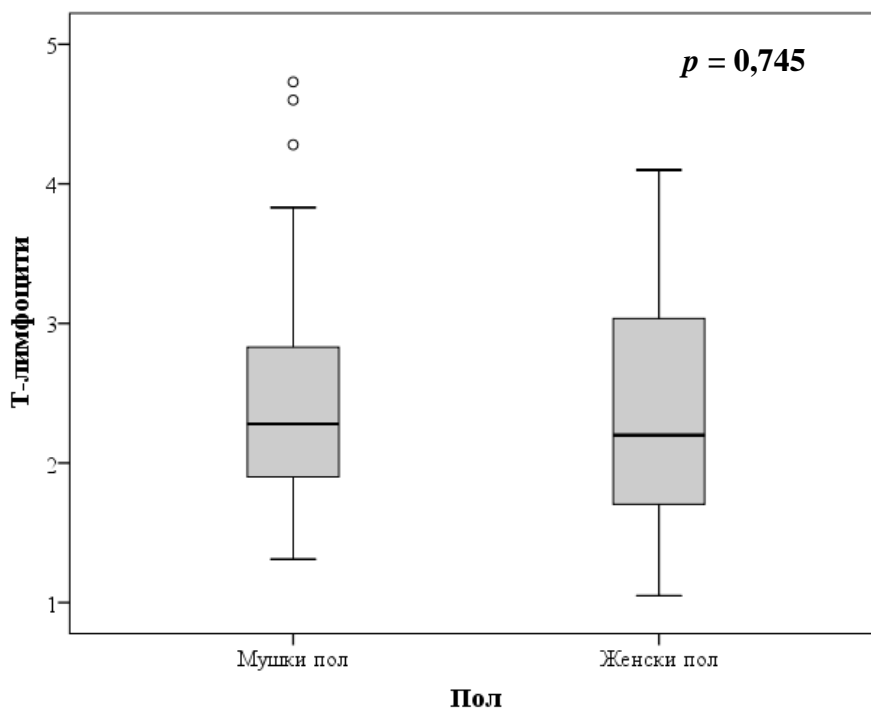


Графикон 13. Поређење средњих вредности броја Т-лимфоцита међу групама формираним на основу дужине узимања хероина

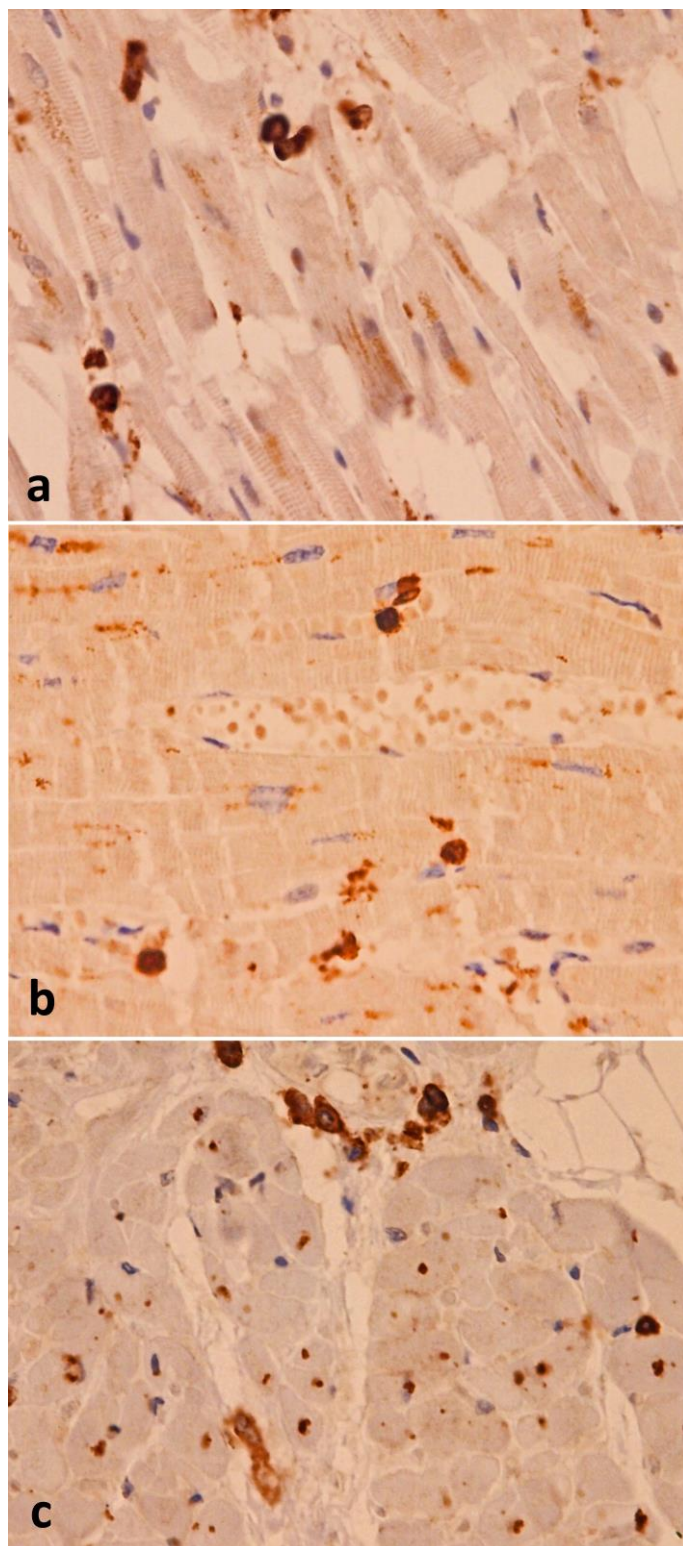


Графикон 14. Поређење средњих вредности броја Т-лимфоцита у различитим деловима срца

Ман–Витнијевим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у броју Т–лимфоцита у срчаном мишићу хероиномана у односу на пол ($z = -0,325$; $p = 0,745$; $r = 0,049$) (графикон 15).



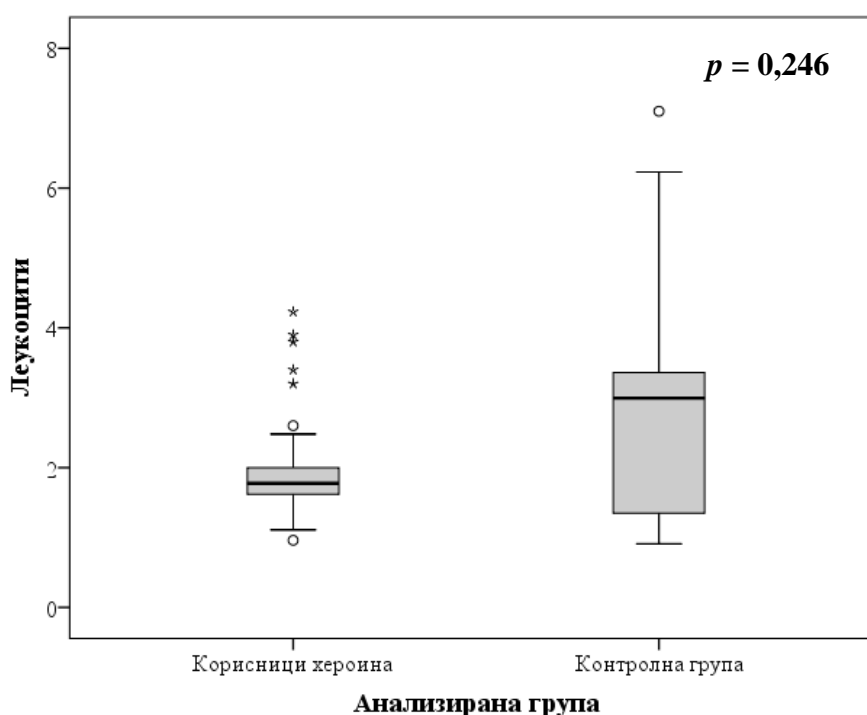
Графикон 15. Поређење средњих вредности броја Т–лимфоцита у односу на пол корисника хероина



Слика 13. Имунохистохемијска позитивност Т-лимфоцита у миокарду на *CD45RO*: дифузно између појединачних кардиомиоцита (a, b), груписани периваскуларно у близини липоматозне трансформације миокарда (c) (увећање 400x)

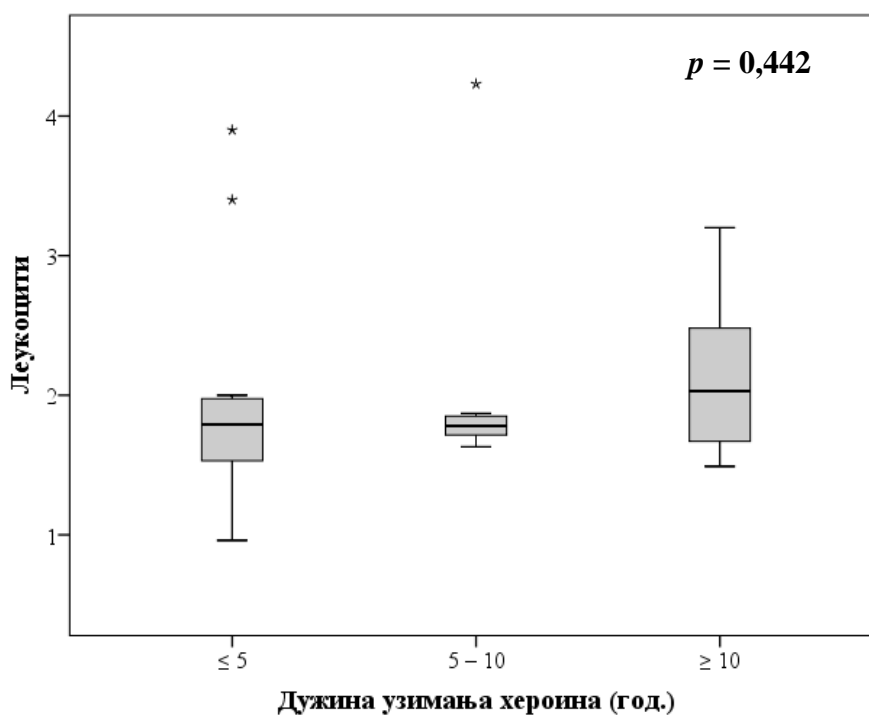
4.4.2. Анализа броја леукоцита у испитиваним групама

Ман–Витнијевим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у броју леукоцита у срчаном мишићу хероиномана у односу на контролну групу ($z = -1,161$; $p = 0,246$; $r = 0,161$). Контролна група је просечно имала већи број леукоцита у миокарду у односу на хероиномане, али статистичка анализа указује на то да употреба хероина не доводи до значајног пада броја леукоцита у миокарду (графикон 16).



Графикон 16. Поређење средњих вредности броја леукоцита међу испитиваним групама

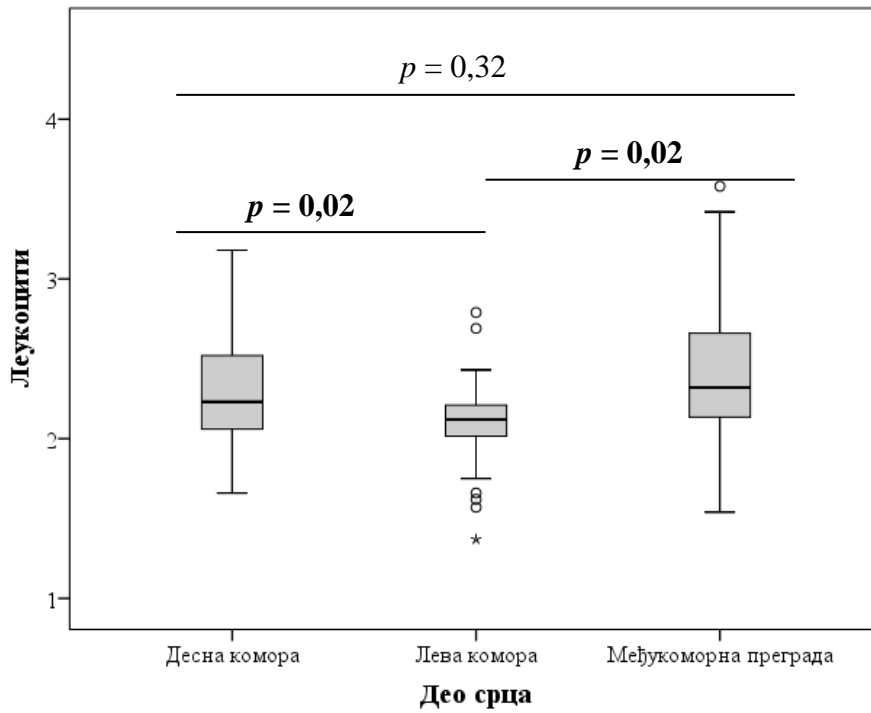
Крускал–Волисовим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у броју леукоцита у срчаном мишићу код дефинисаних група хероиномана у односу на дужину узимања хероина ($p = 0,442$), односно да петогодишњи пораст дужине употребе хероина не утиче значајно на промену броја ових ћелија у миокарду (графикон 17).



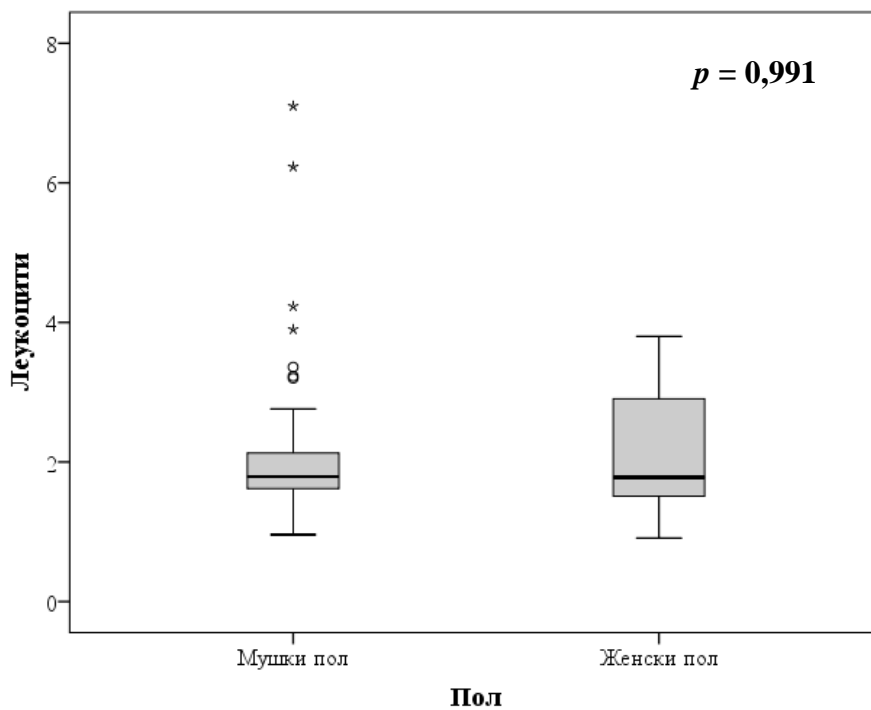
Графикон 17. Поређење средњих вредности броја Т–лимфоцита међу групама формираним на основу дужине узимања хероина

Крускал–Волисовим тестом утврђено је да постоји статистички значајна разлика у броју леукоцита у различитим деловима срца (десној комори, левој комори и међукоморној прегради срца) код хероиномана ($p = 0,004$), односно да постоји део срца за који леукоцити имају већи афинитет у односу на остале делове. Због тога је урађена накнадна анализа. Накнадном анализом и коришћењем Ман–Витнијевог теста, утврђено је да у левој комори срца забележен статистички значајно мањи број леукоцита у односу на десну комору ($z = -2,324$; $p = 0,02$; $r = 0,322$) и у односу на међукоморну преграду ($z = -3,163$; $p = 0,02$; $r = 0,439$), односно да лева комора није место ка коме леукоцити имају већи афинитет. Број леукоцита забележен у десној комори срца и међукоморној прегради није се статистички значајно разликовао код хероиномана ($z = -0,994$; $p = 0,32$; $r = 0,139$) (графикон 18).

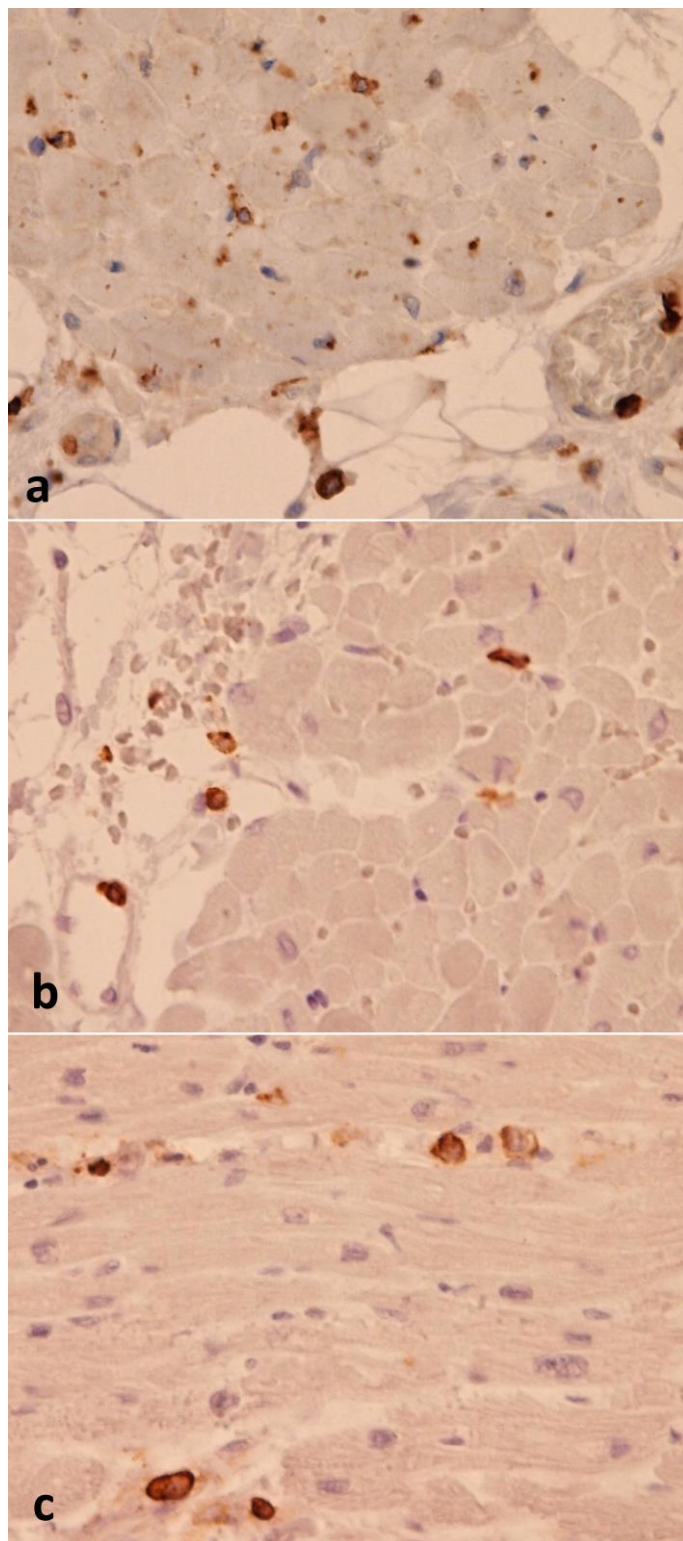
Ман–Витнијевим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у броју леукоцита у срчаном мишићу код хероиномана у односу на пол ($z = -0,011$; $p = 0,991$; $r = 0,002$) (графикон 19).



Графикон 18. Поређење средњих вредности броја леукоцита у различитим деловима срца



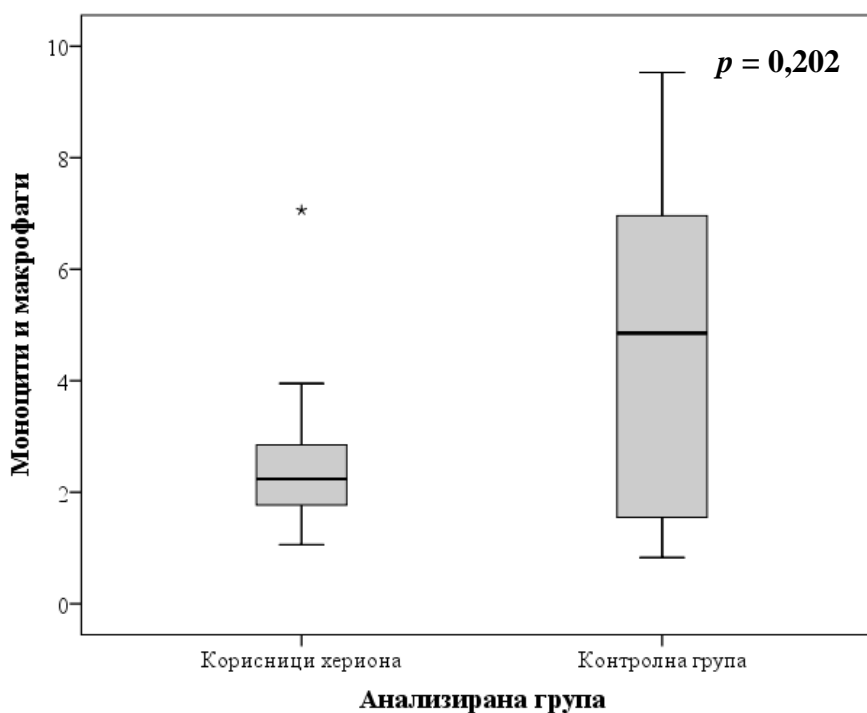
Графикон 19. Поређење средњих вредности броја леукоцита у односу на пол хероиномана



Слика 14. Леукоцитна имунохистохемијска позитивност у миокарду на *LCA*: интра- и периваскуларно (a, b), дифузно појединачно између кардиомиоцита (c) (увећање 400x)

4.4.3. Анализа броја моноцита и макрофага у испитиваним групама

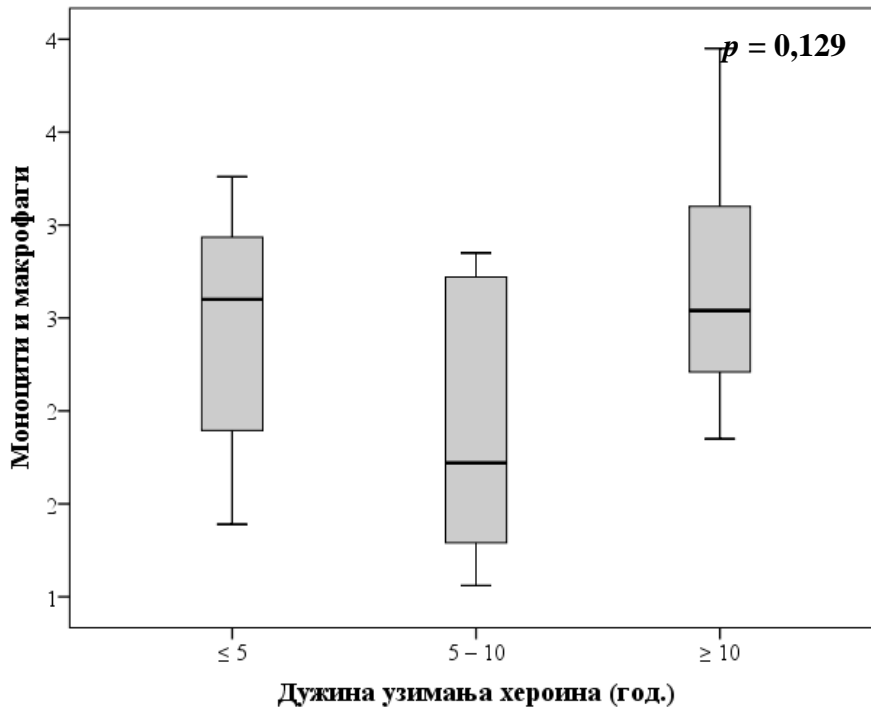
Ман–Витнијевим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у броју моноцита и макрофага у срчаном мишићу хероиномана у односу на контролну групу ($z = -1,277$; $p = 0,202$; $r = 0,177$). Како је контролна група имала већи број моноцита и макрофага у односу на хероиномане, ова анализа је утврдила да употреба хероина не доводи до значајног пада броја моноцита и макрофага у миокарду (графикон 20).



