

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Irina R. Damjanjuk

**SUDSKOMEDICINSKI ZNAČAJ ODREĐIVANJA
POSTMORTALNE KONCENTRACIJE
KATEHOLAMINA, SEROTONINA I
ACETILHOLINA
U ODNOSU NA UZROK I POREKLO SMRTI**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

Mentor: Prof. dr Vesna Popović, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za sudsku medicinu "Milovan Milovanović"

članovi komisije:

1. Prof. dr Tatjana Atanasijević, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za sudsku medicinu "Milovan Milovanović"
2. Prof. dr Zoran Mihailović, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za sudsku medicinu "Milovan Milovanović"
3. Prof. dr Tihomir V. Ilić, Univerzitet odbrane u Beogradu, Medicinski fakultet Vojnomedicinske Akademije

Beograd, 2018.

Sudskomedicinski značaj određivanja postmortalne koncentracije kateholamina, serotonina i acetilholina u odnosu na uzrok i poreklo smrti

APSTRAKT

Stres predstavlja biološki odgovor na realnu/potencijalnu pretnju telesnom integritetu i homeostazi bilo koje vrste, koja pokreće brojne autonomne, endokrine, kognitivne i afektivne procese, sa ciljem da neutrališu izvor pretnje, kroz aktivaciju brojnih neurotransmitera i neuromodulatora. Monoamini: dopamin (DA), noradrenalin (NA), adrenalin (AD) i serotonin (5-HT), pored brojnih uloga kao neurotransmitera u centralnom nervnom sistemu i hormona u perifernim organima i tkivima, imaju ulogu glavnih humoralnih faktora u odgovoru na akutni stres. Nauka ističe i jasnu ulogu acetilholina (ACh) kao neuromodulatora u stresnom odgovoru. Akutni stres se može očekivati i u procesu nastupanja smrtnog ishoda, posebno kada se radi o nasilnim smrtima, te određivanje pomenutih neurotransmitera u postmortalnim uzorcima telesnih tečnosti može predstavljati marker za određene uzroke ili poreklo smrti. Cilj ove teze bio je utvrđivanje vrednosti monoamina i ACh u uzorcima seruma i cerebrospinalne tečnosti u odnosu na različito poreklo i uzrok smrti. Uzorci su uzimani tokom obdukcija, bez odstupanja od redovne obdukcione tehnike: uzorak je činio 81 ispitanik, uzrasta preko 18 godina, a postmortalni interval u kojem su uzorci uzimani nije bio duži od 72 časa. S obzirom na to da analitičke metode detekcije, prema literaturnim podacima, sprovedene na našem uzorku, nisu dale očekivane hromatografske odgovore, u cilju povećanja senzitivnosti detekcije, primenjena je derivatizacija analita etilhloroformatom i tečno-tečna ekstrakcija etilacetatom, uz koje su analiti dali najbolji odgovor. Pripremljeni uzorci su analizirani tehnikom tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom. Ovom tehnikom i uz specifičnu pripremu, određivane su koncentracije i ACh, no njegove vrednosti su bile ispod limita detekcije. Vrednosti monoamina su bile značajno više od dostupnih kliničkih referentnih vrednosti. Statistički značajna korelacija između vrednosti monoamina u likvoru i serumu nije ustanovljena ($p > 0,05$). Vrednosti monoamina se nisu značajno razlikovale u odnosu na pol i dužinu perioda agonije (određenu kao vreme između povređivanja/pojave simptoma bolesti do trenutka smrti), ($p > 0,05$). Generalno su vrednosti ispitivanih analita opadale sa uzrastom ispitanika (sa statističkom značajnošću za serotonin u CST: $p < 0,05$ i noradrenalin u serumu: $p < 0,05$), a rasle sa dužinom postmortalnog intervala; za noradrenalin se korelacija pokazala statistički značajnom ($p < 0,05$). Nije bilo

statistički značajnih razlika u vrednostima monoamina u odnosu na svesnost ispitanika o stresnom i potencijalno letalnom događaju ($p > 0,05$). Vrednosti su bile više u grupi nasilnih smrti u odnosu na prirodne, sa statističkom značajnošću za 5-HT i DA ($p < 0,05$), a ovde su utvrđene i granične vrednosti za distinkciju nasilnih od prirodnih smrti. Ali, značajne razlike u vrednostima monoamina, između podgrupa nasilne smrti (zadesna, samoubilačka i ubilačka) nisu utvrđene ($p > 0,05$). Iako evidentne, razlike u srednjim vrednostima monoamina između različitih uzroka smrti (vrednosti su uopšteno bile više u trovanju ugljen-monoksidom, a najniže u srčanoj smrti i hipotermiji), nisu pokazale statističku značajnost ($p > 0,05$), što smo pripisali relativno malom uzorku. Uprkos velikoj varijabilnosti u koncentracijama monoamina od slučaja do slučaja, njihove vrednosti su bile značajno više od kliničkih referentnih vrednosti i pokazale izvestan obrazac u javljanju, u odnosu na poreklo i uzroke smrti, što ukazuje da njihove vrednosti u likvoru i serumu mogu odražavati patofiziološke promene i disfunkciju moždanog tkiva i drugih organa u mehanizmu umiranja u raznim uzrocima smrti, jednako kao i magnitudu stresa koji prati proces umiranja. Ova je studija pokazala da utvrđivanje vrednosti monoamina, pre svega 5-HT i dopamina, u postmortalnim uzorcima cerebrospinalne tečnosti, može biti koristan marker u razlikovanju nasilnih i prirodnih smrti. Uz originalni doprinos ove studije u unapređivanju analitičke metode za simultano određivanje monoamina u postmortalnim uzorcima likvora i seruma, određene su granične vrednosti serotonina i dopamina u likvoru za razlikovanje smrti prema poreklu.

Ključne reči: monoamini, acetilholin, postmortalne vrednosti, biomarkeri akutnog stresnog odgovora, uzrok smrti, poreklo smrti, sudskomedicinski aspect

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: sudska medicina

Medicolegal aspect of determination of postmortem concentrations of catecholamines, serotonin and acetylcholine regarding the cause and manner of death

ABSTRACT

Stress is a biological response to any kind of real/potential threat to body integrity and homeostasis, which initiates numerous autonomic, endocrine, cognitive and affective processes, aimed to neutralize the source of danger through activation of numerous neurotransmitters and neuromodulators. Monoamines: dopamine (DA), noradrenaline (NA), adrenaline (AD) and serotonin (5-HT), apart from roles in the central nervous system and peripheral organs and tissues, where act as neurotransmitters and local hormones, are major humoral factors of the acute stress response. Science clarifies the role of acetylcholine (ACh) as one of the additional neuromodulators in this response. Acute stress could be expected in the process of dying, especially in cases of violent death, thus measurements of the neurotransmitters in postmortem samples of body fluids could be the marker for certain cause or manner of death. The aim of this thesis was to investigate levels of the monoamines and ACh in cerebrospinal fluid and serum postmortem samples in different manner and cause of death and to render their possible profiles with the regard to these variables. The samples were obtained during standard autopsy procedure (n=81, age ≥ 18 years, within postmortem interval < 72 h). Regarding the detection methods proposed in the literature, which failed to reveal adequate detector response, we applied the method of derivatization using ethyl chloroformate and liquid-liquid extraction by ethyl acetate, aiming to intensify and improve the sensitivity of the detection. This pre-column derivatization method resulted in best detection answer and stability of derivatized analytes, thus was a method of choice for further analyzes. In advance, the samples were analyzed through LC-MS/MS method. The same analytical technique with different pre-treatment of samples, was applied in order to measure ACh, but the values of ACh were under the limit of detection. The values of monoamines were markedly higher than clinical reference values. No significant correlations between values of monoamines in liquor and serum were observed ($p > 0,05$). No gender and agony period (determined as the time between onset of symptoms/injury until death) differences were detected ($p > 0,05$). Generally,

the levels decreased with age (significantly for serotonin CSF values: $p < 0,05$ and NA serum values: $p < 0,05$) and increased with postmortem interval, with the significant correlation for noradrenalin ($p < 0,05$). There was no significant difference in levels of any analyte regarding victims' awareness of impending lethal outcome ($p > 0,05$). The levels were higher for violent deaths, significantly for 5-HT and DA ($p < 0,05$), and their cutoff values were determined to distinguish violent from natural deaths. But, for subgroups of violent deaths (accidental, homicidal and suicidal) the statistical significance was not found ($p > 0,05$). Differences were found in mean values among different causes of death (levels were higher in carbon monoxide intoxication but the lowest in cardiac deaths and hypothermia) but without statistical significance ($p > 0,05$), what could be accounted to relatively small collectives' number. Despite huge case to case differences in concentrations of eACh monoamine, their levels were markedly higher than clinical reference values and revealed certain profiles regarding manner and cause of death. It suggests that their cerebrospinal fluid and serum levels might reflect pathophysiological changes and brain dysfunction as well as other organs in the mechanism of dying in different causes of death as well as a magnitude of stress response following the process of death. This study points that values of monoamine, above all cerebrospinal levels of 5-HT and DA could be useful markers in a distinction of violent and natural deaths. Apart from the contribution of this thesis to improvement in an analytical method of simultaneous detection of monoamines in postmortem samples of liquor and serum, we determined cutoff values to distinguish between different manners of death.

Keywords: monoamines, acetylcholine, postmortem levels, biomarkers of acute stress response, cause of death, manner of death, forensic aspect

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Forensic medicine

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Neurotransmiteri	2
1.1.1. Monoamini	4
1.1.1.1. Kateholamini	4
1.1.1.2. Serotonin	11
1.1.2. Acetilholin.....	13
1.1.2. Uloga neurotransmitera u odgovoru na stres.....	16
1.2. Telesne tečnosti u postmortalnim biohemijskim istraživanjima	20
1.2.1. Krv.....	20
1.2.2. Cerebrospinalna tečnost	21
1.2.3. Struktura i funkcija krvnomoždane barijere.....	23
1.3. Dosadašnja istraživanja na postmortalnim biomarkerima stresnog odgovora	24
2. CILJEVI.....	27
3. MATERIJAL I METODE.....	29
3.1. Materijal	29
3.2. Analitička metoda	33
3.2.1. Analitička metoda za monoamine	33
3.2.2. Analitička metoda za acetilholin	36
3.3. Aparatura.....	37
3.4. Statistička obrada rezultata.....	38
4. REZULTATI.....	39
4.1. Serotonin	39
4.2. Dopamin.....	43
4.3. Noradrenalin.....	50
4.4. Adrenalin.....	57
5. DISKUSIJA.....	61
6. ZAKLJUČCI.....	75
7. LITERATURA.....	76

1. UVOD

Sudskomedicinska ekspertiza smrti podrazumeva, pre svega, utvrđivanje porekla i uzroka smrti. *Uzrok smrti* je svaka povreda ili bolest koja dovodi do poremećaja fizioloških procesa u telu koji se završavaju smrtnim ishodom. Smrt izazvana jednim uzrokom može biti različita prema poreklu. *Poreklo smrti* objašnjava kako je do tog uzroka smrti došlo i uopšteno se smrti prema poreklu dele na prirodne i nasilne: ubilačke, samoubilačke i zadesne [1].

Pored autopsije koja predstavlja osnovu sudskomedicinskog istraživanja smrti, te patohistologije, imunohistopatologije, molekularne biologije, itd., već nekoliko decenija se razvija čitav spektar dijagnostičkih mogućnosti i procedura okupljenih u pojmu *tanatološke hemije ili tanatohemije*, koje se za razne ciljeve mogu primeniti u postmortalnim analizama.

Tanatohemija (ovaj termin je *Evans* upotrebio prvi put 1952.god.) proučava ponašanje i stabilnost različitih biohemijskih parametara-hormona, neurotransmitera ili produkata metabolizma, u postmortalnim uzorcima telesnih tečnosti i/ili organa, i time omogućava proučavanje funkcionalnih promena u procesima koji prethode smrti. Ova jedinjenja definišu sistemske funkcionalne i patofiziološke promene, u sklopu postojećih oboljenja i povreda i procesa umiranja uopšte, te se mogu označiti kao njihove “*patofiziološke vitalne reakcije*” odnosno *postmortalni biohemijski markeri* različitih patoloških stanja i procesa [2].

Svaki spoljašnji ili unutrašnji stimulus koji pretili da ugrozi telesni integritet i naruši homeostazu, u centralnom nervnom sistemu (u daljem tekstu CNS) pokreće tzv. “odgovor na stres”, kroz aktivaciju mehanizama odbrane u kojima pojedini neurotransmiteri i neuromodulatori imaju ključnu ulogu. Istraživanja postmortalnih koncentracija neurotransmitera, pre svega monoamina, pokazala su da njihove koncentracije u postmortalnim uzorcima raznih telesnih tečnosti značajno variraju, ali i pokazuju određene pravilnosti u zavisnosti od dužine postmortalnog intervala, perioda agonije, uzroka i porekla smrti i okolnosti umiranja uopšte. Zato se mogu označiti ne samo kao markeri različitih patoloških stanja i poremećaja (pre svega psihijatrijskih i metaboličkih), već i kao *postmortalni markeri stresnog odgovora*, što doprinosi istrazi

uzroka, mehanizma i porekla smrti, posebno u slučajevima naprasnih i nasilnih smrti ili onima bez prisustva svedoka. Ovo i jesu osnovni zadaci sudske medicine u svakodnevnom rutinskom radu, čime ona služi društvu, pravnom sistemu i nauci [2-6].

1.1. Neurotransmiteri

Neurotransmiter (u daljem tekstu NT) je supstanca koja se oslobađa na kraju nervnog vlakna nakon pristizanja nervnog impulsa i prolaskom kroz sinaptičku pukotinu omogućava prenos impulsa na sledeće nervno vlakno (ili mišićno vlakno ili receptor).

Otkriće neurotransmitera početkom dvadesetih godina prošlog veka dovelo je do revolucije u shvatanjima funkcionisanja nervnog sistema za koji se dotad smatralo da funkcioniše isključivo po tipu električnih potencijala između neurona. Od tog vremena i otkrića prvog neurotransmitera – acetilholina, do danas, identifikovano je više od stotinu supstanci sa neurotransmitterskom funkcijom [7].

Većina NT nastaje sintezom iz prekursora, u citoplazmi aksonskih nervnih završetaka neurona CNS, gde se nakon sinteze deponuju u vezikulama, i nakon pobuđivanja neurona oslobađaju u sinaptičku pukotinu (Slika 1.) Kako bi se podražaj koji izazivaju na postsinaptičkom neuronu završio, NT se iz sinaptičke pukotine ponovo preuzimaju u presinaptički neuron, mehanizmom aktivnog transporta (npr. monoamini) ili se pod dejstvom enzima razgrađuju u samoj sinaptičkoj pukotini (npr. acetilholin) [8].

Ne postoji jedinstvena podela neurotransmitera - oni se dele prema mestu dejstva, funkciji, hemijskom sastavu, itd. Najjednostavnija i najčešće upotrebljavana podela neurotransmitera se zasniva na njihovoj *hemijskoj strukturi*, prema kojoj postoje:

A) estri holina - acetilholin

B) monoamini - kateholamini: dopamin, noradrenalin, adrenalin

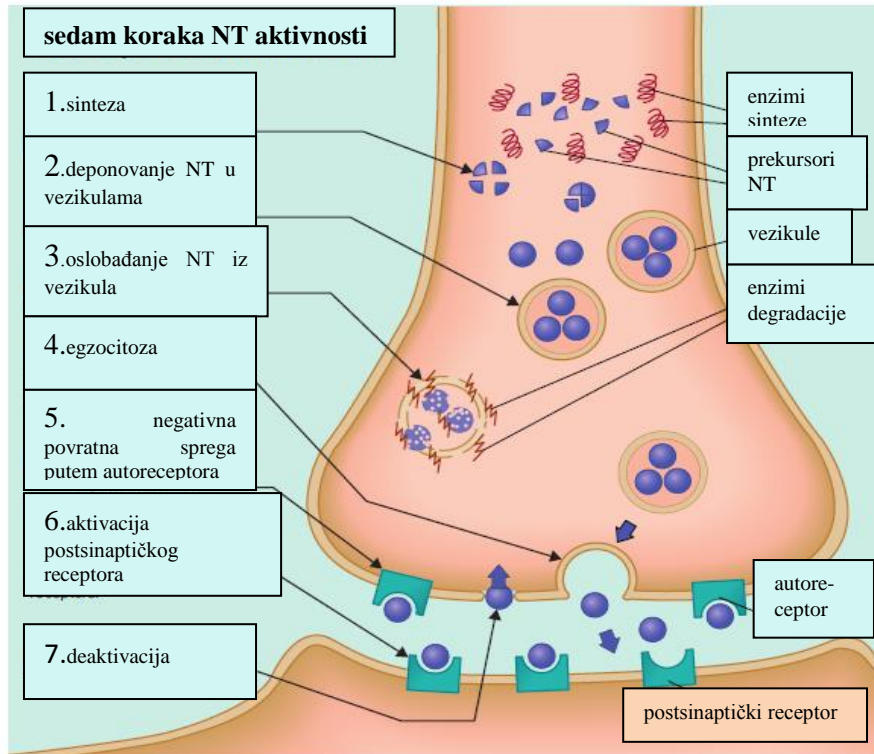
- indolamini: serotonin

- imidazoli: histamin

C) aminokiseline - kisele: glutamat

- bazne: GABA, glicin

- D) peptidi: enkefalini, endorfini, holecistokinin, supstanca P... i mnogi drugi
 E) purini: ATP, adenzin



Slika 1. Sedam koraka sinenze i aktivnosti neurotransmitera: 1) sinteza molekula NT iz prekursora, pod dejstvom enzima, 2) deponovanje u vezikulama, 3) oslobađanje molekula NT iz vezikula pod dejstvom enzima, 4) fuzija vezikula sa presinaptičkom membranom i oslobađanje NT u sinaptiču pukotinu, 5) vezivanje oslobođenih NT za autoreceptore i inhibicija daljeg oslobađanja NT, 6) oslobođeni NT se vezuju za postsinaptičke receptore, 7) oslobođeni NT se deaktiviraju preuzimanjem kroz presinaptičku membranu ili enzimskom degradacijom.

Uz to, važne funkcije unutar centralnog nervnog sistema imaju steroidi, eikosanoidi (prostaglandini), itd., ali je nejasno da li se oni mogu klasifikovati kao neurotransmiteri u pravom smislu [8].

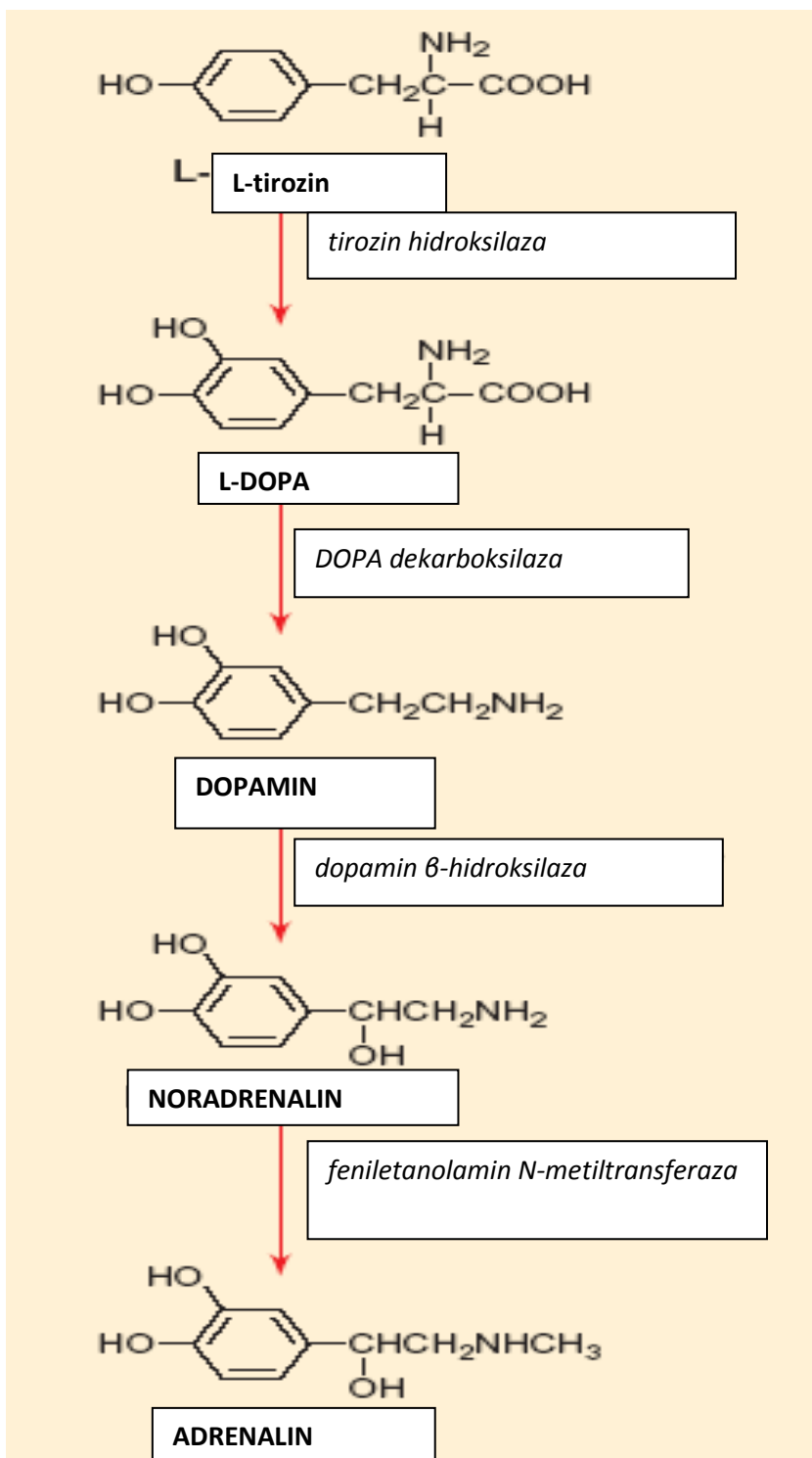
1.1.1. Monoamini

Četiri monoaminska neurotransmitera - dopamin, noradrenalin, adrenalin i serotonin su na osnovu hemijske strukture podeljeni u dve grupe: *kateholamine* (u daljem tekstu KH) – dopamin, adrenalin, noradrenalin i *indolamine*–serotonin [7].

1.1.1.1. Kateholamini

Metabolizam: najvažniji enzim u sintezi KH je *tirozin kinaza*, koja katalizuje pretvaranje neesencijalne aminokiseline tirozina u dihidroksi-l-fenilalanin (L-DOPA). Enzim *dopa dekarboksilaza* omogućava pretvaranje L-DOPA-e u dopamin (ovaj enzim katalizuje i pretvaranje 5-hidroksi triptofana, odnosno serotonina, te bi bolji naziv bio dekarboksilaza L-aromatičnih amino kiselina). U dopaminskim neuronima se sinteza završava nastankom dopamina (u daljem tekstu DA), dok u noradrenergičkim i adrenergičkim neuronima, ćelijama srži nadbubrega i simpatičkim neuronima, postoji enzim *dopamin-β-hidroksilaza* koja dopamin pretvara u noradrenalin (u daljem tekstu NA), a u drugim neuronima (male grupe neurona u moždanom stablu koje koriste adrenalin kao neurotransmiter) i ćelijama srži nadbubrega, enzim *feniletanolamin N-metiltransferaza* koji NA pretvara u adrenalin (u daljem tekstu AD). (Slika 2.) Nakon sinteze, KH su deponovani u sinaptičkim vezikulama nervnih završetaka neurona iz kojih se oslobađaju nakon podržaja, te se kroz sinaptičku membranu oslobađaju pomoću monoaminskih transportera. KH su relativno stabilni u hromafinskim granulama u ćelijama srži nadbubrega, gde im poluživot traje oko 1 dan. DA napušta sinaptičke vezikule unutar nekoliko minuta, dok poluvreme oslobađanja endogenog NA iz sinaptičkih vezikula u perifernim nervima varira između 3-4 minuta. Jednom oslobođeni iz vezikula, KH se egzocitozom oslobađaju u sinaptičku pukotinu, gde nakon podražaja postsinaptičkog neurona dolazi do njihove inaktivacije. Fiziološka aktivnost KH završava se 1) ponovnim preuzimanjem u presinaptički nervni završetak, 2) difuzijom (ni dopaminski ni noradrenalinški transporter se ne nalaze u samoj sinaptičkoj pukotini, tako da DA i NA moraju difuzijom dospeti do mesta ponovnog preuzimanja putem transportera) 3) razgradnjom do završnih produkata metabolizma.

Razgradnja KH se odvija u nervnim završecima neurona u kojima se sintetišu, dejstvom enzima *monoaminooksidaze*, koja ih razgrađuje u odgovarajuće aldehide, koji se potom oksiduju u kiseline dejstvom *aldehyd dehidrogenaza* ili se pretvaraju u alkohole ili glikole dejstvom *aldehyd reduktaza*.



Slika 2. Sinteza kateholamina iz aminokiseline tirozina.

U CNS prvenstveno funkcionišu dva KH neurotransmitera – dopamin i noradrenalin, a razlike u njihovoj aktivnosti inicijalno su uslovljene lokalizacijom receptora i njihovim brojnim podtipovima koji postoje za svaki NT ponaosob i za koje se vezuju nakon oslobađanja [9].

1.1.1.1.1. Dopamin

Dopamin je prvi put otkriven 1910, a njegova NT funkcija se spominje prvi put 1958 (Carlsson i Hillarp), kada je otkriveno da ima posebnu distribuciju u pojedinim delovima mozga, što je uputilo na zaključak da funkcionise kao nezavisni neurotransmiter i da nije samo faza u sintezi noradrenalina (za rad na ovom polju, Carlsson i Greengard dobili su Nobelovu nagradu iz oblasti fiziologije). Istraživanja funkcije dopamina su imala značaja na polju psihijatrije i psihofarmakologije više no ijednog drugog neurotransmitera [9, 10]!

Pored uloge neurotransmitera u CNS, DA je i prekursor NA u svim centralnim i perifernim noradrenergičkim neuronima. Sinteza, pored već opisane (Slika 2.), može ići i iz esencijalne aminokiseline fenilalanina (L-fenilalanin→L-tirozin→L-DOPA→...). Obe aminokiseline – tirozin i fenilalanin postoje u gotovo svakom proteinu i kao takve se obezbeđuju ishranom, kao i dopamin uostalom, međutim, dopamin u konačnom obliku, ne prolazi krvno-moždanu barijeru i njegova sinteza i funkcija na periferiji su nezavisne od onih u CNS, te se za potrebe njegove moždane funkcije, sintetise isključivo u moždanim neuronima. Koncentracija DA u plazmi se može porediti sa koncentracijom adrenalina, ali u ljudskom organizmu 95% dopamina u plazmi je konjugovano u dopamin sulfat, koji se kao takav izlučuje urinom, a relativno mala količina nekonjugovanog dopamina u krvi potiče iz simpatičkog nervnog sistema, digestivnog sistema, a moguće i iz drugih organa. Ovaj DA može delovati na periferne dopaminske receptore, može se metabolisati ili pretvarati u noradrenalin pomoću *dopaminbetahidroksilaze* koja se oslobađa iz srži nadbubrežne žlezde.

Metabolizam: Glavni metabolit koji nastaje razgradnjom DA dejstvom MAO-B i aldehyd-dehidrogenaze je 3,4,dihidroksifenilsirćetna kiselina (DOPAC), koja se dalje metaboliše u homovaniličnu kiselinu (HVA), koja je primarni dopaminski metabolit u ljudi. DOPAC i HVA se oslobađaju u cerebrospinalnu tečnost (u daljem tekstu CST) odakle aktivnim transportom ulaze u krvnu struju. HVA poreklom iz moždanog tkiva čini samo 12 % cirkulišuće količine HVA u krvnoj plazmi – dok njen veći deo nastaje metabolizmom dopamina u intestinalnom traktu. Kao hidrofilna supstanca, DA ne

prolazi krvnomoždanu barijeru u konačnom oliku, te se za potrebe moždane funkcije sintetizuje isključivo u DA neuronima [9,11].