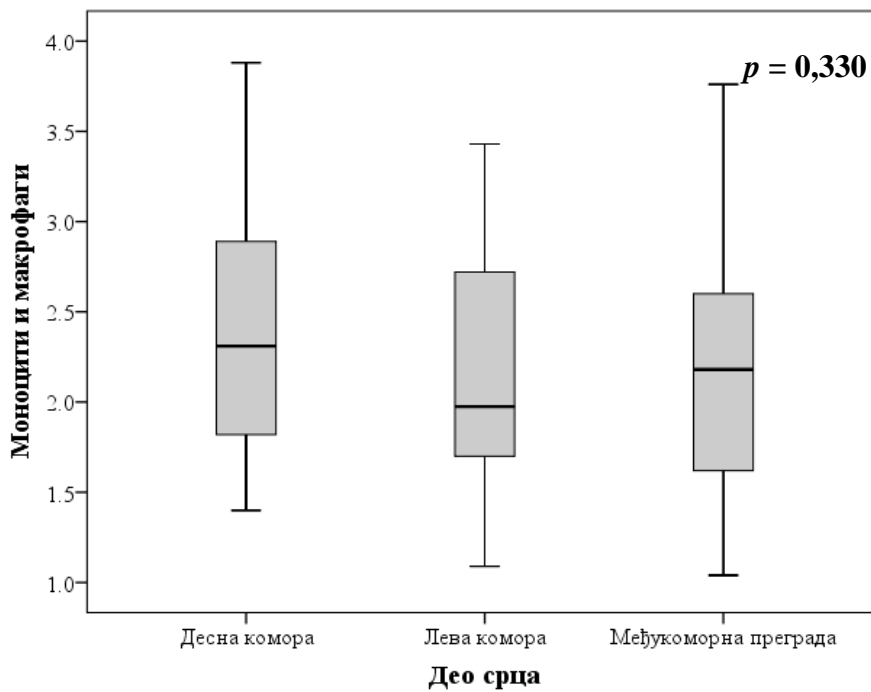
Графикон 20. Поређење средњих вредности броја моноцита и макрофага међу испитиваним групама

Употребом једнофакторског *ANOVA* теста, није утврђена статистички значајна разлика у броју моноцита и макрофага међу групама формираним на основу дужине употребе хероина ($F = 2,206$; $p = 0,129$), односно утврђено је да дужина употребе хероина не утиче значајно на промену броја моноцита и макрофага у миокарду (графикон 21).

Истим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у броју моноцита и макрофага у различитим деловима срца (десној комори, левој комори и међукоморној прегради срца) хероиномана ($F = 1,121$; $p = 0,330$) (графикон 22).

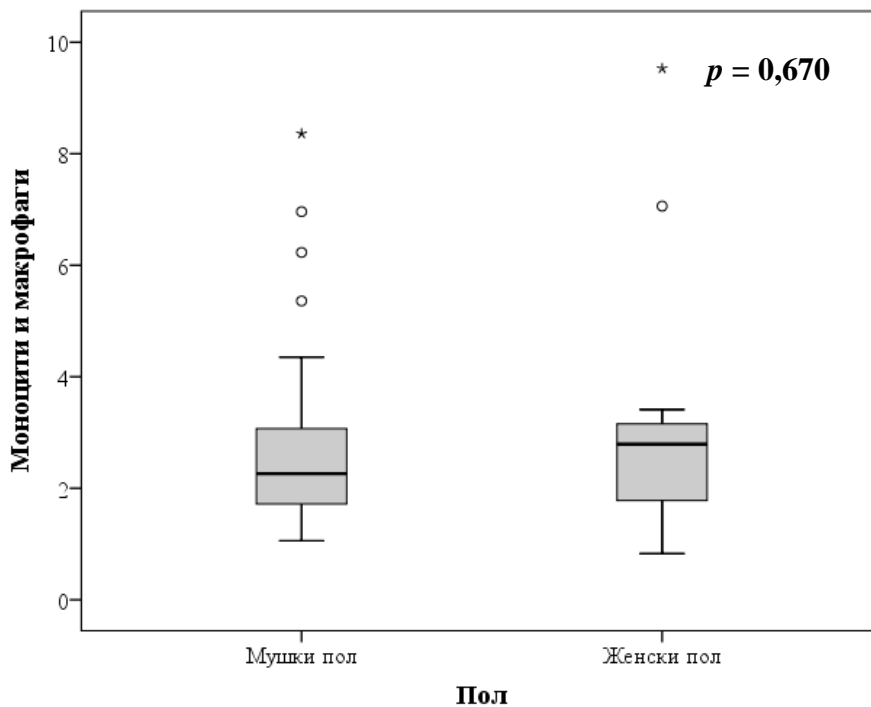


Графикон 21. Поређење средњих вредности броја моноцита и макрофага међу групама формираним на основу дужине узимања хероина

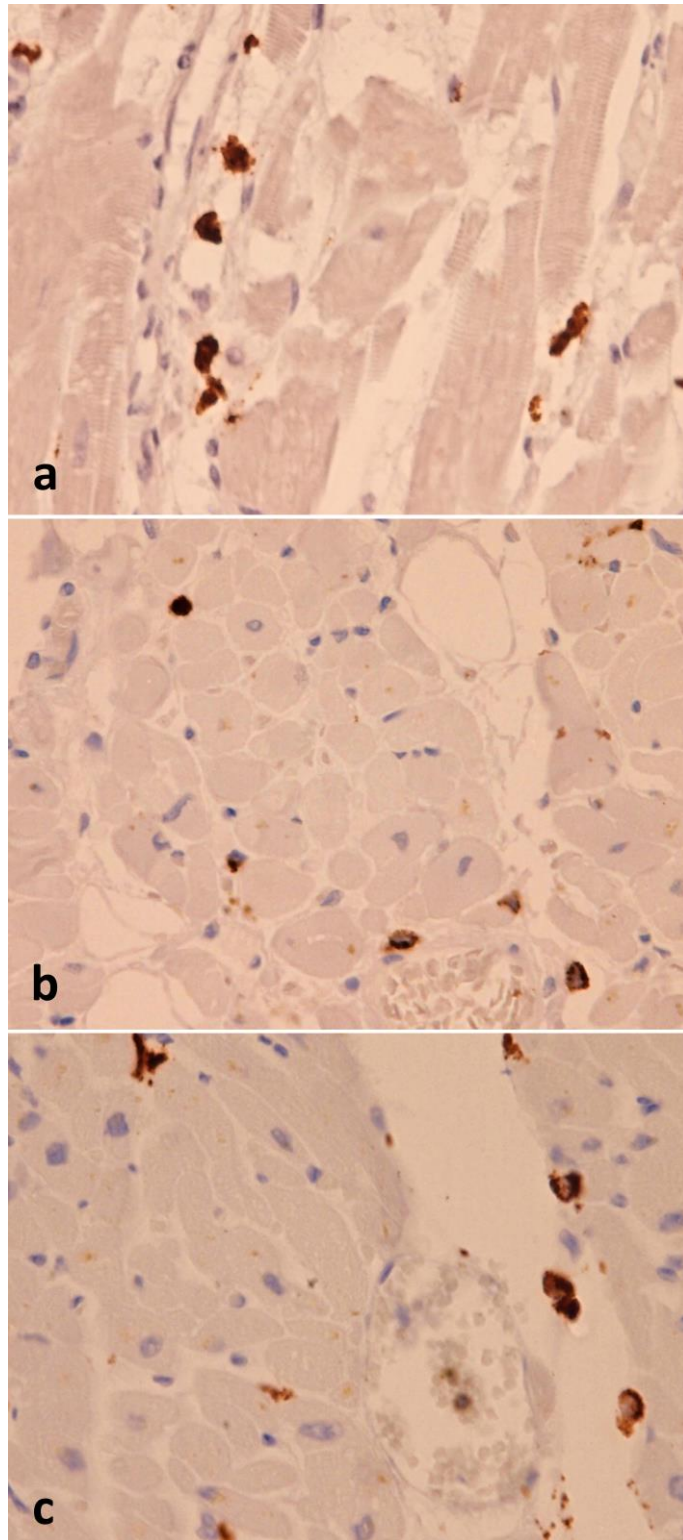


Графикон 22. Поређење средњих вредности броја моноцита и макрофага у различитим деловима срца

Ман–Витнијевим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у броју леукоцита у срчаном мишићу хероиномана у односу на пол ($z = -0,426$; $p = 0,670$; $r = 0,059$) (графикон 23).



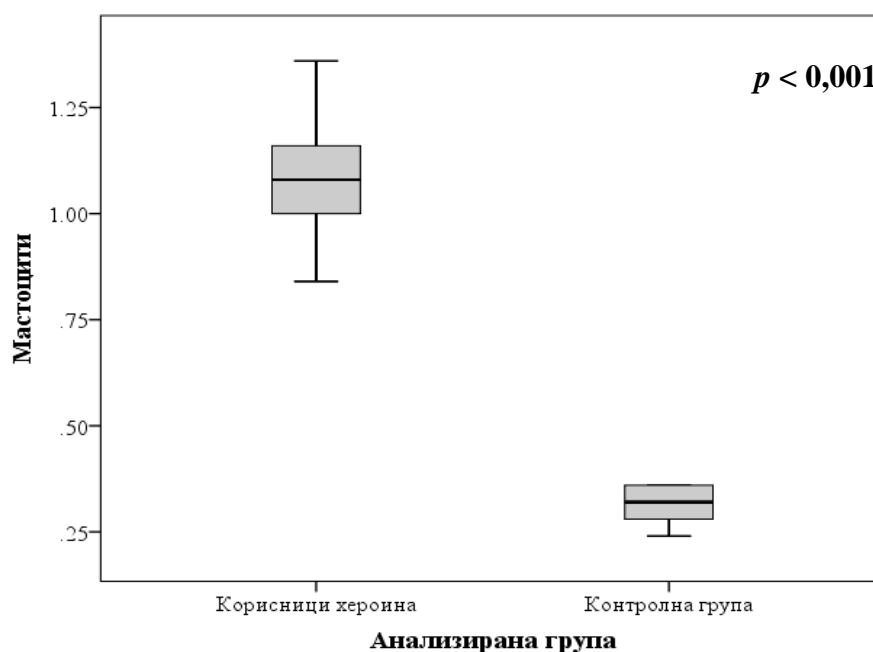
Графикон 23. Поређење средњих вредности броја моноцита и макрофага у односу на пол хероиномана



Слика 15. Имунохистохемијска позитивност моноцита и макрофага у миокарду на *CD68* са претежним периваскуларним и местимичним присуством између кардиомиоцита (увећање 400x)

4.4.4. Анализа броја мастоцита у испитиваним групама

Т–тестом за независне узорке утврђено је да постоји статистички значајна разлика у броју мастоцита у срчаном мишићу хероиномана у односу на контролну групу ($p < 0,001$). Број мастоцита био је значајно већи код хероиномана у односу на контролну групу и ова разлика била је значајнија у односу на све остале праћене параметре током истраживања (графикон 24).

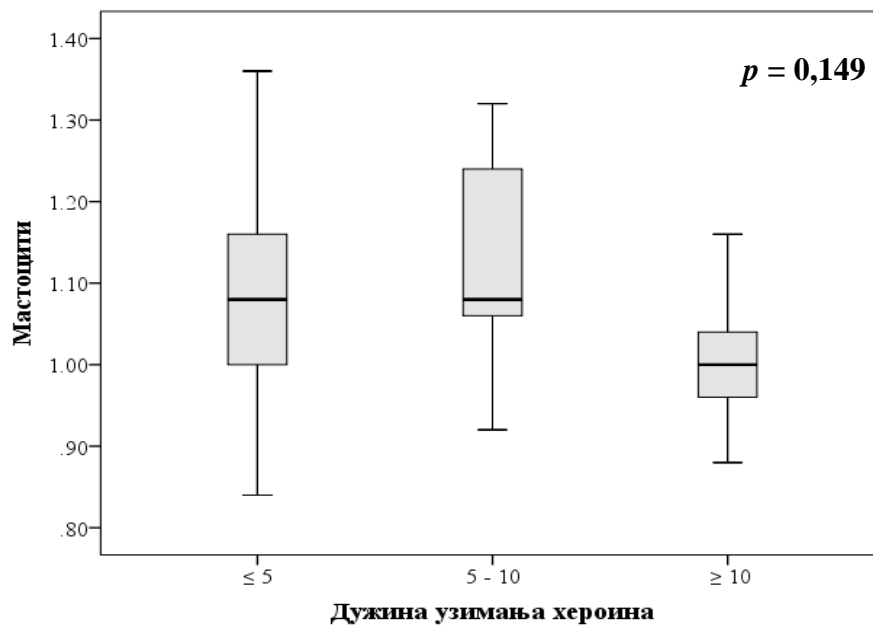


Графикон 24. Поређење средњих вредности броја мастоцита међу испитиваним групама

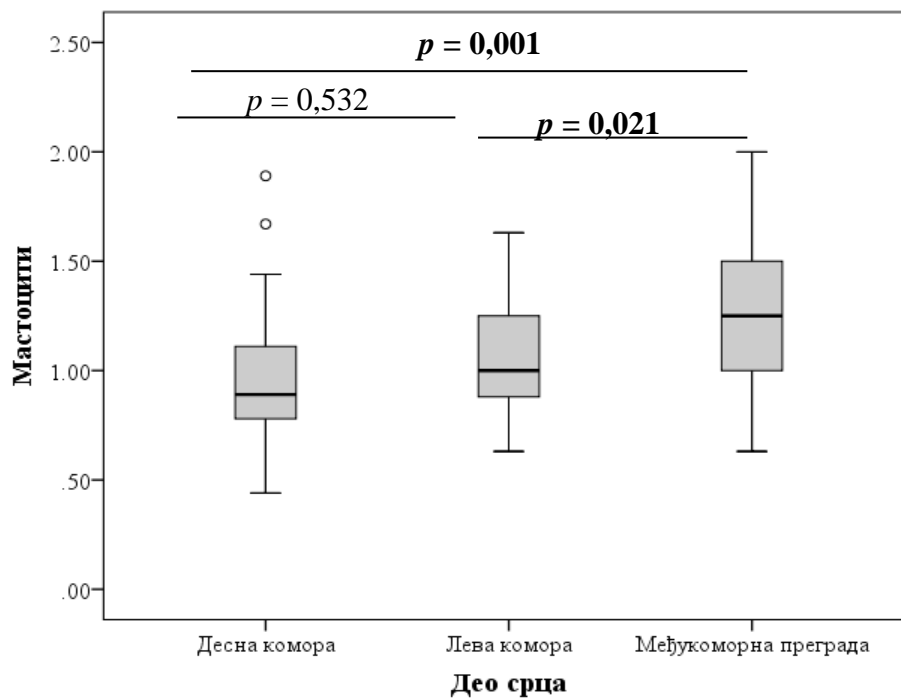
Употребом једнофакторског *ANOVA* теста, није утврђена статистички значајна разлика у броју мастоцита међу групама формираним на основу дужине употребе хероина ($F = 2,043$; $p = 0,149$), што указује на то да се број мастоцита не мења значајно током пораста дужине трајања хероиноманије (графикон 25).

Употребом једнофакторског *ANOVA* теста, утврђено је да постоји статистички значајна разлика у броју мастоцита у различитим деловима срца корисника хероина ($F = 7,625$; $p = 0,001$). У међукоморној прегради срца постоји статистички значајно већи број мастоцита у односу на десну комору ($p = 0,001$), али и у односу на леву комору ($p = 0,021$). Број мастоцита забележен у десној и левој комори срца није се статистички значајно разликовао код хероиномана ($p = 0,532$). Овакав налаз указује на то да је код

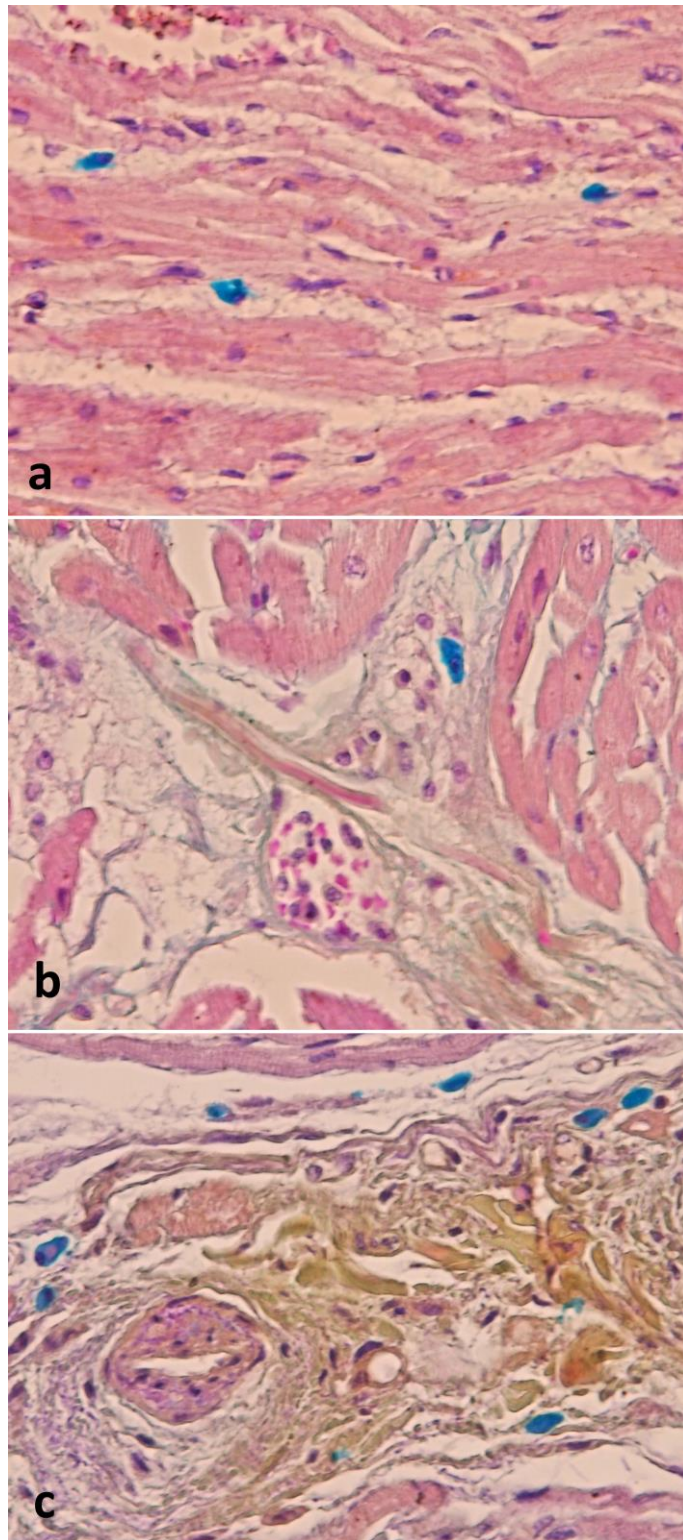
испитиваних хероиномана, део срца са значајно највећим садржајем мастоцита била међукоморна преграда (графикон 26).



Графикон 25. Поређење средњих вредности броја мастоцита међу групама формираним на основу дужине узимања хероина

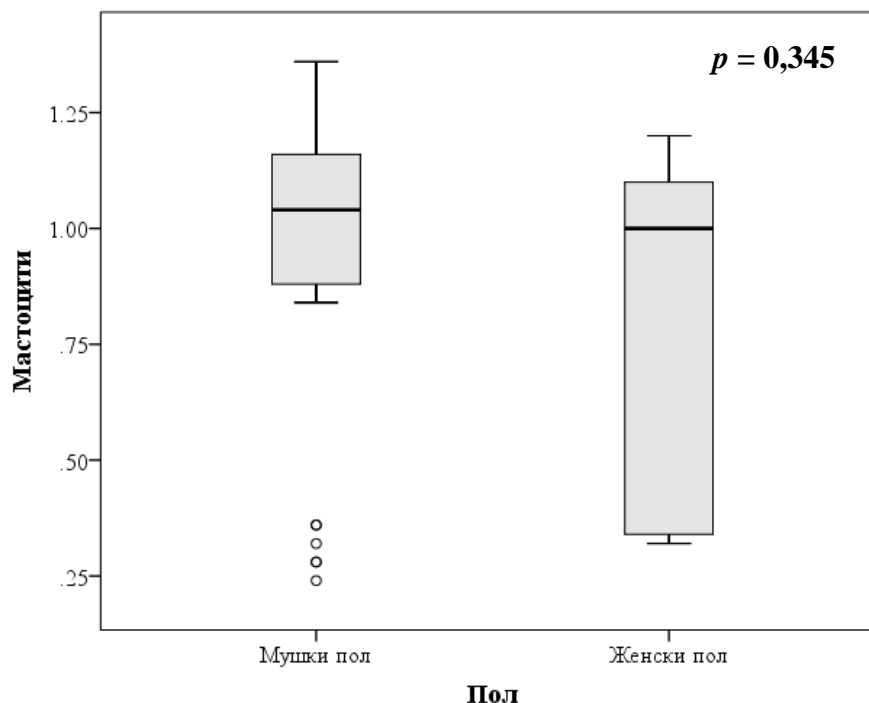


Графикон 26. Поређење средњих вредности броја мастоцита у различитим деловима срца



Слика 16. Мастоцити у миокарду хероиномана: а) појединачни мастоцити између хипертрофичних кардиомиоцита, б) умерена фиброза са липоматозном трансформацијом миокарда, с) мастоцити уз веће поље периваскуларне фиброзе миокарда (модификовано Моватово пентахромско бојење, увећање 400x)

Ман–Витнијевим тестом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у броју мастоцита у срчаном мишићу хероиномана у односу на пол ($z = -0,944$; $p = 0,345$; $r = 0,146$) (графикон 27).



Графикон 27. Поређење средњих вредности броја мастоцита у односу на пол хероиномана

4.4.5. Анализа међузависности броја ћелија запаљења и мастоцита

Корелационом анализом упоређене су вредности броја Т–лимфоцита, леукоцита, моноцита и макрофага и мастоцита у миокарду хероиномана. Између броја Т–лимфоцита и броја моноцита и макрофага утврђена је средња позитивна корелација ($r = 0,691$). Овакав резултат указује на чињеницу да се са порастом броја Т–лимфоцита, средњом стопом повећавао и број моноцита и макрофага у миокарду хероиномана.

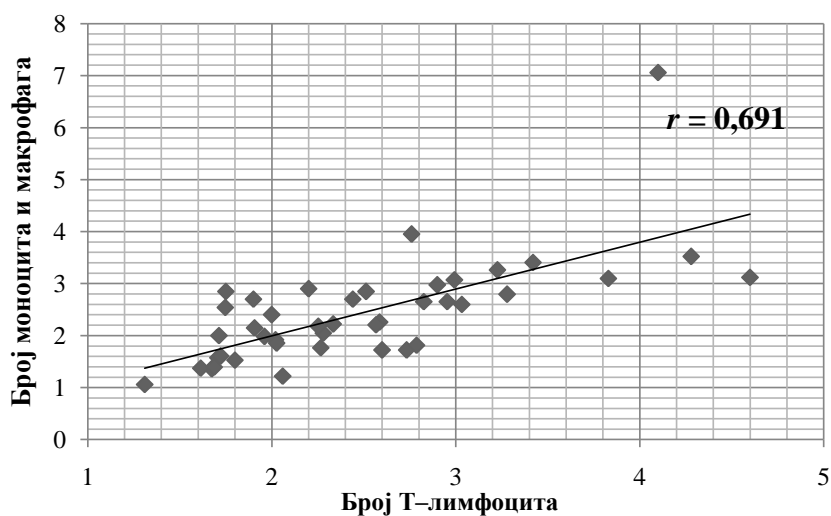
Између броја леукоцита и броја моноцита и макрофага утврђена је мала позитивна корелација ($r = 0,207$), односно повећање броја леукоцита дискретно је пратило и повећање броја моноцита и макрофага у миокарду хероиномана.

Мала негативна корелација утврђена је између броја Т–лимфоцита и броја леукоцита ($r = -0,020$), односно са повећањем броја Т–лимфоцита, број леукоцита је у ткиву срца хероиномана дискретно опадао.

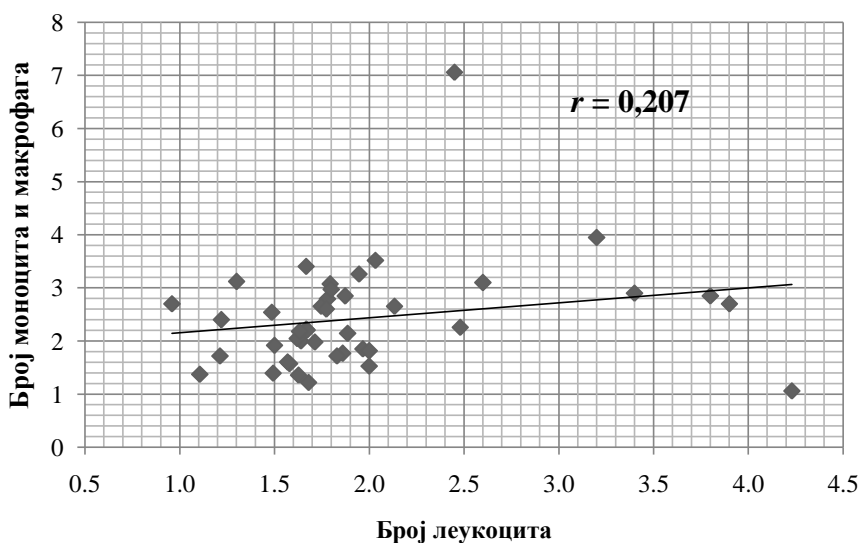
Између броја Т–лимфоцита и броја мастоцита утврђена је мала позитивна корелација ($r = 0,047$), односно повећање броја мастоцита дискретно је пратило и повећање броја Т–лимфоцита у миокарду хероиномана.

Између броја моноцита и макрофага и броја мастоцита утврђена је мала негативна корелација ($r = - 0,049$). Такође, мала негативна корелација нађена је и између броја леукоцита и броја мастоцита ($r = - 0,149$). Овакав налаз указује на то да са повећањем броја мастоцита дискретно опада број леукоцита, моноцита и макрофага.

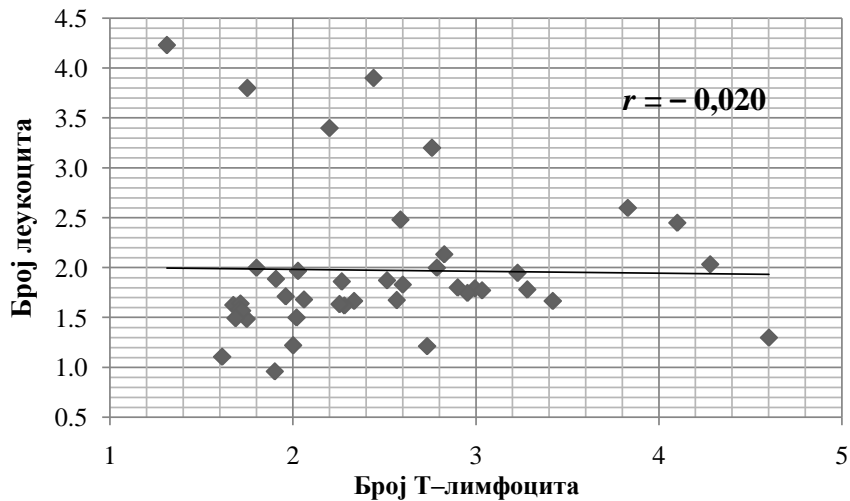
Ови резултати приказани су на графиконима 28 – 33.



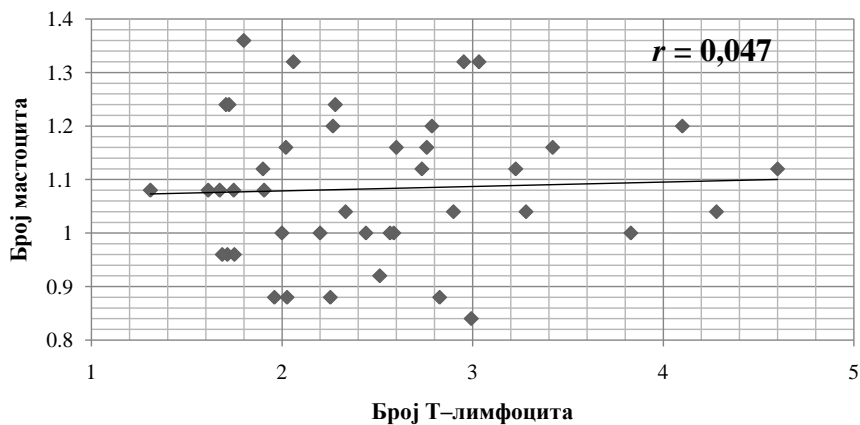
Графикон 28. Међузависност вредности броја Т–лимфоцита и броја моноцита и макрофага у миокарду код хероиномана



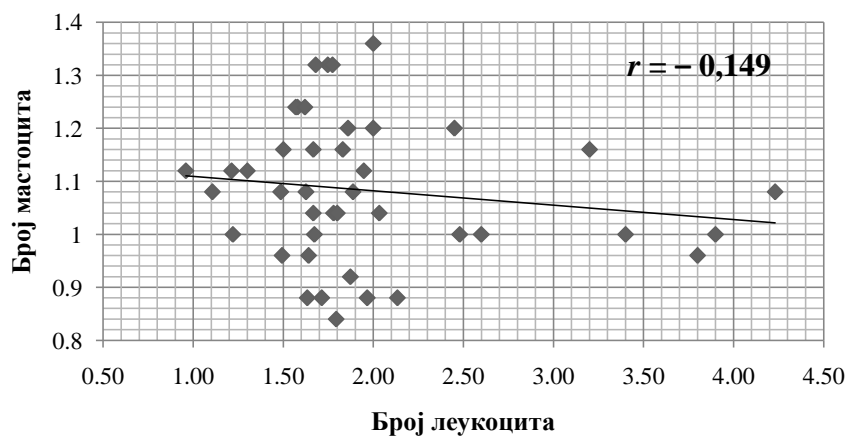
Графикон 29. Међузависност вредности броја леукоцита и броја моноцита и макрофага у миокарду код хероиномана



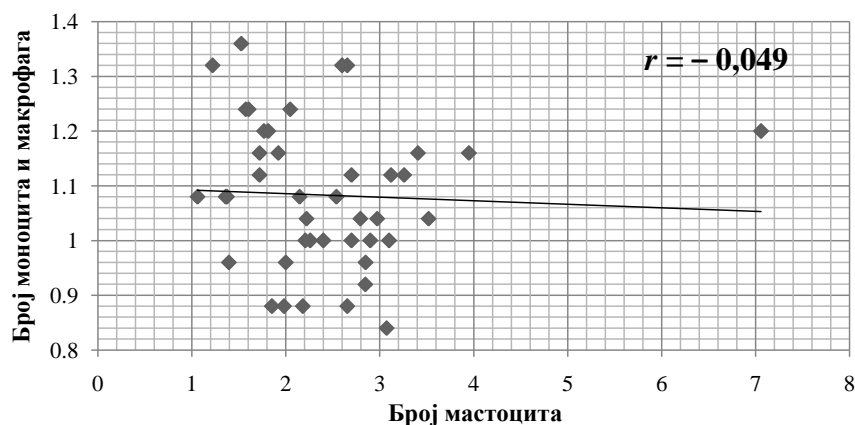
Графикон 30. Међузависност вредности броја Т-лимфоцита и броја леукоцита у миокарду код хероиномана



Графикон 31. Међузависност вредности броја Т-лимфоцита и броја мастоцита у миокарду код хероиномана



Графикон 32. Међузависност вредности броја леукоцита и броја мастоцита у миокарду код хероиномана



Графикон 33. Међузависност вредности броја моноцита и макрофага и броја мастоцита у миокарду код хероиномана

4.5. Хемијско–токсиколошка анализа

Хемијско–токсиколошком анализом, сем присуства хероина, доказано је присуство и неких других егзогених материја, а преглед нађених супстанци, као и број случајева код којих су нађене, дат је у табели 7. Због значаја налаза комбинације појединих токсичних супстанци (морфин, 6–МAM и диазепам; алкохол, кодеин и диазепам), дат је и њихов приказ.

Распон концентрација доказаних супстанци код хероиномана дат је у табели 8.

Табела 7. Преглед доказаних супстанци код хероиномана и број случајева код којих су нађене

Супстанца	Број случајева
Морфин	41/42 (97,62%)
6–МAM	39/42 (92,86%)
Алкохол	17/42 (40,48%)
Кодеин	21/42 (50%)
Метадон	7/42 (16,67%)
Морфин + 6–МAM + Диазепам	8/42 (19,05%)
Алкохол + Кодеин + Диазепам	5/42 (11,91%)

Табела 8. Преглед распона концентрација доказаних супстанци код хероиномана.

Супстанца	Концентрација
Морфин	0,08 – 2,03 <i>mg/L</i>
Морфин код хероиномана код којих је доказано и присуство алкохола	0,36 <i>mg/L</i> (средња вредност)
6-МAM	0,003 – 0,87 <i>mg/L</i>
Алкохол	0,03‰ – 3,05‰

5. ДИСКУСИЈА

Хероин (диацетилморфин) је супстанца чија је употреба забрањена, а која се најчешће уноси у организам интравенским ињекцијама. Хероиномани развијају толеранцију ако га користе хронично, што с временом захтева повећавање дозе, а ово даље доводи до погоршавања и продубљивања, како физичке, тако и психичке зависности. Изузетно непријатни нежељени ефекти који су повезани са престанком употребе опијата, доприносе њиховој сталној употреби [*Kosten и Hollister, 2000*].

Изенадна смрт због ињектирања хероина је важан и све већи глобални здравствени проблем [*WHO 1998*], јер уживаоци хероина имају више него 10 пута већи ризик од превремене смрти [*EMCDDA 1997; Hulse и сар., 1999*]. Већина смртних случајева везаних за хероин јавља се међу људима старосне доби око 30 година, што узрокује губитак много продуктивних година живота због илегалне употребе опијата [*Hulse и сар., 1999*]. Извештај *WHO* из 1998. године се фокусирао на овај проблем и позвао на додатне студије како би се идентификовали фактори ризика за превелике, фаталне дозе опиоида, а све у циљу побољшања превенција [*WHO 1998*]. Већ познати фактори ризика су истовремени унос алкохола [*Ruttenber и сар., 1990; Levine и сар., 1995*] и бензодиазепина [*Hammersley и сар., 1995*], као и губитак толеранције услед периода апстиненције [*Darke и Zador, 1996; White и Irvine, 1999*].

Смртни исход због ињекционе употребе хероина настаје углавном у року од 3 сата након апликације и то обично у друштву друге особе, која има могућност да помогне. [*Darke и Zador, 1996*]. Сходно томе, указано је на потребу едуковања корисника дрога о факторима ризика који су повезани са превеликим ризиком од употребе хероина и начином спасавања живота у случају предозирања [*Darke и Zador, 1996; WHO 1998; Powis и сар., 1999; Strang и сар., 1999*].

Међутим, механизам предозирања остаје слабо разјашњен, вероватно због тога што су различити фактори укључени у настанак фаталног исхода. Према *White и Irvine* [1999], примарни узрок смрти је респираторна депресија, па према њима студије фактора ризика треба усредсредити на фармаколошке ефекте хероина на респираторну функцију. Појединачна варијабилност у фармакокинетици хероина и његових активних метаболита, као и интеракција других лекова, може да допринесе знатном броју смртних случајева. Такође је истакнуто да развој толеранције на респираторну депресију може да утиче на постојање различитог временског периода до појаве

толеранције или еуфоричних ефеката. Због тога, било који индикатор дисконтинуиране употребе дрога у непосредном временском периоду пре смрти треба увек да се забележи. Нивои морфина у крви знатно варирају у смртним случајевима, а такође постоји значајно преклапање у мереној концентрацији између фаталних и нефаталних иноксикација [Wetli и сар., 1997]. Инфекције ХИВ–ом и хепатитисом, лоша исхрана и промене на срцу такође су потенцијални фактори ризика, јер су повезани са интравенском злоупотребом централних стимуланса и опиоида [Karch 1996].

У Стокхолму је 1985. године формиран регистар смртних случајева који су везани за злоупотребу супстанци, укључујући све смрти са форензичким доказима или анамнестичким информацијама о употреби дроге. Циљ овог извештаја био је проучавање сваке повезаности фаталних ињектираних доза хероина и наводних фактора ризика, као што су паралелни унос алкохола, бензодиазепина и других лекова, период апстиненције од хероина и фактора везаних за индивидуално здравље, стање исхране и срчану патологију. Студијска група је била ограничена на случајеве смртог тровања хероином, где су у крви били присутни и морфијум и 6–моноацетилморфин (6–МММ). Присуство 6–МММ је изабрано као критеријум инклузије, јер његово присуство потврђује унос хероина непосредно пре смрти. Раније студије хероиномана биле су фокусиране на концентрацију морфијума, а не на непосреднији и активнији метаболит, 6–МММ [Fugelstad и сар., 2003].

Ефекти хероина на кардиоваскуларни систем нису детаљно описивани у литератури у ранијем периоду. Према томе, за поређење може да послужи морфијум, који може проузроковати значајне, али и пролазне порасте крвног притиска и срчане фреквенције. Међутим, откривено је да морфијум и хероин код експерименталних паса узрокују пад системског крвног притиска, срчане фреквенције и ејекционе фракције [Brashear и сар., 1973; Pur–Shahriari и сар., 1967].

Ови ефекти се приписују ослобађању хистамина након употребе наркотика. Међутим, Brashear и сар. [1973] тврде да стабилни десни преткоморни притисак у њиховим студијама није указивао на поремећај у венском пуњењу, како је наведено у претходним студијама које су испитивале утицај морфина на хемодинамске ефекте. Они сугеришу да је повећан утицај парасимпатикуса (вагуса) у комбинацији са деловањем морфина доминантан фактор који узрокује смањење ејекционе фракције.

Paterna и сар. [1991] су проучавали ефекте хероина на изоловано, перфундовано срце зеца, и открили да није дошло до значајне промене у концентрацији срчаних

ензима, фреквенци срца, контрактилности или коронарном протоку крви. Они закључују да су кардиоваскуларни ефекти хероина засновани на системском, а не директном ефекту на срце. *Lipski* и сар. [1973] су проучавали електрокардиограме 75 асимптоматских особа у метадонском програму, укључујући 34 особе које су користиле хероин у последња 24 сата, и 41 особу која је користила хероин и друге лекове заједно са метадоном у последња 3 дана. Они су пронашли абнормалности код 61% испитиваних зависника, а на супрот њима, у контролној групи није било абнормалности. Најчешће, електрокардиограми су показивали продужење *QT* интервала, истакнуте *U* таласе и брадиаритмије. Аутори су закључили да ове абнормалности могу да имају улогу у развоју аритмија као потенцијалног механизма за акутне фаталне реакције на опијате, односно хероин. Високе дозе метадона повезане су са развојем *torsades de pointes* вентрикуларне тахикардије [*Lipski* и сар., 1973; *Krantz* и сар., 2002].

Познато је и да хероин изазива синдром који симулира акутну инсуфицијенцију миокарда, а који се манифестује као не-кардијални плућни едем, који се обично јавља брзо и нестаје у року од 24 до 48 сати [*Siegel* 1972; *Sporer* и *Dorn*, 2001]. Неки аутори сматрају да ово није узроковано кардиоваскуларном дисфункцијом, већ се сматра да је последица смањене вентилације и хипоксије [*Brashear* и сар., 1973; *Sporer* и *Dorn*, 2001].

Значајне морфолошке промене на плућима код интравенских зависника су добро познате, а *Kringsholm* и *Christoffersen* [1987] су детаљно приказали ове промене које су у складу и са ранијим истраживањима. Конгестија плућног ткива и фокална крварења у самом плућном ткиву су чест обдукциони налаз [*Siegel* 1972; *Rajs* и сар., 1984; *Helpern* и *Rho*, 1966; *Byers* и сар., 1975], а едем је добро позната компликација, нарочито приликом уноса хероина [*Steinberg* и *Karliner*, 1968; *Karliner* и сар., 1969; *Duberstein* и *Kaufman*, 1971].

Само кроз неколико истраживања описано је токсично оштећење хистолошке структуре миокарда због злоупотребе хероина [*Peon* и *Ruiz-Gonzalez*, 1991]

Такође, описан је и налаз хистиоцита који садрже хемосидерин у већини случајева [*Siegel* 1972; *Rajs* и сар., 1984; *Butz* 1969; *Kringsholm* и *Christoffersen*, 1987]. Чињеница да не постоји топографски однос са појавом нових фокалних крварења, чини се вероватним да хемосидероцити представљају последице ранијих епизода крварења. Патогенетски механизам ових крварења није познат, али су епизоде хипоксије сигурно веома важне [*Siegel* 1972]. Фокална фиброза може бити још једна последица ранијих

фокалних крварења. У другим органима нису видљива нити фокална крварења, нити хемосидероцити [*Kringsholm* и *Christoffersen*, 1982; *Kringsholm* и *Christoffersen*, 1984]. Ово неслагање се може објаснити специфичностима капилара у плућним алвеолама у односу на друге органе.

Према неким истраживањима акутни плућни едем који се региструје код хероиномана може да настане услед повећане пермеабилности алвеоларних капилара изазвае хипоксијом, централно изазване респираторне депресије, примарног токсичног ефекта хероина на алвеоларне капиларе, анафилактичког шока, али и услед депресије контрактилности миокардиоцита. Развој едема плућа који се јавља код интоксикација хероином и који у себи често садржи хеморагијску компоненту сматра се једним од главних механизма умирања код хероиномана [*Dettmeyer* и сар., 2000].

Паралелно са хипоксијским ефектима хероина на плућима јављају се хипоксијски ефекти и на миокарду који представљају иницијацију за патогенетске процесе на миокарду који на крају резултирају ремоделирањем срчаног мишића и заменом кардиомиоцита кисеоник мање зависним, али неплеменитим и контрактилно нефункционалним везивним ткивом.

Код вишегодишњих хероиномана, код којих су напред наведени процеси на плућима и срцу унапредовали, постоји могућност да едем плућа не мора да настаје само као последица директног деловања хероина на ткива и органе, већ и као последица смањене могућности везивно-ткивно измењеног миокарда, пре свега десне срчане коморе, да одговори на повећане захтеве организма за кисеоником у склопу понављаних хипоксијских епизода.