Distribucija u CNS: tela dopaminskih neurona se nalaze uglavnom u mezencefalonu, diencefalonu, olfaktornom bulbusu i retini, a najveći deo dopaminskih neurona, gde je i glavno mesto sinteze, su ventralna tegmentalna zona i substancija nigra u bazalnim ganglijama mezencefalona (Slika 3.). Odatle polaze tri glavna neuronska puta i to: u prefrontalni korteks (mezokortikalni put), nukleus akumbens i olfaktorni tuberkul (mezolimbicki put) i bazalne ganglije - za strijatum (nc.caudatus i putamen) i amigdaloidni kompleks (nigrostrijatni put). Četvrti, tuberoinfundibularni put, daje projekcije za medijalnu eminenciju hipotalamusa, a aksoni ovog puta oslobađaju DA u hipotalamo-hipofizni portni sistem, odakle se prevodi u epifizu, gde inhibira oslobađanje prolaktina [12]. Neki od ovih puteva su ipsilateralni, a pojedini prelaze i u drugu moždanu hemisferu. Ove podele nisu apsolutne jer postoje preklapanja neuronskih grupa u mesencephalonu [9, 11, 12].

Funkcija: Kao neurotransmitter, DA ima ulogu u: kontroli motorike i kretanja, učenju, motivacionim procesima i raznim oblicima ponašanja - pre svega afektivnom: uzbuđenju i nagrađivanju; u kognitivnim funkcijama, pripisivanju značaja određenoj vrsti stimulusa, kao i brojne funkcije na nižem kortikalnom nivou, kao što su laktacija, nauzeja, seksualne funkcije, osećaj zadovoljstva.

Van nervnog sistema: Funkcija DA na periferiji nije dovoljno poznata. Poznato je da DA ima pozitivan inotropni efekat na srce - *neto* efekat umerenih doza DA je povećanje sistolnog pritiska i bez promena dijastolnog, što je osnovna karakteristika zbog koje je indikovano u tretmanu traumatskog i kardiogenog šoka [13]. Dopamin dovodi do renalne vazodilatacije, u bubrezima povećava i izlučivanje natrijuma, u pankreasu redukuje produkciju insulina, u digestivnom traktu redukuje motilitet creva i ima zaštitnu ulogu na intestinalnu mukozu, u imunom sistemu redukuje aktivnost limfocita. Sa izuzetkom krvnih sudova, dopamin u perifernim sistemima ima parakrino ulogu: sintetizuje se i deluje lokalno - na ćelije u neposrednoj blizini onih koje ga i izlučuju. [9-12,14,15].

Disfunkcija DA sistema značajno je povezana sa nekoliko važnih oboljenja nervnog sistema, kao što su Parkinsonova bolest, sindrom smanjene pažnje i dečje hiperaktivnosti (*ADHD attention deficit hyperactivity disorder*), sindrom nemirnih nogu, (*RLS, restless legs syndrome*), shizofrenija. DA je odgovoran i za stresom

indukovanu psihopatologiju, u npr. posttraumatskom stresnom poremećaju [10-12,16], a značajna je i povezanost DA sistema sa zavisnošću od zloupotrebe droga [17].

1.1.1.1.2. Noradrenalin

Godine 1954. pokazano je da distribucija NA u CNSu nije uniformna, a i da ta distribucija nije obavezno u korelaciji sa tonusom krvnih sudova, što je uputilo na zaključak da NA funkcioniše i kao centralni neurotransmitter. Godine 1970. Axelrod je dobio Nobelovu nagradu, kada je pokazao da se NA nakon podražaja neurona i oslobađanja u sinaptičku pukotinu, preuzima u presinaptički nervni završetak iz kojeg je prethodno oslobođen [9].

Noradrenalin (drugačije, norepinefrin) se oslobađa iz terminalnih nervnih završetaka noradrenergičkih neurona u CNS i iz većine postganglijskih simpatičkih neurona i hromafinskih ćelija srži nadbubrežne žlezde. Njegova uloga na periferiji (tzv. simpatoadrenalni sistem) je poznata skoro ceo vek, međutim, njegovu funkciju u CNS je mnogo teže pratiti.

Metabolizam: Noradrenalin nastaje iz dopamina, dejstvom enzima *dopamin β -hidroksilaze*. Metabolizam NA nije isti u svim životinjskim vrstama. Najveći deo NA se metaboliše u citosolu nervnih završetaka dejstvom *MAO-A* (njena prevashodno intracelularna lokalizacija odgovorna je za održavanje stalnih niskih koncentracija citoplazmatskog NA - posledice visokih vrednosti NA u citoplazmi viđaju se kod zloupotrebe amfetamina). Drugi enzim razgradnje je *katehol-O-metiltransferaza* (COMT) i ona se nalazi uglavnom van nervnog sistema, u ćelijama glatkih mišića, endotelijalnim ćelijama i ćelijama glije. U humanoj cerebrospinalnoj tečnosti (u daljem tekstu CST) dominantni metabolit NA je 3-metoksi-4-hidroksifenilglikol (MHPG), nešto manje ima 3,4-dihidroksifenilglikola, a još manje vanilmandelične kiseline (VMA). Značajna količina MHPG nastaje i u perifernim nervima, koja se dalje do VMA metaboliše u jetri. VMA je glavni urinarni metabolit NA i adrenalina u ljudi. Kao hidrofilna supstanca, NA ne prolazi krvnomoždanu barijeru, te se za moždane funkcije isključivo sintetiše u NA neuronima.

Distribucija: U CNS (Slika 3.) su tela NA neurona grupisana u dve velike grupe u moždanom stablu: *locus coeruleus* (u daljem tekstu LC), koje je najvažnije NA moždano jedro i *lateralna tegmentalna jedra*. Iz LC, koji sadrži 45% svih noradrenergičkih neurona u CNS, aksoni formiraju dorzalni noradrenergički snop koji daje projekcije u cerebellum i u kičmenu moždinu. LC inerviše i veliki deo velikog mozga. Većina, ako ne i sva ova vlakna su ipsilateralna [9].

Funkcija: NA neuroni imaju širok spektar dejstva - LC igra glavnu ulogu u pažnji, pobuđivanju i vigilonosti. Uopšte, u CNS-u NA je odgovoran za budnost, pripravnost, uzbuđenje, raspoloženje, intuiciju, reakcije tipa “borbe i bega” i za sistem nagrađivanja, te se smatra da je centralna noradrenergička aktivnost deo alarmnog sistema organizma. Još nije potpuno jasno da li je pojačana aktivnost NA odgovorna za neprijatne emotivne doživljaje stresnih stimulusa (strah i anksioznost) ili je njegova glavna uloga da ublaži emotivni odgovor na njih i da se sa njima izbori [18-20], ali je takođe poznato da descendentni NA putevi smanjuju percepciju bola [21].

I na periferiji, sekrecija NA od strane ćelija srži nadbubrežne žlezde, koje se takođe smatraju postganglijskim neuronima, nastaje kao odgovor na stresnu situaciju. Ove ćelije NA, zajedno sa adrenalinom, oslobađaju direktno u krv. NA se takođe oslobađa i iz postganglionskih neurona simpatičkog nervnog sistema, gde izaziva odgovor po tipu “borbe i bega” u svakom tkivu [18-20]. Ovo se može smatrati osnovom za određivanje NA aktivnosti kao “perifernog” odgovora na stres.

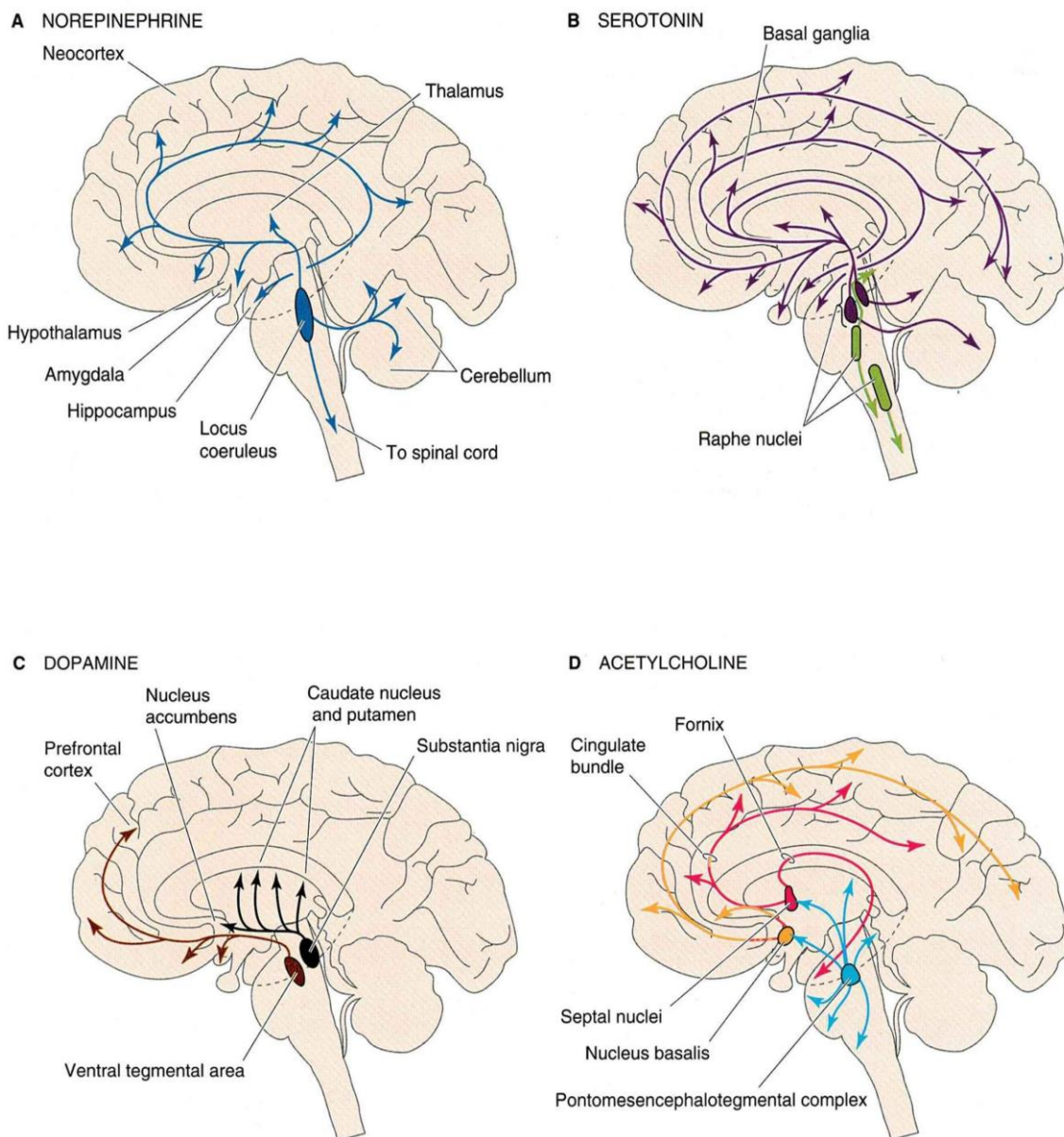
1.1.1.1.3. Adrenalin

U CNS postoji izvestan broj neurona koji sadrži AD (drugačije epinefrin), a njihova ćelijska tela su smeštena u lateralnom tegmentumu i dorzalnoj meduli (gde su izmešana sa NA neuronima), dok aksone šalju u hipotalamus, talamus, periakveduktalnu sivu masu i kičmenu moždinu (Slika 3.)

Uloga AD kao neurotransmitera u CNS nije preterano značajna. Međutim, putem masovnog sinaptičkog odašiljanja, u sklopu povećane sekrecije iz srži nadbubrežne žlezde u kritičnim situacijama, on izaziva pobuđenost i reakciju pripravnosti i opreznosti, time što indirektno snižava prag neurona retikularne formacije moždanog stabla. Smatra se da ovaj efekat nastaje putem skoka krvnog pritiska koji povećava ekscitabilnost retikularne formacije [13].

Van CNS, pored efekata čiji je ukupan učinak podizanje stanja pripravnosti/opreza, noradrenalin i adrenalin imaju i brojne metaboličke efekte: podstiču glikogenolizu u jetri i skeletnim mišićima, mobilizaciju slobodnih masnih kisellina (ubrzavaju metabolizam uopšte), utiču na brzinu i kontrakciju srčanog mišića, kao i na njegovu ekscitabilnost dovodeći do ekstrasistola i aritmija. Kod ljudi, najveći deo KH

izlučenih iz ćelija srži nadbubrežne žlezde u adrenalnu venu, čini adrenalin, a cirkulišući NA potiče delom i iz noradrenergičkih nervnih vlakana. U plazmi je oko 90% dopamina i 70% NA i AD konjugovano u sulfate, koji predstavljaju njihovu neaktivnu frakciju [13].



Slika 3. Distribucija četiri NT sistema. A) NA neuroni smešteni u locus coeruleus daju projekcije za kičmenu moždinu, cerebellum, nekoliko jedara hipotalamusa, thalamus, balazni korteks i neokorteks. B) 5-HT neuron smešteni u jedra raphae nucleii daju projekcije u hipotalamus, limbički sistem, neokorteks, cerebellum i kičmenu moždinu. C) DA neuroni smešteni u jedra substantiae nigrae projektuju vlakna u strijatum, a oni iz ventralne tegmentalne zone mezencephalona u prefrontalni korteks i limbički sistem. D) ACh neuroni u bazalnim delovima velikog mozga daju projekcije u hippocampus i neokorteks, a oni u pontomesencephalotegmentalnom holinergičkom kompleksu projekcije za dorzalne delove talamusa i veliki mozak.

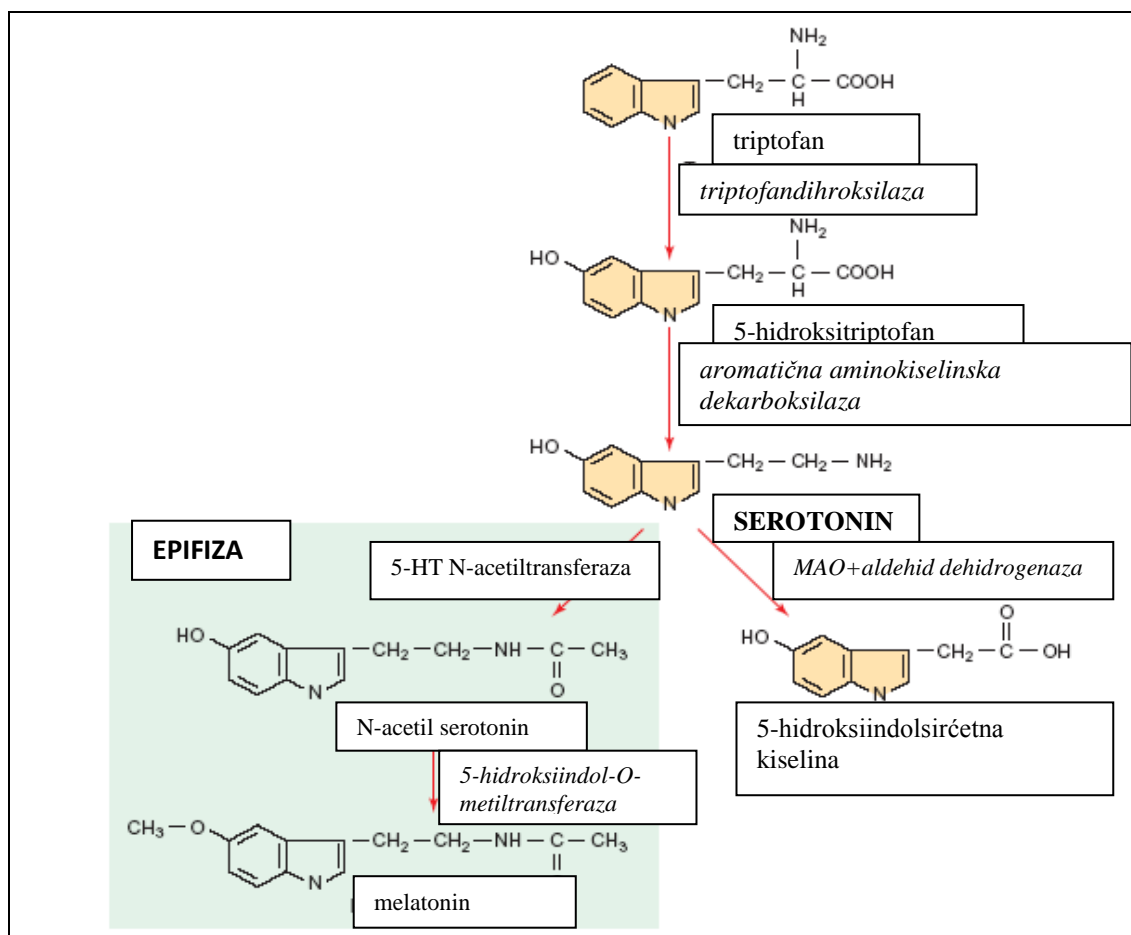
1.1.1.2. Serotonin

Istorijat: Još od sredine XIX veka, nauci je poznato da u serumu, koji se izdvoji nakon zgrušavanja krvi, postoji supstanca koja dovodi do kontrakcije glatkih mišića u zidovima krvnih sudova izazivajući porast vaskularnog tonusa. Početkom XX veka se znalo da ova supstanca potiče iz trombocita (Janeway i dr, 1918)[22]. Nakon desetina godina izučavanja Maurice Rapport i Irvine Page, 1948.god., izolovali su i opisali ovu supstancu, nazvavši je serotonin (naziv potiče od latinske reči serum i grčke reči tonic). Nešto kasnije, 1952. godine, Erspamer i Areso su iz enterohromafinskih ćelija GIT-a izolovali supstancu odgovornu za kontrakciju glatkih mišića zida creva, nazvavši je enteramin, a onda i dokazali da su otkriveni enteramin i serotonin zapravo jedno te isto jedinjenje. Istovremeno, dokazano je da serotonin dovodi do kontrakcije glatkih mišićnih vlakana u zidu karotidne arterije, jejunuma, uterusa, itd. Twarog i Page su 1953. godine detektovali prisustvo serotoninina u tkivu mozga. Tako je serotonin otkriven u tri velika telesna sistema: trombocitima, gastrointestinalnom traktu i CNS-u. Brodie i Shore su 1957. godine pretpostavili i ulogu serotoninina kao neurotransmitera i nadalje su brojni autori doprineli otkriću tzv. serotonergičkog sistema u CNS [23]

Metabolizam: Serotonin (u daljem tekstu 5-HT) je biogeni monoamin, hemijski identifikovan kao 5-hidroksitriptamin čija se sinteza odvija kroz dve faze (Slika 4.): od esencijalne aminokiseline triptofana, hidrosilacijom putem enzima triptofan karboksilaze, nastaje 5-hidroksitriptofan (5-HTP), koji u drugoj fazi, dekarboksilacijom, postaje 5-hidroksitriptamin (5-HT). Razgradnja pod dejstvom monoaminooksidaze (MAO-A) je primarni metabolički put za 5-HT. Glavni produkt metabolizma je 5-hidroksiindolsirćetna kiselina (5-HIAA) koja se prvenstveno izlučuje urinom. Glavna mesta dejstva MAO-A su mozak, GIT, pluća, jetra i trombociti. U CNS 5-HT se obrađuje na nekoliko načina: nakon depolarizacije presinaptičkog neurona, oslobađa se u sinaptičku pukotinu, gde se može vezati za postsinaptičke receptore ili za autoreceptore na presinaptičkoj membrani (što ima ulogu negativne povratne sprege protiv daljeg oslobađanja). Kada dođe do ponovnog preuzimanja u presinaptički neuron, 5-HT se deponuje u vezikulama gde je zaštićen od metabolizma. Serotonin koji potiče iz enterohromafinskih ćelija se oslobađa u portnu cirkulaciju i biva brzo eliminisan iz plazme preuzimanjem od strane trombocita i metabolizmom u jetri. Onaj koji izbegne poslednje, stiže do pluća i tamo se metaboliše. Sinteza van CNS-a (95%) je ograničena na enterohromafinske ćelije i veoma malim delom na trombocite, koji imaju veoma malu mogućnost sinteze i veoma veliku sposobnost deponovanja, te su ova dva i glavni depoi serotoninina van CNS. Trombocitni 5-HT je praktično ukupni sadržaj 5-HT u cirkulaciji, budući da *slobodni serotonin* u plazmi (teško ga je odrediti zbog opasnosti od kontaminacije serotoninom otpuštenim iz trombocita) čini manje od 1% [24].

5-HT je, pri fiziološkim vrednostima pH, hidrofilna supstanca i stoga ne prolazi lipofilnu krvno-moždanu barijeru u konačnom obliku, što je uputilo naučnike na zaključak da se „centralni“ 5-HT sintetiše isključivo u moždanom tkivu [22].

Distribucija u CNS (Slika 3.): U CNSu se nalazi samo 5% ukupnog telesnog 5-HT, i to u neuronima čija su tela organizovana u malu grupu neurona duž srednje linije moždnog stabla, raphae nuclei. Iako malobrojna, njihovi aksoni inervišu gotovo sve delove CNS, putem ascendentnih i descendentnih vlakana u veliki mozak, produženu i kičmenu moždinu [22].



Slika 4. Sinteza i katabolizam serotonina. Pored značajne uloge koju ima, 5-HT je i precursor hormona melatonina. U epifizi, koja leži van krvno-moždane barijere, serotonin se pretvara u melatonin (5-metoksi-N-acetiltriptamin) koji ima ulogu u regulaciji bioritmova, sna i u afektivnim poremećajima

Funkcija: Nijedna poznata fiziološka supstanca nema tako različite funkcije kao što ima serotonin. Kao NT omogućava kontrolu cirkadijalnih i neuroendokrinih ritmova (regulacije disanja, spavanja, kardiovaskularne funkcije, metabolizma, temperature), i praktično sve oblike ponašanja: apetit, seksualne aktivnosti, emotivno i impulsivno ponašanje, motorne i kognitivne aktivnosti i neke autonomne funkcije, pamćenje i

učenje, raspoloženje (serotonin se smatra “hormonom sreće”), percepcije bola, mišićne kontrakcije i dr. Poremećaji ovih mehanizama se vezuju za etiopatogenezu različitih duševnih i somatskih poremećaja: depresije, agresije, autizma, anksioznih poremećaja, opsesivno-kompulzivnih poremećaja, psihoza, poremećaja uzimanja hrane i homeostaze, zavisnosti, migrene, vegetativnih poremećaja – povraćanja itd. [19,22,25,26].

U perifernim organima i tkivima, 5-HT ima ulogu još i u: agregaciji trombocita - u *in vivo* uslovima 5-HT oslobođen iz trombocita izaziva vazokonstrikciju u većini velikih arterija, vena i u venulama, a takođe indirektno doprinosi vazokonstrikciji pojačavajući kontraktilni odgovor drugih vazoaktivnih supstanci kao što su angiotenzin ili histamin; 5-HT ima jedinstven mehanizam dejstva u kardiopulmonalnom sistemu - ima uticaj na mitogenu aktivnost u glatkim mišićnim ćelijama aorte i plućnih arterija čime dovodi do njihove hipertrofije i proliferacije. Uz ostale monoamine reguliše gastrointestinalne motorne i senzorne funkcije. Oslobođanje 5-HT iz enterohromafinskih ćelija pokreće peristaltiku i sekreciju preko aferentnih neurona u mijenteričkom pleksusu, što rezultira u stimulaciji holinergičkih neurona koji dovode do kontrakcije i relaksacije mišića zida creva. Smatra se da poremećaj 5-HT transportera u enterocitnim ćelijama i manjak enterohromafinskih ćelija leže u osnovi sindroma iritabilnog kolona [23].

1.1.2. Acetilholin

ACh je prvi put identifikovan 1915 (Henry Hallett Dale), u vezi sa dejstvom koje ima na srčani mišić, a kao neurotransmiter je otkriven od strane Otto Loewi-ja, koji mu je primarno dao ime Vagusstoff jer je otkrio da se oslobađa iz vagusnog živca. Obojica su 1936 dobili Nobelovu nagradu iz fiziologije i medicine za ova otkrića. Takođe, acetilholin je i prvi neurotransmiter uopšte identifikovan.

Acetilholin (u daljem tekstu ACh) je prisutan na svim prvim sinapsama van CNS, bilo na simpatičkim ili parasimpatičkim ganglijama autonomnog nervnog sistema (gde je glavni NT), srži nadbubrega ili neuromišićnoj sinapsi skeletnih mišića. Na ovim mestima, ACh provodi brze ekscitatorne signale putem nikotinskih receptora. Takođe je NT na završecima parasimpatičkih nervnih vlakana, kao što su vagusni na glatkim mišićima i srčanom mišiću i sekretornim ćelijama, kao i na nekoliko simpatičkih nervnih završetaka znojnih žlezda, gde ima mnogo sporije ekscitatorno i inhibitorno dejstvo kroz muskarinske receptore.

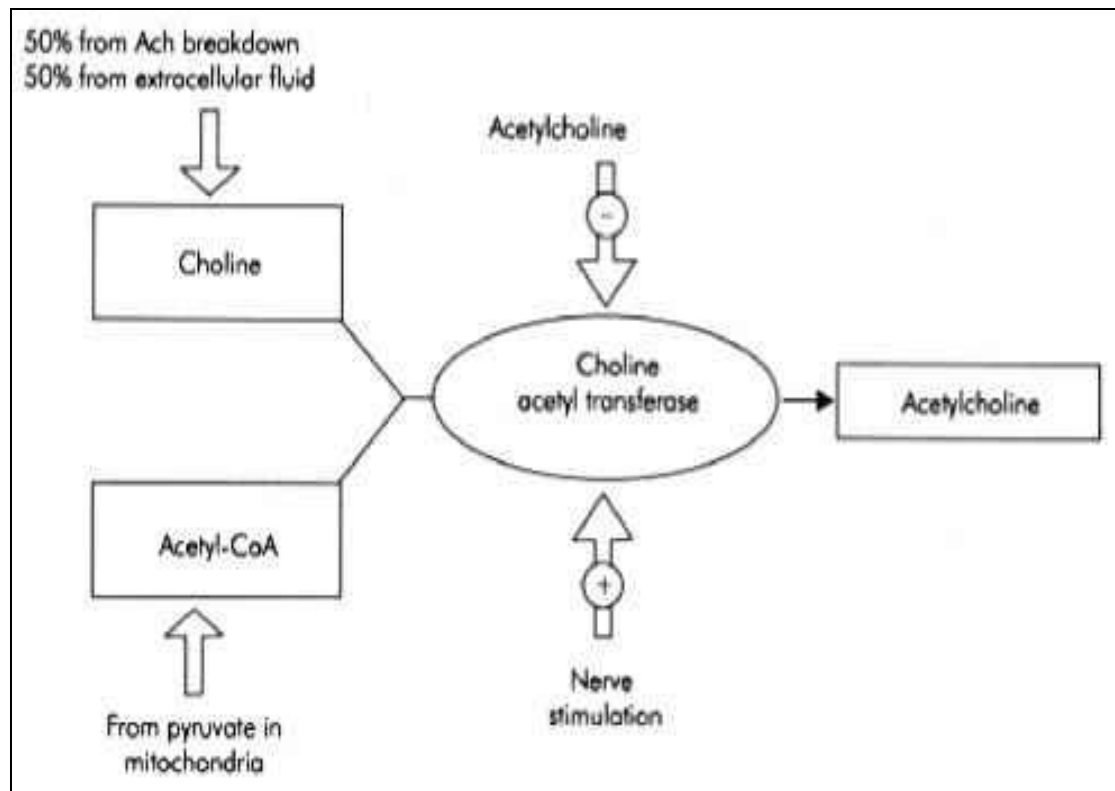
Metabolizam: ACh se sintetise u citoplazmi nervnih završetaka, iz aminoalkohola holina i acetyl-CoA, pod dejstvom enzima *acetilholinstrasnferaze*.

Molekuli ACh su deponovani u presinaptičkim vezikulama nervnih završetaka, gde svaka vezikula sadrži oko 4000 molekula ACh. Smatra se da postoji više vrsta vezikula, u odnosu na mogućnost oslobađanja ACh u zavisnosti od zahteva – one koje promptno oslobađaju ACh (80%) i one u kojima se ACh prevashodno čuva (20%). ACh se nakon dejstva na postsinaptičkom neuronu, vezuje za enzim *acetilholinesterazu* koja se nalazi na presinaptičkoj membrani i koja time biva acetilovana, a oslobođeni holin se aktivnim transportom vraća u presinaptički neuron, gde biva uključen u ponovnu sintezu ACh. Oko 50% holina koji učestvuje u sintezi ACh, obezbeđuje se na ovaj način. Acetilovan enzim nakon ovoga brzo biva hidrolizovan u svoj aktivni oblik, a kao produkt ovog metabolizma nastaje sirćetna kiselina. Ovaj enzim je prisutan u velikim količinama u sinaptičkoj pukotini i veoma je potentan (jedan molekul enzima je dovoljan za 10000 molekula ACh svake sekunde), a njegova uloga u uklanjanju slobodnog ACh iz sinaptičke pukotine je od osnovnog značaja za adekvatno funkcionisanje mišića.

Neki neurotoksini – npr. kurare, deluju upravo tako da inhibiraju acetilholinesterazu čime dovode do nagomilavanja velike količine ACh na neuromišićnom spoju što dovodi do paralize respiratorne muskulature i prestanka srčanog rada.

Zbog visoko polarizovane amonijum grupe ACh ne prolazi lipidne membrane, te ni krvnomoždanu barijeru.

Distribucija u CNS (Slika 3): ACh ima dve vrste receptora: *nikotinske*, koji provode brze impulse i *muskarinske*, koji učestvuju u sporijim transmisija. Nikotinski receptori u CNSu se dominantno nalaze u hipokampusu, cerebralnom korteksu i ventralnoj tegmentalnoj zoni. Muskarinski M₁ receptori su dominantno raspoređeni u neokorteksu i hipokampusu (gde holinerški putevi završavaju) i u strijatumu gde se ACh oslobađa iz intrinzičkih neurona. M₂ receptori se nalaze u bazalnom prosencephalonu odakle potiču ushodni holinerški putevi [27].



Slika 5. Metabolizam ACh

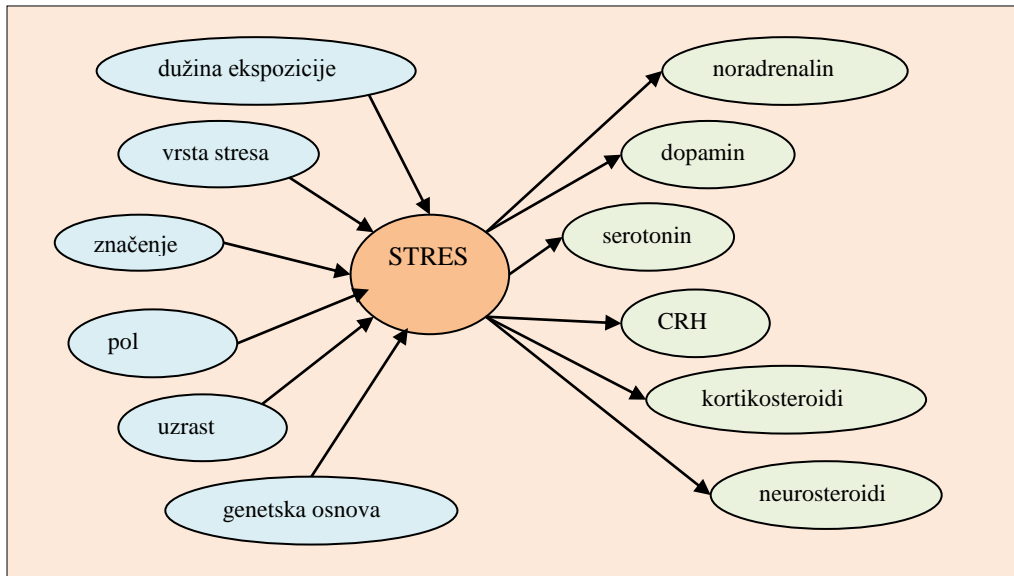
Funkcija ACh: ACh kao neurotransmiter je uglavnom orijentisan na periferni nervni sistem, gde se oslobađa iz preganglijskih neurona dugih aksona u somatskim motornim neuronima skeletnih mišića. U CNS, najveća koncentracija ACh je u strijatumu. On je tesno uključen u inhibiciju DA funkcije (ACh inhibira, a atropin aktivira oslobađanje DA, iako anatomski povezanost kroz koju bi se ovaj proces odvijao, nije potpuno jasna), a kompleksnost odnosa ACh i DA se ogleda u tome da i DA inhibira oslobađanje ACh. ACh i njegovi neuroni formiraju holinerški sistem koji ima ulogu: u budnosti, nagrađivanju, pojačavanju senzorne percepcije i održavanju pažnje, REM fazi sna, kontroli voljnih pokreta, upamćivanju, učenju, neuroendokrinom i emotivnom odgovoru na neprijatne stimuluse [19,27-29] i fleksibilnosti - sposobnosti mozga da se brzo prilagođava (na bolje ili lošije uslove), u bilo kom momentu, što se u nauci označava kao *brain plasticity*. Poslednje ima veoma važnu ulogu u oblikovanju ličnosti i međusobnom razlikovanju ljudi kao ličnosti. Najbolji pokazatelj uloge koju ACh ima u kognitivnim procesima su demencija i Alchajmerova bolest, u kojima su snižene vrednosti ACh, a previše ACh se u skorije vreme smatra mogućim primarnim uzrokom depresije [19,27,28].

1.1.2. Uloga neurotransmitera u odgovoru na stres

Navedeni neurotransmiteri, (DA, NA, AD, 5-HT i ACh), pored brojnih funkcija u CNS i perifernim tkivima i organima, imaju esencijalnu ulogu u neurobiološkom mehanizmu odgovora na stres i na različite načine tome doprinose [12].

Stres se može definisati kao biološki odgovor CNS i tela kao celine, na realnu ili potencijalnu pretnju telesnom integritetu i homeostazi. Bilo da je stresor spoljašnji ili unutrašnji nadražaj, odgovor podrazumeva pokretanje brojnih autonomnih, endokrinih, kognitivnih i afektivnih procesa, koji, pre svega, kroz različite oblike ponašanja kao što su npr. “reakcije borbe i bega”, imaju za cilj neutralizaciju pretnje, kako bi se homeostaza očuvala. Stres se grubo, i samo teorijski, može podeliti na a) psihički stres i b) somatski stres - metabolički stres i bolne stresne stimuluse, jer reakcija na stres nikada nije izolovana na samo jedan odbrambeni sistem (reakcija na fizički stresor uvek ima i psihološku komponentu) [12,30-33]. Od vrste stresnog nadražaja zavisi koje će grupe neurona biti aktivirane i uključene u nervni odgovor: *fizički stres*, kao npr. gubitak krvi ili mehanička trauma, u veoma kratkom vremenu aktiviraju reakciju moždanog stabla i hipotalamičke regije, dok *psihološki stres*, kao npr. posramljenost, testiranje, vremenski rokovi, itd., prvenstveno aktiviraju medijatore stresa u delovima mozga koji su odgovorni za emotivno ponašanje (amigdaloidni i prefrontalni kompleks), učenje i upamćivanje (hippocampus) i odlučivanje (prefrontalni korteks) [30].

Reakcija na stres je uslovljena brojnim faktorima (Slika 6.): dužinom ekspozicije (akutni/hronični stres), vrstom stresa (fizički/psihički), kontekstom i značenjem stresa, uzrastom i polom individue, itd. Sa druge strane, i neuromedijatori oslobođeni ovom prilikom imaju određeni domen dejstva, prostorni i vremenski [30].



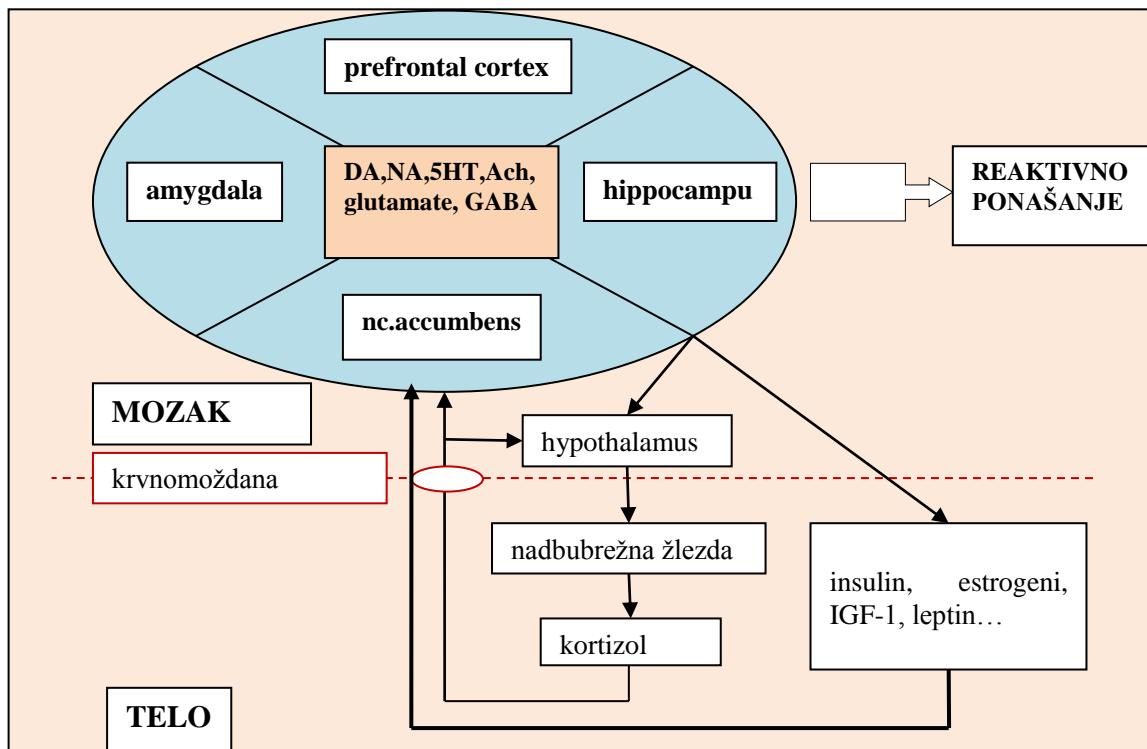
Slika 6. Faktori koji uslovljavaju reakciju na stres i medijatori stresnog odgovora.

Smatra se da različiti neuronski putevi posreduju u reakcijama na različite tipove stresora. Na ovo utiče i doživljaj *straha*, koji predstavlja motivaciono stanje izazvano specifičnim stimulusima čiji je cilj da signalizuje opasnost, pretnju ili motivacioni konflikt i da pokrene odgovarajući adaptivni odgovor. Razlika u odnosu na anksioznost je u tome što je objekat straha - stresor realan, unutrašnji ili spoljašnji, znan ili objektivn (dok je anksioznost generalizovani odgovor na iracionalnu pretnju ili unutrašnji konflikt). *Amigdaloidni kompleks* je moždana struktura koja je najodgovornija za osećaj straha i anksioznosti; ima vodeću ulogu u koordinaciji ponašanja, neuroendokrinog odgovora i aktivaciji monoaminskog sistema (sekreciji DA, NA i 5-HT) u prefrontalnom korteksu, kao odgovora na psihički stres. Zato se kaže da je amigdaloidno telo glavni okidač/pokretač straha (“master switch of fear”, engl.) Odgovor na osećaj straha uvek počinje percepcijom; većina senzornih informacija se prenosi kroz talamus do senzornih delova kore velikog mozga, koji su odgovorni za prepoznavanje i shvatanje stresora. Dva su izuzetka: olfaktivni senzorni put, koji stiže do amigdaloidnog kompleksa direktno i visceralni senzorni put kroz neurone moždanog stabla i locus coeruleus (LC) - najvažnije NA jedro. Iz LC, noradrenalinski eferentni putevi imaju ulogu u perifernom simpatičkom odgovoru na stres, a imaju ulogu i u usmeravanju pažnje na glavne preteće stimulse. Smatra se da je ushodni noradrenergički sistem koji polazi iz locus ceruleusa (LC) osovina oko koje su organizovani osećaji straha i anksioznosti i ključni region moždanog stabla odgovoran za budnost i pobuđivanje i visoko odgovoran za stanje opreza izazvano stresnim

stimulusima [34,35]. Pored amigdaloidnog kompleksa, prefrontalni korteks, hipocampus i nucleus accumbens jesu strukture koje čine *limbički sistem* i imaju ključnu ulogu u organizaciji i kontroli odgovora na stres [30].

U svim ovim strukturama stresni stimulus dovodi do promena u ekstraćelijskoj koncentraciji NT koji su u vezi sa aktivacijom i izmenama ponašanja koje ima za cilj prevazilaženje stresne situacije. Ovi delovi CNS imaju i važan indirektni učinak na hipotalamus čime menjaju konačni odgovor na stres kroz simpatički nervni sistem i aktivaciju osovine hipotalamus – hipofiza – nadbubrežna žlezda. U *prefrontalnom korteksu*, blagi stresni nadražaj dovodi do porasta ekstraćelijske koncentracije ACh, DA, NA i 5-HT. *Amigdaloidni kompleks* je glavno mesto ulaza senzornih informacija u emotivni deo mozga – limbički sistem i inervisan je DA, NA, 5-HT i ACh neuronima, i pod stresnim okolnostima ovde dolazi do porasta koncentracije ekstraćelijskog DA, NA, 5-HT, ali ne i ACh [31]. U hipocampusu su terminalni završeci iz različitih delova CNSa koji oslobađaju NA, DA, 5-HT i ACh. I ovde dolazi do porasta koncentracija NA, DA, 5-HT, ali i ACh kao odgovora na stres. Ovaj ACh, kroz svoja duga aksonska vlakna deluje na srž nadbubrežne žlezde, koja predstavlja postganglijski neuron, te dolazi do oslobađanja NA i AD direktno u krv, čime doprinose perifernom odgovoru na stres. Eksperimentalno je pokazano da prefrontalni korteks integriše senzorne i emocionalne informacije i proizvodi određenu vrstu ponašanja putem projekcija u nc. accumbens, gde DA i ACh interneuroni pokreću motorni odgovor na spoljašnji stresni stimulus [31].

Kako neuronalni mehanizmi odgovorni za ponašanje koje predstavlja odgovor na stresnu stimulaciju ne podrazumevaju samo aktivnost i interakciju različitih delova limbičkog sistema (emotivnog mozga) oslobađanjem nekoliko NT, već i uticaj različitih neuromodulatora i supstanci sa periferije (pre svega kortikosteroida/kortizola, i npr. insulina) na aktivnost u ovim delovima CNS, smatra se da stres i stresom izazvana reakcija predstavljaju najbolji primer integracije telesnih i moždanih funkcija gde telo učestvuje kao celina u odnosu sa spoljašnjom okolinom i nadražajima koje iz nje prima (Slika 7). Ovo je važno i za shvatanje kako se odgovor organizma na stresogeni stimulus menja pod različitim ulovima spoljašnje i unutrašnje sredine [31].



Slika 7. Prikaz moždano-telesne integracije u odgovoru na stresni stimulus.

Odgovor na stres se meri u opsegu od nekoliko milisekundi do nekoliko dana. Uopšteno se smatra da prvi talas reakcije na stresni stimulus sprovode monoamini i peptidi, čiji odgovor počinje unutar samo nekoliko sekundi od početka dejstva stresnog stimulusa. Drugi talas “molekularnog” odgovora primetno nastupa sat ili dva nakon izlaganja stresu i inhibira dugotrajno dejstvo reakcija koje nastaju tokom prvog talasa, što ima za cilj uspostavljanje alostaze u kognitivnim i neuroendokrinim funkcijama [30]. Intenzitet kojim će se aktivirati monoaminergički odgovor zavisi od mnogo faktora: pola, uzrasta, doba dana, mogućnosti da se stres kontroliše ili rekurentnosti stresnog događaja. Na primer, aktivacija neurona raphe nuclei koji oslobađaju 5-HT, u stresnim nadražajima koji dovode do nekog oblika šoka, dešava se jedino kad je stresna situacija izvan kontrole [30].

Osećaj bola je vrlo česta komponenta stresa i odgovora na stres. Postoje tri paradoksa u vezi sa osećajem bola – 1) ne postoji specijalan stimulus za bol – bol je odgovor na potencijalno štetno dejstvo po zdravlje bilo koje vrste. On nas opominje da prestanemo sa upuštanjem u potencijalno po zdravlje štetne radnje. Ne postoji drugo senzorno iskustvo toliko loše, a da ima tako ekstremno važnu ulogu u preživljavanju i opstanku kao doživljaj bola. 2) ne postoji jasna kortikalna prezentacija bola.

Bolni stimuli aktiviraju brojne oblasti moždane kore, ali posebnost u distribuciji varira od studije do studije i pokazuje i individualne razlike (pacijenti sa hemisferektomijom i dalje primaju bolne nadražaje iz obe polovine tela). 3) bolno iskustvo je najintenzivnije od svih senzornih iskustava, a ipak može biti efektivno suprimovano kognitivnim i emotivnim faktorima (ljudi teško povređeni u masovnim katastrofama, npr., ne osećaju bol sve dok opasnost ne prođe). Ovu “blokadu bola” omogućavaju eferentni signali iz periakveduktarne sive mase koji kroz 5-HT neurone raphae nuclei daju nishodne projekcije niz dorzalnu kolumnu kičmene moždine i pobuđuju interneurone koji blokiraju aferentne bolne impulse duž dorzalnog roga kičmene moždine [7].

1.2. Telesne tečnosti u postmortalnim biohemijskim istraživanjima

Postmortalni procesi dekompozicije i degradacije neminovno zahvataju i telesne tečnosti i na različite načine menjaju njihove biohemijske komponente, no zbog njihovih specifičnosti, to se dešava različitom brzinom. Krv brže od drugih telesnih tečnosti podleže postmortalnoj dekompoziciji i kontaminaciji difuzijom iz okolnih tkiva, tako da nije uvek najpogodnija za postmortalna biohemijska istraživanja. Ostale telesne tečnosti – urin, tečnost staklastog tela, cerebrospinalna tečnost, perikardijalna i sinovijalna tečnost, koje su zatvorene u posebnim odeljcima, nisu podložne postmortalnoj kontaminaciji u tako kratkom postmortalnom intervalu kao krv. Uopšteno se proces autolize najbrže odvija u krvi, sporije u CST, a najsporije u tečnosti staklastog tela. Zbog toga je tečnost staklastog tela najpogodnija za izvođenje mnogih postmortalnih biohemijskih studija, u ranom postmortalnom periodu [36,37].

1.2.1. Krv

Desetinama godina je poznato da se brzina i smer kojim se odvijaju postmortalne promene u uzorcima krvi ne mogu predvideti. Smatra se da koncentracioni gradijent nakon gubitka selektivne permeabilnosti membrana krvnih elemenata započinje nakon samo nekoliko sati od smrti [36].

Uopšteno se ispitivanja, u zavisnosti od vrste analita mogu obavljati u punoj krvi, serumu ili plazmi, koji predstavljaju njene derivate. **Serum** je tečna frakcija pune krvi, koji se nakon završenog procesa koagulacije (za koji je punu krv potrebno ostaviti oko 30 minuta na sobnoj temperaturi) dobija centrifugiranjem. Tokom centrifugiranja, fibrinska mreža sa krvnim ćelijama (koagulum) izdvaja se na dnu epruvete, a iznad njih ostaje serum, koji normalno ima izgled bistre, žućkaste tečnosti. Serum se u praksi koristi kao uzorak prilikom određivanja većine biohemijskih parametara. **Plazma** je krv bez krvnih ćelija, a dobija se centrifugiranjem pune krvi u kojoj nije došlo do koagulacije. Centrifugiranje se može izvršiti neposredno posle vađenja krvi.

Osnovna razlika u sastavu seruma i plazme je da plazma sadrži fibrinogen.

1.2.2. Cerebrospinalna tečnost

Neuronska signalizacija u CNSu zahteva visoko kontrolisanu mikrosredinu, koju obezbeđuju CST i krvnomoždana barijera (KMB). One su odgovorne za mehaničku zaštitu moždanog tkiva, homeostazu moždane intersticijalne tečnosti i neuronalnog okruženja, kroz regulaciju elektrolitne ravnoteže, cirkulacije aktivnih molekula i eliminacije produkata katabolizma. Kako u moždanom tkivu ne postoji limfni sistem, CST ima ulogu i u odvođenju intersticijalne tečnosti u cirkulaciju. CST je odvojena od krvi krvnomoždanom barijerom koju prolaze jedino liposolubilne materije [38,39].

Zbog svojih anatomskih i fizioloških specifičnosti (Tabela 1.), u postmortalnim biohemijskim istraživanjima CST predstavlja mesto izbora u ispitivanju npr. sadržaja centralnih neurotransmitera, koji u nepromenjenom obliku ne prolaze krvnomoždanu barijeru, te stoga njihove moždane frakcije nisu sadržane, niti mogu biti ispitivane u krvi, serumu ili urinu. [37,40].

Tabela 1. Fizičko-hemijske karakteristike i fiziologija CST

<i>Zapremina CST</i>	150 ml (oko 125 ml u unutarlobanjskom i kičmenom subarahnoidalnom prostoru, a oko 25 ml u moždanim komorama). Odnos zapremine CST prema zapremini moždanog tkiva povećavaju starenje i neurodegenerativne bolesti [41].
<i>Sekrecija CST</i>	500-600 ml dnevno; kod mladih odraslih se za 24 h potpuno izmeni 4-5 puta, a kod starijih sporije-zbog sporijeg obnavljanja i relativnog proširivanja likvorskog prostora na račun atrofije moždanog parenhima [39,41]. Oko 75% CST se produkuje u horioidnom pleksusu bočnih moždanih komora, a manji deo nastaje direktno iz zidova moždanih komora [40]. Sekrecija se odvija kroz dve faze: prvi korak je pasivna filtracija plazme kroz horioidne

	kapilare u horioidni intersticijalni odeljak vođena gradijentom pritiska; drugi korak je aktivni transport iz ovog odeljka u prostor moždanih komora preko horioidnog epitela [39,42].
--	--

<i>Apsorpcija CST</i>	najvećim deo (90%) obavljaju arahnoidalne čupice spoljašnjeg lista meke moždanice, kroz tvrdu moždanicu, u lumen venskih sinusa dure, a manjim delom direktno moždane venule (10%). Kičmene arahnoidalne čupice sprovode likvor u epiduralni venski pleksus. Vilozna apsorpcija, bilo u lobanjskom ili kičmenom prostoru je dinamički proces koji adaptira brzinu filtracije u odnosu na pritisak CST; arahnoidalne čupice u lumbosakralnim nervnim korenovima pojačano apsorbuju likvor kada je telo u fizičkom naporu, uspravnom položaju pod dejstvom gravitacije, i sprovode ga u limfni sistem. Kada je intrakranijalni pritisak oko 110 mm vodenog stuba, brzina sekrecije i apsorpcije su izjednačene [39].
-----------------------	--

<i>Cirkulacija CST</i>	Makrocirkulaciju CST čini jednosmerni rostrokaudalni tok sa mesta sekrecije-bočnih moždanih komora, kroz interventrikularne otvore u III moždanu komoru, zatim kroz moždani akvedukt u IV komoru i kroz foramen Magendie u subarahnoidalni prostor, odakle cirkuliše rostralno do mesta apsorpcije do mesta ili kaudalno u kičmeni subarahnoidalni prostor i višesmernim tokom kroz subarahnoidalni prostor, u pulzacijama koje odgovaraju sistolnom talasu u horioidnim arterijama Postoji i ograničena mikrocirkulacija CST iz kortikalnog subarahnoidalnog prostora u Virchow-Robinove perivaskularne prostore i dalje van mozga kroz drenažne puteve, subarahnoidalni prostor koji obavlja kranijalne nerve koji ulaze u nosnu i očne duplje, laminu kribrozu etmoide kosti, nosnu submukozu i naniže kroz cervikalne limfne puteve, kao i duž kičmenih nerava [39,41].
------------------------	---

<i>Pritisak CST</i>	pritisak CST fiziološki varira u opsegu 10-15 mmHg (iznad ovoga se smatra povišenim) i određen je parenhimskim i venskim pritiskom; po pravilu je nešto viši od pritiska u sinusima dure i stabilan je kada su sekrecija i apsorpcija CST- i uravnotežene. Vrednosti pritiska CST zavise od sistolnog pulsog talasa, respiratornog ciklusa, abdominalnog pritiska, jugularnog venskog pritiska, stanja budnosti, fizičke aktivnosti i stava tela [39,40]. Patološka stanja koja okupiraju intrakranijalni prostor i dovode do porasta intrakranijalnog pritiska, dovode do kompenzatornog smanjenja sadržaja krvi (naročito venske) i CST, opadanja gradijenta pritiska na nivou krvnomoždne barijere, čime se smanjuje i filtracija plazme na nivou horioidnog pleksusa, koji prima i holinergičku, adrenergičku, serotoninergičku i peptidergičku autonomnu inervaciju. Simpatički nervni sistem redukuje sekreciju CST, a autonomna nervna inervacija je verovatno odgovorna za cirkadijalne varijacije u sekreciji. Takođe, u ovome igraju ulogu i monoamini i neuropeptidi: DA, 5-HT, melatonin, atrijalni natriuretični peptid i arginin vazopresin koji postoje na površini horioidnog epitela [39].
---------------------	---

<i>Sastav CST</i>	CST se po sastavu razlikuje od plazme: 1.) pCO ₂ je viši (50 mmHg), zbog čega je pH CST niži (7.33); 2.) sadržaj proteina je veoma nizak (0.2g/L) zbog čega je i puferski kapacitet CST nizak; 3.) niže su vrednosti glukoze, uree, K i Ca, dok je sadržaj holesterola veoma nizak; 4) više su vrednosti Cl ⁻ , Mg [40,41] i Na. 5) CST normalno sadrži i nekoliko ćelija, uglavnom 5 ćelija po mililitru [43]. 6) 99% CST čini voda, dok plazme čini 92%. Klirens moždanih metabolita zavisi od obnavljanja CST, a smatra se da se u sisara CST potpuno
-------------------	--

obnovi četiri puta na dan. U različitim oboljenjima – tumori, infekcije, trauma, ishemija ili hidrocefalus...itd, nastaju promene u fiziologiji i hemijskom sastavu CST, a koje predstavljaju biomarkere tih patoloških stanja. Ozbiljne promene protoka CST remete kognitivne i motorne funkcije. [41]

1.2.3. Struktura i funkcija krvnomoždane barijere

Krvnomoždana barijera postoji na tri nivoa [38]:

1. KMB u užem smislu, koju čine endotelne ćelije zidova kapilara, međusobno uzastopno vezane *tight junction vezama*. Ona predstavlja daleko najveću površinu preko koje komuniciraju krv i moždano tkivo.

2. drugu barijeru (KCSTB) čine epitelijalne ćelije horioidnog pleksusa okrenute CST u moždanim komorama i vezane *tight junction vezama*. Sekretija CST se odvija preko epitelnih ćelija horioidnog pleksusa u sistem moždanih komora, dok ostatak ekstracelularne tečnosti (ECT) – intersticijalna tečnost (IST) nastaje, bar delom, sekrecijom kroz endotel kapilara KMB. IST i CST slobodno komuniciraju na nekoliko mesta, a utvrđeno je da IST čini 10-60% cerebrospinalne tečnosti.

3. Treći deo KMB čini avaskularni arahnoidalni epitel koji leži na tvrdoj moždani i u potpunosti prekriva CNS, čime i odvaja ECT centralnog nervnog sistema od ostatka tela.

Funkcija KMB:

- pre svega obezbeđuje fizičku i metaboličku nezavisnost CNS od krvne plazme
- održava optimalnu jonski stabilnu sredinu potrebnu za neuronalnu funkciju
- kako CNS i periferna cirkulacija dele mnoge neurotransmitere, KMB održava ove neurotransmiterske sadržaje međusobno nezavisnim
- sprečava ulazak mnogih makromolekula iz plazme u mozak (proteinski sadržaj CST je mnogo niži od onog u plazmi, a oni se i po sastavu međusobno razlikuju), npr. albumin, protrombin i plazminogen oštećuju nervno tkivo, dovodeći do ćelijske aktivacije i apoptoze.
- zaštita CNSu od egzogenih i endogenih (metaboliti ili proteini) neurotoksičnih supstanci koje cirkulišu krvlju

- zahvaljujući specifičnim transportnim sistemima obezbeđuje nutrijente neophodne za metabolizam i funkciju nervnog sistema [38].