Испитујући ткиво плућа *Kringsholm* и *Christoffersen* [1987] су навели да је у њиховом истраживању 94% случајева имало присутне супстанце у ткиву плућа, које су описане као додатне примесе у дрогама, најчешће талк (магнезијум силикат). Ово се слаже с чињеницом да већина данских наркомана, при ињекционој употреби наркотика комбиновано уноси морфијум и хероин, те да повремено наркотике узимају и перорално у виду таблета. Примесе које су додате хероину да би га разблажиле, најчешће су растворљиви разблаживачи, као што су малтоза, лактоза и сл. [*Kaa* и *Kaempfe*, 1986], а често присуство оваквих супстанци указује на злоупотребу таблета.

Ангиотромбоза у плућном ткиву се примећује у скоро петини случајева, а грануломи у скоро 60%, док су циновске ћелије присутне у скоро трећини случајева [*Kringsholm* и *Christoffersen*, 1987]. Грануломатозна реакција на талк и друге нерастворљиве компоненте које се налазе у таблетама, као производном облику,

описане су и раније [*Spain* 1950; *Wendt* и сар., 1964; *Tomashefski* и *Hirsch*, 1980; *Duberstein* и *Kaufman*, 1971; *Burton* и сар., 1965; *Bainborough* и *Jericho*, 1970; *Arnett* и сар., 1976; *Robertson* и сар., 1976; *Lamb* и *Roberts*, 1972; *Zeltner* и сар., 1982; *Hahn* и сар., 1969] као и ангиотромбоза и знаци плућне хипертензије [*Wendt* и сар., 1964; *Bainborough* и *Jericho*, 1970; *Lerner* и *Oerther*, 1966; *Szwed* 1970; *Hopkins* 1972]. Ови резултати делимично су у сагласности са онима из других истраживања: међу 100 зависника од дроге (врста злоупотребе није наведена) *Hopkins* [1972] је пронашао грануломе индуковане талком у 15%, ангиотромбозу код 12% и хистолошке знаке плућне хипертензија у 8% случајева. *Tomashefski* и *Hirsch* [1980] међу 70 зависника открили су грануломе у 74%, ангиотромбозу у 19%, неке од њих су били са "плексиформним" и ангиоматоидним лезијама, али нису пронашли значајну разлику у дебљини мишићног слоја малих мишићних плућних артерија у поређењу са контролном групом коју су чиниле особе које не употребљавају дрогу. *Kringsholm* и *Christoffersen* [1987] нису приметили плексиформне или ангиоматоидне лезије.

Хистолошки знаци пулмоналне хипертензије, хипертрофије глатких мишића или пролиферације еластичних влакана нису описани током рада на материјалу *Kringsholm* и *Christoffersen* [1987]. У једном случају забележили су бројне грануломе и тромбозу, а претпостављен узрок смрти по искључењу могао је бити акутна срчана инсуфицијенција (акутно плућно срце). За разлику од овог налаза, *Rajs* и сар. [1984] међу 30 наркомана нашли су задебљање артеријског зида у 12 случајева. Ово неслагање могло би да се деси због разлика у коришћеној супстанци. Централни стимуланси, који узрокују констрикцију и хипертрофију малих артерија, злоупотребљавају се у Шведској. У сагласности са овим *Robertson* и сар. [1976] код четири жива зависника који злоупотребљавају α -симпатомиметичке лекове доказали су плућну хипертензију.

Према *Byers* и сар. [1975] сматра се да је део промена у плућним артеријама таложeње супстанце која је примеса активној супстанци у унутрашњем слоју артерија, а која изазива грануломатозну инфламаторну реакцију и фокалну тромбозу. Са организовањем тромба материјал се дислоцира у медијални слој и коначно, када се васкуларни зид реконструише, и у периваскуларни интерстицијум. Овај механизам потврдили су и други аутори [*Tomashefski* и *Hirsch*, 1980; *Zeltner* и сар., 1982].

Промене на срцу код зависника од наркотика најчешће се односе на септични ендокардитис/валвулитис десне половине срца, док су промене на миокарду ретко описиване [*Rajs* и *Falconer*, 1979; *Ginsberg* и сар., 1976]. У клиничким испитивањима често су бележене електрокардиографске промене у односу на унос хероина

[*Paranthaman* и *Khan*, 1976; *Glauser* и сар., 1977]. Механизам настанка оваквих промена, могао би да буде хипоксична епизода која штети микроваскулатури и последично оштећује срчани мишић [*Hackel* и сар., 1974]. У серији од 25 интравенозних зависника који су злоупотребљавали централне стимуланте и/или опијате, *Rajs* и *Falconer* [1979] су код случајева који су умирали због примене наркотика, пронашли као најсвежије лезије у смислу хеморагија, контракционих трака са јачим преузимањем киселог или базног фуксина, док су као хроничне промене примећена запаљења у атриовентрикуларном чвору, стромална кондензација и фокална фиброза, и ово је у већини случајева било забележено без обзира на узрок смрти. У истраживању *Kringsholm* и *Christoffersen* [1987] нису пронађене значајне разлике у променама на срцу код зависника и код контролне групе. Везивно ткиво доказано у апикалном делу папиларних мишића и код зависника и код контролне групе, сматрано је нормалном прелазном зоном између мишићних влакана и тетивних нити. Једини налаз вредан помена била је фокална инфилтрација лимфоцитима у атриовентрикуларном снопу код два зависника, чије значење није јасно. Објашњење за различите резултате могло би да буде разлика у злоупотребљеној супстанци, пошто централни стимуланси могу да делују кроз катехоламински ефекат који узрокује и лезије миокарда [*Haft* 1974].

Резултати студије *Pons-Llado* и сар. [1992] подржавају хипотезу да продужено интравенско уношење наркотика може да изазове појаву морфолошких абнормалности срчаних валвула што може да буде забележено на ехокардиографији, без видљивих знакова или симптома срчаних обољења. Тако би могла да се дефинишу два типа лезија. Прва се јавља као мало фокално задебљање или митралне или трикуспидалне валвуле. Ова лезија се разликује од истинске валвуларне вегетације по недостатку препознатљивог ехогеног обрасца и у одсуству инерцијалних кретања независно од срчане валвуле у реалном времену ехокардиографског прегледа [*Jaffe* и сар., 1990]. Друга врста лезија била би пролапс валвуле: постојало је значајно већа преваленција пролапса трикуспидалне валвуле у испитиваној групи зависника (7,3%) него код контролних субјеката (0%), и код особа пријављених у другим студијама (0,1 до 5,5%) [*Raichlen* и *Brest*, 1987]. Интерпретација прве лезије (валвуларно фокално задебљање) треба да скрене пажњу на процес депозиције тромбоцита и фибрина након ендокардијалне инокулације честица и да укаже на основу за инфективни ендокардитис [*Sheagren* 1981]. Потенцијална узрочна релација између злоупотребе супстанци и валвуларног пролапса била би интригантнија хипотеза. Међутим, имајући у виду да је

хистолошка основа пролапса губитак чврстих колагених влакана валвула [Raichlen и Brest, 1987], није немогуће да се овај процес посматра као алтернативни, могући облик оштећења или због саме супстанце или због неке од многих нерастворљивих супстанци за које је познато да су присутне у убризганом материјалу [Stimmel и Dack, 1987; Sheagren 1981].

Присуство благих валвуларних регургитација детектованих колор доплером код здравих особа је добро познато [Yoshida и сар., 1988] обично без јасног аускултаторног шума [Kinney 1988]. Ово је потврђено и у контролној групи Pons–Llado и сар. [1992]; ипак, њихова преваленца је значајно повећана у испитиваној групи и није ограничена на оне са ехокардиографским абнормалностима валвуле. Ова чињеница иде у корист абнормалностима валвула које су изазване злоупотребом супстанце, која код неких пацијената са регургитацијама на доплеру, али без ехокардиографских абнормалности, може бити довољно суптилна да се не открије ехокардиографијом.

Статистички значајне разлике су примећене у неким колор доплер индексима дијастолне функције између пацијената и контролних група. Ипак, неопходно је да се нагласи пре закључивања да они одражавају стварно оштећење вентрикуларне релаксације код зависних особа [Pons–Llado и сар., 1992]. Поред дијастолне дисфункције, показано је да смањење срчаног пуњења ствара промене врло сличне онима које су примећене код зависника: повећање митралног и трикуспидног времена раног дијастолног тока [Choong и сар., 1987]. Код функционалних клиничких испитивања, пацијенти могу да добију и пропоксифен и бензодиазепин, за које је познато да смањују артеријски и венски отпор [Jaffe и Martin, 1985; Harvey 1985] (артеријски крвни притисак може да буде значајно мањи код зависника него у контролној групи), абнормалности на колор доплеру могу да се приписују употреби лекова [Pons–Llado и сар., 1992].

Откривање антитела вируса имунодефицијенције, као што је наведено у претходним студијама, [Himelman и сар., 1989] не може да буде повезано са ехокардиографским абнормалностима.

Pons–Llado и сар. [1992] су показали високу преваленцу ехокардиографских абнормалности валвула у нивоу митралног и трикуспидалног ушћа код кардиолошки асимптоматских хроничних интравенских хероиномана. Чини се да је прихватљиво спекулисати да ове лезије могу бити основа будућег инфективног ендокардитиса. Са друге стране, код њихових испитаника није било могуће да се са сигурношћу утврди никакво оштећење у структури и систолној или дијастолној функцији срца.

Налази представљени у ретроспективној студији *Seltenhammer* и сар. [2013] јасно указују на то да постоји јака повезаност између дуготрајне употребе опиоида и фибротичних промена у миокарду. Познато је да злоупотреба опијата има високу инциденцу срчаних компликација, како су показали *Burke* и сар. [1997], *Dettmeyer* и сар. [2009], *Stringer* и сар. [2009] и *Nerantzis* и сар. [2011]. Првобитно, акутни ефекти хероина на срце су прво истраживали *Brashear* и сар. [1973] користећи псе са хипотензијом и брадикардијом, које су узроковали периферном вазодилатацијом, смањеном периферном резистенцијом и ослобађањем хистамина, као и инхибицијом рефлекса барорецептора. Са клиничког гледишта, опиоиди, нарочито хероин, могу узроковати аритмије и едем плућа, као и смањење ејекционе фракције срца, као што су представили *Frishman* и сар. [2003].

Студија *Seltenhammer* и сар. [2013] пружа додатне доказе да хронична злоупотреба опиоида може бити фактор ризика који доприноси развоју фибротичног ремоделирања у срцу током, али чак и након престанка употребе опиоида. Ови налази су у складу са резултатима претходних хистопатолошких студија *Passarino* и сар. [2005] и *Milroy* и *Parai* [2011]. Постоје различите квантитативне методе за одређивање обима фиброзе миокарда: методом бројања тачака, софтверском анализом дигиталне слике и биохемијском методом за квантификацију ожиљака миокарда. Међутим, према *Kitamura* и сар. [1997], ове методе мерења показују високу варијабилност у односу на посматрача.

Одређивање локације биопсије унутар срца може такође да води до различитих резултата у вези са количином миокардне фиброзе. Као последица тога, може да се закључи да средња вредност процента фиброзног ткива зависи од неколико фактора, као што су анатомска позиција са које је узет узорак, метода и посматрач, а креће се од 0,4 до 10% или више, по *Seltenhammer* и сар. [2013]. У њиховој студији, контролна група имала је средњу вредност фиброзног везивног ткива од 5,2%. Сличне вредности су раније пронашли *Gaspard* и *Pasumarthi* [2008], а средња вредност коју су они забележили била је $6,2 \pm 2,2\%$.

Према студијама које су спровели *Vasan* и сар. [2004] и *Campbell* и сар. [2011], описане су разлике у структурама срца између мушког и женског пола, при чему жене имају мање интерстицијалне фиброзе него мушкарци истог узраста. Ово одговара резултатима *Seltenhammer* и сар. [2013], који откривају значајну разлику између жена и мушкараца и код испитиване и код контролне групе.

У студији *Seltenhammer* и сар. [2013], скоро сви (93,42%) испитаници имали су свеже тачкасте убоде, што указује на интензивну интравенозну злоупотребу опијата, док је готово две трећине (65,79%) испитаних хроничну интравенозно узимало хероин, што је закључено на основу постојања различитих ожиљака. Чињеница да су више од две трећине испитаника у овој пост–мортем студији били корисници више недозвољених супстанци наглашава кумулативни ефекат психоактивних и депресорних супстанци на централни нервни систем, што појачава штетне последице опиоида, а такође штети и срчаном ткиву.

Даље, као што је случај са скоријим налазима *Nerantzis* и сар. [2011] и *Passarino* и сар. [2005], и студија *Seltenhammer* и сар. [2013] јасно подржава теорију да не само да хронична злоупотреба кокаина и/или амфетамина узрокује фибротично ремоделирање у срцу, као што су показали *Milroi* и *Parai* [2011], већ и да дугорочна злоупотреба хероина оштећује срчано ткиво са сличним ефектима, што може довести до дисфункције или поремећених електричних активности миокарда и различитих типова аритмије, као што је продужење *QT* интервала и *torsades de pointes* вентрикуларне аритмије, што су показали и *Stringer* и сар. [2009].

Пут који води до развоја фиброзе миокарда након хроничне злоупотреба хероина могао би теоријски да буде представљен на следећи начин: поновљена злоупотреба хероина, нарочито интравенозних ињекција хероина, узрокује смањење фреквенце дисања због смањене осетљивости неурона респираторног центра који се налази у мозгу. Овај депресивни респираторни утицај на крају узрокује хипоксију и у срчаном ткиву, ометајући иницијализацију кисеоника у ћелијама. Критични дефицит кисеоника у миокарду индукује апоптозу у кардиомиоцитима због дефеката у метаболичким путевима на скоро исти начин као и код инфаркта миокарда. Ова патогенеза се онда наставља у стимулацију срчане ремоделације, односно на једној страни долази прво до атрофије кардиомиоцита и њиховог одумирања на крају. На месту одумрлих кардиомиоцита накупља се везивно ткиво, док се паралелно са умножавањем везива код преосталих кардиомиоцита јавља задебљање.

Постоје бројне студије које се тичу само утицаја кокаина на срчани мишић [*Cregler* и *Mark*, 1985; *Morris* 1991; *Fineschi* и сар., 1997; *Fineschi* и сар., 2001; *Hollander* и сар., 1998; *Crumb* и *Clarkson*, 1992; *Kloner* и *Hale*, 1993; *Tella* и сар., 1992; *Karch* 2005; *Tazelaar* и сар., 1987; *Daras* и сар., 1994; *Kasch* 1987; *Saleem* и сар., 2001; *Kramer* и *Turner*, 1993; *Nzerue* и сар., 2000; *Pogue* и *Nurse*, 1989; *Heng* и *Haberfeld*, 1987; *Zamora–Quizada* и сар., 1988; *Nalbandian* и сар., 1985; *Brown* и сар., 1994; *Gourgoutis* и *Das*,

1994; *Gadaleta* и сар., 1989; *Vaghjimal* 1996; *Novielli* и *Chambers*, 1991; *Dettmeyer* и сар., 2004; *Ness* и сар., 1999]. Са друге стране, према новијој литератури [*Fineschi* и сар., 1997; *Rajs* и *Falconer*, 1979; *Tazelaar* и сар., 1987; *Fugelstad* и сар., 2003; *Kringsholm* и *Christoffersen*, 1987; *Passarino* и сар., 2005], оштећење миокарда изазвано хероинском разматра се као један од могућих узрока који доводе до коначног едема плућа и смрти у случајевима акутног ињектирања дроге, мада је основни патофизиолошки процес и даље нејасан.

У актуелном истраживању, утврђено је да су удео везивног ткива у миокарду и дебљина кардиомиоцита статистички значајно већи код корисника хероина у односу на контролну групу. Иако су корисници хероина подељени у групе на основу дужине употребе хероина на групу која је користила хероин мање од 5 година, групу која је користила хероин између 5 и 10 година и групу која је користила хероин више од 10 година, статистички значајна разлика у процентуалном уделу везивног ткива у миокарду, али и у дебљини кардиомиоцита, међу овим групама није утврђена. Овакав налаз могао би да упућује на закључак да је и употреба хероина у периоду од 5 година довољан за ремоделирање миокарда у великом обиму јер је пре тога потврђено да постоји статистички значајна разлика у уделу везивног ткива и дебљини кардиомиоцита између хероинмана и контролне групе. Самим тим, за даља истраживања наметнула би се као императив подела корисника хероина на више група које описују дужину употребе хероина, а унутар првих 5 година, да би се одредила издржљивост компензаторних механизма миокарда током процеса интоксикације хероинском.

Међузависност вредности дебљине кардиомиоцита и садржаја везивног ткива у миокарду код корисника хероина описана је малом негативном корелацијом, што указује на то да се са повећањем удела везивног ткива, дискретно смањује дебљина кардиомиоцита, то јест овакав налаз указује на смењивање фаза процеса ремоделације у самом миокарду. Наведени резултати истраживања потврђује да су испитивани узорци имали углавном или благу доминацију везивног ткива у миокарду или благу доминацију задебљаних кардиомиоцита.

Актуелном студијом утврђено је да се на истим видним пољима срчаног мишића хероинмана могу уочити зоне са хипертрофисаним и са атрофисаним кардиомиоцитима. Овакав налаз није могуће приказати у статистичкој обради података, али је он у корелацији са претходно наведеним литературним подацима, указујући на чињеницу да се услед хипоксичних промена на срчаном мишићу јавља одумирање

одређеног броја кардиомиоцита, који се у патофизиолошком следу догађаја накнадно мењају везивним ткивом. Ова чињеница је потврђена корелационом анализом међузависности налаза дебљине кардиомиоцита и проценталне заступљености везивног ткива у миокарду корисника хероина. Са друге стране, преостали кардиомиоцити компензаторно хипертрофишу, те је из тих разлога при морфометријској анализи нађен велики распон у дебљини кардиомиоцита, као и статистички сигнификантно већа процентуална заступљеност везивног ткива у срчаном мишићу код хероиномана у односу на контролну групу.

Апсолутна вредност дебљине кардиомиоцита је налаз који према расположивим литературним подацима, није до сада разматран. Литературни подаци указују на генералну хипертрофију миокарда, а једино *Dettmeyer* [2011] подвлачи промену величине кардиомиоцита, али без навођења тачних вредности. Разлика између дебљине кардиомиоцита код хероиномана ($13,776 \pm 2,793 \mu m$) и контролне групе ($11,64 \pm 0,967 \mu m$) показала је јаку статистичку значајност ($z = -2,786$; $p = 0,005$; $r = 0,386$). Исто као и код вредности заступљености везивног ткива, и дебљина кардиомиоцита није се статистички значајно мењала са петогодишњим порастом дужине употребе хероина, иако је на основу величине стандарде девијације утврђен шири дијапазон апсолутних вредности дебљине кардиомиоцита.

Године старости и пол нису били фактори који су утицали на појаву статистички значајних разлика у заступљености везивног ткива у миокарду корисника хероина, али ни у дебљини кардиомиоцита.

Дакле, сходно свему наведеном, хемодинамски пормећаји настали у склопу морфолошких промена на срцу карактеристичних за стечену кардиомиопатију, каква се између осталог може јавити и код хероиномана, могли би да представљају један од разлога умирања ових лица. Разлог умирања хероиномана може се тражити и у малигним поремећајима срчаног ритма узрокованих како хипертрофичним променама на самим кардиомиоцитима, тако и умножавањем везива у миокарду.

Студија [*Dettmeyer* и сар., 2009] обухвата 21 смртни случај изазван првенствено морфијумом и/или придодатим супстанцама код корисника дрога. У само 2 испитивана смртна случаја доказано је присуство кокаина. Хероин/морфин или придодате супстанце (нпр. кинин, лактоза, прокаин, инозитол, скроб, сахароза, метакалон, манитол, лидокаин, скополамин), као и инфекција хепатитисом Б или Ц, уобичајени су налази приликом злоупотребе наркотика и такође могу довести до измене, односно

оштећења миокарда. Нејасно је и да ли чистоћа хероина игра важну улогу. У овом истраживању [Dettmeyer и сар., 2009] поређен је 21 корисник хероина са 15 случајева контролне групе, а аутори су први урадили имунохистохемијску квалификацију и квантификацију интерстицијалних инфламаторних миокардијалних ћелија, користећи узорке миокарда из дефинисаних локација срца. Након студије Dettmeyer и сар. [2009], Ilić и сар. [2011] урадили су сличну студију на 13 срца корисника хероина и поредили резултате са 10 случајева који су представљали контролну групу. Обе студије доказале су да се у миокарду хероинских зависника могу наћи инфламаторне реакције. Циљ ових студија био је проналажење разлика у знацима инфламације миокарда код зависника од дрога у поређењу са контролном групом. Због тога, интерстицијалне ћелије миокарда окарактерисане су имунохистохемијски. Према литератури [Fugelstad и сар., 2003; Kringsholm и Christoffersen, 1987; Passarino и сар., 2005; Aretz 1987; Schnitt и сар., 1987; Steenbergen и сар., 1986; Forcada и сар., 1996; Dettmeyer и сар., 1999; Linder и сар., 1985], више од 10 LCA+ леукоцита, 10 CD45R0+ Т–лимфоцита и CD68+ макрофага сумарно, више од 6 CD68+ макрофага, као и више од 2 до 5 CD45R0+ Т–лимфоцита по видном пољу (увечање 400x) морају се сматрати поузданим знаком инфламаторног процеса у миокарду који се налази у случајевима вирусног миокардитиса [Fugelstad и сар., 2003; Kringsholm и Christoffersen, 1987; Passarino и сар., 2005; Aretz 1987; Schnitt и сар., 1987; Steenbergen и сар., 1986; Forcada и сар., 1996; Linder и сар., 1985; Milei и сар., 1990]. Са друге стране, према новој класификацији [Maron и сар., 2006] у случајевима хроничних инфламаторних процеса као што су хронични миокардитис или почетна кардиомиопатија, не може се дијагностиковати запаљење миокарда према Далас критеријумима, што су потврдили и Dettmeyer и сар. [2009] и Ilić и сар. [2011]. По Dettmeyer и сар. [2009], када се сумња на миокардитис, имунохистохемијска студија може да реши иначе нејасну ситуацију захваљујући дијагностици инфламаторних инфилтрата и некрози, према критеријумима из Даласа, али је такође ограничена недовољном осетљивошћу и лажно негативним хистолошким резултатима. Имунохистохемијска квалификација и квантификација интерстицијалних инфламаторних ћелија омогућава дијагнозу благих облика упале, користећи морфолошке критеријуме. У истраживаним деловима миокарда, леукоцити, Т–лимфоцити и макрофаги су пронађени у дифузним облицима расподеле и повремено као микрофокалне акумулације. Ипак, с обзиром на напред поменуте граничне вредности за леукоците, Т–лимфоците и макрофаге по видном пољу, број инфламаторних ћелија у студијској групи није повећан у мери у којој би се

верификовао инфламаторни процес упоредив са вирусним миокардитисом. У супротном, постојао би значајни пораст броја инфламаторних ћелија у испитиваној групи у односу на контролну групу, што би се даље сматрало знаком опште активације целуларног имунолошког система. Овакав број запаљењских ћелија би се са једне стране могао сагледавати у склопу системских манифестација бројних инфективних стања, која се по правилу срећу код интравенских хероиномана (хепатитис Б или Ц, ХИВ и сл.). Са друге стране, сходно опште познатом имуномодулаторном ефекту хероина, овакав број запаљењских ћелија може бити и производ супресије целуларног имуног одговора до кога доводи злоупотреба ове супстанце.