CST je sredina koja najvernije od svih telesnih tečnosti prikazuje dinamiku i metabolizam monoaminskih neurotransmitera i acetiholina koji deluju na nivou CNS, tako da su koncentracije ovih neurotransmitera i njihovih metabolita u CNS indikatori njihove centralne aktivnosti [44].

Uopšteno se sadržaj monoamina na moždanom nivou, kroz postmortalna istraživanja na obdukcionom materijalu može ispitivati na dva nivoa: u uzorcima samog moždanog tkiva iz tačno određenih regiona mozga (no ukoliko je potrebno simultano određivanje više NT, a njihova neuronska tela se nalaze u različitim grupama neurona, onda ovo nije najzahvalniji metod izbora) i iz uzoraka CST bilo centralnim ili lumbalnim pristupom [45]. Ali ovde treba imati na umu da koncentracije u CST predstavljaju samo prosečne vrednosti ispitivanih analita iz svih regiona moždanog tkiva u trenutku uzorkovanja CST, te ne mogu pružiti informacije o funkciji konkretnih neuronskih grupa.

1.3. Dosadašnja istraživanja na postmortalnim biomarkerima stresnog odgovora

U sudskomedicinskoj praksi, jedan od glavnih ciljeva je utvrđivanje uzroka i porekla smrti. No, nekada se odgovor na ova pitanja ne može dati samo interpretacijom morfoloških karakteristika obdukcionog nalaza. Pogotovo u slučajevima gde je potrebno napraviti razliku između samoubilačkog, ubilačkog ili zadesnog porekla smrti, a okolnosti slučaja ne pružaju odgovarajuće podatke, postoji potreba za primenom drugih dodatnih kriterijuma. Tako se, na osnovu istraživanja koja se sprovode decenijama unazad, monoaminski neurotransmiteri svrstavaju u biomarkere različitih patoloških stanja i endogenih poremećaja, ali su značajni i kao postmortalni biomarkeri koji oslikavaju odgovor organizma na stres, kao i različite oblike ponašanja u vremenu koje prethodi smrti.

Kauert i saradnici su 1986. god., podstaknuti hipotezom da monoaminski NT imaju značajnu ulogu u patogenezi depresivnih poremećaja, prvi merili koncentracije biogenih monoamina u postmortalnim uzorcima CST, kako bi utvrdili kvantitativne razlike u njihovim vrednostima u odnosu na poreklo smrti, preciznije između samoubilačkih i drugih smrti, i zaključili da postmortalne vrednosti, konkretno 5-HT mogu biti marker suicidogenog ponašanja u žrtava [46].

Slično, Arranz i saradnici [26] su 1997. godine sproveli istraživanje na sadržaju monoaminima u uzorcima moždanog tkiva iz regiona mozga koji pripadaju limbičkom sistemu, kako bi utvrdili eventualnu vezu između njihovih koncentracija i međusobnih interakcija i samoubilačkog ponašanja ili različitih afektivnih poremećaja, naročito kod depresije i samoubilačkih tendencija u vezi sa njom i nisu našli značajne promene u sadržaju ispitivanih NT koje bi doveli u vezu sa suicidogenim ponašanjem.

Hirvonen i saradnik [47] su ispitivali upotrebljivost biogenih amina kao indikatora stresa u antemortem periodu i zaključili da KH iz postmortalnog seruma ne pokazuju promene na osnovu kojih bi se mogao donositi zaključak o stresu doživljenom u kratkom intervalu pred smrt, to su delom objasnili rezultatima koji pokazuju da vrednosti KH u serumu značajno rastu u postmortalnom periodu, a i njihove vrednosti pokazuju veoma značajne interindividualne razlike.

Wilke i saradnici su pokušali da utvrde model po kojem se menjaju koncentracije i odnos koncentracija NA i AD u raznim telesnim tečnostima, u vezi sa različitim uzrocima smrti i u različito dugom periodu agonije [48], ali zbog velikih varijacija u koncentracijama ovih NT nisu doneli statistički značajne zaključke.

Okuda i saradnici [33] su na animalnom eksperimentalnom modelu ispitivali promenu moždane aktivnosti DA i 5-HT u sklopu akutnog odgovora na nagle promene telesne temperature i pokazali da hipotermija dovodi do promena u njihovim vrednostima, ali i vrednostima NA, kao odgovor na stres izazvan hipotermijom.

Novija istraživanja na postmortalnom uzorku CST, koja su sproveli Musshoff i saradnici, imala je za cilj određivanje koncentracija 5-HT sa posebnim akcentom na samoubilačke smrti i trovanja opijatima [49], koja je pokazala između ostalog da su vrednosti 5-HT značajno niže u samoubistvima i trovanjima u odnosu na kontrolnu grupu koju su činili različiti oblici zadesne i prirodne smrti.

Zhu i saradnici [6] su sproveli iscrpnu analizu koncentracija KH u uzorcima postmortalnog seruma, u odnosu na različite uzroke smrti i pored značajnog porasta koncentracija u odnosu na kliničke referentne vrednosti, utvrdili da serumske vrednosti

KH mogu biti korisni biomarkeri u istrazi uzroka smrti, uz druge patohistološke, toksikološke i druge biohemijske dokaze, jer odražavaju magnitudu fizičkog stresnog odgovora tokom procesa umiranja.

Quan i saradnici su određivali koncentracije 5-HT na postmortalnim uzorcima CST i perikardijalne tečnosti u odnosu na različite uzroke smrti sa ciljem da kroz topografske karakteristike 5-HT u ovim odeljcima ispituju moždanu i kardijalnu funkciju tokom procesa umiranja [50]. Njihovi su rezultati ukazali na to da serotoninski sistemi na različite načine učestvuju u fatalnom procesu i da je 5-HT koristan biomarker u utvrđivanju uzroka smrti, posebno u intoksikaciji sedativima, hipertermiji i hipotermiji, kao i da serumske vrednosti 5-HT nisu realni pokazatelj mentalnog stresa.

Ishikawa i saradnici su pokazali da koncentracije KH u CST variraju u odnosu na različite uzroke smrti [5], te mogu biti markeri koji odražavaju moždanu aktivnost u različitim oblicima odovora na stres tokom procesa umiranja, kada se koriste zajedno sa drugim hemijskim i imunohistohemijskim markerima.

Eisenach i saradnici su na animalnom i humanom modelu istraživali da li periferni bolni stimuli dovode do oslobađanja NA i time aktivacije holinergičkih neurona u kičmenoj moždini, što dovodi do porasta njihovih koncentracija u CST i pokazuje međusobnu povezanost noradrenergičkog i holinergičkog sistema [21].

2. CILJEVI

Navedene studije, kao i brojne druge sprovedene na animalnom i humanom modelu, nedvosmisleno potvrđuju ulogu monoaminskih NT u odgovoru na stres. Kako je ACh, pored monoamina, jedan od glavnih neurotransmitera koji ima ulogu u odgovoru CNS na stres, smatrali smo značajnim istovremeno određivanje njihovih vrednosti u postmortalnim uzorcima cerebrospinalne tečnosti, čije bi eventualne promene vrednosti mogle predstavljati dodatni pokazatelj promena u CNS, u sklopu odgovora na stres.

Zahvaljujući brojnim studijama utvrđeno je da navedeni neurotransmiteri pokazuju obrazac promena koncentracija u CST i serumu, u odnosu na različite uzroke smrti, na osnovu čega su svrstani u biomarkere odgovora na stres. Iste su studije pokazale i da vrednosti ovih NT pokazuju veliku varijabilnost, te smo smatrali da bi precizniji izbor parametara za uključenje i isključenje ispitanika u uzorak mogao eliminisati uticaj velike varijabilnosti na konačne rezultate.

Takođe, kako su sinteza ovih NT na moždanom i perifernom nivou potpuno međusobno nezavisne i zahvaljujući postojanju krvnomoždane barijere njihove frakcije se pod fiziološkim uslovima ne mešaju, smatrali smo da bi promene njihovih “centralnih” vrednosti odražavale samo njihovu moždanu funkciju, na osnovu čega bi se mogla proceniti i psihička komponenta stresnog odgovora u kratkom vremenu pred letalni događaj, dok bi vrednosti u perifernom serumu odražavale sistemski/fizički odgovor na stres.

Na osnovu svega, formulisali smo glavne ciljeve ove teze:

1. Određivanje koncentracija serotonina, dopamina, noradrenalina i acetilholina u CST i kateholamina u serumu, u odnosu na različito poreklo smrti u ranom postmortalnom intervalu.
2. Određivanje koncentracija serotonina, dopamina, noradrenalina i acetilholina u likvoru i kateholamina u serumu u odnosu na različite uzroke smrti u ranom postmortalnom intervalu.

3. Utvrđivanje razlika koncentracija monoamina i acetilholina u uzorcima seruma i cerebrospinalne tečnosti, kako bi se na osnovu toga eventualno napravio obrazac njihovog međusobnog odnosa kroz različito poreklo i uzrok smrti.

Pored navedenih glavnih ciljeva, vrednosti ispitivanih NT su analizirane i u odnosu na:

- životnu dob/ pol ispitanika
- trajanje postmortalnog perioda
- trajanje agonalnog perioda (perioda nadživljavanja, odnosno vremena od povređivanja/pojave simptoma oboljenja do momenta smrti, označenog kao veoma kratko i duže (tj. do nekoliko minuta i od nekoliko minuta do nekoliko sati)
- postojanje svesti kod ispitanika o predstojećem mogućem letalnom ishodu, predstavljenog kroz dihotomiju da/ne (da – npr. žrtve utopljenja, žrtve napada oružjem aktivno suočene sa napadačem, ne – iznenada umrli usled srčanog zastoja u snu ili žrtve strujnog udara).

Kako bismo utvrdili eventualnu povezanost vrednosti ispitivanih NT u različitim odeljcima telesnih tečnosti, a time i relevantnost u njima izmerenih koncentracija kao markera njihove centralne i periferne aktivnosti, ispitivali smo korelaciju dobijenih vrednosti u CST iz centralnog i lumbalnog odeljka i perifernom serumu i serumu uzetom iz desnog srca.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

U ovoj prospektivnoj studiji, analiziran je obdukcioni materijal Instituta za sudsku medicinu "Milovan Milovanović" Medicinskog fakulteta u Beogradu, u periodu od 2014. do 2017. godine. Slučajevi su inicijalno podeljeni, prema uzroku i poreklu smrti u dve grupe:

a) grupu ispitanika kod kojih je smrt bila nasilna prema poreklu - zadesna, ubilačka ili samoubilačka, a kao uzrok smrti podrazumevala različite oblike mehaničkog, asfiktičnog, fizičkog ili hemijskog (trovanje CO) povređivanja.

b) grupu ispitanika koju su činili leševi osoba umrlih prirodnom smrću, po tipu *naprasne srčane smrti* (iznenadna smrt prividno zdravih osoba, odnosno osoba čija bolest nije takve prirode da bi se očekivao smrtni ishod, a koja nastupa do 24h od početka simptoma *def. SZO*), a koji su činili kontrolnu grupu u utvrđivanju razlika između prirodnog i nasilnog uzroka i porekla smrti.

Kako bi uzorak bio što konzistentniji, leševi uključeni u studiju, bez obzira na uzrok i poreklo smrti, *pre obdukcije* su birani prema sledećim kriterijumima:

- ispitanici su bili uzrasta od 18 i više godina
- postmortalni interval (vreme od nastupanja smrtnog ishoda do obdukcije i uzimanja uzoraka za analizu) nije bio duži od 72 sata
- smrt je nastupila *na licu mesta*, gde umrli nisu bili podvrgnuti pokušaju reanimacije, niti su neposredno pred smrt primili ikakvu terapiju
- umrli nisu imali dokumentovanu medicinsku istoriju o nekom akutnom i/ili hroničnom neurološkom i psihijatrijskom oboljenju, kao ni terminalnoj fazi neke bolesti (npr. malignitet)
- umrli nisu prethodno bili na psihotropnoj medikaciji, niti su konzumirali psihoaktivne supstance.

Kriterijumi za isključenje slučajeva iz odabranog uzorka, *tokom i nakon obdukcije*:

- ustanovljeno oboljenje/povreda koji su doveli do prodora krvi u sistem moždanih komora
- povišen nivo alkohola ili pozitivne toksikološke analize na prisustvo droga i lekova u ispitivanim telesnim tečnostima, koji bi mogli imati uticaja na izmerene vrednosti analita.

Zaključci o uzroku smrti, poreklu smrti i druge karakteristike uzorka određeni su nakon obdukcija i hemijskotoksikoloških analiza, dok su okolnosti nastupanja smrti, vreme i mesto smrti i drugi značajni podaci prikupljeni iz policijskih izveštaja i heteroanamnestičkih intervjua.

Uzorci likvora i seruma su uzimani tokom obdukcije, bez odstupanja od standardne obdukcione procedure. Likvori, označeni kao "centralni" uzimani su punkcijom ventralnih rogova bočnih moždanih komora kroz prednju komisuru korpus kalozuma [37]. Likvori označeni kao "lumbalni" uzimani su punkcijom lumbalne cisterne kroz L4/L5 međupršljenski prostor, tzv. "ventralnim pristupom" nakon uklanjanja sadržaja trbušne duplje [46].

Uzorci krvi su uzimani punkcijom femoralne vene i desne srčane komore, a onda ostavljeni na sobnim uslovima 30 minuta, te centrifugirani 10 minuta na 3000 obrtaja, kako bi se izdvojio serum za dalju analizu.

Kako bi se izbegla kontaminacija likvora krvlju ili kontaminacija likvora i seruma u procesu hemolize, oni uzorci koji su sadržali nečistoće - imponovali zamućeni ili rozikasti bili su u ovom momentu isključeni iz dalje analize, a oni čisti-bistri uzorci zamrzavani na -20°C do dalje analize.

Strogim poštovanjem svih prethodno navedenih kriterijuma, konačan broj ispitivanih slučajeva iznosio je 81, od kojih je obezbeđen 81 uzorak centralnog likvora, 17 uzoraka lumbalnog likvora, 46 uzoraka perifernog i 9 kardijalnog seruma. Tabela 2., Grafikoni 1. i 2. prikazuju opšte karakteristike uzorka.

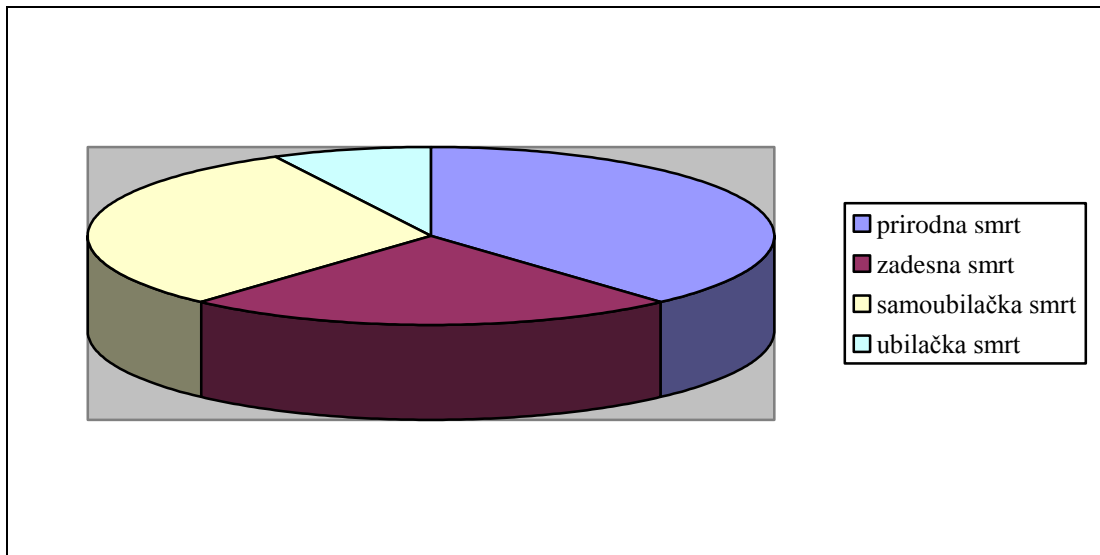
Tabela 2. Opšte karakteristike uzorka.

uzrok smrti mehanizam	broj slučajeva n(%)	poreklo smrti* p/z/s/u n (%)	pol muški/žens ki n(%)	period nadživljav anja veoma kratko/ odloženo n (%)	svesnost stresnog događaja da/ne n(%)
nasilna smrt*	50 (61.73%)				
mehaničke povrede	17(34%)				
tupina	7			13/4	17/0
<i>skok sa visine</i>	2	s2	2/0	2/0	2/0
<i>saobraćajni</i>	4	z4	4/0	3/1	4/0
<i>trumatizam</i>	1	u1	0/1	0/1	1/0
<i>tuča</i>	8	s5/u3	5/3	7/1	8/0
<i>ustreline</i>	2	u2	1/1	1/1	2/0
<i>ubodine</i>					
mehanička asfiksija	18(36%)				18/0
<i>utopljenje</i>	5	s4/z1	3/2	5/0	5/0
<i>vešanje</i>	13	s13	10/3	13/0	13/0
fizičke povrede	8(16%)				0/8
<i>hipotermija</i>	5	z5	1/4	0/5	0/5
<i>elektrokucija</i>	3	z3	3/0	3/0	0/3
CO intoksikacija	7(14%)	z7	4/3	5/2	3/4
naprasna srčana smrt	31 (38.27%)	p31	25/6	13/18	19/12
ukupno	81 (100%)	31/20/24/6 (38.3/24.7/29.6/7.4)	58/23 (71.6/28.4)	52/29 (71.6/28.4)	57/24 (70.4/29.6)

*Poreklo smrti: p – prirodna, a – zadesna, s – samoubilačka, u – ubilačka

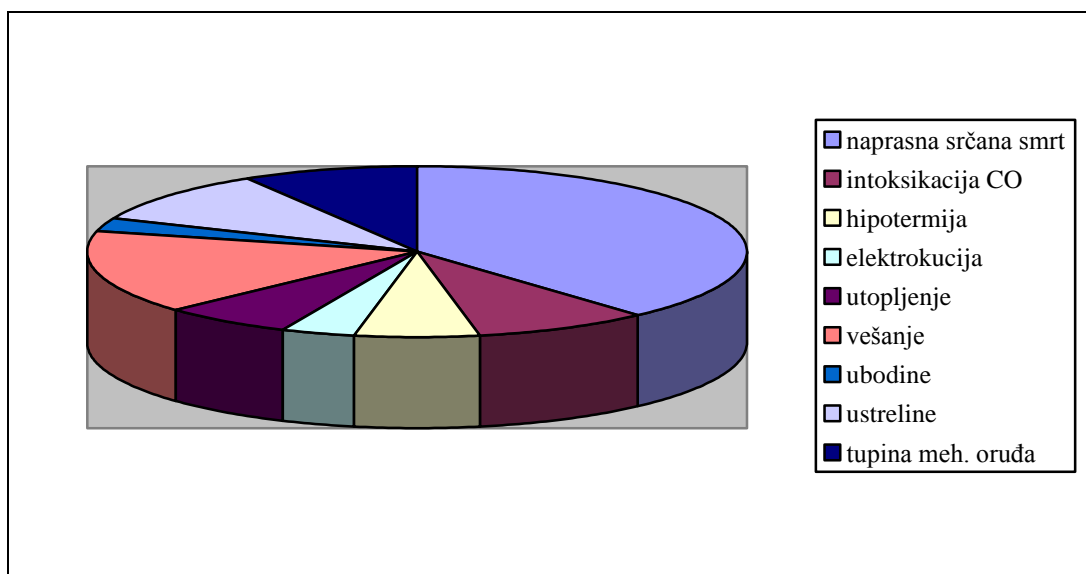
Uzorak je činilo 58 (71,6%) ispitanika muškog i 23 (28,4%) ispitanika ženskog pola. Starosna dob ispitanika je bila u opsegu 18 – 87 godina, a srednja vrednost životne dobi iznosila je 51.77 ± 14.26 godina (Tabela 1.).

Prirodnom smrću (Tabela 1., Grafikon 1.) umrlo je 31 ispitanika, što je činilo 38,3% ukupnog uzorka, a nasilnom 50 ispitanika (61.7%), od kojih je 20 umrlo zadesnom smrću, 24 samoubilačkom, a 6 ispitanika su bile žrtve ubistava (što je u procentima činilo 24,7%, 29,6% i 7.4% redom).



Grafikon 1. Zastupljenost smrti prema poreklu u opštem uzorku

Uzrok svih prirodnih smrti je bila naprasna srčana smrt 31(38,3%), dok je među nasilnim uzrocima smrti (n=50, 61,7%), 17 (34%) slučajeva bilo posledica mehaničke traume, 18 (36%) slučajeva bilo posledica mehaničke asfiksije; fizičke povrede su činile 16% (n=8 slučajeva), a hemijske, koje su sve bile posledica trovanja ugljenmonoksidom obuhvatale su 7 (14%) slučajeva (Tabela 1., Grafikon 2.).



Grafikon 2. Zastupljenost različitih uzroka smrti u uzorku

3.2. Analitička metoda

Kvantifikacija biogenih monoamina i drugih neurotransmitera malih molekula moguća je već dugi niz godina i do današnjih dana je veoma napredovala, a najčešće primenjivan metod je tečna hromatografija sa elektrohemijском detekcijom (HPLC-EDC). No danas je sve više u upotrebi tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS), kao osetljivija i pouzdanija metoda, [51], što je bio glavni razlog zbog čega smo je odabrali za određivanje izabranih analita u ovoj studiji.

3.2.1. Analitička metoda za monoamine

3.2.1.1. Optimizacija i postavljanje uslova metode

Simultano određivanje monoamina u biološkom materijalu, generalno predstavlja veliki izazov, pre svega zbog toga što su prisutni u veoma niskim koncentracijama u složenom matriksu kakav su likvor i serum. Brojne studije su napisane o razlikama u pripremi uzoraka i analitičkim metodama za određivanje koncentracije biogenih amina, međutim, njihova receptura primenjena na naš postmortalni materijal nije dala adekvatan odgovor.

Prvi korak u analizi je podrazumevao optimizaciju instrumentalnih parametara metode za monoamine, čime su dobijeni MRM prelazi i odgovarajuće kolizione energije, koji su se slagali sa podacima iz literature: za dopamin 154.0 → 136.95 i 154.0 → 91.1; noradrenalin 170.0 → 152.1; 170.0 → 107.1; adrenalin 184.0 → 166.05, 184.0 → 107.05 i serotonin 177.0 → 159.95 i 177.0 → 115.10. Dobijena je i odgovarajuća hromatografska separacija na C18 koloni, kao i na PFP koloni.

Nakon optimizacije parametara metode, uzorci (arteficijalne CST i realni uzorci) su pripremani tečno-tečnom ekstrakcijom etilacetatom u baznoj sredini, precipitacijom proteina acetonitrilom, ekstrakcijom čvrstom fazom (solid phase extraction) uz SP kertridže različitog sastava (Strata-X-C, Strata X, Weak Cation Exchange i specijalizovane Bond Elut PBA), kao i po različitim procedurama navedenim u aplikacijama proizvođača i literaturi [52,53] koje smo pokušali da reprodukujemo u

našim uslovima. Međutim, nijedna od primenjenih procedura za pripremu uzoraka nije dala zadovoljavajući odgovor za sve analite - u većini slučajeva, nije bilo nikakvog odgovora u vidu analitičkog signala na instrumentu.

U cilju povećanja senzitivnosti simultane detekcije analita, primenjena je derivatizacija kao dodatni korak u pripremi uzoraka, što se favorizuje i u literaturi [17,54,57], a kao sredstvo za derivatizaciju, koristili smo benzoilhlorid, preporučen za neurohemijski monitoring neurotransmitera i njihovih metabolita, pre svega u mikrodijalozatu ekstraćelijske moždane tečnosti [54]. Prvo su derivatizovani standardi svih ispitivanih monoamina, kako bi potvrdili nastajanje stabilnih derivata. Pretpostavljene formule nastalih derivata i njihove molekulske mase potvrđene su na LC-MS-QTOF instrumentu. Tako dobijene molekulske mase analita koristili smo za optimizaciju metode na LC-MS/MS, odnosno, za dobijanje odgovarajućih prekursora i produkt jona, za dopamin $466.0 \rightarrow 105.0$, noradrenalin $482.0 \rightarrow 105.0$, adrenalin $496 \rightarrow 105.0$ i serotonin: $385.0 \rightarrow 105.0$. Iste su vrednosti prikazane i u literaturi [57]. Realne sveže, kontrolne uzorke CST i seruma, pripremili smo prema proceduri navedenoj u ovoj referenci, međutim, i uprkos brojnim modifikacijama navedenog postupka pripreme uzoraka, nismo dobili odgovarajući odgovor detektora za sve analite.

Kako prethodni postupak derivatizacije nije bio primenljiv na naš uzorak, kao novo derivatizaciono sredstvo, koje je dalo odgovarajuće rezultate na detektoru, uveden je etilhloroformat (uz druge organske rastvarače: piridin, hlороform i n-heksan) i tečno-tečnu ekstrakciju etilacetatom. Nastajanje stabilnih derivata sa etilhloroformatom takođe je prvo potvrđeno na Q-TOF LC-MS instrumentu (za adrenalin: $C_{18}H_{25}NO_9$, molekulska masa 399.15293; za noradrenalin: $C_{17}H_{23}NO_9$, molekulska masa 385.13728; za dopamin: $C_{17}H_{27}NO_8$, 369.14237 i za serotonin: $C_{16}H_{20}N_2O_5$, molekulska masa 320.13722.) Tako dobijene molekulske mase derivatizovanih analita koristili smo za optimizaciju metode na LC-MS/MS, tj. za dobijanje odgovarajućih prekursora i produkt jona. Dobijene m/z tranzicije sa odgovarajućim vrednostima kolizione energije za derivatizovane monoamine bile su sledeće: za serotonin: $321.10 \rightarrow 275.10$ (10 eV), $321.10 \rightarrow 160.05$ (30 eV); za dopamin: $370.20 \rightarrow 180.00$ (20 eV) , $370.20 \rightarrow 252.10$ (15eV); za noradrenalin: $386.10 \rightarrow 368.05$ (10eV), $386.10 \rightarrow 178.00$ (20 eV); za adrenalin: $400.00 \rightarrow 310.05$ (20 eV), $400.10 \rightarrow 192.05$ (20 eV), kao i $180.10 \rightarrow 91.05$ (25 eV) i $180.10 \rightarrow 74.05$ (15 eV) za derivatizovani benzilamin kao interni standard.

Maseni spektrometar je bio podešen na rad u pozitivnom jonskom elektrosprej režimu rada. Detekcija i kvantifikacija analita izvršena je praćenjem po dve tranzicije prekursor → produkt jona za svaki analit, upotrebom Selected Reaction Monitoring (SRM) moda.

Hromatografska separacija je sprovedena upotrebom PFP kolone (Phenomenex Kinetex PFP column (75 x 4.6 mm, 2.6 μ m) na 40°C sa 6.0 - minutnim gradijentom razdvajanja. Protok je podešen na 0,6 ml/min. Injekcioni volumen je iznosio 10.0 μ L. Kao mobilna faza je odabrana 0,1% mravlja kiselina, a kao mobilna faza B acetonitril. Uslovi gradijenta su postavljeni na sledeći način: 0.01 – 1.5 min, 5 – 40% B; 1.5 – 3.5 min, 40 – 70% B; 3.5 – 6.0 min, 70% B; nakon toga sa povratkom na 5% B.

Zbog dobijenog pozitivnog odgovara, ovaj je metod usvojen i korišćen za analizu sadržaja monoamina u uzorcima seruma i likvora u našoj studiji.

3.2.1.2. Priprema uzoraka

Nakon potpunog odmrzavanja uzoraka na sobnoj temperaturi, uzeto je po 100 μ l od svakog uzorka CST i seruma u koje je dodato po 20 μ l internog standarda – benzilamina (30 μ g/ml). Dobijena smeša je 10 minuta mešana na šejkeru. Nakon toga, u cilju derivatizacije, u smešu je dodato po 30 μ l etanol:piridinskog rastvora (u zapreminskom odnosu 75:25) i po 30 μ l reagensa koji se sastojao od smeše etilhloroformata, hlороforma i n-hexana (u zapreminskom odnosu 20:70:10) [55,56]. Novonastali derivati su ekstrahovani dodavanjem 500 μ l etilacetata, zatim centrifugirani 15 min na 14000g. Odvojeni supernatant je prebačen u nove vialе, a onda uparen. Uparavanje je vršeno u struji azota, na sobnoj temperaturi, do suvog ostatka. Dobijeni suvi ostatak je rekonstituisan sa 60 μ l acetonitrila, zatim prebačen u staklene inserte za analizu LC-MS/MS metodom.

Napravljena je serija standardnih rastvora 5-HT, DA, NA i AD (Sigma Aldrich) i standardni rastvor benzilamina (konc. 30 μ g/ml), koji je služio kao interni standard. Rastvori su dodavani u prethodno sveže napravljenu arteficialnu CST (aCST u daljem tekstu), koja se sastojala od 145 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 1.55 mM Na₂HPO₄ i 0.45 mM NaH₂PO₄, albumina 45g/l i pH 7.4 uz

NaOH[17], tako da su koncentracije monoamina u aCST iznosile: 1, 10, 50, 100, 300, 1000 ng/ml; aCST poznatih koncentracija, pripremane su na isti način kao i ispitivani uzorci CST i seruma i služile za konstruisanje kalibracione krive na osnovu koje su izračunavane koncentracije analita u uzorcima likvora i seruma.

3.2.2. Analitička metoda za acetilholin

Napravljen je standardni rastvor ACh (Sigma Aldrich), (koncentracije 1 mg/ml) u H₂O i smeši acetonitril:H₂O (u zapreminskom odnosu 50:50 v/v). Od oba osnovna rastvora napravljena su razblaženja od 100 µg/ml koja su korišćena za optimizaciju radnih parametara metode na MS/MS spektrometru. U oba slučaja (bilo da je korišćen rastvor ACh u vodi ili u smeši ACN:H₂O), dobijeni parametri MRM optimizacije su bili isti – dobijen je prekursor m/z jon za ACh 145,80 i product m/z joni (sa odgovarajućim vrednostima kolizione energije): 86.85 (15eV), 43.05 (30eV) i 60.10 (10eV). Optimizacijom su dobijene tri tranzicije, a najintenzivniji odgovor dobijen je za tranziciju prekursor → produkt jon 145.80 → 86.85, što odgovara i podacima iz literature [57].

Napravljena je serija rastvora standarda ACh u prethodno sveže napravljenoj aCST (145 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 1.55 mM Na₂HPO₄ i 0.45 mM NaH₂PO₄, albumini 45g/l i pH 7.4 uz NaOH [17]), tako da su koncentracije ACh iznosile 0.1, 1, 10 i 100 ng/ml; aCST poznatih koncentracija, pripremljena je na isti način kao i uzorci CST kako bi služila za konstruisanje kalibracione krive za izračunavanje vrednosti ACh u likvoru.

Nakon potpunog odmrzavanja, uzorci CST su pripremljeni na sledeći način: u 200 µg uzorka dodato je 20 µg ACN i 20 µg 0.01M amonijum acetata, zatim je smeša centrifugirana 5 min na 14000 obrtaja (mikrocentrifugator SIGMA), nakon čega je po 80 µl supernatanta prebačeno u insert viala za hromatografsku analizu.

Istovremeno je na isti način pripremljena “slepa proba” aCST sa reagensima, bez dodavanja standarda ACh u cilju provere uticaja matriksa na odgovor analita. Dobijeni negativni odgovor je ukazao na to da ni matriks ni dodati reagensi nisu interferirali na retencionom vremenu na kojem je detektovan ACh.

Hromatografska separacija je sprovedena na koloni Agilent Technologies (Zorbax Eclipse AAA Rapid Resolution 4.6 x 150 mm, 3.5 micron, Agilent USA) na 25°C sa 8.0 minutnim gradijentom razdvajanja, a protok je podešen na 0.6 ml/min. Injekcioni volumen je bio 10 µg. Kao mobilna faza A odabrana je 0.1% mravlja kiselina, a kao mobilna faza B acetonitril. Uslovi gradijenta su postavljeni na sledeći način: 0.01 – 1.5 min, 5 – 40 % B; 1.5 – 3.5 min, 40 – 70 % B; 33.5 – 6 min, 70 % B; nakon toga sa povratkom na 5 % B što je zadržano još 2 min.

Maseni spektrometar je podešen na rad u pozitivnom jonskom elektrosprej režimu rada.

Deset uzoraka CST je pripremano kao i uzorci aCST opterećeni standardom acetilholina. Ni u jednom slučaju nije dobijen odgovor na retencionom vremenu koje odgovara hromatografskom piku acetilholina, na osnovu čega je zaključeno sa ACh u analiziranim uzorcima likvora nije prisutan u koncentraciji višoj od 100 pg/ml što je bilo najniže detektovano opterećenje pripremljene aCST.

U jednoj od malobrojnih studija u literaturi, koja se tiče određivanja koncentracija ACh, kakva je studija koju su sprovedeli Wong i saradnici [57] u uzorcima humanog likvora, postoji podatak da je izmerena koncentracija ACh oko 179 pg/ml, međutim, rezultati kliničkih studija se ne mogu upotrebiti kao referentni za postmortalne uzorke CST. U literaturi postoje brojne dostupne aplikacije proizvođača o određivanju ACh, koje u tu svrhu koriste analitičke standarde [58,59], sa određenim limitom detekcije za ACh od 0.1 ng/ml [59].

3.3. Aparatura

Tečni hromatograf sa tandem masenim detektorom (Nexera UHPLC sistem, LCMS-8030 triple quadripole mass spectrometer, Shimadzu, Japan).

Tečni hromatograf sa TOF (*time of flight*) spektrometrijom (Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 6520, Agilent Technologies).

Sistem za uparavanje: DRI-Block, TECHNE DB 100/4, Sample concentrator, TECHNE Mikrocentrifuga: Sigma.

Vorteks mešalica: Vortex-Genis 3, IKA Vortex, Bohimia; New York, USA.

Šejker mešalica: Advanced vortex mixer, VELP SCIENTIFICA, Italy.

3.4. Statistička obrada rezultata

U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode. Od deskriptivnih korišćeni su apsolutni i relativni brojevi (n,%), mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i mere disperzije (standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrednost). Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike i analiza povezanosti - parametarski (ANOVA) i neparametarski (Mann-Whitney U test i Kruskal-Wallis test). Za ispitivanje povezanosti između koncentracija ispitivanih parametara korišćen je Spearmanov rho test korelacije. ROC analiza je korišćena za procenu dijagnostičke tačnosti testa, a Youdenov indeks za određivanje optimalne granične vrednosti. Sve p vrednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnim. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički (box-plotovi: 50% rezultata su sumirani u boksovima, linije unutar boksa su predstavljale medijanu, a linije van boksova 90% intervala poverenja). Podaci su obrađeni u SPSS 20.0 (IBM korporacija) softverskom paketu.

4. REZULTATI

4.1. Serotonin

Vrednosti izmerenih koncentracija 5-HT u svim uzorcima bile su u opsegu od 0.08 do 143.6 ng/ml (Tabela 3.).

Tabela 3. Vrednosti 5-HT (ng/ml) u CST (centralnoj i lumbalnoj) i perifernom serumu.

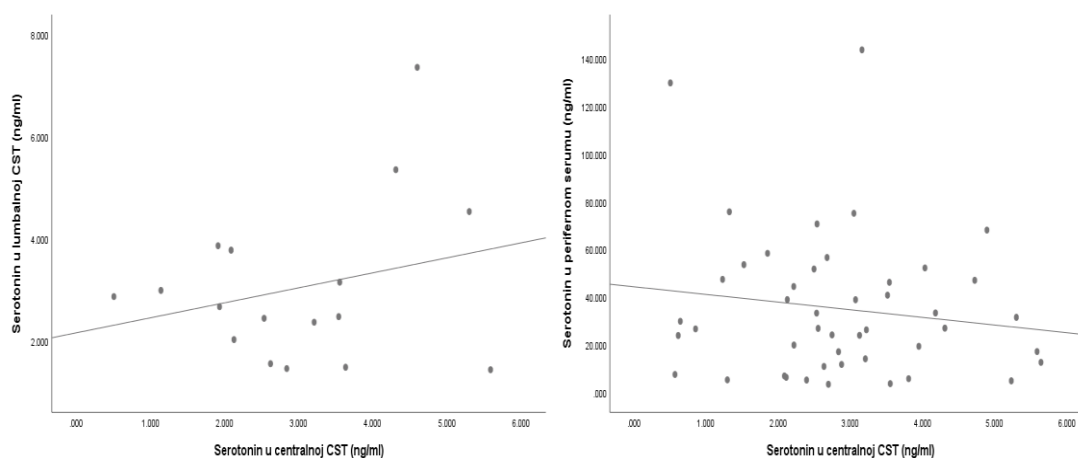
	N	Medijana	Min-Max	$\bar{X} \pm SD$
centralna CST	81	2.75	0.08 - 6.13	2.86 ± 1.43
lumbalna CST	17	3.01	1.44 - 7.36	3.26 ± 1.39
periferni serum	46	26.89	3.42 - 143.57	34.34 ± 29.72

Između koncentracija 5-HT u centralnoj i lumbalnoj CST, nije ustanovljena statistički značajna korelacija ($r = -0.015$, $p = 0,955$), kao ni između koncentracija 5-HT u centralnoj CST i perifernom serumu ($r = -0.095$, $p = 0,530$) (Tabela 4., Grafikon 3).

Tabela 4. Vrednosti koeficijenta korelacije i p za vrednosti 5-HT (ng/ml) u CST (centralnoj i lumbalnoj) i perifernom serumu.

	N	r^*	p
centralna/lumbalna CST	17	-0.015	0.955
centralna CST/ periferni serum	46	-0.095	0.530

*Spearmanov rho test



Grafikon 3. Prikaz odnosa vrednosti 5-HT a) u centralnoj i lumbalnoj CST i b) u centralnoj CST i perifernom serumu.

Vrednosti 5-HT u centralnoj CST nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na pol ispitanika ($U = 553,000$; $p = 0,232$), (Tabela 5.).

Tabela 5. Vrednosti 5-HT (ng/ml) u centralnoj CST u odnosu na pol, uzrast, dužinu postmortalnog intervala, dužinu agonalnog intervala i svesnost stresnog događaja.

		5-HT u centralnoj CST				
		N	Medijana	Min-Max	$\bar{X} \pm SD$	p
pol	muški	58	2,84	0.08 - 6.13	2.97 ± 1.45	0.232 ^a
	ženski	23	2,42	0.14 - 5.17	2.58 ± 1.36	
uzrast (g)	< 40	16	3.66	1.85 - 6.03	3.81 ± 1.20	0.001 ^b
	41-65	52	2.75	0.08 - 6.13	2.81 ± 1.39	
	65 >	13	1.71	0.14 - 4.89	1.16 ± 1.71	
postmortalni interval (h)	≤ 24	58	2.76	0.14 - 6.13	2.95 ± 1.40	0.456 ^b
	25 - 48	15	2.75	0.08 - 3.62	2.33 ± 1.09	
	49 - 72	8	3.42	0.61 - 5.23	3.22 ± 2.03	
agonalni interval	veoma kratak	52	2.72	0.14 - 6.13	2.32 ± 1.5	0.650 ^a
	duži	29	2.84	0.08 - 5.59	2.73 ± 1.29	
svesnost stresnog događaja	ne	24	2.63	0.14 - 5.64	2.87 ± 1.51	0.775 ^a
	da	57	2.88	0.08 - 6.13	2.9 ± 1.38	

^aMann-Whitney U test; ^bKruskal-Wallis test

Poređenjem vrednosti 5-HT između starosnih grupa, ustanovljeno je postojanje visoko statistički značajne razlike ($\chi^2 = 13,354$; $p = 0,001$), sa tendencijom opadanja vrednosti sa starošću ispitanika (Tabela 5.), za šta je i Spearman-ov test korelacije pokazao statistički značajnu negativnu korelaciju između vrednosti 5-HT i uzrastnih grupa ($r = -0.368$; $p = 0,001$).

Iako su vrednosti 5-HT rasle sa dužinom postmortalnog intervala (Tabela 5.), nisu ustanovljene statistički značajne razlike u vrednostima 5-HT između ova tri intervala ($\chi^2 = 1,572$; $p = 0,456$), kao ni značajna povezanost ($r = -0.075$; $p = 0,503$).

Statistički značajna razlika u vrednostima 5-HT u odnosu na dužinu perioda agonije nije ustanovljena ($U = 708,000$, $p = 0,650$; Tabela 5.).

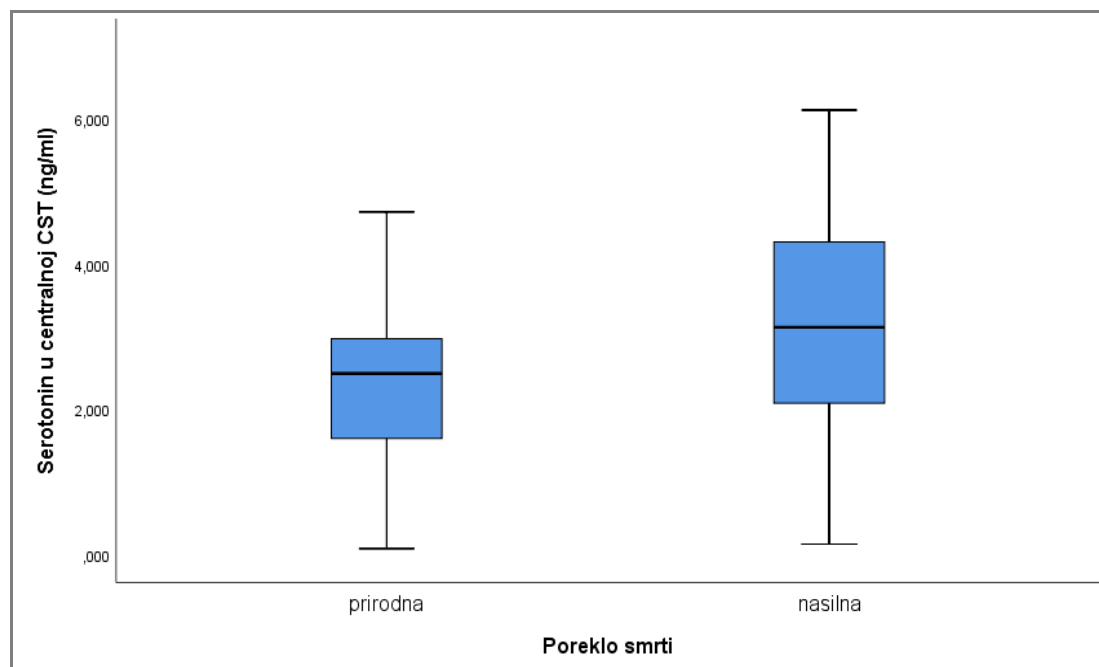
Nisu ustanovljene statistički značajne razlike u vrednostima 5-HT u odnosu na postojanje svesti o stresnom-po život opasnom događaju ($U = 711,000$; $p = 0,775$, Tabela 5.).

Tabela 6. Vrednosti 5-HT (ng/ml) u centralnoj CST u odnosu na poreklo smrti.

		5-HT u centralnoj CST				
		N	Medijana	Min - Max	$\bar{X} \pm SD$	p
poreklo smrti	prirodna smrt	31	2.50	0.08 - 4.72	2.32 ± 1.17	0,013
	nasilna smrt	50	3.13	0.14 - 6.13	3.2 ± 1.50	
	zadesna	20	3.56	0.14 - 5.64	3.38 ± 1.66	0,414
	samoubilačka	24	2.72	0.5 - 6.13	2.91 ± 1.3	
	ubilačka	6	3.18	1.45 - 6.03	3.76 ± 1.73	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test

U odnosu na poreklo smrti, dobijene su statistički značajne razlike u vrednostima 5-HT između grupa prirodne i nasilne smrti ($U = 519,000$, $p = 0,013$) – vrednosti su bile statistički značajno više u grupi nasilnih smrti u odnosu na prirodne (Tabela 6., Grafikon 4). Cutoff vrednost 5-HT za nasilne smrti iznosila je 3.27 ng/ml, (senzitivnost 46%, specifičnost 87.1%; $AUC = 0.665$ (0.548-0.783); $p=0,013$). Ali, daljom analizom, nisu ustanovljene statistički značajne razlike u vrednostima 5-HT unutar grupe nasilnih smrti ($\chi^2 = 1,765$; $p = 0,414$), iako su srednje vrednosti 5-HT bile najniže u grupi samoubilačkih smrti (Tabela 6.).

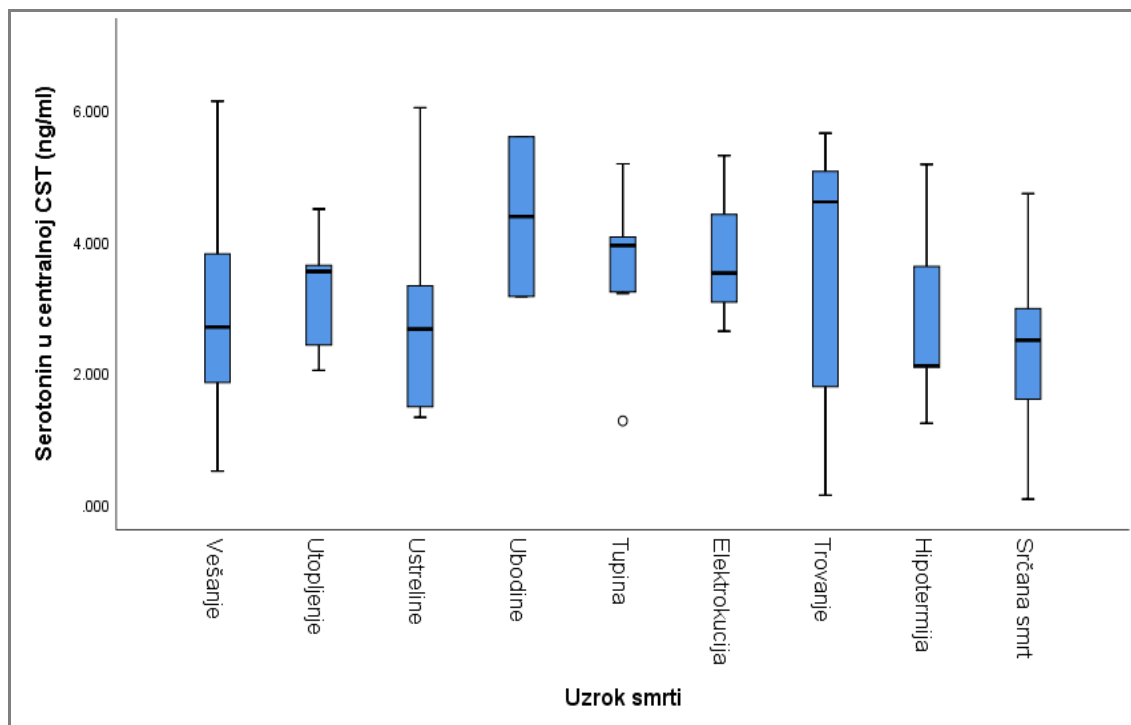


Grafikon 4. Vrednosti 5-HT (ng/ml) u CST u odnosu na poreklo smrti.

Tabela 7. Vrednosti 5-HT (ng/ml) u centralnoj CST u odnosu na uzrok smrti

		5-HT u centralnoj CST				
		N	Medijana	Min - Max	$\bar{X} \pm SD$	p
uzrok smrti	srčana smrt	31	2.50	0.08 – 4.72	2.32 ± 1.13	0.180
	vešanje	13	2.92	0.50 – 6.13	2.92 ± 1.52	
	utopljenje	5	3.54	2.04 – 4.50	3.22 ± 0.99	
	dejstvo tupine	7	3.93	1.27 – 5.18	3.57 ± 1.20	
	ustreline	8	2.67	1.32 – 6.03	2.79 ± 1.55	
	ubodine	2	4.37	3.16 – 5.6	4.37 ± 1.72	
	hipotermija	5	2.11	1.23 – 5.17	2.84 ± 1.56	
	elektrokucija	3	3.51	2.63 – 5.30	3.82 ± 1.36	
	intoksikacija CO	7	4.60	0.14 – 5.64	3.44 ± 2.16	

U odnosu na uzrok smrti (Tabela 7., Grafikon 5.), vrednosti su bile najviše kod trovanja ugljenmonoksidom, više u smrtima nastalim dejstvom šiljka i oštrice, tupine mehaničkog oruđa, kod utopljenja i u elektrokciji, dok su niže bile kod vešanja i u srčanoj smrti, a najniže u hipotermiji, no ipak nije ustanovljena statistički značajna razlika ($F = 1.478$, $p = 0,180$) u vrednostima 5-HT u odnosu na ispitivane uzroke smrti.



Grafikon 5. Vrednosti 5-HT u centralnoj CST (ng/ml) u odnosu na uzrok smrti.

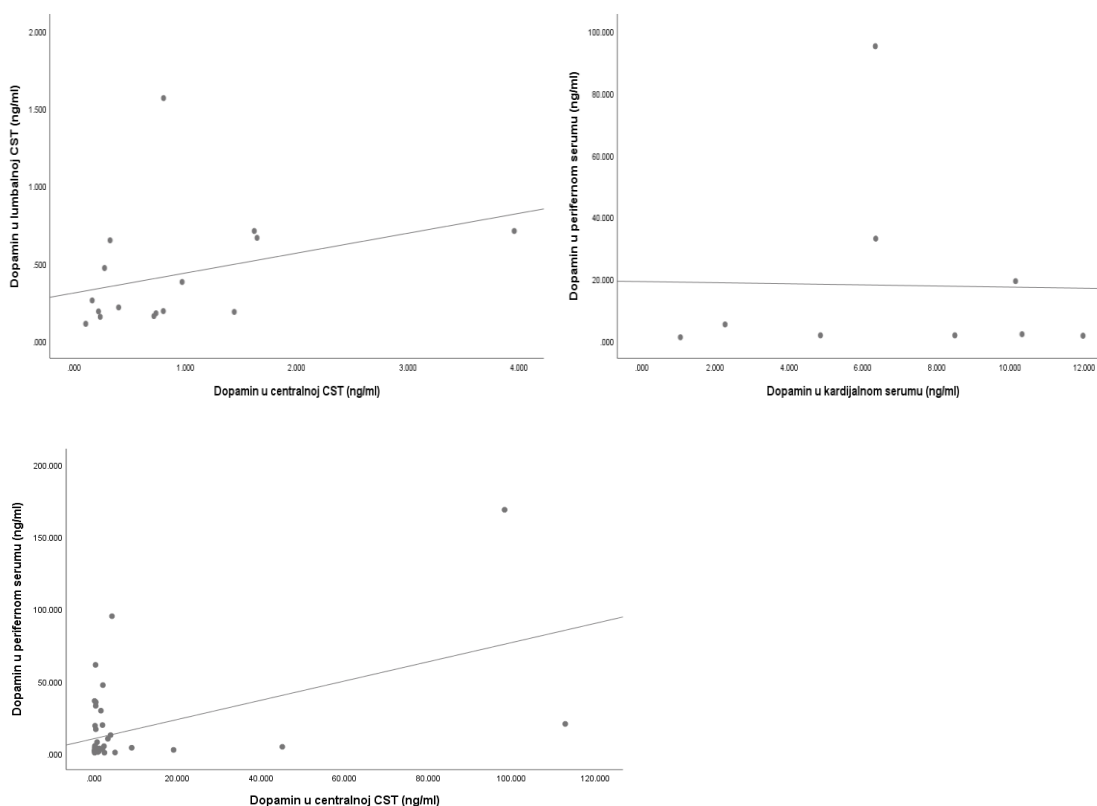
4.2. Dopamin

Vrednosti izmerenih koncentracija DA u svim uzorcima bile su u opsegu od 0.05 do 168,8 ng/ml (Tabela 8.).

Tabela 8. Vrednosti DA (ng/ml) u CST (centralnoj i lumbalnoj) i serumu (perifernom i kardijalnom).

	N	Medijana	Min-Max	$\bar{X} \pm SD$
centralna CST	81	0.68	0.05 – 112.84	5.00 ± 17.49
lumbalna CST	17	0.27	0.11 – 1.57	0.42 ± 0.35
periferni serum	46	3.42	0.60 – 168.83	15.11 ± 29.71
kardijalni serum	9	6.33	1.05 – 27.95	8.12 ± 7.00

Analizom odnosa koncentracija DA u centralnoj i lumbalnoj CST uočena je statistički značajna pozitivna korelacija ($r = 0,568$; $p = 0,022$, Grafikon 6.), dok povezanost nije utvrđena između vrednosti u centralnoj CST i perifernom serumu ($r = 0,204$; $p = 0,173$), kao ni u perifernom i kardijalnom serumu ($r = 0,067$; $p = 0,865$). (Tabela 9., Grafikon 6.)



Grafikon 6. Prikaz odnosa vrednosti DA a) u centralnoj i lumbalnoj CST, b) perifernom i kardijalnom serumu, c) centralnoj CST i perifernom serumu

Tabela 9. Vrednosti koeficijenta korelacije i p za vrednosti DA (ng/ml) u CST (centralnoj i lumbalnoj) i serumu (perifernom i kardijalnom).

	N	r ^a	p
centralna/lumbalna CST	17	0,568*	0.022
centralna CST/ periferni serum	46	0,204	0.173
serum periferni/kardijalni	9	0,067	0.865

^aSpearmanov rho test, značajnost na p=0,05.

Dopamin u centralnoj CST

Tabela 10. Vrednosti DA (ng/ml) u centralnoj CST u odnosu na pol, uzrast, dužinu postmortalnog intervala, dužinu agonalnog intervala i svesnost stresnog događaja.

		DA u centralnoj CST				
		N	Medijana	Min - Max	$\bar{X} \pm SD$	p
pol	muški	58	0.49	0.05 – 112.84	4.91 ± 19.73	0.016 ^a
	ženski	23	1.65	0.12 – 45.09	5.23 ± 10.11	
uzrast (g)	< 40	16	0.97	0.23 - 4.29	1.49 ± 1.38	0.603 ^b
	41-65	52	0.71	0.05 – 112.84	6.87 ± 21.43	
	65 >	13	0.49	0.25 – 9.01	1.43 ± 2.49	
postmortalni interval (h)	< 24	58	0.50	0.11 – 112.84	4.68 ± 16.22	0.604 ^b
	25 - 48	15	0.76	0.05 – 2.11	0.82 ± 0.59	
	49 - 72	8	1.50	0.10 – 98.32	14.54 ± 34.04	
agonalni interval	veoma kratak	52	0.71	0.14 -112.84	7.15 ± 21.38	0.082 ^a
	duži	29	0.45	0.05 – 5.02	0.93 ± 1.14	
svesnost stresnog događaja	ne	24	0.83	0.14 -112.84	9.93 ± 28.44	0.362 ^a
	da	57	0.65	0.05 – 45.09	2.54 ± 6.86	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test

Vrednosti DA u centralnoj CST su pokazale statistički značajnu razliku između polova, kod žena su vrednosti bile značajno više (U = 400,000; p = 0,016, Tabela 10.).

Iako vrednosti DA u centralnoj CST opadaju sa starošću ispitanika, poređenjem vrednosti DA između starosnih grupa, nije ustanovljena statistički značajna razlika ($\chi^2 = 1,013$; p = 0.603, Tabela 10.), a Spearman-ov rho test nije pokazao statistički značajnu negativnu povezanost (r = - 0,086; p = 0,455).

U odnosu na postmortalni interval nisu ustanovljene statistički značajne razlike ($\chi^2 = 1,009$; p = 0.604), a ni Spearman-ov rho test nije pokazao značajnu povezanost (r = 0,076; p = 0,506) iako je srednja vrednost DA rasla sa dužinom intervala. Međutim, unutar grupa postoje velike varijacije u vrednostima, što bi moglo objasniti nedostatak statističke značajnosti (Tabela 10.).