Два случаја у испитиваној групи показивала су слику тешке интерстицијалне и периваскуларне фиброзе, са хистолошким налазом компатибилним са налазом леченог миокардитиса или стечене кардиомиопатије узроковане запаљењем [Dettmeyer и сар., 2002], према предложеној новој и ригорозној класификацији кардиомиопатија [Maron и сар., 2006], иако је тежина срца била мања од 500 грама у свим случајевима. У конкретним случајевима вероватно се радило о почетку процеса развоја стечене кардиомиопатије, по типу запаљења, а због инфекције вирусом хепатитиса.

У истраживању Ilić и сар. [2011], број инфламаторних ћелија није повећан у мери да би се потврдио инфламаторни процес упоредив са вирусом изазваним миокардитисом као у истраживању Dettmeyer и сар. [2009]. У ствари, постојале су ниже средње вредности леукоцита и Т-лимфоцита у поређењу са контролном групом, без статистички значајних разлика. Средњи број инфламаторних ћелија не одражава стање миокардитиса, јер је расподела запаљенских ћелија неједнака у топографски различитим узорцима миокарда за истог пацијента. Аутори сматрају да критеријуми за инфламаторне реакције морају бити прилагођени са налазом да су најраније запаљенске промене миокарда очигледне у бочном зиду леве коморе, и да је само на овим местима откривен миокардитис хистолошким прегледом [Baughman 2006], као и према чињеници да су корисници хероина имали измењен имунолошки систем [Talloczy и сар., 2008; Messmer и сар., 2006].

Резултати Dettmeyer и сар. [2009], са приближно пет пута повећаним бројем инфламаторних ћелија у интерстицијуму миокарда у поређењу са контролном групом, указују на постинфламаторну фокусну интерстицијалну фиброзу код зависника од хероина. Утицај неколико адјувантних супстанци остаје нејасан. С обзиром на то да повећане концентрације хероина, односно морфина, повећавају ризик од изненадне смрти при њиховој злоупотреби, према овој студији указује да је то главни узрок смрти,

док хепатитис или вирусом индуковани фокални миокардитис, периваскуларна и/или интерстицијска фиброза и/или утицај адјувантних супстанци нису имали одлучујућу, али би могли да имају потпорну улогу.

По *Casali* и сар. [2012], разлика између леталног миокардитиса и случајног налаза миокардитиса је у томе што миокардитис треба да се развија далеко изнад изолованог налаза некрозе миоцита. Користећи критеријуме некрозе као једини водич, око 15% леталних миокардитиса у њиховој студији би се погрешно означили као случајни налаз миокардитиса. Такође, и миокардитис без некрозе може да буде леталан, иако је у суштини налаз у складу са традиционалним описом миокардитиса [*Burke* и *Tavora*, 2011; *Corby* 1960; *Stevens* и *Underwood–Ground*, 1970; *Saukko* и *Knight*, 2004; *Kitulwatte* и сар., 2010; *Zhang* и сар., 2011; *Sheppard* 2011] – некроза миоцита увек треба да буде посматрана као главна варијабла за разликовање леталног миокардитиса од случајног миокардитиса. У овом раду летални миокардитис без некрозе миоцита показује шири интерстицијални едем и инфламацију која утиче на кључне електричне миокардне тачке (десна преткомора, интервентрикуларни септум и врх срца). Зато се интерстицијални едем тумачи као много важнији елемент од једноставне непрозирне везе у ткиву и некрозе [*Jennings* и сар., 1985]. По искуству аутора, патологија миокардитиса је у 50% случајева асимптоматска, са чистом или мешовитом лимфомоноцитном инфилтрацијом. Чисти неутрофилни миокардитис (увек смртоносни миокардитис према резултатима овог рада и према хипотези о веома раном развоју неутрофилне миоцитне некрозе) чини се да је обично веома ретка појава. Миокардитис гигантских ћелија (0 случаја у овој студији) и еозинофилни миокардитис (2 случаја у овој студији) испоставило се да су врло ретки, и да захтевају широку експерименталну популацију за независно тестирање о њиховом смртоносном потенцијалу. Овај рад је први који садржи експериментални оквир који је од почетка јасно могао разликовати широку подгрупу смртосног миокардитиса од широке подгрупе случајног миокардитиса.

Статистички тестиране смртоносне варијабле миокардитиса по [*Casali* и сар., 2012] су: позитивна лична анамнеза за срчане симптоме кратко време пре смрти, акутни патолошки налази у макроскопској анализи срца, чиста или мешовита неутрофилна инфилтрација, вишеструке локације миоцитне некрозе, вишеструке локације интерстицијалног едема, посебно у нивоу интервентрикуларног септума, и присуство периваскуларних манжетна. Неке од ових варијабли вероватно се развијају током истог патофизиолошког дешавања, са сугестивном срчаном анамнезом и патолошком

макроскопијом срца која произилази из релевантне некрозе миоцита и из отворене дисфункције срца или периваскуларних манжетна. Вероватно да ове промене делују као јаки промотери некрозе кроз вазоспастички механизам. Без обзира на то, у форензичкој оцени миокардитиса прво се разматрају све ове варијабле као посебне особине пре дијагнозе леталног исхода (кардијалног или екстракардијалног порекла). Сви смртни миокардитиси не показују истовремено све налазе које су тестирани у овом раду. Миокардитис се јављао чешће као патолошки налаз на левој комори. Код некротизујућег миокардитиса миоцитна некроза се углавном развијала у средњем и доњем делу предњег зида леве коморе. Миокардитис је болест која у просеку обухвата (код леталног и оног који то није) око 20–25% миокардног мишића. У форензичком смислу пресудно је узорковање миокарда са више анатомских локација из целог срца. Штавише, само темељна хистолошка анализа целог срца и пажљиво анамнестичка испитивање могу се користити за правилну примену представљеног система бодовања. Приказани систем процене је веома једноставан за коришћење са дефинисаном граничном линијом која јасно раздваја смртоносни миокардитис од случајног миокардитиса и такође је очигледно поштедна по својим основама у једноставној комбинацији клиничке анамнезе, обдукције и основне хистологије. Његова рутинска примена могла би да обезбеди објективност у форензичком оцењивању миокардитиса, али ће његова дефинитивна валидација бити добијена тек након независних експерименталних потврда и након додатних научних искустава која деле исти методолошки оквир. Имунохистохемија и технике реакције ланчане полимеризације могу се користити за даља истраживања о смртоносној патофизиологији миокардитиса и можда као додатно тестирање за представљени систем бодовања [Sheppard 2011; Why и сар., 1994; Satoh и сар., 1994].

Током актуелног истраживања и анализе ћелија запаљења у миокарду 42 корисника хероина, утврђено је да су број леукоцита и број моноцита и макрофага били су нешто виши у контролној групи, док је број Т–лимфоцита био нешто виши у групи корисника хероина. Ове разлике су биле без статистичке значајности.

Број било којих од анализираних ћелија запаљења унутар групе корисника хероина није се статистички значајно разликовала у односу на дужину коришћења хероина.

Статистички значајна разлика у дистрибуцији ћелија запаљења у срцу хероиномана забележена је само у случају леукоцита. Леукоцита је било статистички

значајно мање у левој комори у односу и на десну комору и на међукоморну преграду ($p = 0,02$).

Разлика у броју ћелија запаљења у односу на пол испитаника није била статистички значајна.

Корелационом анализом поређене су вредности броја ћелија запаљења и сви добијени коефицијенти су показивали малу корелацију, изузев у случају броја Т-лимфоцита и броја моноцита и макрофага где је постојала средња позитивна корелација. Овакав налаз указује на то да анализирание ћелије запаљења не показују заједничку активност приликом хроничне интоксикације хероином. Такође, број, врста и дистрибуција анализираних запаљењских ћелија у миокарду не испуњава услове који су дефинисани Далас критеријумима за токсични миокардитис.

У складу са опште познатим имуномодулаторним ефектом хероина на имуни систем може се претпоставити да овакав налаз у актуелној студији јесте производ супресивног деловања хероина на имуни систем хероиномана.

Мастоцити су ћелије које се нормално дистрибуирају у ткивима широм тела, за које је дуго познато да играју важну улогу у алергијским реакцијама. Недавна експериментална опажања сугеришу да могу такође имати важне ефекте у многим другим различитим процесима болести, као што су ремоделирање ткива, зарастање ране [Abd-El-Aleem и сар., 2005] и патолошка фиброза [Bradding и Holgate, 1999], и то у многим органима и под много различитих патофизиолошких услова. Мастоцити се налазе и у нормалном срчаном ткиву, а неколико истраживања сугеришу могућу улогу миокардних мастоцита у патогенези различитих оштећења срца, па се тако могу видети у налазима миокардне исхемије, фиброзе повезане са трансплантацијом срца, код хипертензивних болести срца и дилатативне кардиомиопатије [Estensen и сар., 1985; Petrovic и сар., 1999; Patella и сар., 1998]. Конкретно, недавно је објављено да се мастоцити активирају уз дегранулацију у ранијим фазама срчане хипертрофије [Shiota и сар., 2003; Palladini и сар., 2003], а повећан број ових ћелија пријављен је у миокарду животињских модела хипертензије, инфаркта миокарда и ремоделирања миокарда [Stewart и сар., 2003].

Главни стимулус за хипертрофично ремоделирање миокарда су механичко преоптерећење и активација неурохормоналних система, као што је осовина ренин–ангиотензин–алдостерон и симпатиоадренергични систем [Willenheimer 2000]. Катехоламинергичка нервна влакна и мастоцити су често описани у тесним

морфолошким и функционалним интеракцијама у различитим органима [Bergerot и сар., 2000] и недавно је описана тесна веза између ових ћелија и катехоламинергичких нерава у паријеталној плеури [Artico и сар., 1998].

Међутим, у интеракцији између мастоцита и ремоделовања ткива мора се узети у обзир да постоје варијације у апсолутном броју ткивних мастоцита и да је њихов функционални статус патофизиолошки релевантан, јер након што се активирају, мастоцити пролазе дегранулацију и ослобађају неколико медијатора у екстрацелуларни простор. Зато је кључно проценити и апсолутни број и однос активираних/инактивираних мастоцита како би се проценила могућност укључивања мастоцита у анализираном процесу. Штавише, активирани мастоцити су показали да у великој мери индукују фиброзу и депозицију колагена путем ослобађања неколико посредника, као што су цитокини и $TGF-\beta$ [Puxeddu и Levi-Schaffer, 2002].

Facoetti и сар. [2006] су претпоставили да у миокарду леве коморе активација мастоцита може бити под утицајем срчаног симпатичког система, за који је већ показано да игра важну улогу у срчној фибрози која је изазвана хроничним преоптерећењем [Perlini и сар., 2005]. Да би се тестирали ову хипотезу, хронично су подвргнули пацове или прекидањем дејства централног симпатичког нервног система хемијском симпатектомијом или блокадом β рецептора применом пропранолола у нормалним хемодинамским условима. После 10 недеља, ефекти ових денервенција на укупну густину мастоцита, дегранулацијски однос мастоцита и интерстицијски депозит колагена процењени су у секцијама леве коморе. Главни налаз ове студије је да је код нормалног миокарда β блокада повезана са великим повећањем пропорције дегранулираних ћелија мастоцита. Јасно повећање дегранулираних мастоцита није неизбежно резултат повећања укупне густине ћелија мастоцита. Није пронађена значајна промена укупног броја мастоцита. Ово показује да у нормалном миокарду активација мастоцитних ћелија модулира симпатички нервни систем, посебно путем механизма посредованог бета адренергичним рецепторима. Означене промене густине и морфологије мастоцитних ћелија примећене су код различитих хроничних болести код којих се сумња на промене аутономних нерава, дајући велики доказ у корист неуроимунске интеракције која укључује мастоците и нервни систем [Bergerot и сар., 2000]. Ова студија је била фокусирана на ефекте симпатичке инхибиције дегранулације мастоцитних ћелија и на фиброзу миокарда, с обзиром да је познато да су медијатори са повећаним бројем фибробласта и синтезом колагена стимулирани и *in vitro* и *in vivo* [Panizo и сар., 1995; Hara и сар., 1999]. Међу огромним панелом продуката мастоцита

описани су хистамин, триптаза и *IL-4* као митогени и ко-митогени за хумане фибробласте и промовишу синтезу колагена код морског прасета [*Hatamochi* и сар., 1985; *Abe* и сар., 1998]. Што се тиче срчаног ткива, мастоцити су главни извор хистамина, са доказано повећаним укупним бројем мастоцита код пацијената са дилатираном кардиомиопатијом [*Marone* и сар., 1995; *Patella* и сар., 1998].

У свом раду *Facoetti* и сар. [2006] су доказали да је хемијска симпатектомија повећала густину ћелија срца без значајног утицаја на укупан број маст ћелија. Побољшана активација мастоцитних ћелија код симпатектомираних пацова може бити одговорна за значајан депозит интерстицијског колагена, чиме се показује важна улога интеракција срчаних ћелија и фибробласта у ремоделовању миокарда пацова [*Brover* 2002]. Међутим, примећено је да пропранолол проузрокује даље повећање активације мастоцитних ћелија без икаквог ефекта на интерстицијалну фиброзу. Пропранолол је неселективни агенс са једнаким афинитетима за блокирање рецептора $\beta 1$ и $\beta 2$ [*Bristow* 2000]. Две недавне студије [*Long* и *Brown*, 2002; *Johnson* 2002] су пријавили да су $\beta 2$ адренергични рецептори присутни на ћелијама које се срећу у инфламаторним процесима, као што су мастоцити и моноцити, а $\beta 2$ агонисти инхибирају ослобађање хистамина [*Barnes* 2002], а хронично лечење форметеролом или салметеролом изазива десензибилизацију $\beta 2$ рецептора [*Scola* 2004]. С друге стране, добро је познато да антагонист β адренорецептора пропранолол промовише дегранулацију мастоцитних ћелија у плућима [*Chong* и сар., 1998]. Ови подаци указују на сложену интеракцију мастоцита са β адренорецепторима посредованих путева.

У студији *Facoetti* и сар. [2006] хронична администрација пропранолола узроковала је значајно повећање фракције дегранулираних мастоцита: 81,3% укупне популације мастоцита у односу на 52,7% у контролној групи и 64% код симпатектомираних животиња. Ови налази потврђују хипотезу да хронична примена пропранолола повећава удео активираних срчаних мастоцита, истовремено са смањењем концентрације интерстицијског колагена који је примећен у третираним пацовима у поређењу са контролном групом. Због тога је врло вероватно да је повећана фиброза која је примећена код симпатектомираних пацова стварно узрокована локалним ефектима срчаног неуротоксина б-хидроксидамина. Аутори истичу да дегранулација срчаних мастоцита снажно утиче на β адренергични систем и да вазоактивни пептиди из мастоцитних ћелија, попут хистамина и цитокина, могу играти важну улогу у ремоделовању екстрацелуларног матрикса. Ово је у складу са доказима да неколико различитих неуротрансмitera може утицати на дегранулацију мастоцитних ћелија,

иако ефекти ових агенаса на стање активације мастоцита још нису описани [Nechushtan и Razin, 1996]. Поред тога, дегранулација мастоцита у срцу посредује ендотхелин-1 и потенцијално је укључен у ремоделирање миокарда [Murray и сар., 2004]. Ови налази потврђују доказе да широк спектар цитокина, протеаза и липидних медијатора који се јављају у мастоцитима могу дати активан допринос у више биолошких догађаја у организму, како у стању здравља, тако и у условима болести. Треба узети у обзир да хемијска симпатектомија узрокује значајно смањење концентрације норепинефина у плазми, а истовремено штеди адреналну производњу епинефрина [Ferrari и сар., 1996], која може стимулисати и α и β адренорецепторе. Насупрот томе, β адренергична блокада не мења производњу катехоламина. Подаци о пацовима третираним са пропранололом сугеришу да β адренергичка стимулација може да инхибира (или бар модулира) дегранулацију мастоцита. Доказано је да терапија изопротеренолом инхибира дегранулацију мастоцитних ћелија у ткиву душника [Brown и сар., 1982]. Зато аутори претпостављају да је такав инхибиторни ефекат такође посредован надбубрежним епинефрином.

Осим складиштења хистамина и протеаза као што су триптаза и химаза, срчани мастоцити производе и широк спектар цитокина, фактора раста, вазоактивних средстава и других биолошки активних медијатора који су способни да посредују ремоделирање ткива. На пример, неколико њих је способно за активирање матриксних металопроотеиназа (ММП) које изазивају деградацију колагеног матрикса срца. Мастоцити срца су укључени у процес фиброзне ремоделације срца у склопу хипертензије и миокардитиса [Levick и сар., 2011].

Студије које повезују перитонеалне и кожне ћелије са преобликовањем ткива показале су да триптаза мастоцита може да активира интерстицијалну колагеназу (ММП-1) и стромелин (ММП-3) у *in vitro* условима [Lees и сар., 1995; Suzuki и сар., 1995]. Gruber и сар. [1989] показали су да триптаза није у могућности да директно активира ММП-1, међутим, триптаза прво цепа проММП-3, на активни ММП-3, а затим активира ММП-1. Студије које користе перитонеалне мастоците изоловане код мишева показале су да химаза може да активира ММП-2 и -9 [Tchougounova и сар., 2005]. Такође, чини се да су мастоцити важан извор $TNF-\alpha$, за који се показало да активира ММП [Seguin и сар., 2008]. У срцу $TNF-\alpha$ је локализован у мастоцитима у нормалним условима. Хистамин такође може да игра улогу у ремоделовању миокарда [Frangogiannis и сар., 1998; Gilles и сар., 2003].

Један од првих извештаја о повећању мастоцита у срцу повезаних са болестима повезан је са миокардитисом [Estensen 1984]. Аутоимуни миокардитис се препознаје као болест коју воде Т лимфоцити, посебно $CD4^+$ Т лимфоцити [Afanasyeva и сар., 2004], а мастоцити су примећени у фибротичним подручјима код мишева са дилатираном кардиомиопатијом након експериментално индукованог аутоимуног миокардитиса. Претпоставља се да инхибиција акутних патолошких промена настаје помоћу $IL-10$ путем инхибиције мастоцита, будући да су нивои хистамина, густине мастоцитних ћелија и величине мастоцита смањени управо посредством $IL-10$ [Palaniyandi и сар., 2005]. Поред тога, $IFN-\gamma$ штити од хроничног миокардитиса спречавајући дегранулацију мастоцитних ћелија и фиброзу [Fairweather и сар., 2004a]. Код вирусног миокардитиса мишева изазваног инфекцијом коаксаки вирусом, дегранулација мастоцитних ћелија је примећена у року од 6 сати након инфекције [Fairweather и сар., 2004b]. Код мишева инфицираних вирусом енцефаломиокардитиса, густина мастоцитних ћелија имала је благи пад петог дана након инокулације вируса, пре него што се касније повећала до нивоа који су знатно већи од нормалног (након 14 дана), а што се временски подударило са обрасцем фиброзе унутар срца [Kitaura–Inenaga и сар., 2003]. У експерименталној Chagas–овој болести, мишеви заражени са *Trypanosoma cruzi* показују повећане нивое хистамина у срцу [Pires и сар., 1992] и хистолошким прегледом откривено је да се мастоцити јављају у подручјима фиброзе [Postan и сар., 1994]. Palaniyandi и сар. [2005] показали су изузетно јаку корелацију између густине ћелија мастоцита и количине волумена колагена у срцима мишева са дилатираном кардиомиопатијом након експерименталног индукованог аутоимунског миокардитиса. Лечење ових мишева стабилизаторима мастоцита смањује густину мастоцита, фиброзе и $TGF-\beta$.

Актуелном анализом утврђено је да је број мастоцита био статистички значајно већи код хероиномана у односу на контролну групу и ова разлика је показала изузетно високу статистичку значајност ($p < 0,001$). Број мастоцита је параметар који је показао највише статистички значајно повећање код хероиномана, од свих коришћених и анализираних параметара у овој студији.

Мастоцита је било статистички значајно више у нивоу међукоморне преграде и у односу на десну комору ($p = 0,001$) и у односу на леву комору ($p = 0,021$). Мања разлика у броју мастоцита (која није статистички значајна) се уочава између међукоморне преграде и леве коморе.

У актуелном истраживању, број мастоцита је био нижи у миокарду лешева женских особа, али без статистички значајне разлике.

Уочено је да се највећи број мастоцита налазио у нивоу периваскуларне и/или интерстицијалне фиброзе миокарда, што, уз резултате осталих анализираних параметара, још више наглашава улогу мастоцита у процесу репарације и ремоделације миокарда хероиномана.

На основу негативног односа између нивоа морфина у централном нервном систему и фиброзног везива у срчаном ткиву у својој студији, *Seltenhammer* и сар. [2013] сугеришу да би хроничним корисницима опиоида (углавном старијим појединцима који дуже користе опиоиде) можда биле потребне ниже концентрације морфина да би дошли до предозирања због дуготрајног ефекта опиоида на срчано ткиво у поређењу са мање искусним, млађим зависницима.

Током актуелног истраживања, хемијско–токсиколошком анализом утврђено је да је код значајног броја испитиваних корисника хероина у тренутку смрти, поред хероина доказано и присуство неке друге супстанце. У преко 90% случајева доказано је присуство морфина, односно 6–МAM који су показатељи скорог узимања хероина у односу на тренутак смрти. Код половине случајева доказано је и присуство кодеина. Код 40,48% случајева доказано је присуство алкохола, а код 16,67% метадона. Комбиновани налаз морфина, 6–МAM и диазепама постојао је код 19,05% случајева, а комбиновани налаз алкохола, кодеина и диазепама код 11,91% испитиваних случајева. Налаз политоксикоманије могао би да отежа интерпретацију статистички анализираних резултата патохистолошких налаза, али и указује на комплексност проблема хероиноманије. Подаци о дужини употребе других супстанци, изузев хероина, нису били доступни за укључивање у анализу.