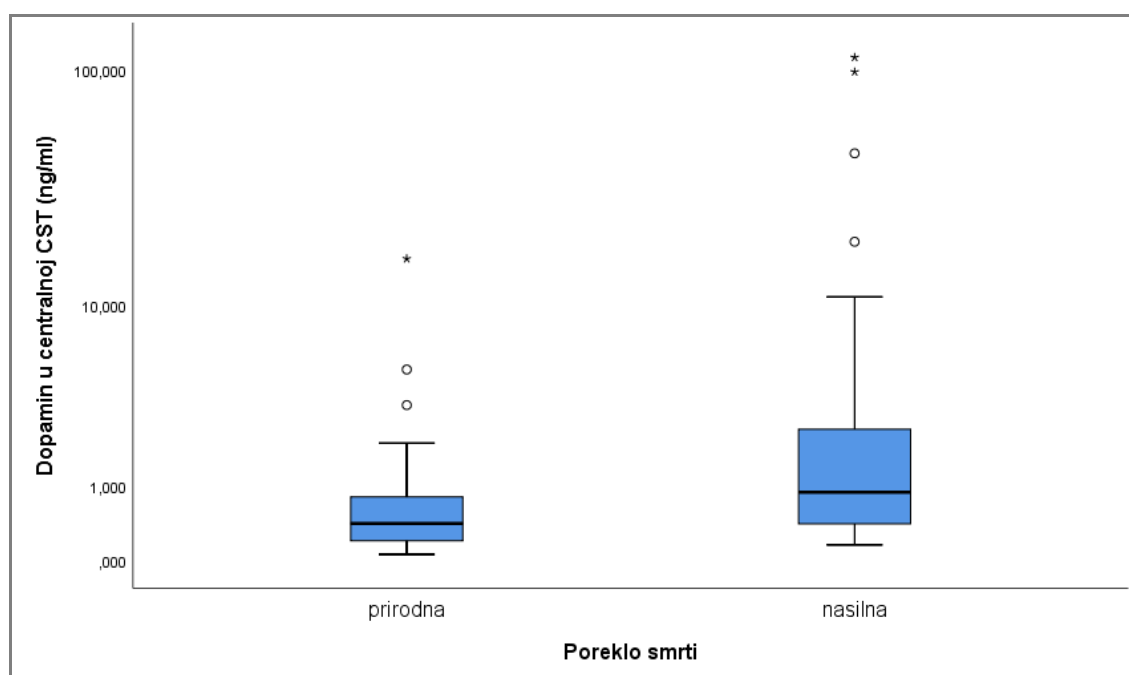
Statistički značajna razlika nije ustanovljena između vrednosti DA u odnosu na dužinu perioda agonije ($U = 523,000$; $p = 0,082$), a srednje vrednosti DA su bile više u grupi veoma kratkog agonalnog intervala (Tabela 10.).

Nije ustanovljena statistički značajna razlika u vrednostima DA u odnosu na postojanje svesti o stresnom događaju ($U = 590,000$; $p = 0,362$).

Tabela 11. Vrednosti DA (ng/ml) u centralnoj CST u odnosu na poreklo smrti.

		DA u centralnoj CST				
		N	Medijana	Min-Max	$\bar{X} \pm SD$	p
poreklo smrti	prirodna smrt	31	0.41	0.05 – 16.08	1.24 ± 2.94	0.003 ^a
	nasilna smrt	50	0.89	0.15 – 112.84	7.48 ± 22.15	
	zadesna	20	1.86	0.15 – 112.84	14.07 ± 34.06	0.557 ^b
	samoubilačka	24	0.75	0.16 – 45.09	4.02 ± 9.70	
	ubilačka	6	0.40	0.23 – 10.94	2.68 ± 4.28	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test



Grafikon 7. Vrednosti DA (ng/ml) u CST u odnosu na poreklo smrti.

U odnosu na poreklo smrti (Tabela 11., Grafikon 7), postoji visoko statistički značajna razlika u vrednostima DA u CST između prirodne i nasilne smrti ($U = 435,500$; $p = 0,003$). Vrednosti su bile značajno više u grupi nasilnih smrti u odnosu na prirodne. Cutoff vrednost za nasilne smrti je iznosila 0,24 ng/ml (senzitivnost 91,4 %, specifičnost 41,9 %; $AUC = 0,701$ (0,581 - 0,821); $p = 0,003$). No, daljom analizom,

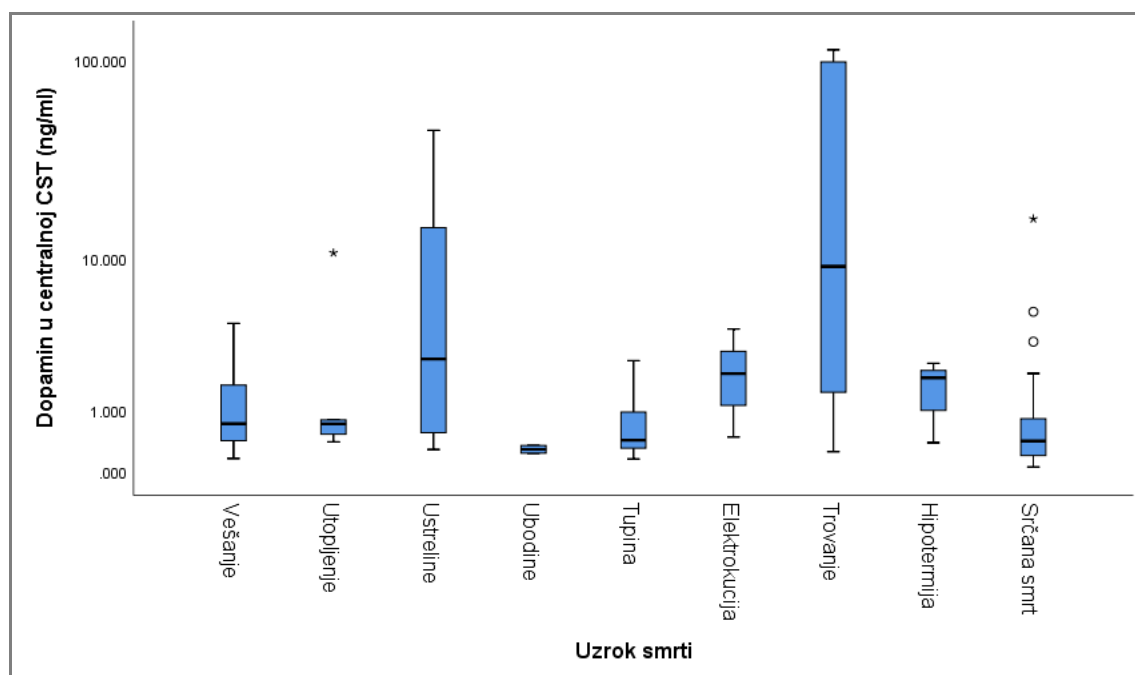
unutar nasilnih smrti, nisu ustanovljene statistički značajne razlike ($\chi^2 = 1,170$; $p = 0,557$; Tabela 11.).

U odnosu na grupe uzroka smrti (Tabela 12., Grafikon 8.), dobijena je statistička značajnost u razlikama vrednosti DA u centralnoj CST ($\chi^2 = 17,494$; $p = 0,025$), međutim, zbog malog uzorka, ona je diskutabilna. Evidentno najviše srednje vrednosti DA su u trovanju ugljenmonoksidom, više kod ustrelina, niže u utopljenjima i elektrokciji; vrednosti u slučajevima hipotermije su veoma bliske onima u srčanim smrtima, a najniže u slučajevima ubodina i smrtima nastalim dejstvom tupine mehaničkog oruđa.

Tabela 12. Vrednosti DA (ng/ml) u centralnoj CST u odnosu na uzrok smrti

		DA u centralnoj CST				
		N	Medijana	Min - Max	$\bar{X} \pm SD$	p
uzrok smrti	srčana smrt	31	0.41	0.05 – 16.08	1.24 ± 2.94	0.025 ^a
	vešanje	13	0.71	0.16 – 4.29	1.22 ± 1.21	
	utopljenje	5	0.71	0.40 – 10.66	2.62 ± 4.50	
	dejstvo tupine	7	0.42	0.15 – 2.48	0.80 ± 0.81	
	ustrelina	8	2.71	0.28 – 45.09	10.23 ± 15.56	
	ubodine	2	0.29	0.23 – 0.34	0.29 ± 0.08	
	hipotermija	5	1.87	0.38 – 2.37	1.62 ± 0.86	
	elektrokcija	3	2.01	0.48 – 3.96	2.15 ± 1.74	
	intoksikacija CO	7	9.01	0.25 – 112.84	44.37 ± 56.21	

^aKruskal-Wallis test



Grafikon 8. Vrednosti DA u centralnoj CST (ng/ml) u odnosu na uzrok smrti

Dopamin u perifernom serumu

Vrednosti DA u serumu nisu pokazale statistički značajne razlike između polova (U = 145,000, p = 0,140), (Tabela 13.).

Poređenjem vrednosti DA u serumu između starosnih grupa nije ustanovljena statistički značajna razlika ($\chi^2 = 5,219$; p = 0,074). Međutim, u odnosu na starosne grupe uočena je jasna tendencija opadanja vrednosti sa starošću ispitanika (Tabela 13.), a Spearman-ov rho test je pokazao statistički značajnu negativnu povezanost (r = -0,329; p = 0,025).

Tabela 13. Vrednosti DA (ng/ml) u perifernom serumu u odnosu na pol, uzrast, dužinu postmortalnog intervala, dužinu agonalnog intervala i svesnost stresnog događaja.

		DA u perifernom serumu				
		N	Medijana	Min - Max	$\bar{X} \pm SD$	p
pol	muški	34	2.71	0.60 – 168.83	15.84 ± 33.02	0.140 ^a
	ženski	12	4.37	1.80 – 61.44	13.06 ± 18.26	
uzrast (g)	< 40	10	9.10	0.63 - 95.15	20.78 ± 28.79	0,074 ^b
	41-65	29	3.95	0.60 – 168.83	16.25 ± 33.14	
	65 >	7	1.80	1.45 – 4.03	2.30 ± 0.98	
postmortalni interval (h)	≤ 24	34	3.74	0.60 – 95.15	11.35 ± 19.53	0.709 ^b
	25 - 48	7	2.19	1.70 – 47.43	13.36 ± 19.54	
	49 - 72	5	10.28	1.66 – 168.83	43.13 ± 71.43	
agonalni interval	veoma kratak	32	2.90	0.60 – 168.83	18.13 ± 34.77	0.765 ^a
	duži	14	4.29	0.76 – 36.48	8.20 ± 9.91	
svesnost stresnog događaja	ne	18	2.90	0.60 – 168.83	15.90 ± 39.19	0.485 ^a
	da	28	3.96	0.63 – 95.15	14.61 ± 22.43	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test

U odnosu na postmortalni interval nisu ustanovljene statistički značajne razlike ($\chi^2 = 0,688$; p = 0,709), a ni Spearman-ov rho test nije pokazao značajnu povezanost (r = 0,044; p = 0,773) iako je srednja vrednost DA rasla sa dužinom intervala. Međutim, unutar grupa postoje velike varijacije u vrednostima, što bi moglo objasniti nedostatak statističke značajnosti (Tabela 13.).

Statistički značajna razlika nije ustanovljena između serumskih vrednosti DA u odnosu na dužinu perioda agonije (U = 211,000; p = 0,756), a srednje vrednosti DA su bile više u grupi veoma kratkog agonalnog intervala (Tabela 13.).

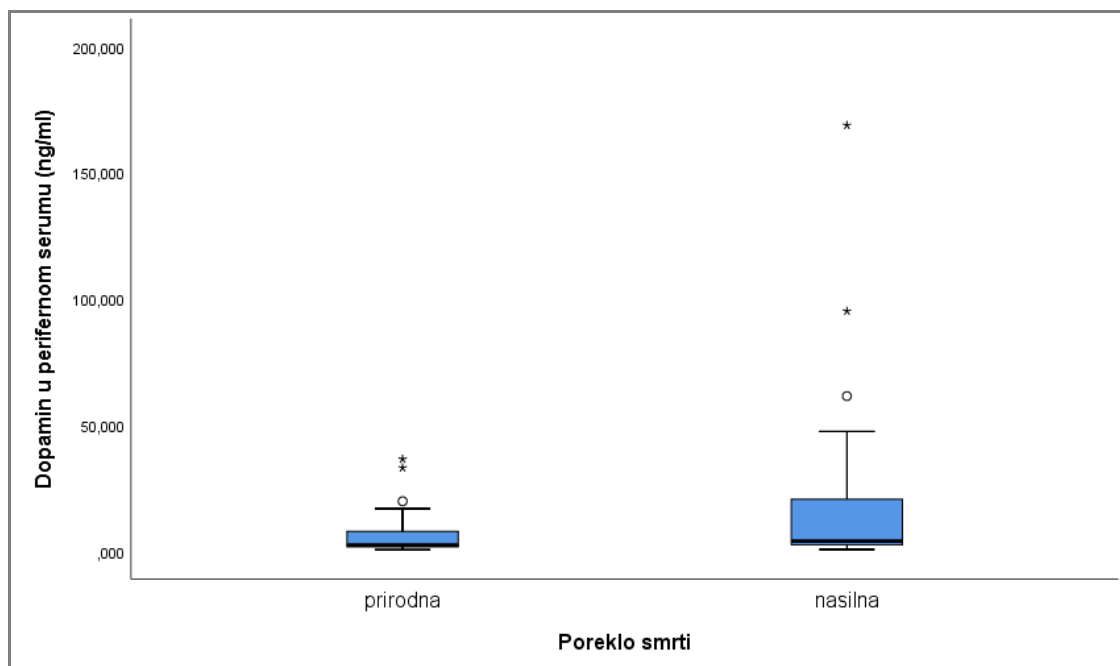
Nije ustanovljena statistički značajna razlika u vrednostima DA u odnosu na postojanje svesti o stresnom događaju ($U = 221,000$; $p = 0,485$).

Tabela 14. Vrednosti DA (ng/ml) u perifernom serumu u odnosu na poreklo smrti.

		DA u perifernom serumu				
		N	Medijana	Min-Max	$\bar{X} \pm SD$	p
poreklo smrti	prirodna smrt	20	2.38	0.60 – 36.48	7.55 ± 10.68	0.106 ^a
	nasilna smrt	26	4.00	0.63 – 168.83	20.93 ± 37.70	
	zadesna	9	4.03	0.63 – 168.83	24.48 ± 54.50	0.544 ^b
	samoubilačka	14	3.96	1.04 – 95.15	17.12 ± 27.02	
	ubilačka	3	19.32	3.33 – 61.44	28.03 ± 30.02	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test

Vrednosti DA izmerene u serumu nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu na poreklo smrti, iako su srednje vrednosti u grupi nasilnih smrti evidentno više (Tabela 14., Grafikon 9.); nepostojanje značajnosti u razlikama se može pripisati veoma velikom rasponu vrednosti u ove dve grupe ($U = 187,000$; $p = 0,106$). Ni daljom analizom, između podgrupa nasilne smrti nisu ustanovljene značajane razlike ($\chi^2 = 1,219$; $p = 0,544$), iako je uočeno da su vrednosti DA najniže u grupi samoubilačkih smrti (Tabela 14.).



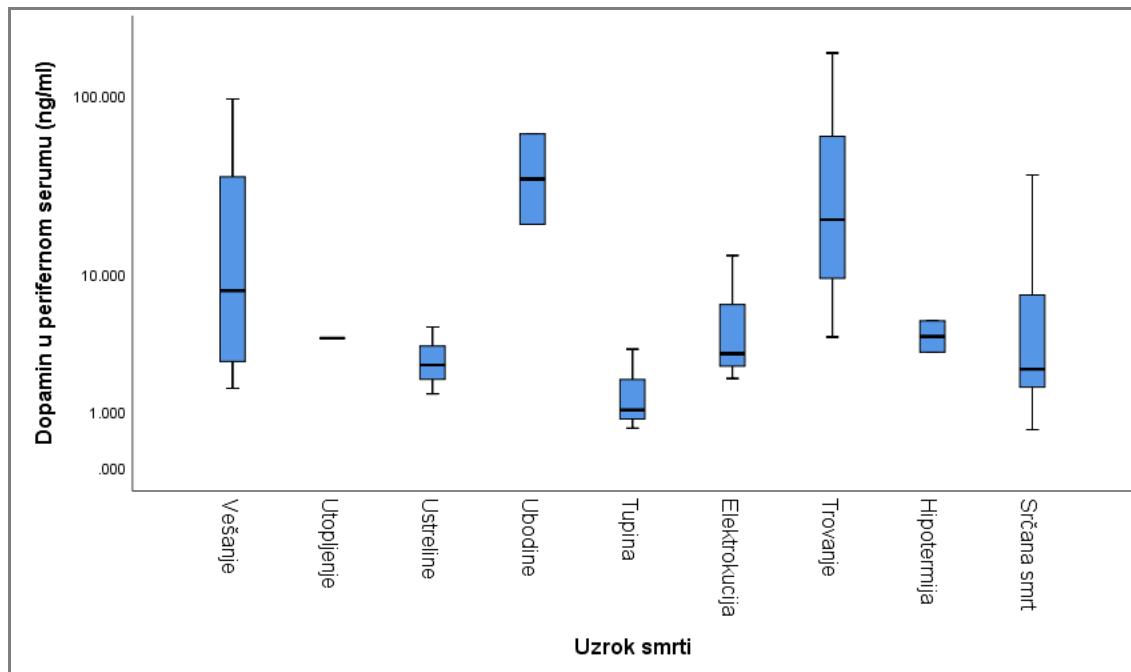
Grafikon 9. Vrednosti DA (ng/ml) u serumu u odnosu na poreklo smrti.

Tabela 15. Vrednosti DA (ng/ml) u perifernom serumu u odnosu na uzrok smrti

		DA u perifernom serumu				
		N	Medijana	Min - Max	$\bar{X} \pm SD$	p
uzrok smrti	srčana smrt	20	2.38	0.60 – 36.48	7.55 ± 10.68	0.109 ^a
	vešanje	9	7.93	1.66 – 95.15	25.11 ± 31.37	
	utopljenje	1	3.97	3.97	3.97	
	dejstvo tupine	3	1.04	0.63 – 3.33	1.66 ± 1.45	
	ustreline	3	2.56	1.49 – 4.70	2.92 ± 1.63	
	ubodine	2	40.38	19.32 – 61.44	40.38 ± 29.78	
	hipotermija	2	4.16	3.17 – 5.14	4.16 ± 1.39	
	elektrokucija	3	3.09	2.01 – 12.82	5.97 ± 5.96	
	intoksikacija CO	3	20.56	4.03 – 168.83	64.47 ± 90.75	

^aKruskal-Wallis test

U odnosu na grupe uzroka smrti (Tabela 15., Grafikon 10.), nije ustanovljena statistički značajna razlika u serumskim vrednostima DA ($\chi^2 = 13,097$; $p = 0,109$), iako se uvidom u vrednosti među najvišima ističu smrt usled ubodina i trovanja ugljenmonoksidom, a najniže srednje vrednosti su dobijene u grupi mehaničkih povreda nanesenih dejstvom tupine i u ustrelinama, kao i u srčanim smrtima. Vrednosti unutar i između grupa veoma variraju.



Grafikon 10. Vrednosti DA u serumu (ng/ml) u odnosu na uzrok smrti.

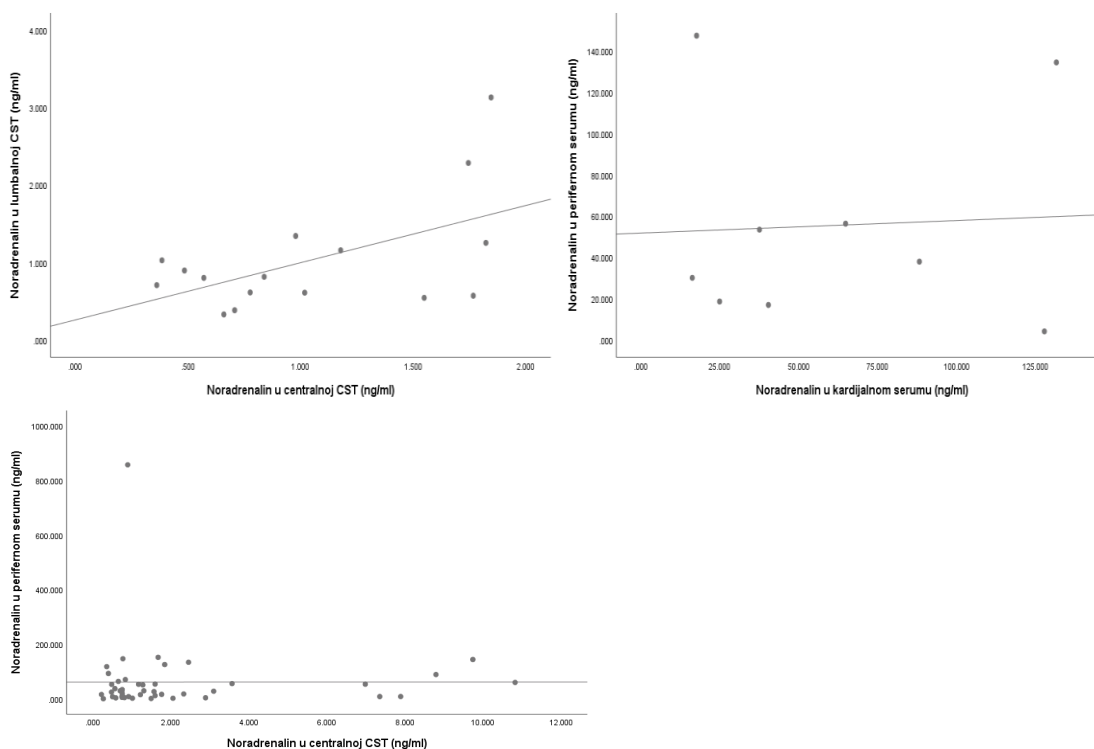
4.3. Noradrenalin

Vrednosti izmerenih koncentracija NA u svim uzorcima bile su u opsegu od 0.16 do 856,8 ng/ml (Tabela 16.).

Tabela 16. Vrednosti NA (ng/ml) u CST (centralnoj i lumbalnoj) i serumu (perifernom i kardijalnom).

	N	Medijana	Min-Max	$\bar{X} \pm SD$
centralna CST	81	1.02	0.16 – 10.82	2.02 ± 2.39
lumbalna CST	17	0.82	0.33 – 3.13	1.06 ± 0.72
periferni serum	46	29.12	1.07 – 856.84	62.14 ± 127.44
kardijalni serum	9	39.10	16.28 - 210.15	67.36 ± 55.92

Analizom odnosa vrednosti NA u centralnoj i lumbalnoj CST, nije ustanovljena statistički značajna korelacija ($r = 0,329$; $p = 0,213$), kao ni između vrednosti u centralnoj CST i perifernom serumu ($r = 0,140$; $p = 0,361$) i perifernom i kardijalnom serumu ($r = -0,050$; $p = 0,898$), Tabela 17., Grafikon 11).



Grafikon 11. Prikaz odnosa vrednosti NA a) u centralnoj i lumbalnoj CST, b) perifernom i kardijalnom serumu, c) centralnoj CST i perifernom serumu

Tabela 17. Vrednosti koeficijenta korelacije i p za vrednosti NA (ng/ml) u CST (centralnoj i lumbalnoj) i serumu (perifernom i kardijalnom).

	N	r ^a	p
centralna/lumbalna CST	17	0,329	0.213
centralna CST/ periferni serum	46	0,140	0.361
serum periferni/kardijalni	9	-0,050	0.898

^aSpearmanov rho test

Noradrenalin u centralnoj CST

Vrednosti NA u centralnoj CST nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na pol ispitanika (U = 588,000; p = 0,670, Tabela 18.)

Analizom razlika u vrednostima NA u CST između starosnih grupa, uočeno je da one opadaju sa uzrastom, ali među njima nisu ustanovljene statistički značajne razlike. Ni Spearman-ov test korelacije nije pokazao statistički značajnu povezanost (r = -0,182; p = 0,109).

Tabela 18. Vrednosti NA (ng/ml) u centralnoj CST u odnosu na pol, uzrast, dužinu postmortalnog intervala, dužinu agonalnog intervala i svesnost stresnog događaja.

		NA u centralnoj CST				
		N	Medijana	Min - Max	$\bar{X} \pm SD$	p
pol	muški	58	1.10	0.16 – 10.82	1.87 ± 2.20	0.670 ^a
	ženski	23	1.01	0.28 – 9.74	2.39 ± 2.84	
uzrast (g)	< 40	16	1.22	0.66 – 8.79	2.17 ± 2.37	0,257 ^b
	41-65	52	1.02	0.16 – 10.82	2.21 ± 2.62	
	65 >	13	0.92	0.35 – 3.10	1.06 ± 0.76	
postmortalni interval (h)	≤ 24	58	0.95	0.23 – 10.82	1.97 ± 2.50	0,003 ^b
	25 - 48	15	0.88	0.16 – 3.11	1.10 ± 0.75	
	49 - 72	8	2.93	1.77 – 8.79	4.07 ± 2.59	
agonalni interval	veoma kratak	52	1.29	0.23 – 9.74	2.20 ± 2.37	0.125 ^b
	duži	29	0.85	0.16 -10.82	1.67 ± 2.43	
svesnost stresnog događaja	ne	24	1.00	0.23 – 7.35	1.74 ± 1.95	0.499 ^b
	da	57	1.10	0.16 – 10.82	2.17 ± 2.60	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test

U odnosu na postmortalni interval, vrednosti NA u CST su pokazale statistički značajne razlike ($\chi^2 = 11,570$; p = 0.003), a i Spearman-ov rho test je pokazao

značajnu pozitivnu korelaciju između koncentracija NA i dužine postmortalnog intervala ($r = 0,262$; $p = 0,019$)

Statistički značajna razlika u vrednostima NA u CST nije ustanovljena u odnosu na dužinu perioda agonije ($U = 564,000$; $p = 0,125$).

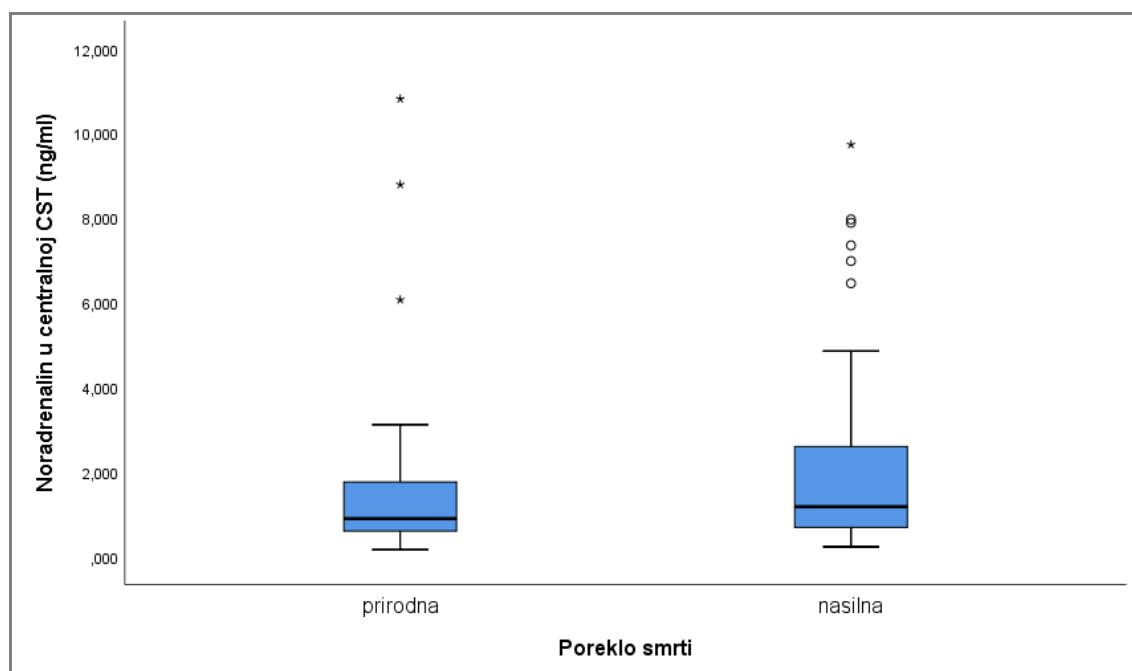
Nisu ustanovljene statistički značajne razlike u vrednostima NA u odnosu na postojanje svesti o stresnom događaju ($U = 648,000$; $p = 0,499$, Tabela 18.).