Иако резултати рада *Seltenhammer* и сар. [2013] указују на значајну корелацију између дугорочне опиоидне злоупотребе и миокардне фиброзе, мора се имати на уму да њихова студија има одређених ограничења. Као ретроспективно ограничење, анализирана срчана ткива добијена су из узорака узетих искључиво у форензичке сврхе; и друго, узорци косе нису узети и анализирани како би се проценио континуитет и одредио тип додатних супстанци које су потенцијално коришћене у време пре смрти. Досијеи предмета, документи за форензичку обдукцију и полицијски извјештаји, који су сви изучени детаљно, служе искључиво као информације у вези са претходним навикама везаним за злоупотребу супстанци. Сви случајеви коришћени у њиховој

студији били су пажљиво одабрани из специфичног периода деведесетих година, а заједничка потрошња опиоида и стимулативних лекова, као што је кокаин, могла би се искључити, с једне стране, из емпиријских разлога, како је рекао *Risser* и сар. [2007], а с друге стране може се јасно потврдити. У наведеној студији популација чија је смрт везана за хероин представљала је само око трећину смртних случајева, а у друге две трећине могли су се открити деривати морфина у комбинацији са другим лековима и/или алкохолом. У овом контексту, мора да се има у виду да заједничка употреба других депресаната централног нервног система или психоактивних лекова може значајно да повећа проценат фаталних исхода након ињектирања хероина као последица појачаних ефеката хероина. Ова чињеница је такође описана у извештају из 2009. године од стране *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction – EMCDDA* [2013]: негативни кардиоваскуларни ефекти кокаина се појачавају када се узимају заједно са другим опиоидима. Истраживања на животињама такође указују на то да кокаин, као и опиоиди, могу да изазову респираторну депресију, што би могло да повећа ризик од предозирања. Поред тога, кокаин може иницијално да маскира седативне ефекте опиоида, чиме се повећава ризик од каснијег предозирања. Опиоиди, бензодиазепини и алкохол су депресанти централног нервног система. Њихова истовремена употреба може довести до изражене респираторне депресије, са високом стопом ризика од фаталних и нефаталних предозирања. Корисници опојних дрога са дужим стажом такође могу да се суоче са одложеним метаболизмом бензодиазепина, те постоји повећана опасност од респираторне депресије када се користи са метадоном [EMCDDA 2013]. Даље, квалитет хероина није био детаљно утврђен, иако кодеин који је утврђен у око три четвртине жртава указује на одређену нечистоћу хероина, што су већ описали *Risser* и сар. [2007]. Међутим, у ранијој студији *Risser* и сар. [2001], резултати нису поткрепили широко уверење да повећање смртних случајева везаних за хероин може бити објашњено повећањем квалитета хероина. Штавише, ово првенствено дескриптивно истраживање указује на потребу за додатним прегледима и даљим будућим студијама контроле случаја како би се утврдила стварна улога опиоида у развоју фиброзе, нарочито у миокарду, и допринос таквих опијата функционалном оштећењу срчаног система циркулације. На крају, у складу са најновијим налазима и недавном студијом *George* и сар. [2008] и *Fareed* и сар. [2010], обавезна је препорука пацијентима који примају супституциону терапију (нпр. метадона) [*Aeschbach Jachmann* и сар., 2008] да се пажљиво прате и да се подвргавају редовним

кардиолошким прегледима како би се спровео одговарајући третман и спречило прогредијентно уништавање срчаног ткива.

Студија *Fugelstad* и сар. [2003] је заснована на истрази свих форензички испитаних смртних случајева од хероина у подручју Стокхолма током периода од неколико година. Пошто је веома велики број насилних смртних случајева прошао форензичку истрагу, испитивана популација обухватила је готово све релевантне случајеве. Из ове веће популације изабрани су случајеви са позитивним налазима б–МАМ. Нова карактеристика студије био је критеријум укључивања детектабилне б–МАМ концентрације у крви, поред других традиционалних доказа о смрти која је повезана са хероином. Пошто се б–МАМ може детектовати само неколико сати након уноса [*Inturissi* и сар., 1984; *Cone* и сар., 1991; *Goldberger* и сар., 1993], вероватно је јака веза између уноса хероина и догађаја који су проузроковали смрт. Упркос овом јединственом одабиру случајева аутори су потврдили претходне налазе променљивих и ниских нивоа морфијума у смртним случајевима [*Darke* и *Zador*, 1996]. Ниво б–МАМ је био генерално један ред величине мањи од морфина, што је било у складу са претходним извештајима [*Goldberger* и сар., 1994; *Kronstrand* и сар., 1998].

Неколико претходних испитивања покушало је да утврди типични токсични ниво морфина који је повезан са фаталним исходом. Из једне од раних студија утврђен је ниво од 300 *ng/ml* морфина у крви [*Monforte* 1977]. Детаљна статистичка анализа дала је вредност од 240 *ng/ml* [*Spiehler* 1989]. Подаци *Fugelstad* и сар. [2003] подржавају да се у случајевима када се претпоставља да није укључена ниједна друга дрога, концентрација у крви за слободни морфијум изнад 300 *ng/g* обично се примећује код смрти од превелике дозе хероина. Међутим, преглед литературе о нивоима морфијума код смртних случајева показује да су различите аналитичке методе биле у употреби са различитом специфичношћу. Осим тога, и слободни (некоњуговани) и тотални морфин су пријављени у налазима. Резултати ове студије су показали да се концентрације б–МАМ у крви од 10 *ng/g* најчешће налазе у смртним случајевима где је присутан б–МАМ.

Статистичком униваријантном и мултиваријантном анализом покушано је да се открију могући фактори ризика. У коришћеном моделу откривен је нижи ниво б–МАМ или морфина у крви у тренутку смрти у поређењу са контролном групом (тј. са групом која има негативни исход за факторе ризика). Важно је схватити да ова претпоставка можда није увек релевантна за стварне догађаје који доводе до смрти. У сагласности са претходним студијама [*Darke* и *Zador*, 1996], примећено је да је унос алкохола један од

главних фактора ризика, откривањем етанола у 62% случајева. Статистичка анализа показала је да се ризик повећао с повећањем концентрације етанола, што је у сагласности са ранијим извештајима [Darke и Zador, 1996]. Нивои етанола у крви већи од 0,5 mg/g били су потребни за повећани ризик, а зависност од концентрације је пала при високим нивоима етанола. Осим фармакодинамске интеракције између етанола и хероина која доводи до појачане респираторне депресије [White и Irvine, 1999], постоји и могућност метаболичке интеракције на нивоу глукуронидације. Постоји велика разноврсност у броју изоензима глукуронозил–трансфераза са могућностима полиморфизма [Coffman и сар., 1998; Tukey и Strassburg, 2000]. Према томе, треба узети у обзир потиснут капацитет за глукуронидацију хероина као појединачни фактор ризика. Међутим, за даље проучавање овог стања било би потребно директно мерење глукуронида.

Губитак толеранције је раније препознат фактор ризика. Разматрани су и биохемијски темељи за развој и губитак толеранције [White и Irvine, 1999]. Најважније, истакнуто је да је временски ток толеранције на еуфоричне и респираторне ефекте различит и да период ретке употребе хероина највероватније доприноси повећаном ризику од смртог исхода. У подгрупи смртних случајева којима је претходио период апстиненције од употребе опијата, нађен је мали садржај морфина у коси [Kronstrand и сар., 1998; Tagliaro и сар., 1998]. Студија Fugelstad и сар. [2003] подржава став да је ниска толеранција заиста фактор ризика, јер је нађено удружење ниског фаталног нивоа супстанце у крви уз апстиненцију од опијата непосредно пре смрти. Апстиненција од употребе хероина и губитак толеранције претпоставља се када су постојале анамнестичке информације о добровољним или нехотичним периодима дисконтинуиране употребе дроге. Резултати показују да периоди без дрога, понекад у вези са лечењем, могу повећати ризик од фаталних иносикација.

Претходне истраге показале су да бензодиазепини представљају заједнички налаз у смртним случајевима везаним за хероин [Darke и Zador, 1996], а у студији Fugelstad и сар. [2003] бензодиазепини су заправо пронађени у 40% случајева. Међутим, статистичка анализа из ове студије није подржала такву улогу бензодиазепина. Ово је у складу са недавним извештајима из Аустралије [Zador и сар., 1996; Darke и сар., 1997], где су забележени и недостатак везе нивоа бензодиазепина са нивоом морфијума у крви и различита учесталост налаза бензодиазепина, у поређењу са преживелима. Заправо, у овој студији присуство флунитразепама било је повезано са вишим нивоима морфијума и 6–МAM у крви. Међутим, један од разлога за ову разлику

у односу на етанол може бити интеракција која има другачији механизам и утиче на смртни исход.

Стање ухрањености, што је изражено индексом телесне масе (*body mass index – BMI*), преминулих корисника хероина био је изузетно висок, јер једна трећина испуњава критеријуме за прекомерну тежину, или чак гојазне. Ова опсервација, заједно са одсуством септичког ендокардитиса, као израза ниске хигијене и нечистог руковања са шприцевима, показује да су корисници хероина у истраживаним географским подручјима живели у добрим условима са медицинског становишта. Није примећена корелација *BMI* са постмортем концентрацијама морфина или 6–МAM. Хепатитис, који је најчешћи хистопатолошки налаз, такође није показао корелацију са концентрацијом морфијума и 6–МAM. Изненађујући резултат био је недостатак било какве корелације концентрације морфијума и 6–МAM-а са патологијом срца. Упркос великом броју случајева са абнормалностима, анализом није подржана хипотеза да би ови субјекти били подложнији изненадној смрти од штетног ефекта хероина. Међутим, учесталост миокардитиса код субјеката ове студије (19%) била је велика у поређењу са особама са асимптоматским миокардитисом који су умрли због насиља (0–5%) [Turnicky и сар., 1992; Saphir 1942; Stevens и Ground, 1970; Sopher 1974, Virmani и сар., 1988].

Један фактор који је деловао збуњујуће, а који је свакао требало узети у обзир приликом тумачења нивоа морфина у крви била је појава постмортем ефеката. Није познато који степен посматраног нивоа морфина и 6–МAM одражава нивое у циљним органима у тренутку смрти. Међутим, није се смела искључити могућност постморталне деградације и редистрибуције, јер се слободни морфин може формирати из морфин 3– и 6–глукуронида. У циљу тестирања важности постмортем ефеката, процењивани су мерени нивои у функцији времена између момента смрти и узорковања. Како није било детектованог односа, упркос великом броју података, предложено је да постмортем ефекат није од великог значаја. Сходно томе, иако се не могу искључити промене које се јављују непосредно након смрти, Fugelstad и сар. [2003] су закључили да су измерени нивои вероватно из групе мерених нивоа морфина у тренутку смрти. Међутим, недавно су приказани биохемијски процеси који доводе до стварања слободног морфина из коњугованих облика [Skopp и сар., 2001]. Због методологије за директно мерење коњугованих форми која сада постоји, у будућности могу детаљније да се истраже нивои свих ових прелазних облика [Aderjan и сар., 1995; Bogusz и сар., 1997].

Налаз кодеина у крви је у складу са уносом хероина јер је ацетил–кодеин један од метаболита хероина. Широк спектар односа између морфина и кодеина у крви, може да укаже на то да у неким случајевима ипак постоји и узимање кодеина, сем хероина. Није познато да ли би то могло да допринесе смртном исходу као фактор ризика, али би то свакако допринело повећању нивоа морфијума у крви. На крају, истрага *Fugelstad* и сар. [2003], која се заснива на свим познатим смртним случајевима везаним за хероин, у метрополитанском подручју, потврдила је да су унос алкохола и губитак толеранције фактори ризика за смртни исход након употребе хероина. Није доказана веза са патологијом срца.

Резултати актуелне и приказаних студија снажно указују на промену имунолошког система зависника од наркотика, што је у сагласности са претходним истраживањима [*Baughman* 2006; *Talloczy* и сар., 2008; *Messmer* и сар., 2006; *Nympha* и сар., 2007; *Reynolds* и сар., 2009; *Bhat* и сар., 2004; *Roy* и *Loh*, 1996; *Eisenstein* и *Hilburger*, 1998] и са најизраженијим ефектима на мастоците, чији је број био драматично већи у групи корисника хероина.

Према свему наведеном, будућа истраживања у овој области би могла да буду усмерена ка детаљнијем испитивању процеса имуног одговора код хероиномана, али и процеса ремоделације миокарда и ближег објашњења улоге мастоцита у овом процесу, пре свега унутар првих 5 година од почетка употребе хероина, те да се на тај начин што адекватније објасне могући механизми умирања код хероиномана узроковани променама на срчаном мишићу.

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Морфометријском анализом утврђено је да код хероиномана постоји сигнификантно увећање дебљине кардиомиоцита.
2. Паралелно са хипертрофијом на срчаном мишићу местимично се јавља и атрофија кардиомиоцита, највероватније као директна последица хипоксијских епизода у склопу поновних аката узимања хероина.
3. Умножавање периваскуларног и интерстицијалног везивног ткива које замењује кардиомиоците у срчаном мишићу хероиномана је статистички сигнификантно.
4. Умножавање везивног ткива у срчаном мишићу хероиномана највероватније настаје као последица понављаних и пролонгираних хипоксијских епизода срчаног мишића у склопу злоупотребе хероина.
5. Хемодинамски оптерећенији делови срчаног мишића (десна комора и септум) вероватно су више изложени хипоксијским ефектима, а оштећења на кардиомиоцитима настала услед хипоксије представљају сигнал за ремоделирање миокарда кисеоник мање зависним ткивом (везивним ткивом), што је праћено присуством већег броја запаљењских ћелија и мастоцита управо у тим подручјима.
6. Број запаљењских ћелија у срчаном мишићу хероиномана не задовољава *Далас* критеријуме на основу којих би могли да дијагностикујемо токсични миокардитис.
7. У септалном делу миокарда хероиномана, морфометријском анализом је утврђено присуство статистички високо сигнификантно већег броја мастоцита, пре свега по ободу зона периваскуларне и/или интерстицијалне фиброзе.
8. Умножено везивно ткиво у срчаном мишићу, као и хипертрофисани кардиомиоцити, могу представљати разлог појаве акутних малигних поремећаја срчаног ритма као могућег непосредног узрока смрти код хероиномана.
9. Морфолошке промене на срчаном мишићу хероиномана могу представљати основу настанка хроничне кардиомиопатије која, гледано у дужем временском периоду, може бити разлог затајивања срчане функције и настанка смртног исхода.

7. ЛІТЕРАТУРА

1. Abas L, Bogoyevitch MA, Guppy M. Mitochondrial ATP production is necessary for activation of the extracellular-signal-regulated kinases during ischaemia/reperfusion in rat myocyte-derived H9c2 cells. *Biochem J* 2000;349(Pt 1):119–126.
2. Abd-El-Aleem SA, Morgan C, Ferguson MWJ, McCollum CN, Ireland GW. Spatial distribution of mast cells in chronic venous leg ulcers. *Eur J Histochem* 2005;49:265–272.
3. Abe M, Kurosawa M, Ishikawa O, Miyachi Y, Kido H. Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *Clin Exp Allergy* 1998;28:1509–1517.
4. Aderjan R, Hofmann S, Schmitt G, Skopp G. Morphine and morphine glucuronides in serum of heroin consumers and in heroin-related deaths determined by HPLC with native fluorescence detection. *J Anal Toxicol* 1995;19:163–168.
5. Adle-Biassette H, Marc B, Benhaiem-Sigaux N, Durigon M, Gray F. [Cerebral infarctions in a drug addict inhaling heroin]. *Arch Anat Cytol Pathol* 1996;44(1):12–17. (in French)
6. Aeschbach Jachmann C, Jagsch R, Winklbaaur B, et al. Office-based treatment in opioid dependence: a critical survey of prescription practices for opioid maintenance medications and concomitant benzodiazepines in Vienna, Austria. *Eur Addict Res* 2008;14:206–212.
7. Afanasyeva M, Georgakopoulos D, Rose NR. Autoimmune myocarditis: cellular mediators of cardiac dysfunction. *Autoimmunity Rev* 2004;3:476–486.
8. Allegro JM. *The sacred mushroom and the cross*. New York: Doubleday, 1970.
9. Anversa P, Leri A, Kajstura J. Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(9):1769–1776.
10. Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol* 1987;18(6):619–624.
11. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ Jr, Olsen EG, Schoen FJ. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987;1(1):3–14.
12. Arnett EN, Battle WE, Roberts WC. Intravenous injection of talc-containing drugs intended for oral use. *Am J Med* 1976;60:711–718.

13. Artico M, Iannetti G, Tranquilli Reali FM, Milinovsky L, Cavallotti C. Nerve fibers–mast cells correlation in the rat pleura. *Respir Physiol* 1998;113:181–188.
14. Bainborough AR, Jericho KWF. Cor pulmonale secondary to talc granulomata in the lungs of a drug addict. *Can Med Assoc J* 1970;103:1297–1298.
15. Barille FA. Clinical toxicology, Principles and mechanisms. CRC Press, Boca Raton, 2005.
16. Barnes PJ. Are mast cells still important in asthma? *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2002;42:20–27.
17. Bartolomei F, Nicoli F, Swiader L, Gastaut JL. [Ischemic cerebral vascular stroke after heroin sniffing. A new case]. *Presse Med* 1992;21(21):983–986. (in French)
18. Baughman KL. Diagnosis of myocarditis. Death of Dallas criteria. *Circulation* 2006;113:593–595.
19. Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, et al. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(1):H8–H16.
20. Bergerot A, Reynier–Rebuffel AM, Callebert J, Aubineau P. Longterm superior cervical sympathectomy induces mast cell hyperplasia and increases histamine and serotonin content in the rat dura mater. *Neuroscience* 2000;96:205–213.
21. Bhat RS, Bhaskaran M, Mongia A, Hitosugi N, Singhal PC. Morphine–induced macrophage apoptosis: oxidative stress and strategies for modulation. *J Leukoc Biol* 2004;75:1131–1138.
22. Bogusz MJ, Maier RD, Erkens M, Driessen S. Determination of morphine and its 3- and 6-glucuronides, codeine, codeine-glucuronide and 6-monoacetylmorphine in body fluids by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1997;703:115–127.
23. Bradding P, Holgate ST. Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999;31:119–133.
24. Brashear RE, Cornog JL, Forney RB. Cardiovascular effects of heroin in the dog. *Anesth Analg* 1973;52:323–327.
25. Bristow MR. β -Adrenergic Receptor Blockade in Chronic Heart Failure. *Circulation* 2000;101:558–569.
26. Brown JK, Leff AR, Frey MJ, Reed BR, Lazarus SC, Shields R, Gold WR. Characterization of tracheal mast cell reactions in vivo. Inhibition by a beta-adrenergic agonist. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:842–848.

27. Brown DN, Rosenholtz MJ, Marshall JB. Ischemic colitis related to cocaine abuse. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1558–1561.
28. Brunton L, Chabner B, Knollman B. *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics (ed 12)*. McGraw Hill Professional, 2012.
29. Burke AP, Kalra P, Li L, Smialek J, Virmani R. Infectious endocarditis and sudden unexpected death: incidence and morphology of lesions in intravenous addicts and non-drug abusers. *J Heart Valve Dis* 1997;6:198–203.
30. Burke A, Tavora F. *Practical Cardiovascular Pathology*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2011, pp. 241–246.
31. Burton JF, Zawadzki ES, Wetherell HR, et al. Mainliners and blue velvet. *J Forensic Sci* 1965;10:466–469.
32. Butz WC. Pulmonary arteriole foreign body granulomata associated with angiomatoids resulting from the intravenous injection of oral medications, e.g. Propoxyphene Hydrochloride (Darvon®). *J Forensic Sci* 1969;14: 317–326.
33. Byers JM, Soin JS, Fischer RS, Hutchins GM. Acute pulmonary alveolitis in narcotics abuse. *Arch Pathol* 1975;99:273–277.
34. Campbell DJ, Somaratne JB, Jenkins AJ, et al. Differences in myocardial structure and coronary microvasculature between men and women with coronary artery disease. *Hypertension* 2011;57:186–192.
35. Casali MB, Lazzaro A, Gentile G, Blandino A, Ronchi E, Zoja R. Forensic grading of myocarditis: an experimental contribution to the distinction between lethal myocarditis and incidental myocarditis. *Forensic Sci Int* 2012;223(1–3):78–86.
36. Cheng TH, Shih NL, Chen SY, et al. Reactive oxygen species modulate endothelin-i-induced c-fos gene expression in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 1999;41(3):654–662.
37. Chong LK, Cooper E, Vardey CJ, Peachell PT. Salmeterol inhibition of mediator release from human lung mast cells by β -adrenoceptor dependent and independent mechanisms. *Br J Pharmacol* 1998;123:1009–1015.
38. Choong CY, Herrmann HC, Weyman AE, et al. Preload dependence of Doppler-derived indexes of left ventricular diastolic function in humans. *J Am Coll Cardiol* 1987;10:800–808.
39. Coffman BL, King CD, Rios GR, Tephly TR. The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y [268] and UGT2B7H [268]. *Drug Metab Dispos* 1998;26:73–77.