Tabela 19. Vrednosti NA (ng/ml) u centralnoj CST u odnosu na poreklo smrti.

		NA u centralnoj CST				
		N	Medijana	Min-Max	$\bar{X} \pm SD$	p
poreklo smrti	prirodna smrt	31	0.89	0.16 – 10.82	1.82 ± 2.42	0.498 ^a
	nasilna smrt	50	1.17	0.23 – 9.74	2.14 ± 2.38	
	zadesna	20	0.98	0.23 – 7.35	1.69 ± 2.10	0.215 ^b
	samoubilačka	24	1.57	0.30 – 9.74	2.43 ± 2.60	
	ubilačka	6	1.00	0.71 – 6.46	2.47 ± 2.53	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test

U odnosu na poreklo smrti, nisu dobijene statistički značajne razlike između grupa prirodne i nasilne smrti ($U = 676,500$; $p = 0,498$), iako su srednje vrednosti NA u grupi nasilnih smrti bile nešto više, (Tabela 19., Grafikon 12.) Statistički značajne razlike nisu ustanovljene ni između podgrupa nasilne smrti ($\chi^2 = 3,079$; $p = 0,215$), mada su vrednosti daleko najviše u grupi samoubilačkih smrti (Tabela 19).



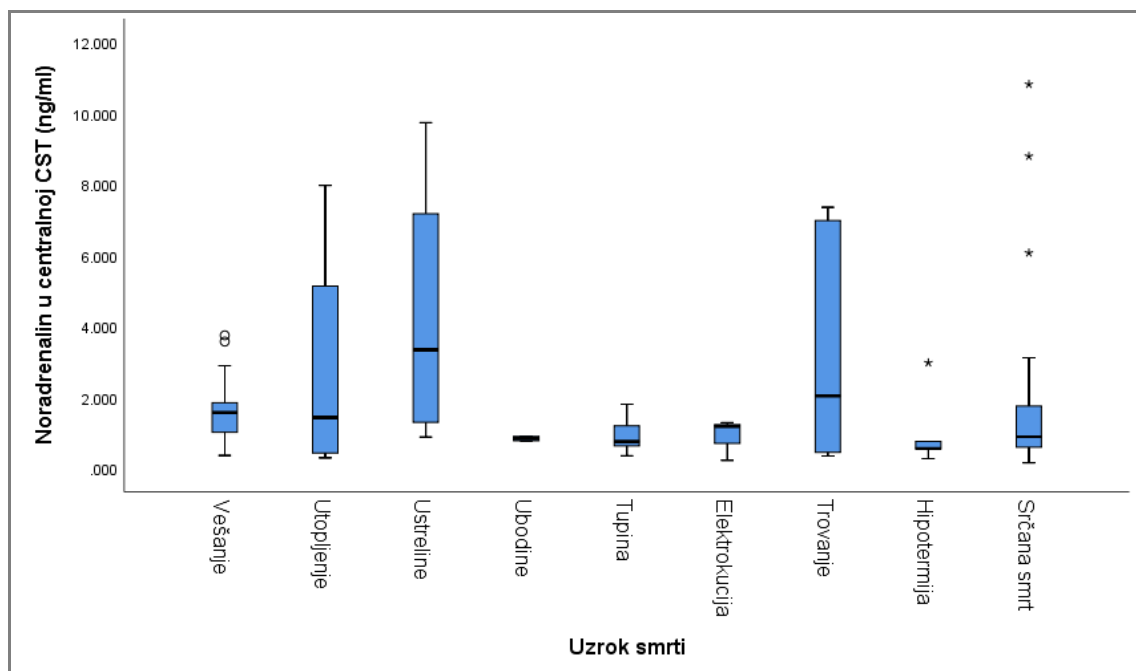
Grafikon 12. Vrednosti NA (ng/ml) u CST u odnosu na poreklo smrti.

Tabela 20. Vrednosti NA (ng/ml) u centralnoj CST u odnosu na uzrok smrti

		NA u centralnoj CST				
		N	Medijana	Min - Max	$\bar{X} \pm SD$	p
uzrok smrti	srčana smrt	31	0.89	0.16 – 10.82	1.82 ± 2.42	0.179 ^a
	vešanje	13	1.57	0.36 – 3.75	1.70 ± 1.08	
	utopljenje	5	1.43	0.30 – 7.97	2.78 ± 3.57	
	dejstvo tupine	7	0.76	0.35 – 1.81	0.94 ± 0.49	
	ustreline	8	3.34	0.88 – 9.74	4.28 ± 3.45	
	ubodine	2	0.84	0.78 – 0.90	0.84 ± 0.09	
	hipotermija	5	0.56	0.28 – 2.98	1.02 ± 1.10	
	elektrokucija	3	1.18	0.23 – 1.29	0.90 ± 0.58	
	intoksikacija CO	7	2.04	0.35 – 7.35	3.20 ± 3.23	

^aKruskal-Wallis test

U odnosu na uzrok smrti (Tabela 20., Grafikon 13.), nisu ustanovljene statistički značajne razlike ($\chi^2 = 11,424$; $p = 0,179$) između pojedinih grupa, mada su najviše srednje vrednosti ustanovljene u ustrelinama, više u trovanju ugljenmonoksidom, niže u asfikičnim smrtima, elektrokuciji, smrtima kardijalnog porekla, ubodinama i usled dejstva tupine mehaničkog oruđa, dok su najniže izmerene u hipotermiji. Razlike u vrednostima su između grupa vidljive, ali ne i statistički značajne.



Grafikon 13. Vrednosti NA u CST (ng/ml) u odnosu na uzrok smrti.

Noradrenalin perifernom serumu

Tabela 21. Vrednosti NA (ng/ml) u perifernom serumu u odnosu na pol, uzrast, dužinu postmortalnog intervala, dužinu agonalnog intervala i svesnost stresnog događaja.

		NA u perifernom serumu				p
		N	Medijan a	Min - Max	$\bar{X} \pm SD$	
pol	muški	34	26.22	1.89 – 152.46	43.51 ± 44.30	0.468 ^a
	ženski	12	32.19	1.07 – 856.84	114.93 ± 237.58	
uzrast (g)	< 40	10	55.47	15.85 – 147.34	66.25 ± 42.86	0.029 ^b
	41-65	29	25.25	1.07 – 856.84	71.82 ± 157.62	
	65 >	7	8.77	1.89 – 34.57	16.17 ± 13.36	
postmortalni interval (h)	≤ 24	34	27.81	1.07 – 856.84	64.86 ± 146.02	0.794 ^b
	25 - 48	7	51.49	4.17 – 152.46	50.55 ± 49.52	
	49 - 72	5	54.22	4.48 – 134.39	59.9 ± 53.32	
agonalni interval	veoma kratak	32	29.26	1.89 – 856.84	71.17 ± 150.19	0.811 ^a
	duži	14	27.53	1.07 - 147.34	41.52 ± 42.09	
svesnost stresnog događaja	ne	18	27.75	1.07 – 134.39	33.56 ± 33.15	0.184 ^a
	da	28	33.87	1.89 – 856.84	80.52 ± 159.64	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test

Vrednosti NA u serumu nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu na pol ispitanika ($U = 175,000$; $p = 0,468$).

Poređenjem serumskih vrednosti NA između starosnih grupa ustanovljena je statistički značajna razlika ($\chi^2 = 7,115$; $p = 0,029$), a Spirmanov rho test korelacije pokazao je statistički značajnu negativnu korelaciju između grupa ($r = - 0,396$; $p = 0,006$), sa jasnom tendencijom opadanja vrednosti kroz starosne grupe (Tabela 21.)

U odnosu na postmortalni interval nisu ustanovljene statistički značajne razlike ($\chi^2 = 0,462$; $p = 0,794$), a ni test korelacije nije pokazao statistički značajnu povezanost ($r = 0,098$; $p = 0,517$), iako su srednje vrednosti rasle sa dužinom postmortalnog intervala.

Statistički značajna razlika nije ustanovljena između vrednosti NA u odnosu na dužinu perioda agonije ($U = 214,000$; $p = 0,811$), a srednje vrednosti NA su bile više u grupi ispitanika sa veoma kratkim periodom agonije (Tabela 21).

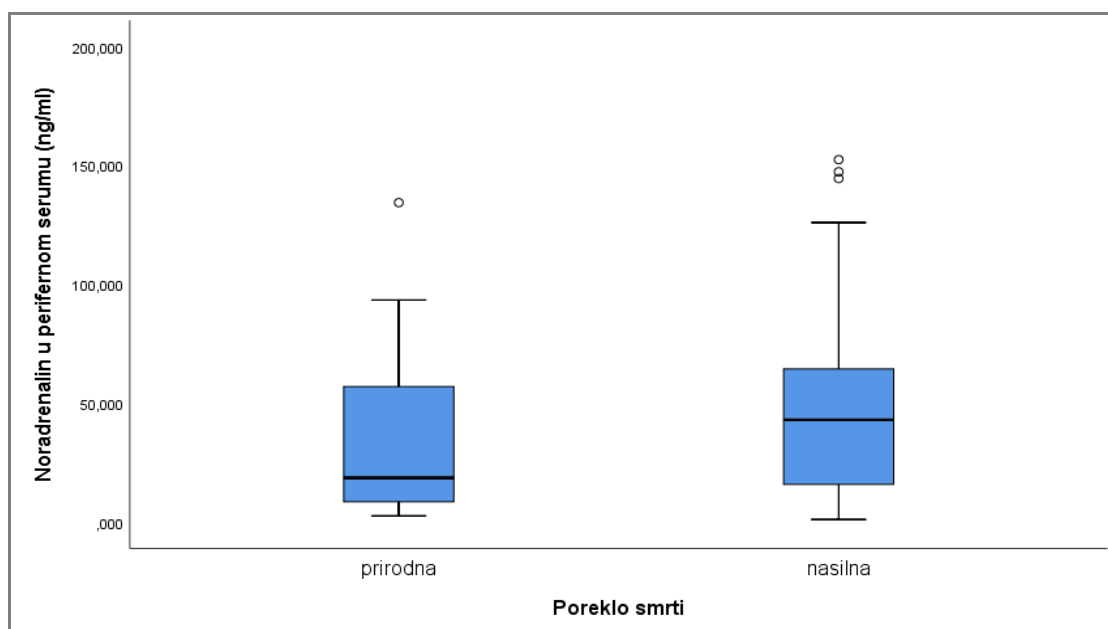
Kod ispitanika nije ustanovljena statistički značajna razlika u vrednostima NA u serumu u odnosu na postojanje svesti o stresnom događaju ($U = 193,000$; $p = 0,184$).

Tabela 22. Vrednosti NA (ng/ml) u perifernom serumu u odnosu na poreklo smrti.

		NA u perifernom serumu				
		N	Medijana	Min-Max	$\bar{X} \pm SD$	p
poreklo smrti	prirodna smrt	20	18.57	2.59 – 134.39	35.24 ± 36.98	0,184 ^a
	nasilna smrt	26	43.03	1.07 – 856.84	82.84 ± 164.84	
	zadesna	9	28.44	1.07 – 54.22	29.44 ± 20.31	0,098 ^b
	samoubilačka	14	55.47	1.89 – 152.46	61.06 ± 53.81	
	ubilačka	3	147.34	29.81 – 856.84	344.66 ± 447.44	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test

Vrednosti NA u serumu nisu pokazale statistički značajnu razliku između grupe nasilnih i prirodnih smrti ($U = 200,000$; $p = 0,184$). Dobijene srednje vrednosti ukazuju da je koncentracija NA znatno viša u nasilnim smrtima (Tabela 22., Grafikon 14.), ali u odsustvu statističke značajnosti. Statistički značajne razlike nisu ustanovljene ni u podgrupama nasilne smrti ($\chi^2 = 4,641$; $p = 0,098$, Tabela 22.).



Grafikon 14. Vrednosti NA (ng/ml) u serumu u odnosu na poreklo smrti

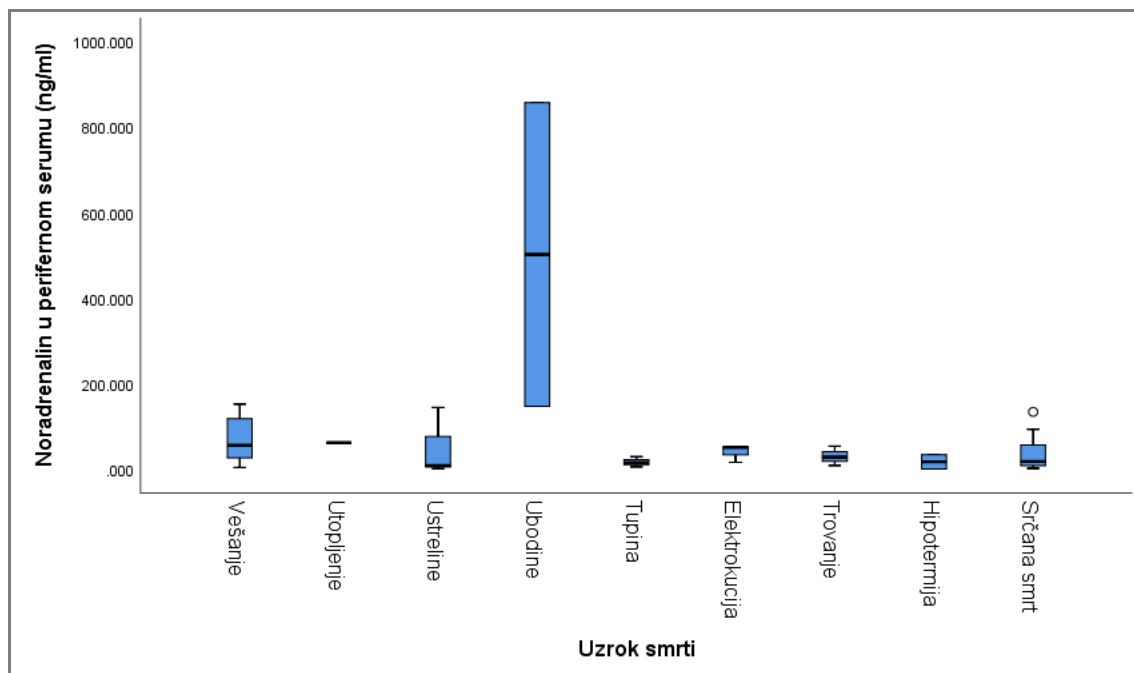
Tabela 23. Vrednosti NA (ng/ml) u perifernom serumu u odnosu na uzrok smrti

		NA u perifernom serumu				
		N	Medijana	Min - Max	$\bar{X} \pm SD$	p

uzrok smrti	srčana smrt	20	18.57	2.59 – 134.39	35.24 ± 36.98	0.152 ^a
	vešanje	9	56.31	4.48 – 152.46	70.11 ± 50.88	
	utopljenje	1	62.37	62.37	62.37	
	dejstvo tupine	3	15.85	6.05 – 29.81	17.24 ± 11.94	
	ustreline	3	9.02	1.89 – 144.52	51.81 ± 80.37	
	ubodine	2	502.09	147.34 – 856.84	502.09 ± 501.7	
	hipotermija	2	17.82	1.07 – 34.57	17.82 ± 23.68	
	elektrokucija	3	51.49	16.57 – 53.85	40.64 ± 20.88	
	intoksikacija CO	3	28.44	8.92 – 54.22	30.53 ± 23.68	

^aKruskal-Wallis test

Serumske vrednosti NA se nisu statistički značajno razlikovale u odnosu na uzrok smrti ($\chi^2 = 11,978$; $p = 0.152$); iako su daleko najviše bile u ubodinama, više u slučajevima utopljenja, vešanja i elektrokuciji, dok su niže izmerene u trovanjima ugljenmonoksidom, srčanim smrtima i hipotermiji, a najniže kod ustrelina (Grafikon 15., Tabela 23.).



Grafikon 15. Vrednosti NA u perifernom serumu (ng/ml) u odnosu na uzrok smrti.

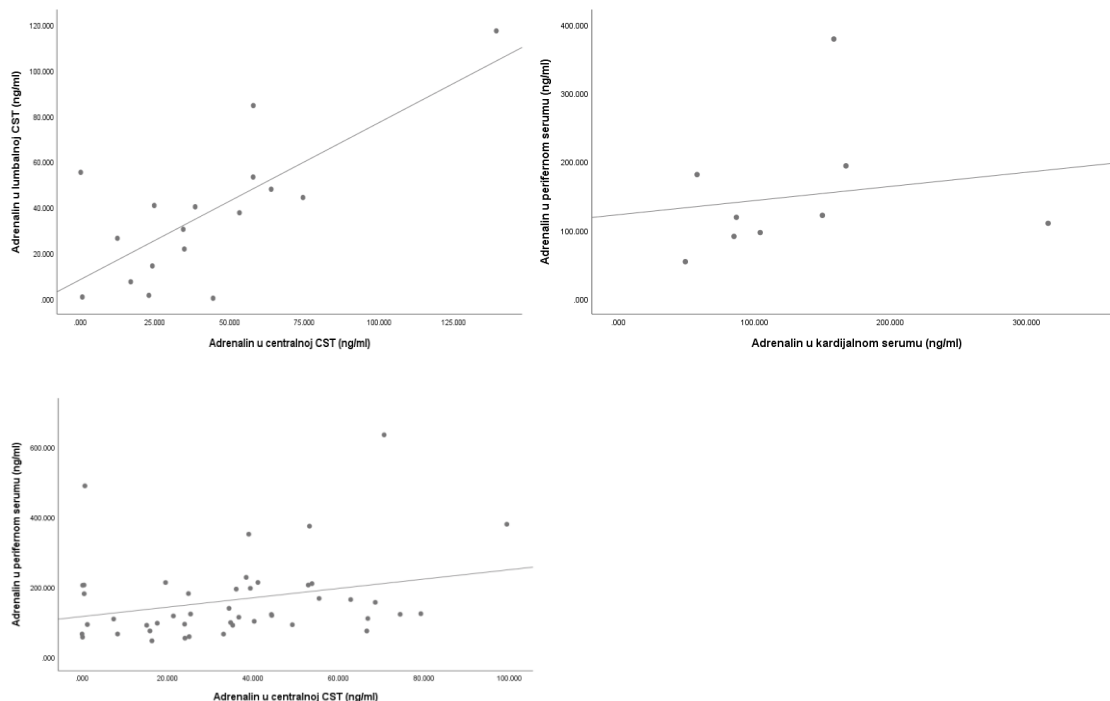
4.4. Adrenalin

Vrednosti izmerenih koncentracija AD u svim uzorcima bile su u opsegu od 0.03 do 634,13 ng/ml (Tabela 24).

Tabela 24. Vrednosti AD (ng/ml) u CST (centralnoj i lumbalnoj) i serumu (perifernom i kardijalnom).

	N	Medijana	Min-Max	$\bar{X} \pm SD$
centralna CST	81	34.43	0.03 – 141.38	35.14 ± 29.03
lumbalna CST	17	37.69	0.27 – 117.32	36.77 ± 30.83
periferni serum	46	122.02	46.55 – 634.13	162.37 ± 117.54
kardijalni serum	9	116.62	49.18 – 315.68	130.08 ± 67.22

Analizom odnosa koncentracija AD u centralnoj i lumbalnoj CST uočena je statistički značajna pozitivna korelacija ($r = 0,539$; $p = 0,026$), kao i između vrednosti u centralnoj CST i perifernom serumu ($r = 0,347$; $p = 0,018$), dok između koncentracija u perifernom i kardijalnom serumu povezanost nije utvrđena (Grafikon 16., Tabela 25.).



Grafikon 16. Prikaz odnosa vrednosti AD a) u centralnoj i lumbalnoj CST, b) perifernom i kardijalnom serumu, c) centralnoj CST i perifernom serumu

Tabela 25. Vrednosti koeficijenta korelacije i p za vrednosti AD (ng/ml) u CST (centralnoj i lumbalnoj) i serumu (perifernom i kardijalnom).

	N	r ^a	p
centralna/lumbalna CST	17	0,539*	0.026
centralna CST/ periferni serum	46	0,347*	0.018
serum periferni/kardijalni	9	0,500	0.170

^aSpearmanov rho test* značajnost na p= 0.05

Adrenalin u perifernom serumu

Tabela 26. Vrednosti AD (ng/ml) u perifernom serumu u odnosu na pol, uzrast, dužinu postmortalnog intervala, dužinu agonalnog intervala i svesnost stresnog događaja.

		AD u perifernom serumu				
		N	Medijana	Min - Max	$\bar{X} \pm SD$	p
pol	muški	34	122.59	46.55 – 488.60	153.47 ± 97.83	0.822 ^a
	ženski	12	115.67	57.06 – 634.13	187.58 ± 163.92	
uzrast (g)	< 40	10	145.70	54.21 – 488.60	205.01 ± 153.90	0.227 ^b
	41-65	29	123.00	46.55 – 634.13	157.36 ± 106.20	
	65 >	7	92.46	65.86 – 350.81	122.21 ± 102.10	
postmortalni interval (h)	≤ 24	34	122.02	46.55 – 634.13	171.71 ± 133.40	0,624 ^b
	25 - 48	7	156.37	92.46 – 205.66	150.41 ± 46.73	
	49 - 72	5	110.24	74.65 – 180.92	115.57 ± 40.28	
agonalni interval	veoma kratak	32	147.80	46.55 – 634.13	176.75 ± 130.43	0,262 ^a
	duži	14	113.14	54.21 – 350.81	129.50 ± 74.73	
svesnost stresnog događaja	ne	18	130.54	46.55 – 350.81	151.29 ± 72.26	0,719 ^a
	da	28	120.58	54.21 – 634.13	169.49 ± 140.02	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test

Vrednosti AD u perifernom serumu nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na pol ispitanika (U = 195,000; p = 0,822) (Tabela 26).

Poređenjem vrednosti AD između starosnih grupa, nije ustanovljeno postojanje statistički značajne razlike ($\chi^2 = 2,967$; p = 0,227), iako je posmatranjem srednjih vrednosti koncentracija AD (Tabela 26.) uočena tendencija njihovog opadanja sa starošću ispitanika, ali Spearman-ov test korelacije nije pokazao značajnu korelaciju između vrednosti 5-HT i uzrasta u vreme smrti (r = - 0,214; p = 0,154)

Statistički značajna razlika nije ustanovljena između vrednosti AD u odnosu na dužinu postmortalnog intervala (Tabela 26.) ($\chi^2 = 0,944$; p = 0,624), kao ni značajna povezanost (Spearman-ov rho test r = 0,161; p = 0,284) iako se iz rezultata vidi jasna tendencija opadanja srednje vrednosti sa dužinom intervala. Međutim, unutar grupa

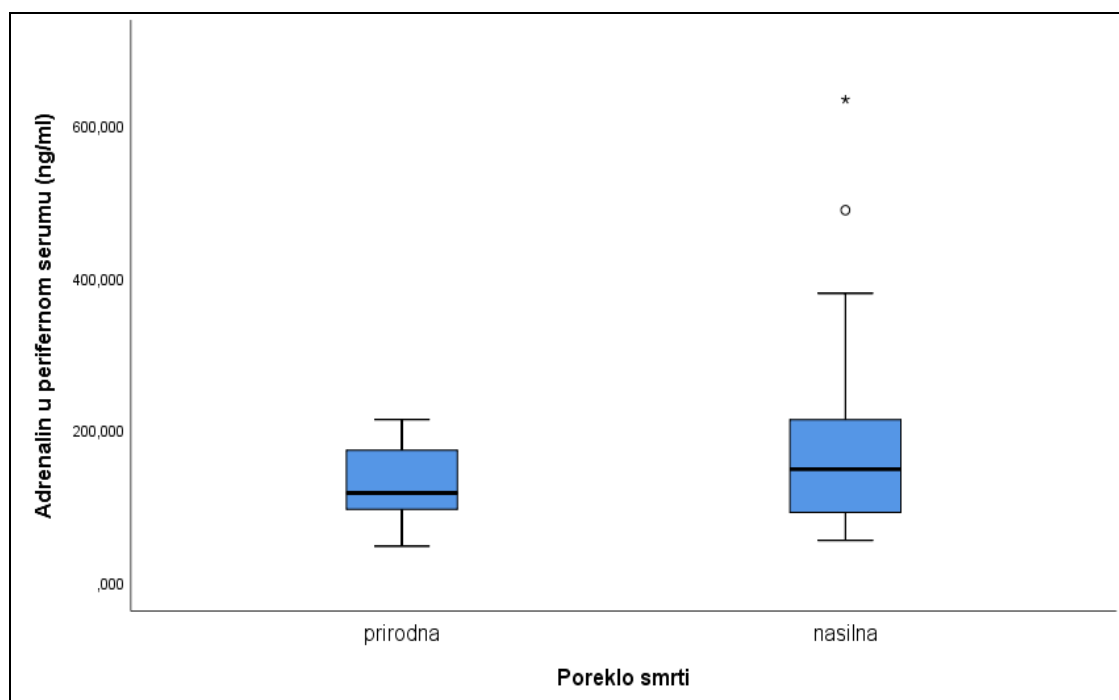
postoje velike varijacije u vrednostima, što bi moglo objasniti nedostatak statističke značajnosti.

Nisu ustanovljene statistički značajne razlike između vrednosti AD u perifernom serumu u odnosu na dužinu perioda agonije ($U = 177,000$; $p = 0,262$), štaviše, srednje vrednosti su bile više u grupi ispitanika sa veoma kratkim agonalnim intervalom (176.75 ± 130.43 naspram 129.50 ± 74.73), ali zbog velikog raspona vrednosti, statistička značajnost nije ustanovljena, kao ni u odnosu na svesnost o stresnom događaju ($U = 236,000$; $p = 0,719$), (Tabela 26.).

Tabela 27. Vrednosti AD (ng/ml) u perifernom serumu u odnosu na poreklo smrti.

		AD u perifernom serumu				
		N	Medijana	Min-Max	$\bar{X} \pm SD$	p
poreklo smrti	prirodna smrt	20	116.40	46.55 – 213.09	126.59 ± 50.08	0,319 ^a
	nasilna smrt	26	147.80	54.21 – 634.13	189.89 ± 145.43	
	zadesna	9	139.23	65.70 – 350.81	158.0 ± 90.66	0,826 ^b
	samoubilačka	14	161.92	57.06 – 488.60	194.84 ± 132.86	
	ubilačka	3	98.66	54.21 – 634.13	262.33 ± 322.75	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test



Grafikon 13. Vrednosti AD (ng/ml) u serumu u odnosu na poreklo smrti.