40. Cone EJ, Welch P, Mitchell JM, Paul BD. Forensic drug testing for opiates: 1. Detection of 6-acetylmorphine in urine as an indicator of recent heroin exposure; drug and assay considerations and detection times. *J Anal Toxicol* 1991;15:1–7.
41. Corby C. Isolated myocarditis as a cause of sudden obscure death. *Med Sci Law* 1960;1:23–28.
42. Cregler LL, Mark H. Relation of acute myocardial infarction to cocaine abuse. *Am J Cardiol* 1985;56:794.
43. Crumb WJ, Clarkson CW. Characterization of the sodium channel blocking properties of the major metabolites of cocaine in single cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;261:910–917.
44. Daras M, Tuchman AJ, Koppel BS, Samkoff LM, Weitzner I, Marc J. Neurovascular complications of cocaine. *Acta Neurol Scand* 1994;90:124–129.
45. Darke S, Sunjic S, Zador D, Prolov T. A comparison of blood toxicology of heroin-related deaths and current heroin users in Sydney, Australia. *Drug Alcohol Dep* 1997;47: 45–53.
46. Darke S, Zador D. Fatal heroin 'overdose': a review. *Addiction* 1996;91(12):1765–1772.
47. Dec GW, Fallon JT, Scherer JM, et al. Does repeat endomyocardial biopsy aid in the diagnosis of active myocarditis? (abstract) *J Am Coll Cardiol* 1986;7:121A.
48. Depre C, Taegtmeyer H. Metabolic aspects of programmed cell survival and cell death in the heart. *Cardiovasc Res* 2000;45(3):538–548.
49. De Simone G. Left ventricular geometry and hypotension in end-stage renal disease: a mechanical perspective. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(10):2421–2427.
50. Dettmeyer RB. *Forensic Histopathology*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2011; doi: 10.1007/978-3-642-20659-7_4.
51. Dettmeyer R, Friedrich K, Schmidt P, Madea B. Heroin-associated myocardial damages – Conventional and immunohistochemical investigations. *Forensic Sci Int* 2009;187(1–3):42–46.
52. Dettmeyer RB, Preuss J, Wollersen H, Madea B. Heroin-associated nephropathy. *Expert Opin Drug Saf* 2005;4(1):19–28.
53. Dettmeyer R, Reith K, Madea B. Alcoholic cardiomyopathy versus chronic myocarditis—immunohistological investigations with LCA, CD3, CD68 and tenascin. *Forensic Sci Int* 2002;126:57–62.

54. Dettmeyer R, Schlamann M, Madea B. Immunohistochemical techniques improve the diagnosis of myocarditis in cases of suspected sudden infant death syndrome [SIDS]. *Forensic Sci Int* 1999;105:83–94.
55. Dettmeyer R, Schlamann M, Madea B. Cocaine-associated abscesses with lethal sepsis after splenic infarction in an 17-year-old woman. *Forensic Sci Int* 2004;140:21–23.
56. Dettmeyer R, Schmidt P, Musshoff F, Dreisvogt C, Madea B. Pulmonary edema in fatal heroin overdose: immunohistological investigations with IgE, collagen IV and laminin - no increase of defects of alveolar-capillary membranes. *Forensic Sci Int* 2000;110(2):87–96.
57. Di Bello MG, Masini E, Ioannides C, Ndisang JF, Raspanti S, Bani Sacchi T, Mannaioni PF. Histamine release from rat mast cells induced by the metabolic activation of drugs of abuse into free radicals. *Inflamm Res* 1998;47(3):122–130.
58. Dockery DW. Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environ Health Perspect* 2001;109(suppl 4):483–486.
59. Dorn GW, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 2005;115(3):527–537.
60. Duberstein JL, Kaufman DM. A clinical study of an epidemic of heroin intoxication and heroin-induced pulmonary edema. *Am J Med* 1971;51:704–714.
61. Edwards WD. Myocarditis and endomyocardial biopsy. *Cardiol Clin* 1984;2(4):647–656.
62. Edwards WD, Holmes DR Jr, Reeder GS. Diagnosis of active lymphocytic myocarditis by endomyocardial biopsy: quantitative criteria for light microscopy. *Mayo Clin Proc* 1982;57(7):419–425.
63. Eisenstein TK, Hilburger ME. Opioid modulation of immune responses: effects on phagocyte and lymphoid cell populations. *J Neuroimmunol* 1998;83:36–44.
64. Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, et al. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* 2002;105(1):85–92.
65. Estensen RD. Eosinophilic myocarditis: a role for mast cells? *Arch Pathol Lab Med* 1984;108:358–359.
66. Estensen RD. What is the role of myocardial mast cells? *Hum Pathol* 1985;16:536–538.
67. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) 1997; *1997 Annual Report on the State of the Drugs Problem in The European Union*. Lisbon: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.

68. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Polydrug Use: Patterns and Responses*. Luxembourg, Publications Office of the European Union, 2009. Available at: http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_93217_EN_EMCCDDA_SI09_polydrug%20use.pdf
69. Facchetti A, Fallarini S, Miserere S, Bertolotti A, Ferrero I, Tozzi R, Gatti C, Palladini G, Perlini S, Nano R. Histochemical study of cardiac mast cells degranulation and collagen deposition: interaction with the catecholaminergic system in the rat. *Eur J Histochem* 2006;50(2):133–140.
70. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung SA, Barrett MA, Davis SE, Gatewood SJL, Njoku DB, Rose NR. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta1, interleukin-1beta, and interleukin-4 in the heart. *Am J Pathol* 2004a;165:1883–1894.
71. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Gatewood S, Njoku D, Steele R, Barrett M, Rose NR. Mast cells and innate cytokines are associated with susceptibility to autoimmune heart disease following coxsackievirus B3 infection. *Autoimmunity* 2004b;37:131–145.
72. Fareed A, Vayalapalli S, Byrd-Sellers J, et al. Onsite QTc interval screening for patients in methadone maintenance treatment. *J Addict Dis* 2010;1:15–22.
73. Fernandez H, Libby TA. Heroin – its history, pharmacology and treatment (2nd ed). Minnesota: Hazelden, 2011.
74. Ferrari AU, Franzelli C, Daffonchio A, Perlini S, Dirienzo M. Sympathovagal interplay in the control of overall blood pressure variability in unanesthetized rats. *Am J Physiol* 1996;270:H2143–2148.
75. Ferreiro C. Heroin, Drugs, the straight facts. New York: Infobase Publishing, 2003.
76. Fineschi V, Cecchi R, Centini F, Reattelli LP, Turillazzi E. Immunohistochemical quantification of pulmonary mast-cells and post-mortem blood dosages of tryptase and eosinophil cationic protein in 48 heroin-related deaths. *Forensic Sci Int* 2001;120(3):189–194.
77. Fineschi V, Wetli CV, Di Paolo M, Baroldi G. Myocardial necrosis and cocaine—a quantitative morphologic study in 26 cocaine-associated deaths. *Int J Leg Med* 1997;110:193–198.
78. Forcada P, Beigelman R, Milei J. Inapparent myocarditis and sudden death in pediatrics. Diagnosis by immunohistochemical staining. *Int J Cardiol* 1996;56:93–97.

79. Francis GS, Chu C: Compensatory and maladaptive responses to cardiac dysfunction. *Curr Opin Cardiol* 1995;10(3):260–267.
80. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- α , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischaemia/reperfusion. *Circulation* 1998;98:699–710.
81. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 2003;65:45–79.
82. Frishman WH, Del Vecchio A, Sanal S, et al. Cardiovascular manifestations of substance abuse: part 2: alcohol, amphetamines, heroin, cannabis, and caffeine. *Heart Dis* 2003;5:253–271.
83. Fugelstad A, Ahlner J, Brandt L, Ceder G, Eksborg S, Rajs J, Beck O. Use of morphine and 6-monoacetylmorphine in blood for the evaluation of possible risk factors for sudden death in 192 heroin users. *Addiction* 2003;98(4):463–470.
84. Gadaleta MD, Hall MH, Nelson RL. Cocaine induced acute aortic dissection. *Chest* 1989;96:1203–1205.
85. Gaspard GJ, Pasumarthi KB. Quantification of cardiac fibrosis by colour–subtractive computer–assisted image analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35:679–686.
86. Gerevich J, Bácskai E, Farkas L, Danics Z. A case report: Pavlovian conditioning as a risk factor of heroin 'overdose' death". *Harm Reduction Journal* 2005;2:11.
87. George S, Moreira K, Fabohunda M. Methadone and the heart: what the clinician needs to know. *Curr Drug Abuse Rev* 2008;3:297–302.
88. Ghuran A, Nolan J. Recreational drug misuse: issues for the cardiologist. *Heart* 2000;83(6):627–633.
89. Gilles S, Zahler S, Welsch U, Sommerhoff CP, Becker BF. Release of TNF- α during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovasc Res* 2003;60:608–616.
90. Ginsberg MD, Hedley–Whyte T, Richardson EP. Hypoxicischemic leukoencephalopathy in man. *Arch Neurol* 1976;33:5–14.
91. Glauser L, Dowrie RL, Smith WR. Electrocardiographic abnormalities in acute heroin overdosage. *Bull Narcotics* 1977;29:85–89.
92. Glennon RA. *Classical hallucinogens*. In: *Pharmacological Aspects of Drug Dependence*, Eds. Shuster CR, Kuhar MJ. Berlin: Springer, 1996, 343–371.

93. Goldberger BA, Cone EJ, Grant TM, Caplan YH, Levine BS, Smialek JE. Disposition of heroin and its metabolites in heroin-related deaths. *J Anal Toxicol* 1994;18:22–28.
94. Goldberger BA, Darwin WD, Grant TM, Allen AC, Caplan YH, Cone EJ. Measurement of heroin and its metabolites by isotope dilution electron-impact mass spectrometry. *Clin Chem* 1993;39:670–675.
95. Goldsmith S, From AH. Arsenic-induced atypical ventricular tachycardia. *N Engl J Med* 1980;303(19):1096–1098.
96. Gordon T, Reibman J. Cardiovascular toxicity of inhaled ambient particulate matter. *Toxicol Sci* 2000;56(1):2–4.
97. Gourgoutis G, Das G. Gastrointestinal manifestations of cocaine addiction. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1994;32:136–141.
98. Graves R. *Steps*. London: Cassell, 1958.
99. Gray H. Gray's anatomy – 37th ed. (Williams PL, Ed.) Edinburgh: C. Livingstone, 1989.
100. Gruber BL, Marchese MJ, Suzuki K, Schwartz LB, Okada Y, Nagase H et al. Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *J Clin Invest* 1989;84:1657–1662.
101. Hackel DB, Ratliff NB, Mikat E. The heart in shock. *Circulation Res* 1974;35:805–811.
102. Haft JJ. Cardiovascular injury induced by sympathetic catecholamines. *Prog Cardiovasc Dis* 1974;17:73–86.
103. Hahn HH, Schweid AI, Beaty HN. Complications of injecting dissolved methylphenidate tablets. *Arch Znt Med* 1969;123: 656–659.
104. Halloran O, Ifthikharuddin S, Samkoff L. Leukoencephalopathy from "chasing the dragon". *Neurology* 2005;64(10):1755.
105. Hammarneh S. Sources and development of Arabic medical therapy and medical pharmacology. *Sudhaffs Arch Gesch Med Naturwiss* 1970;54:34.
106. Hammersley R, Cassidy MT, Oliver J. Drugs associated with drug-related deaths in Edinburgh and Glasgow, November 1990 to October 1992. *Addiction* 1995;90:959–965.
107. Hara M, Matsumori A, Ono K, Kido H, Hwang MW, Miyamoto T, Iwasaki A, Okada M, Nakatani K, Sasayama S. Mast cells cause apoptosis of cardiomyocytes and proliferation of other intramyocardial cells in vitro. *Circulation* 1999;100:1443–1449.
108. Harvey SC. Hypnotics and sedatives. In: Gilman AG, Goodman LS, Rail TW, Murad F, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7th ed. New York Macmillan, 1985:339–371.

109. Hatamochi A, Fujiwara K, Ueki H. Effects of histamine on collagen synthesis by cultured fibroblasts derived from guinea pig skin. *Arch Dermatol Res* 1985;277:60–64.
110. Haunstetter A, Izumo S: Apoptosis. Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998;82(11):1111–1129.
111. He SY, Matoba R, Sodesaki K, et al. Morphological and morphometric investigation of cardiac lesions after chronic administration of methamphetamine in rats. *Nippon Hoigaku Zasshi* 1996;50(2):63–71.
112. Helpern M, Rho Y–M. Deaths from narcotism in New York City. *New York State J Med* 1966;11:2391–2408.
113. Heng MC, Haberfeld G. Thrombotic phenomenon associated with intravenous cocaine. *J Am Acad Dermatol* 1987;16:462–468.
114. Hill MD, Cooper PW, Perry JR. Chasing the dragon--neurological toxicity associated with inhalation of heroin vapour: case report. *CMAJ* 2000;162(2):236–238.
115. Hill JA, Karimi M, Kutschke W, et al. Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation* 2000;101(24):2863–2869.
116. Himelman RB, Chung WS, Chernoff DN, et al. Cardiac manifestations of human immunodeficiency virus infection: a two-dimensional echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:1030–1036.
117. Hollander JE, Levitt MA, Young GP, Briglia E, Wetle CV, Gawad Y. Effect of recent cocaine use on the specificity of cardiac markers for diagnosis of acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1998;135:245–252.
118. Holtz J: Pathophysiology of heart failure and the renin–angiotensin–system. *Basic Res Cardiol* 1993;88(suppl 1):183–201.
119. Hopkins GB. Pulmonary angiothrombotic granulomatosis in drug offenders. *J Am Med Assoc* 1972; 221: 909–911.
120. Hulse GK, English DR, Milne E, Holman CDJ. The quantification of mortality resulting from the regular use of illicit opiates. *Addiction* 1999;94:221–229.
121. Ilic G, Gligorijevic J, Karadzic R, Antovic A, Kostic-Banovic L, Stojanovic J, Milic M. Myocardial damage in heroin abuse: immunohistochemical investigations with LCA, CD68, and CD45R0. *Rom J Leg Med* 2011;19:89–94.
122. Inturissi CE, Max MB, Foley KM, Schultz M, Shin S-U, Houde RW. The pharmacokinetics of heroin in patients with chronic pain. *New Eng J Med* 1984;310: 1213–1217.

123. Inturrisi CE, Schultz M, Shin S, Umans JG, Angel L, Simon EJ. Evidence from opiate binding studies that heroin acts through its metabolites. *Life Sci* 1983;33 Suppl 1: 773–6.
124. Jaffe JH, Martin WR. Opioid analgesics and antagonists. In: Gilman AG, Goodman IS, Rail TW, Murad F, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7th ed. New York: Macmillan, 1985:491–531.
125. Jaffe WM, Morgan DE, Pearlman AS, et al. Infective endocarditis, 1983–1988: echocardiographic findings and factors influencing morbidity and mortality. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1227–1233.
126. James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation* 1994;90(1):556–573.
127. Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C, Reimer KA. Effect of reperfusion in the late phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites and ultrastructure. *Circ Res* 1985;56:262–278.
128. Johnson M. Effects of β 2-agonists on resident and infiltrating inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:S282–290.
129. Kaa E, Kaempe B. Impurities, adulterants and diluents in illicit heroin in Denmark (Jutland and Fyn). *Forensic Sci Znt* 1986;31:195–210.
130. Kališnik M. Temelji stereologije. *Acta Stereologica* 1985;4(1):1–148.
131. Karch SB. The pathology of drug abuse, 2nd edn. Boca Raton, New York: CRC Press, 1996.
132. Karch SB. Cocaine cardiovascular toxicity. *South Med J* 2005;98:794–799.
133. Karliner JS, Steinberg AD, Williams MH. Lung function after pulmonary edema associated with heroin overdose. *Arch Znt Med* 1969;124:350–353.
134. Kasch S. Serum catecholamines in cocaine intoxicated patients with cardiac symptoms. *Ann Emerg Med* 1987;16:481.
135. Kass DA, Saavedra WF, Sabbah HN. Reverse Remodeling and enhanced inotropic reserve from the cardiac support device in experimental cardiac failure. *J Card Fail* 2004;10(6 Suppl):S215–S219.
136. Katzung B. Temeljna i klinička farmakologija (ed 11). Medicinska naklada: Zagreb, 2011.
137. Kinney EL. Causes of false negative auscultation of regurgitant lesions: a Doppler echocardiographic study of 294 patients. *J Gen Intern Med* 1988;3: 429–434.
138. Kitamura M, Shimizu M, Kita Y, et al. Quantitative evaluation of the rate of myocardial interstitial fibrosis using a personal computer. *Jpn Circ J* 1997;61:81–86.

139. Kitaura-Inenaga K, Hara M, Higuchi K, Yamamoto K, Yamaki A, Ono K, Nakano A, Kinoshita M, Sasayama S, Matsomori A. Gene expression of cardiac mast cell chymase and tryptase in a murine model of heart failure caused by viral myocarditis. *Circ J* 2003;67:881–884.
140. Kitulwatte ID, Kim PJ, Pollanen MS. Sudden death related myocarditis: a study of 56 cases. *Forensic Sci Med Pathol* 2010;6:13–19.
141. Kloner RA, Hale S. Unraveling the complex effects of cocaine on the heart. *Circulation* 1993;87:1046–1047.
142. Klous MG, Van den Brink W, Van Ree JM, Beijnen JH. Development of pharmaceutical heroin preparations for medical co-prescription to opioid dependent patients. *Drug Alcohol Depend* 2005;80(3):283–295.
143. Kosten TR, Hollister LE. Drugs of abuse. In: Katzung BG, ed. *Basic & Clinical Pharmacology, 8th ed.* Norwalk: Appleton & Lange; 2000: 532–548.
144. Kramer RK, Turner RC. Renal infarction associated with cocaine use and latent protein C deficiency. *South Med J* 1993;86:1436–1438.
145. Krantz MJ, Lewkowicz L, Hays H, et al. Torsade de pointes associated with very-high-dose methadone. *Ann Intern Med* 2002;137:501–504.
146. Kringsholm B, Christoffersen P. Liver pathology in fatal drug addiction. *Forensic Sci Int* 1982;20:141–151.
147. Kringsholm B, Christoffersen B. Spleen and portal lymph node pathology in fatal drug addiction. *Forensic Sci Int* 1984;25:233–244.
148. Kringsholm B, Christoffersen P. Lung and heart pathology in fatal drug addiction. A consecutive autopsy study. *For Sci Internat* 1987;34:39–51.
149. Kronstrand R, Grundin R, Jonsson J. Incidence of opiates, amphetamines, and cocaine in hair and blood in fatal cases of heroin overdose. *For Sci Internat* 1998;92:29–38.
150. Labianca R, Sarzi-Puttini P, Zuccaro SM, et al. Adverse effects associated with non-opioid and opioid treatment in patients with chronic pain. *Clin Drug Investig* 2012;32 Suppl 1:53–63.
151. Lamb D, Roberts G. Starch and talc emboli in drug addicts' lungs. *J Clin Pathol* 1972;25:876–881.
152. Lees M, Taylor DJ, Woolley DE. Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B. *Eur J Biochem* 1994;223:171–177.

153. Leppert W. The role of opioid receptor antagonists in the treatment of opioid-induced constipation: a review. *Adv Ther* 2010;27:714–730.
154. Lerner AM, Oerther FJ. Characteristics and sequelae of paregoric abuse. *Ann In Med* 1966;65:1019–1030.
155. Levick SP, Meléndez GC, Plante E, McLarty JL, Brower GL, Janicki JS. Cardiac mast cells: the centrepiece in adverse myocardial remodelling. *Cardiovasc Res* 2011;89(1):12–19.
156. Levine B, Green D, Smialek JE. The role of ethanol in heroin deaths. *J For Sci* 1995;40:808–810.
157. Li F, Wang X, Capasso JM, et al. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28(8):1737–1746.
158. Linder J, Cassling RS, Rogler WC, Wilson JE, Markin RS, Sears TD, McManus BM. Immunohistochemical characterization of lymphocytes in uninflamed ventricular myocardium. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:917–920.
159. Lipski J, Stimmel B, Donoso E. The effect of heroin and multiple drug abuse on the electrocardiogram. *Am Heart J* 1973;86(5):663–668.
160. Litwak KN, McMahan A, Lott KA, et al. Monensin toxicosis in the domestic bovine calf: A large animal model of cardiac dysfunction. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2005;44(3):45–49.
161. Long CS, Brown RD. The cardiac fibroblast, another therapeutic target for mending the broken heart? *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1273–1278.
162. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. *Circulation* 2006;113:1807–1816.
163. Martin XJ, Wynne DG, Glennon PE, et al. Regulation of expression of contractile proteins with cardiac hypertrophy and failure. *Mol Cell Biochem* 1996;157(1–2):181–189.
164. Melandri R, De Tommaso I, Zele I, Rizzoli D, Rapezzi C, Pezzilli R, Re G, Fontana G. [Myocardial involvement in rhabdomyolysis caused by acute heroin intoxication]. *Recenti Prog Med* 1991;82(6):324–327. (in Italian)
165. Messmer D, Hatsukari I, Hitosugi N, Schmidt-Wolf GH, Pravin CS. Morphine reciprocally regulates IL-10 and IL-12 production by monocyte-derived human dendritic cells and enhances T cell activation. *Mol Med* 2006;12(Suppl11–12):284–290.

166. Metzger JM, Wahr PA, Michele DE, et al. Effects of myosin heavy chain isoform switching on Ca²⁺-activated tension development in single adult cardiac myocytes. *Circ Res* 1999;84(11):1310–1317.
167. Mickel EJ. *The artificial paradises in French literature*. Univ. N. Carolina Press: Chapel Hill, 1969.
168. Milei J, Bortman G, Fernandez-Alonso G, Grancelli H, Beigelman R. Immunohistochemical staining of lymphocytes for the reliable diagnosis of myocarditis in endomyocardial biopsies. *Cardiology* 1990;77:77–85.
169. Milroy CM, Parai JL. The histopathology of drugs of abuse. *Histopathology* 2011;59:579–593.
170. Monforte JR. Some observations concerning blood morphine concentrations in narcotic addicts. *J For Sci* 1977;22:718–724.
171. Moorman A, Webb S, Brown NA, Lamers W, Anderson RH. Development of the heart: (1) Formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart* 2003;89:806–814.
172. Morris DC. Cocaine heart disease. *Hosp Prac* 1991;26:81–90.
173. Murray DB, Gardner JD, Brower GL, Janicki JS. Endothelin-1 mediates cardiac mast cell degranulation, matrix metalloproteinase activation, and myocardial remodeling in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:2295–2299.
174. Nalbandian H, Sheth N, Dietrich R, Georgiou J. Intestinal ischemia caused by cocaine ingestion: report of two cases. *Surgery* 1985;97:374–376.
175. Nechushtan H, Razin E. Regulation of mast cell growth and proliferation. *Crit Rev Oncol Hematol* 1996;23:131–150.
176. Nerantzis CE, Koulouris SN, Marianou SK, et al. Histologic findings of the sinus node and the perinodal area in street heroin addicts, victims of sudden unexpected death. *J Forensic Sci* 2011; 56:645–648.
177. Ness RB, Grisso JA, Hirschinger N, Markovic N, Shaw LM, Day NL, Kline J. Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med* 1999;340:333–339.
178. Novielli KD, Chambers CV. Splenic infarction after cocaine use. *Ann Intern Med* 1991;114:251–252.
179. Nympha B, El-Guindy DS, DeVilliers W, Doherty DE. Acute alcohol intake impairs lung inflammation by changing pro- and antiinflammatory mediator balance. *Alcohol* 2007;41(5):335–345.
180. Nzerue CM, Hewan-Lowe K, Riley LJ. Cocaine and the kidney: a synthesis of pathophysiologic and clinical perspectives. *Am J Kidney Dis* 2000;35:783–795.

181. Offiah C, Hall E. Heroin-induced leukoencephalopathy: characterization using MRI, diffusion-weighted imaging, and MR spectroscopy. *Clinical Radiology* 2008;63(2):146–152.
182. Olson EN. A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med* 2004;10(5):467–474.
183. Olson KR. Poisoning & drug overdose – 5th ed. McGraw Hill Lange, 2006.
184. Opie L. Heart cells and organells, in Opie L (ed.): *The Heart*. New York: Harcourt Brace Jovanovich, 1996, pp. 15–29.
185. Palaniyandi SS, Watanabe K, Ma M, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y. Involvement of mast cells in the development of fibrosis in rats with postmyocarditis dilated cardiomyopathy. *Biol Pharm Bull* 2005;28:2128–2132.
186. Palladini G, Tozzi R, Perlini S. Cardiac mast cells in the transition to heart failure: innocent bystanders or key actors? *J Hypertens* 2003;21:1823–1825.
187. Pallant J. *SPSS – Priručnik za preživljavanje (prevod trećeg izdanja)*. Mikro knjiga, Beograd, 2009.
188. Panizo A, Mindan FJ, Galindo M, Cenarruzabeitia E, Hernandez M, Diez J. Are mast cells involved in hypertensive heart disease? *J Hypertens* 1995;13:1201–1208.
189. Paranthaman SK, Khan F. Acute cardiomyopathy with recurrent pulmonary edema and hypotension following heroin overdosage. *Chest* 1976;69:117–119.
190. Passarino G, Ciccone G, Sirgusa R, et al. Histopathological findings in 851 autopsies of drug addicts, with toxicologic and virologic correlations. *Am J Forensic Med Pathol* 2005;26:106–116.
191. Patella V, Marino I, Arbustini E, Lamparter-Schummert B, Verga L, Adt M, Marone G. Stem cell factor in mast cells and increased mast cell density in idiopathic and ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 1998;97(10):971–978.
192. Paterna S, Di Pasquale P, Montaina G, et al. Effect of heroin and morphine on cardiac performance in isolated and perfused rabbit heart: evaluation of cardiac haemodynamics, myocardial enzyme activity and ultrastructure features. *Cardiologia* 1991;36(10):811–815.
193. Paterna S, Di Pasquale P, Montaina G, et al. Effect of heroin and morphine on cardiac performance in isolated and perfused rabbit heart: evaluation of cardiac hemodynamics, myocardial enzyme activity and ultrastructural features. *Cardiologia* 1991;36:811–815.
194. Peon J, Ruiz-Gonzalez M. Electrophysiological effects of morphine, naloxone, and comorphone on cardiac Purkinje fibers. *Proc West Pharmacol Soc* 1991;34:255–259.

195. Perlini S, Palladini G, Ferrero I, Tozzi R, Fallarini S, Facchetti A, Nano R, Clari F, Busca G, Fogari R, Ferrari AU. Sympathectomy or doxazosin, but not propranolol, blunt myocardial interstitial fibrosis in pressure-overload hypertrophy. *Hypertension* 2005;46:1213–1218.
196. Petrovic A, Abramovic M, Mihailovic D, Gligorijevic J, Zivkovic V, Mojsilovic M, et al. Multicolor counterstaining for immunohistochemistry – a modified Movat's pentachrome. *Biotech Histochem* 2011; 86(6):429–435.
197. Petrovic D, Zorc M, Zorc-Pleskovic R, Vraspir-Porenta O. Morphometrical and stereological analysis of myocardial mast cells in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Folia Biol [Praha]* 1999;45:63–66.
198. Peters A, Liu E, Verrier RL, et al. Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology* 2000;11(1):11–17.
199. Philippe B, Schonberg J. Righteous Dopefiend. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, 2009.
200. Piano MR. Cellular and signaling mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Nurs* 1994;8(4):1–26.
201. Piano MR, Bondmass M, Schwertz DW. The molecular and cellular pathophysiology of heart failure. *Heart Lung* 1998;27(1):3–19.
202. Pires JG, Milanez MC, Pereira FE. Histamine levels in tissues of Trypanosoma cruzi-infected mice. *Agents Actions Suppl* 1992;36:96–98.
203. Pogue VA, Nurse HM. Cocaine-associated acute myoglobinuric renal failure. *Am J Med* 1989;86:183–186.
204. Pons-Llado G, Carreras F, Borràs X, MD, et al. Findings on Doppler echocardiography in asymptomatic intravenous heroin users. *Am J Cardiol* 1992;69:238–241.
205. Popik P, Layer RT, Skolnick P. 100 years of ibogaine: neurochemical and pharmacological actions of a putative anti-addictive drug. *Pharmacol Rev* 1996;53:791–798.
206. Postan M, Correa R, Ferrans VJ, Tarleton RL. In vitro culture of cardiac mast cells from mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;105:251–257.
207. Powis B, Strang J, Griffiths P, Taylor C, Williamson S, Fountain J, Gossop M. Self-reported overdose among injecting drug users in London: extent and nature of the problem. *Addiction* 1999;94:471–478.

208. Pur-Shahriari AA, Mills RA, Hoppin FG, et al. Comparison of chronic and acute effect of morphine sulfate on cardiovascular function. *Am J Cardiol* 1967;20:654–659.
209. Puxeddu I, Levi-Schaffer F. Mast cells and tissue remodelling. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2002;42:16–18.
210. Raichlen JS, Brest AN. Tricuspid valve prolapse. *Cardiovasc Clin* 1987;17: 97–109.
211. Rajs J, Falconer B. Cardiac lesions in intravenous drug addicts. *Forensic Sci Znt* 1979;13:193–209.
212. Rajs J, Härm T, Ormstad K. Postmortem findings of pulmonary lesions of older datum in intravenous drug addicts. *Virchows Arch A* 1984;402:405–414.
213. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. Golden marketing: Zagreb, 2006.
214. Rauck RL. Treatment of opioid-induced constipation: focus on the peripheral μ -opioid receptor antagonist methylnaltrexone. *Drugs* 2013;73:1297–306.
215. Ray O, Ksir C. *Drugs, Society & Human Behavior*. 6th Ed. St. Louis: Mosby, 1993.
216. Reynolds JL, Mahajan SD, Aalinkeel R, Nair B, Sykes DE, Schwartz SA. Proteomic analyses of the effects of drugs of abuse on monocytederived mature dendritic cells. *Immunol Invest* 2009;38(Suppl 6):526–550.
217. Richey PA, Brown SP. Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: A review. *J Sports Sci* 1998;16(2):129–141.
218. Risser D, Hönigschnabl S, Stichenwirth M, et al. Drug-related emergencies and drugrelated deaths in Vienna, 1995–1997. *Drug Alcohol Depend* 2001;61:307–313.
219. Risser D, Uhl A, Oberndorfer F, et al. Is there a relationship between street heroin purity and drug-related emergencies and/or drug related deaths? An analysis from Vienna, Austria. *J Forensic Sci* 2007;52:1171–1176.
220. Robertson CH, Reynolds RC, Wilson JE. Pulmonary hypertension and foreign body granulomas in intravenous drug abusers. *Am J Med* 1976;61: 657–664.
221. Robbins J. Genetic modification of the heart: Exploring necessity and sufficiency in the past 10 years. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36(5):643–652.
222. Rosen MR. Cardiac arrhythmias and antiarrhythmic drugs: recent advances in our understanding of mechanism. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995;6(10 Pt 2):868–879.
223. Roy S, Loh HH. Effects of opioids on the immune system. *Neurochem Res* 1996;21:1375–1386.
224. Rutenber AJ, Kalter HD, Santinga P. The role of ethanol abuse in the etiology of heroin-related death. *J For Sci* 1990;35:891–900.

225. Sabbah HN, Sharov VG. Apoptosis in heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 1998;40(6):549–562.
226. Saleem TM, Singh M, Murtaza M, Singh A, Kasubhai M, Gnanasekaran I, Freudenberger RS, Cappell MS, Hutt DA. Renal infarction: a rare complication of cocaine abuse. *Am J Emerg Med* 2001;19:528–529.
227. Saphir O. Myocarditis: general review with analysis of 240 cases. *Arch Pathol* 1942;33:88–137.
228. Satoh M, Tamura G, Segawa I. Enteroviral RNA in endomyocardial biopsy tissues of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Pathol Intern* 1994;44:345–351.
229. Saukko P, Knight B. *Knight's Forensic Pathology*. 3rd ed. Arnold: London, 2004.
230. Sawynok J. The therapeutic use of heroin: a review of the pharmacological literature. *Can J Physiol Pharmacol* 1986;64(1):1–6.
231. Schnitt SJ, Ciano PS, Schoen FJ. Quantification of lymphocytes in endomyocardial biopsies. *Hum Pathol* 1987;18:796–800.
232. Schwartz RH. Adolescent heroin use: a review. *Pediatrics* 1998;102(6):1461–1466.
233. Schwartzfarb L, Singh G, Marcus D. Heroin-associated rhabdomyolysis with cardiac involvement. *Arch Intern Med* 1977;137(9):1255–1257.
234. Scola AM, Chong LK, Suvarna SK, Chess–Williams R, Peachell PT. Desensitisation of mast cell beta2-adrenoceptor-mediated responses by salmeterol and formoterol. *Br J Pharmacol* 2004;14:163–171.
235. Scott JM. *The White Poppy: a History of Opium*. New York: Funk & Wagnalls, 1969.
236. Seguin CA, Pilliar RM, Madri JA, Kandel RA. TNF-alpha induces MMP2 gelatinase activity and MT1-MMP expression in an in vitro model of nucleus pulposus tissue degeneration. *Spine* 2008;33:356–365.
237. Seltenhammer MH, Marchart K, Paula P, et al. Micromorphological changes in cardiac tissue of drug-related deaths with emphasis on chronic illicit opioid abuse. *Addiction* 2013;108:1287–1295.
238. Sheagren JN. Endocarditis complicating parenteral drug abuse. In: Remington JS, Swarm MN, eds. *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*. New York: McGraw–Hill, 1981:211–233.
239. Sheppard MN. *Practical cardiovascular pathology*. 2nd ed. Hodder Arnold: London, 2011, pp. 193–219.

240. Shiota N, Rysa J, Kovanen PT, Ruskoaho H, Kokkonen JO, Lindstedt KA. A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease. *J Hypertens* 2003;21:1935–1944.
241. Shultes RE. *Hallucinogenic Plants*. New York: Golden Press, 1976.
242. Shultes RE. The Plant Kingdom and Hallucinogenes. Part III. *Bull Narcot* 1970;22:43.
243. Siegel H. Human pulmonary pathology associated with narcotic and other addictive drugs. *Hum Pathol* 1972;3:55–66.
244. Silverman SH, Turner WW Jr. Intraarterial drug abuse: new treatment options. *J Vasc Surg* 1991;14(1):111–116.
245. Skopp G, Pötsch L, Klingmann A, Mattern R. Stability of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-6-glucuronide in fresh blood and plasma and postmortem blood samples. *J Anal Toxicol* 2001;25:2–7.
246. Sopher IM. Myocarditis and the air accident. *Aerospace Med* 1974;45:963–967.
247. Spain DM. Patterns of pulmonary fibrosis as related to pulmonary function. *Ann Znt Med* 1950; 33:1150–1163.
248. Spiegelhalter DJ, Stovin PG. An analysis of repeated biopsies following cardiac transplantation. *Stat Med* 1983;2(1):33–40.
249. Spiehler VR. Computer-assisted interpretation in forensic toxicology: morphine-involved deaths. *J For Sci* 1989;34:1104–1115.
250. Sporer KA, Dorn E. Heroin overdose related noncardiogenic pulmonary edema. A case series. *Chest* 2001;120:1628–1632.
251. Steenbergen C, Kolbeck PC, Wolfe JA, Anthony RM, Sanfilippo FP, Jennings RB. Detection of lymphocytes in endomyocardium using immunohistochemical biopsies in suspected cases of myocarditis. *J Appl Cardiol* 1986;1:63–73.
252. Steinberg AD, Karliner JS. The clinical spectrum of heroin pulmonary edema. *Arch Znt Med* 1968;122:122–127.
253. Stevens PJ, Ground KE. Occurrence and significance of myocarditis in trauma. *Aerospace Med* 1970;41:776–780.
254. Stevens PJ, Underwood–Ground K. Occurrence and significance of myocarditis in trauma. *Aerosp Med* 1970;41:776–780.
255. Stewart JA Jr, Wei CC, Brower GL, Rynders PE, Lucchesi PA, Janicki JS, Dell'Italia LJ. Cardiac mast cell– and chymase–mediated matrix metalloproteinase activity and left ventricular remodelling in mitral regurgitation in the dog. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:311–319.

256. Stimmel B, Dack S. Infective endocarditis in narcotic addicts. In: Rahimtoola SH, ed. *Infective Endocarditis*. New York: Grune & Stratton, 1978:195–209.
257. Strang J, Powis B, Best D, Vingoe L, Griffiths P, Taylor C, Welch S, Gossop M. Preventing opiate overdose fatalities with take-home naloxone: pre-launch study of possible impact and acceptability. *Addiction* 1999;94:199–204.
258. Stringer J, Welsh C, Tommasello A. Methadone-associated QT interval prolongation and torsades de pointes. *Am J Health Syst Pharm* 2009; 66:825–833.
259. Suematsu M, Ito Y, Fukuzaki H. The role of parasympathetic nerve activity in the pathogenesis of coronary vasospasm. *Jpn Heart J* 1987;28(5):649–661.
260. Suzuki K, Lees M, Newlands GF, Nagase H, Woolley DE. Activation of precursors for matrix metalloproteinases 1 (interstitial collagenase) and 3 (stromelysin) by rat mast-cell proteinases I and II. *Biochem J* 1995;305:301–306.
261. Symanski JD, Gettes LS. Drug effects on the electrocardiogram. A review of their clinical importance. *Drugs* 1993;46(2):219–248.
262. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999;79(1):215–262.
263. Sztajzel J, Karpuz H, Rutishauser W. Heroin abuse and myocardial infarction. *Int J Cardiol* 1994;47(2):180–182.
264. Szwed JJ. Pulmonary angiothrombosis caused by "Blue Velvet" addiction. *Ann Int Med* 1970;13:771–774.
265. Tagliaro F, De Battisti Z, Smith FP, Marigo M. Death from heroin overdose: findings from hair analysis. *Lancet* 1998;351:1923–1925.
266. Tallóczy Z, Martinez J, Joset D, Ray Y, Gácsér A, Toussi S, Mizushima N, Nosanchuk JD, Goldstein H, Loike J, Sulzer D, Santambrogio L. Methamphetamine inhibits antigen processing, presentation, and phagocytosis. *PLoS Pathog* 2008;4(2):e28.
267. Tazelaar HD, Karch SB, Stevens BG, Billingham ME. Cocaine and the heart. *Hum Pathol* 1987;18:195–199.
268. Tchougounova E, Lundequist A, Fajardo I, Winberg JO, Abrink M, Pejler G. A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. *J Biol Chem* 2005;280:9291–9296.
269. Tella SR, Schindler CW, Goldberg SR. Cardiovascular effects of cocaine in conscious rats: relative significance of central sympathetic stimulation and peripheral neuronal monoamine uptake and release mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;262:602–610.

270. Tomaszefski JF, Hirsch CS. The pulmonary vascular lesions of intravenous drug abuse. *Hum Pathol* 1980;11:133–146.
271. Tukey RH; Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:581–616.
272. Turnicky RP, Goodin J, Smialek JE, Herskowitz A, Beschoner WE. Incidental myocarditis with intravenous drug abuse: the pathology, immunopathology, and potential implications for human immunodeficiency virus-associated myocarditis. *Hum Pathol* 1992;23:138–143.
273. Vaghjimal A. Splenic infarction related to cocaine use. *Postgrad Med J* 1996;72:768.
274. Van Empel VP, De Windt LJ. Myocyte hypertrophy and apoptosis: A balancing act. *Cardiovasc Res* 2004;63(3):487–499.
275. Van Vleet JF, Amstutz HE, Weirich WE, et al. Clinical, clinicopathologic, and pathologic alterations in acute monensin toxicosis in cattle. *Am J Vet Res* 1983;44(11):2133–2144.
276. Vasani RS, Evans JC, Benjamin EJ, et al. Relations of serum aldosterone to cardiac structure: gender-related differences in the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2004;43:957–962.
277. Virmani R, Robinowitz M, Smialek JE, Smyth DD. Cardiovascular effects of cocaine: an autopsy study of 40 patients. *Am Heart J* 1988;115:1068–1076.
278. Wang ML, Lin JL, Liaw SJ, Bullard MJ. Heroin lung: report of two cases. *J Formos Med Assoc* 1994;93(2):170–172.
279. Wasson VP, Wasson RG. *Mushrooms, Russia, and History*. New York: Pantheon Books, 1957.
280. Wasson RG. *Fly agaric and man*. In: *Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs*. Ed. Efron DH., Washington DC: National Institute of Mental Health, 1967.
281. Wasson RG, Hofmann A, Ruck CAP. *The Road to Eleusis*, Harcourt, New York: Brace Jovanovich, 1978.
282. Weber KT. Are myocardial fibrosis and diastolic dysfunction reversible in hypertensive heart disease? *Congest Heart Fail* 2005;11(6):322–324.
283. Wendt VE, Puro HE, Shapiro J, et al. Angiothrombotic pulmonary hypertension in addicts. *J Am Med Assoc* 1964;188:755–757.
284. Wetli CV, Rao A, Rao VJ. Fatal heroin body packing. *Am J For Med Path* 1997;18:312–318.
285. White JM, Irvine RJ. Mechanisms of fatal opioid overdose. *Addiction* 1999;94:961–972.

286. Why KJF, Meany BT, Richardson PJ, Olsen EG, Bowles NE, Cunningham L, Freeke CA, Archard LC. Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1994;89:2582–2589.
287. Willenheimer R. Left ventricular remodelling and dysfunction. Can the process be prevented? *Int J Cardiol* 2000;72:143–150.
288. World Health Organization. *Opioid Overdose: Trends, Risk factors, Interventions and Priorities for Action*. Geneva: World Health Organization, 1998.
289. Yeh PS, Yuan A, Yu CJ, Kuo SH, Luh KT, Yang PC. Acute respiratory distress syndrome in a woman with heroin and methamphetamine misuse. *J Formos Med Assoc* 2001;100(8):553–556.
290. Yoshida K, Yoshikawa J, Shakudo M, et al. Color Doppler evaluation of valvular regurgitation in normal subjects. *Circulation* 1988;78:840–847.
291. Zador D, Sunjic S, Darke S. Heroin-related deaths in New South Wales, 1992: toxicological findings and circumstances. *Med J Austral* 1996;164:204–207.
292. Zamora–Quizada JC, Dinerman H, Stadecker MJ, Kelly JJ. Skin infarction after freebasing cocaine (crack). *Ann Int Med* 1988;108:564–566.
293. Zeltner TB, Nussbaumer U, Rudin O, et al. Unusual pulmonary vascular lesions after intravenous injections of microcrystalline cellulose. *Virchows Arch A* 1982;395:207–216.
294. Zhang M, Tavora F, Zhang Y, Ripple M, Fowler D, Li L, Zhao Z, Burke A. The role of focal myocardial inflammation in sudden unexpected cardiac and noncardiac deaths—a clinicopathological study. *Int J Legal Med* 2011; doi:10.1007/s00414-011-0634-x.
295. Zhou S, Starkov A, Froberg MK, et al. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res* 2001;61(2):771–777.

БИОГРАФИЈА

Асист. др Мирослав Милић, од оца Славољуба, рођен 06.09.1976. године у Белој Паланци. Основну школу и гимназију „Стеван Сремац“ завршио је у Нишу са одличним успехом. Медицински факултет у Нишу, на студијској групи медицина, као редован студент, уписао је 1995/96. године и исти завршио 2003. године са просечном оценом 9,05. Након обављеног обавезног лекарског стажа у Клиничком центру у Нишу, 2004. године засновао је радни однос на неодређено време у Заводу за судску медицину у Нишу. Специјалистички стаж из судске медицине започео је новембра месеца 2006. године, при чему је део овог стажа (3 месеца) обавио у Центру за патологију и судску медицину ВМА у Београду. Специјалистички испит положио је са одличном оценом дана 30.11.2009. године пред комисијом Медицинског факултета у Нишу и тиме стручни назив специјалисте судске медицине.

Магистарску тезу из области судске медицине под називом *“Судско-медицински и правни аспекти квалификација повреда максилофацијалне регије”* одбранио је 2010. године на Медицинском факултету у Нишу и тиме стекао научно звање магистра медицинских наука.

НСВ Универзитета у Нишу је 2011. године донело одлуку о сагласности (8/13-01-004/11-008) којом је одобрена израда докторске тезе из области судске медицине под насловом: *„Хистохемијска, имунохистохемијска и морфометријска анализа промена на срчаном мишићу код хероинских зависника-аутопсијска студија“*.

У свакодневном раду активно се служи енглеским језиком и радом на рачунару (Windows, MS Office: Word, Excell, Internet Explorer).

У периоду од 2012. до 2014. године, као и током школске 2016./2017. године од стране Медицинског факултета у Нишу ангажован је у извођењу практичне наставе на предмету Судска медицина у звању клиничког асистента, а од 01.04.2018. године и као асистент на предмету Судска медицина.

Као аутор и коаутор учествовао је у изради више од 30 радова публикованих у домаћим и међународним часописима и презентованим на домаћим и међународним конгресима и симпозијумима.

Прилог 1. Изјаве аутора докторске дисертације

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Хистохемијска, имунохистохемијска и морфометријска анализа промена на срчаном мишићу код хероинских зависника – аутопсијска студија

која је одбрађена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио ауторска права, нити злоупотребио интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Мирослав С. Милић

Изјава 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

**Наслов дисертације: Хистохемијска, имунохистохемијска и морфометријска
анализа промена на срчаном мишићу код хероинских зависника – аутопсијска
студија**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Мирослав С. Милић

Изјава 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку "Никола Тесла" да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Хистохемијска, имунохистохемијска и морфометријска анализа промена на срчаном мишићу код хероинских зависника – аутопсијска студија

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*), за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Мирослав С. Милић