U odnosu na poreklo smrti, nisu dobijene statistički značajne razlike u vrednostima AD u perifernom serumu, između prirodne i nasilne smrti ($U = 215,000$, p

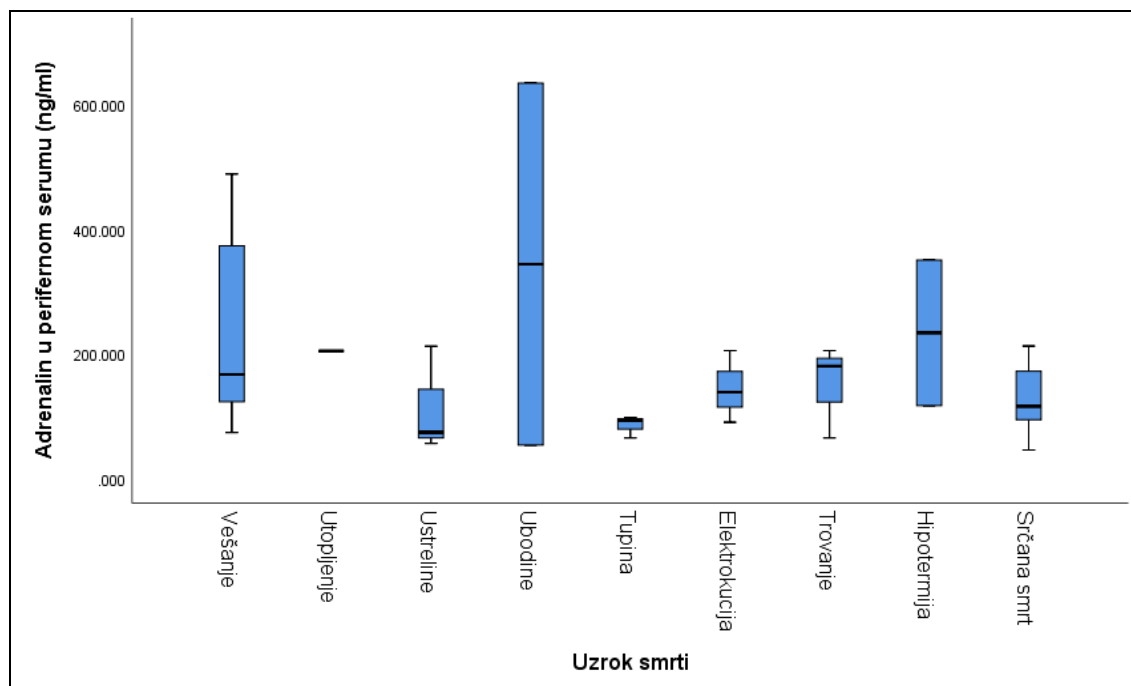
= 0,319), iako su srednje vrednosti AD više u grupi nasilnih smrti u odnosu na prirodne. Takođe, nije utvrđena statistička značajnost ni među vrednostima AD u odnosu na podgrupe nasilne smrti ($\chi^2 = 0,383$; $p = 0,826$), (Tabela 27.)

Tabela 28. Vrednosti AD (ng/ml) u perifernom serumu u odnosu na uzrok smrti

		AD u perifernom serumu				
		N	Medijana	Min - Max	$\bar{X} \pm SD$	p
uzrok smrti	srčana smrt	20	116.40	46.55 – 213.09	126.59 ± 50.08	0,461 ^a
	vešanje	9	167.47	74.65 – 488.60	231.54 ± 147.22	
	utopljenje	1	205.06	205.06	205.06	
	dejstvo tupine	3	94.09	65.70 – 98.66	86.15 ± 17.86	
	ustreline	3	74.80	57.06 – 212.84	114.90 ± 85.28	
	ubodine	2	344.17	54.21 – 634.13	344.17 ± 410.07	
	hipotermija	2	234.16	117.50 – 350.81	234.16 ± 164.98	
	elektrokucija	3	139.23	90.93 – 205.66	145.27 ± 57.60	
	intoksikacija CO	3	180.92	65.86 – 205.69	150.82 ± 74.62	

^aKruskal-Wallis U test

Nije bilo statistički značajnih razlika u vrednostima AD u odnosu na uzrok smrti, ($U = 7,724$; $p = 0,461$), iako su srednje vrednosti bile najviše u ubodinama, više u smrtima nastalim dejstvom šiljka i oštrice-ubodinama, hipotermiji i utopljenju, a najniže u smrtima nastalim dejstvom tupine mehaničkog oruđa, ustrelinama i srčanoj smrti (Tabela 28, Grafikon 14.).



Grafikon 14. Vrednosti AD u serumu (ng/ml) u odnosu na uzrok smrti.

5. DISKUSIJA

Iako su uloga i značaj monoamina i acetilholina u organizmu poznati već nekoliko decenija, još uvek određivanje njihovih koncentracija u različitim telesnim tečnostima predstavlja veliki izazov, posebno u postmortalnim istraživanjima. Pored inter-individualnih razlika u njihovoj aktivnosti i vrednostima u različitim delovima moždanog tkiva, gde imaju ulogu NT, i perifernim organima gde imaju ulogu hormona, njihove vrednosti zavise od brojnih drugih fizioloških faktora, kao što su uzrast, pol, težina, visina ispitanika ili cirkadijalni ritam sekrecije, režim ishrane, fizička aktivnost/bolest, itd. Na postmortalne vrednosti uticaja imaju još i dužina perioda agonije [46], uslovi koji se tiču načina i vremena uzorkovanja, čuvanja uzoraka i konačno analitičke procedure kojom se određuju njihove koncentracije.

Kroz primer 5-HT (koji je i najviše izučavani NT u literaturi), najbolje se vidi uticaj raznih egzogenih i endogenih faktora na ritam sekrecije i njegove koncentracije: Musshoff i saradnici u tom smislu navode kao faktore od uticaja i dužinu perioda agonije, manipulaciju lešom, prethodnu medikamentnu terapiju, tehniku postmortalnog uzorkovanja, količinu uzorka CST, sezonski/dnevni ritam sekrecije, hemijsku stabilnost/način čuvanja, analitičku metodu [49]. U ovom smislu, Kauert [46] dodaje da se koncentracije 5-HT i drugih monoamina postmortalno menjaju moguće i zbog produžene enzimske aktivnosti, a isti autori kao primer navode i diurnalni ritam sekrecije 5-HT utvrđen na rezus majmunima, koji je pokazao povišene vrednosti u CST sa početkom mračnog doba dana i vraćanje na osnovne vrednosti sa svetlim periodom dana, ali i različite amplitude u vrednostima u jedne te iste jedinice [46]. I konzumiranje hrane bogate serotoninom (orasi, banane, ananas) dovodi do značajnog porasta koncentracije metabolita serotonina u urinu, a mogu i uticati na njegovu količinu i u plazmi. Na vrednosti 5-HT može imati uticaja i njegovo vezivanje za plastičnu i staklenu ambalažu nakon ekstrakcije iz biološkog materijala (CST, urina, trombocita, plazme). Kao jedan od glavnih problema u određivanju 5-HT u derivatima krvi, koji sadrže ekstremno niske vrednosti 5-HT je i uvek moguća kontaminacija uzoraka serotoninom sadržanim u trombocitima, koja značajno menja rezultate. U analitici, triptofan može da interferira sa 5-HT u detekciji hromatografskim metodama [60].

I sekundarni poremećaji monoaminskih sistema se mogu javiti u sklopu različitih metaboličkih poremećaja: posthipoksijskim stanjima, epilepsiji, febrilnim konvulzijama, oboljenjima jetre, virusnim infekcijama, poremećajima metabolizma

folata, kao u brojnim neurološkim stanjima gde su nejasne etiologije [61] i tako uticati na izmerene koncentracije.

Zbog svega navedenog, jasno je zašto u literaturi još uvek ne postoje referentne postmortalne vrednosti za ove neurotransmitere, a tumačenja dobijenih rezultata u postmortalnim uzorcima telesnih tečnosti se uglavnom oslanjaju na njihove kliničke referentne vrednosti, od kojih su, gotovo po pravilu, daleko viši. Tako kliničke referentne vrednosti za 5-HT u CST iznose $< 1\text{ ng/ml}$ [46,50,62], a kliničke serumske referentne vrednosti za monoamine iznose: za AD $< 0.1\text{ ng/ml}$; za NA $0.1 - 0.45\text{ ng/ml}$; za DA $< 0.02\text{ ng/ml}$ [55] i za 5-HT $< 230\text{ ng/ml}$ [50].

Uloga ACh u odgovoru na stresne i bolne stimuluse [29], kao i njegova direktna uloga u pokretanju sekrecije KH iz srži nadbubrežne žlezde (koja ovde ima ulogu postsinaptičkog parasimpatičkog gangliona i pod direktnim je uticajem ACh), kao i njegova poznata interakcija sa NA u odgovoru na bolne stimuluse [21], bila je osnov za našu hipotezu da bi i ACh uz monoamine mogao biti koristan marker u evaluaciji neuronskog odgovora na stres neposredno pred smrt.

Neuspeh u detekciji ACh u uzorcima likvora u ovoj studiji se može pripisati veoma niskim koncentracijama u postmortalnim uzorcima, koje su bile ispod limita detekcije naše analitičke procedure, tačne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom, koja i jeste metoda izbora za hidrofилna jedinjenja male molekulske težine, kakav je i ACh [63]. Veoma niske postmortalne koncentracije ACh mogu se objasniti mehanizmom razgradnje ovog NT, koji se razlikuje od razgradnje monoamina, koji dejstvu monoaminooksidaze podležu tek nakon ponovnog preuzimanja u presinaptički neuron. Naime, ACh se nakon dejstva na postsinaptičkom neuronu vezuje za acetilholinesterazu koja se nalazi na presinaptičkoj membrani i aktivna je unutar same sinaptičke pukotine. Zbog mesta dejstva, i kao jako potentan enzim (molekul enzima razgrađuje oko 10 000 molekula ACh svake sekunde) [27], acetilholinesteraza verovatno ne dopušta „curenje“ molekula ACh u ekstraćelijsku tečnost i dalje u CST, u značajnoj meri, kako to biva sa većinom drugih NT, što je bila i opservacija u davnoj studiji Duvoisina i saradnika [64] koji čak nisu bili sigurni da je ACh u CST uopšte neuronskog porekla! Druga karakteristika ovog enzima, demonstrirana u studiji Schneidera i saradnika [65], je njegovo produženo dejstvo u postmortalnom periodu, gde je pokazano da je AChE aktivna još 12 h nakon smrti eksperimentalnih životinja, a

da se nakon toga, u periodu do 30 h njena aktivnost gasi. Drugačija je situacija sa određivanjem ACh u *in vivo* uslovima, gde se u uzorcima telesnih tečnosti obezbeđuje inhibicija ovog enzima, što je u uslovima postmortalnog uzorkovanja praktično nemoguće.

Slično monoaminima, u dostupnoj literaturi nismo naišli na kliničke referentne vrednosti za ACh u likvoru, kao ni vrednosti u postmortalnim uzorcima. Vrednosti ACh na kontrolnom uzorku CST živih pacijenata iznosile su oko 6.14 pmol/ml [66] dok su Jia i saradnici [67], metodom tačne hromatografije sa elektrohemijom na kontrolnom uzorku CST zdravih pacijenata izmerili prosečnu vrednost ACh u CST od oko 34.5 nmol/L odnosno oko 5,04 ng/ml). U metodi Wong i saradnika [57], dobijene vrednosti u humanoj CST su iznosile oko 179 pg/ml.

Dobijene vrednosti 5-HT u CST su bile u opsegu 0.08 – 7.36 ng/ml, a srednje vrednosti su u lumbalnom odeljku lako premašivale "centralne" vrednosti, dok su vrednosti u perifernom serumu bile u opsegu 3.42 – 143.57 ng/ml, bez značajnih statističkih korelacija.

Vrednosti DA u CST su bile u opsegu 0.05 – 112.84 ng/ml, a srednje vrednosti u centralnoj CST su bile više u odnosu na lumbalne, dok je između njih ustanovljena i značajna pozitivna korelacija. Serumske vrednosti su se kretale u opsegu od 0.6 – 168.83 ng/ml. Između serumskih vrednosti u kardijalnom i perifernom serumu, kao i između vrednosti u perifernom serumu i likvoru nije ustanovljena nikakva povezanost.

Vrednosti NA u CST bile su u opsegu 0.16 – 10.82 ng/ml, u centralnoj CST evidentno više nego u lumbalnom odeljku, ali bez statistički značajne povezanosti. Serumske vrednosti NA su se kretale u opsegu 1.07 – 856.84 ng/ml, srednje vrednosti su bile više u kardijalnom serumu, ali bez statistički značajne povezanosti. Ni vrednosti između likvora i seruma nisu pokazale značajnu korelaciju.

Vrednosti AD u CST su se kretale u opsegu 0.03 – 141.38 ng/ml i između ova dva odeljka pokazale pozitivnu korelaciju, dok između dva odeljka seruma povezanost nije ustanovljena. Serumske vrednosti su se kretale u opsegu 46.55 – 634.13 ng/ml. Samo je u slučaju AD dobijena srednje jaka korelacija između vrednosti AD u centralnoj CST i perifernom serumu, koja se ne može objasniti drugačije no varijacijama u vrednostima

Sve izmerene serumske vrednosti za kateholamine su bile daleko više od kliničkih referentnih intervala vrednosti, dok su serumske vrednosti 5-HT bile unutar referentnog intervala. Njegove centralne vrednosti su znatno premašivale referentnu vrednost. Svi su rezultati pokazali veoma velike varijacije, što se može objasniti magnitudom stresa i akutnom neuronalnom disfunkcijom tokom perioda agonije [6].

Monoamini kao hidrofilne supstance ne prolaze lipofilnu krvnomoždanu barijeru u konačnom obliku, za razliku od njihovih prekursora i metabolita. Dakle, 5-HT, DA, NA i AD u cerebrospinalnoj tečnosti uglavnom potiču iz moždanog tkiva, dok oni serumski KH potiču iz simpatičkih nervnih vlakana, srži nadbubrežne žlezde i visceralnih organa, a 5-HT iz trombocita iz kojih se oslobađa tokom procesa koagulacije [22,23]. Centralna i periferna, dve međusobno nezavisne sinteze monoamina, mogu objasniti nedostatak pozitivne korelacije između vrednosti 5-HT, DA i NA u likvoru i serumu u našim rezultatima. Štaviše, to takođe znači da serumske vrednosti monoamina nisu dobar marker njihove “centralne” aktivnosti.

Centralni i lumbalni odeljak CST predstavljaju delove jedinstvenog likvorskog sistema, koji cirkuliše rostrokaudalnim smerom, kroz moždane komore i moždani i kičmeni subarahnoidalni prostor [39,41]. Zbog toga je lumbalni pristup uzorkovanju CST, kao manje invazivan, u kliničkoj praksi metod izbora u dijagnostici različitih patoloških stanja vezanih za moždanu funkciju, koja mogu biti utvrđena biohemijskim analizama [45]. No, zbog postojanja rostrokaudalnog gradijenta u koncentracijama različitih NT, lumbalni pristup u postmortalnim istraživanjima moždane funkcije ne bi trebalo da bude isključivo pravilo (posebno iz razloga što se uzorci “centralnog” likvora mogu uzeti tokom standardne obdukcione procedure). Dva autora [46,49] su prethodno opisivala statistički značajno više vrednosti 5-HT u centralnoj u odnosu na lumbalnu CST. Rezultati naše studije nisu pokazali statistički značajnu razliku ni korelaciju u ovom smislu, štaviše, u našoj studiji su vrednosti 5-HT u lumbalnoj CST bile za nijansu više od onih centralnih. Ekscitacija 5-HT neurona duž kičmene moždine i njegovo oslobađanje, gde 5-HT ima ulogu u kontroli transmisije bolnih senzacija [23,25,68], može objasniti naše rezultate. Kako i 5-HT i NA imaju neurone u kičmenoj moždini, lumbarna CST može samo delimično odražavati aktivnost moždanih serotoninskih i noradrenalinskih neurona [68]. Na dalje, ovako dobijene razlike u vrednostima između ova dva mesta uzorkovanja, mogu biti u vezi sa različitim karakteristikama procesa postmortalne degradacije i/ili difuzije iz okolnog tkiva između ove dva anatomska odeljka, koja se svakako dešava u procesu postmortalne dekompozicije. Na vrednosti

monoamina u ova dva odeljka može imati uticaja i položaj leša tokom transporta, kada može doći do mešanja i izjednačavanja koncentracija [46].

U literaturi se ne ističu rezultati o statistički značajnim razlikama u vrednostima 5-HT, DA i NA u cerebrospinalnoj tečnosti u odnosu na pol ispitanika [5,49,50] kao ni vrednosti KH (DA, NA i AD) u serumu [6], što je za vrednosti 5-HT i NA u CST, kao i svih kateholamina u serumu potvrđeno i našim rezultatima ($p > 0.05$). Međutim, naši rezultati su pokazali više vrednosti DA u ispitanika ženskog pola u CST i to sa statističkom značajnošću ($p < 0.05$), za šta u literaturi, pored velikih varijacija u vrednostima, nismo našli druga objašnjenja, a što bi zahtevalo dalju analizu.

U uzorcima CST i seruma su ispitivani monoamini generalno pokazali tendenciju opadanja koncentracija sa starošću ispitanika. Tako su vrednosti 5-HT u centralnoj CST pokazale visoko statistički značajne razlike u odnosu na starosne grupe ($p = 0,001$), kao i statistički značajnu negativnu korelaciju između 5-HT i uzrasnih grupa ($p < 0.05$). Opadanje vrednosti koncentracija 5-HT u našoj studiji, potvrđuje redukovanu serotonergičku moždanu aktivnost u sklopu involutivnih procesa tokom starenja. Ovakvu značajnu negativnu tendenciju srećemo i u literaturi [6], međutim, postoje studije u kojima rezultati nisu dali značajne razlike u odnosu na životnu dob [49]. Jasna tendencija opadanja vrednosti u odnosu na starosne grupe uočljiva je i u koncentracijama DA i NA u likvoru, ali bez statističkih značajnosti ($p > 0.05$).

Serumske vrednosti kateholamina pokazale su sličnu tendenciju: koncentracije svih KH su vidno opadale sa starošću ispitanika, ali su samo koncentracije DA i NA pokazale statistički značajnu negativnu povezanost sa uzrasnim grupama ($p < 0.05$), dok za promenu vrednosti AD statistička značajnost nije utvrđena ($p > 0.05$). Zhu i saradnici su zabeležili značajnu negativnu korelaciju između vrednosti AD i DA u serumu i životne dobi ispitanika [6]. I druge su studije [5] pokazale iste rezultate. Tendencija ka opadanju vrednosti KH u serumu ukazuje na redukovani simpatičko/adrenomedularni odgovor kod osoba starije životne dobi.

Postmortalni interval u kojem smo ispitivali promenu vrednosti monoamina u ovoj tezi, nije bio duži od 72h, i smatrali smo ga ranim postmortalnim intervalom u kojem još uvek nisu nastale vidljive postmortalne promene. Pa ipak, vrednosti ispitivanih analita su vidno rasle sa dužinom intervala. Likvorske vrednosti NA su pokazale statistički značajne razlike i značajnu pozitivnu korelaciju ($p < 0.05$) između koncentracija i dužine postmortalnog intervala, kakav je rezultat dobijen i u studiji Ishikawe i saradnika [5]. Ostali analiti, 5-HT i DA u likvoru, iako uz vidni porast vrednosti, nisu pokazali statistički značajne razlike u odnosu na vremenske intervale, ni značajnu korelaciju ($p > 0.05$). U još nekoliko studija [50] su zabeleženi isti rezultati, uz statistički značajne razlike. Kauert i saradnici [46] nisu našli statistički značajne korelacije između postmortalnog intervala i koncentracija monoamina u CST.

I serumske vrednosti DA i NA su rasle sa dužinom postmortalnog intervala. U skladu sa našima su i rezultati Zhu-a i saradnika [6], koji su pokazali da vrednosti KH u serumu daju izvesnu pozitivnu korelaciju u odnosu na dužinu postmortalnog intervala. U našoj studiji, jedino su serumske vrednosti AD, suprotno vrednostima ostalih monoamina, opadale, no testovi nisu utvrdili bilo kakve nivoe statističke značajnosti ($p > 0.05$). Dakle, šta se zaista dešava sa monoaminima u ovim telesnim tečnostima kroz postmortalni interval, nije potpuno jasno. Porast njihovih vrednosti može biti u vezi sa degradacijom i/ili difuzijom iz okoline i u najranijem postmortalnom periodu ili produženom aktivnošću nekih enzima [46]; vrednosti evidentno rastu i zbog postmortalne difuzije iz simpatičkih nervnih završetaka u srcu i velikim krvnim sudovima, zbog difuzije NA iz simpatičkih nervnih završetaka i AD iz same srži nadbubrega (eksperimentalno je utvrđeno da se AD ne može kvantifikovati u krvi životinja koje su prethodno podvrgnute adrenektomiji) [47].

Inicijalno postavljene kriterijumi za odabir slučajeva koji su ušli u uzorak, su podrazumevali smrt “na licu mesta”, bez pokušaja reanimacije. Zbog toga je tzv. “agonalni period”, odnosno vremenski period od povređivanja/pojave simptoma oboljenja do momenta smrti, bio relativno kratak. U skladu sa ovim i uz podatke o okolnostima slučajeva, uzorak je za potrebe analiziranja promena u koncentracijama monoamina kroz agonalni period bio podeljen na dve grupe: ispitanike sa veoma kratkim agonalnim periodom (do nekoliko minuta) i ispitanike sa “dužim” agonalnim

periodom, od nekoliko minuta do nekoliko sati. Poznato je da su za inicijalni odgovor na stres odgovorni upravo monoaminski neurotransmiteri i da ekscitacija njihovih neurona počinje u opsegu od nekoliko sekundi, kao i da za njim primetno, sat ili dva nakon izlaganja stresu, nastupa i drugi talas odgovora koji ima za cilj inhibiciju dugotrajnog dejstva ove inicijalne reakcije, kojem je cilj ponovno uspostavljanje alostaze [30,69]. Zbog toga je očekivano da vrednosti monoamina rastu sa dužinom postmortalnog intervala. To je i opservacija Kauerta i saradnika. Međutim, vrednosti dobijene u ovoj sudiji nisu pokazale statistički značajne razlike u vrednostima monoamina u odnosu na kratak i produžen period agonije: centralne vrednosti 5-HT su bile veoma slične ($p > 0.05$), dok su za DA i NA bile nešto više u kratkom agonalom intervalu, ali bez statistički značajnih razlika ($p > 0.05$); serumske vrednosti DA, NA i AD su redom bile više u kratkom intervalu, takođe bez statističke značajnosti ($p > 0.05$) u razlikama. Dobijeni rezultati su u skladu sa drugim studijama [48] koje su pretpostavile da vrednosti KH treba da rastu sa dužinom agonalnog intervala, a prikazale upravo suprotne rezultate (vrednosti AD i NA u cerebrospinalnoj tečnosti i serumu su bile više u grupi sa veoma kratkim agonalnim intervalom), ali bez statističke značajnosti. Wilke i saradnici [48] su ovo pripisali velikim preklapanjima i rasponu vrednosti u obe grupe. Ni studija Ishikawa-e i saradnika, na vrednostima kateholamina u CST nije pokazala statistički značajan odnos vrednosti KH i perioda agonije [5], kao ni studija koju su sprovedli Quan i saradnici na CST vrednostima serotonina [50]. Bez obzira na promptnost monoaminskog stresnog odgovora, treba imati na umu da koncentracije NT u cerebrospinalnoj tečnosti predstavljaju njihove prosečne vrednosti iz svih regiona moždanog tkiva u trenutku uzorkovanja CST, te ne mogu pružiti informacije o funkciji pojedinačnih neuronskih grupa, ali ovo svakako ne može biti objašnjenje za tek minimalne i statistički beznačajne razlike u serumskim vrednostima kateholamina.

Utvrđivanje porekla smrti je jedan od osnovnih ciljeva sudskomedicinske ekspertize. U najvećem broju slučajeva, u rutinskom radu, rezultati obdukcije su sami po sebi dovoljni za opredeljivanje da li je smrt prirodna ili nasilna prema poreklu. Međutim, ponekad, u definisanju da li je smrt prirodna ili nasilna, a posebno da li je prema poreklu zadesna, ubilačka ili samoubilačka, u odsustvu konkretnog morfološkog nalaza, kao i informacija o okolnostima slučaja koje su često aproksimativne ili

subjektivne, zasnovane na iskustvenoj proceni i najčešće nepotpune u trenutku koji zahteva definisanje porekla smrti, pored nalaza obdukcije i drugih dopunskih konvencionalnih dijagnostičkih metoda (patohistoloških, toksikoloških, mikroskopskih), postmortalana biohemijska istraživanja zauzimaju značajno mesto. U ovom smislu, naša analiza postmortalnih vrednosti monoamina kao parametara koji odražavaju odgovor organizma na stres, dala je značajne rezultate. Dobijene vrednosti 5-HT u odnosu na poreklo smrti (prirodna/nasilna smrt) su pokazale značajne razlike: vrednosti su bile evidentno više u grupi ispitanika umrlih nasilnom smrću i to sa statističkom značajnošću ($p < 0.05$). U ovom cilju, utvrđena je granična vrednost koja diferencira prirodne od nasilnih smrti i iznosila je 3.23 ng/ml 5-HT (senzitivnost 46%, specifičnost 87.1%), iznad koje su dobijene vrednosti označavale nasilnu smrt. I vrednosti DA izmerene u CST su pokazale statistički značajnu razliku ($p < 0.05$) između prirodnih i nasilnih smrti, a granična vrednost je iznosila 0,24 ng/ml DA (senzitivnost 91,4 %, specifičnost 41,9 %). Vrednosti NA u CST nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu na poreklo smrti, iako su srednje vrednosti koncentracija u grupi nasilnih smrti i za NA bile više. No daljom analizom koncentracija ova tri monoamina u CST, nisu ustanovljene značajne razlike u podgrupama nasilne smrti: ovde su jedino vrednosti 5-HT evidentno bile niže u grupi samoubilačkih smrti. No, pitanje je da li su vrednosti u samoubilačkim smrtima same po sebi iz nekog razloga niže ili su u vezi sa postojećim, ali ne i prepoznatim i diganostikovanim depresivnim oboljenjem i depresivnim ponašanjem, što dovodi u pitanje pouzdanost dobijenih podataka. U literaturi postoje brojni podaci u odnosu na ove varijable: značajno niže vrednosti 5-HT u CST u suicidima opisuju Musshoff i saradnici [49], mada njihovi rezultati nisu pokazali moguću graničnu vrednost 5-HT u CST koja bi mogla napraviti razliku između suicidalnih i nesuicidalnih incidenata. Generalno niže vrednosti 5-HT u samoubilačkim smrtima, ali mereno u određenim regionima moždang tkiva, ne i u CST, prikazuju i Ohmori i saradnici [66]. Naši rezultati korespondiraju sa rezultatima drugih studija koje nisu pokazale značajne razlike u vrednostima 5-HT u odnosu na podgrupe nasilne smrti [46,50], kao ni u vrednostima drugih monoamina [46]. U literaturi je manje dostupnih podataka o razlikama koncentracija NA i DA kod žrtava suicida, jer su ova dva NT uopšte manje izučavana u ovom smislu od serotoninergičkog sistema. Iako su poznate interakcije NA i 5-HT sistema, prema Arranz-u i saradnicima, vrednosti NA se ne menjaju značajno u suicidima [26]. Isti autori, u odnosu na sintezu, deponovanje i katabolizam DA, nisu identifikovali konzistentne abnormalnosti kod depresivnih

pacijenata. Različiti faktori mogu objasniti ovako nekonzistentne nalaze: koncentracije NT u likvoru zavise od fizičke aktivnosti, stresa, sezonskih oscilacija u lučenju, uzrastu, telesne težine ispitanika, kao i od postmortalnog intervala u kojem se uzimaju uzorci za određivanje koncentracija, ispitivanog regiona mozga, upotrebe lekova pre smrti i uzroka smrti [26]. Ovi autori nisu našli dokaze o značajnoj promeni dopaminske funkcije kod žrtava suicida, iako DA dovode u vezu sa psihomotornim funkcijama, intenzivnijim metabolizmom DA u akutnom stresu i mnogo nasilnijim oblicima samoubistva. Vrednosti DA, NA i AD u serumu, iako evidentno više u grupi nasilnih smrti, nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu na prirodnu smrt ($p > 0.05$). Interesovanje podstiču povišene (ne i statistički značajno, $p > 0.05$) serumske vrednosti dopamina i noradrenalina u grupi ubilačkih smrti.

Poseban akcenat ove studije bio je na hipotezi da se koncentracije ispitivanih NT značajno menjaju kroz posebno dramatičan scenario okolnosti umiranja, odnosno da magnituda straha i drugih neprijatnih emocija na karakterističan način utiče i na koncentracije ispitivanih neurotransmitera u CST. Poznato je da je amigdaloidni kompleks označen kao “master switch of fear” i da, između ostalog, ima ulogu i u aktivaciji monoaminskog sistema u odgovoru na psihički stres [34]. U težnji da dovedemo u vezu vrednosti monoamina sa dramatičnošću događaja koji su prethodili smrti, podelili smo ispitanike u dve grupe: one koji su, na osnovu vrste, rasporeda i drugih karakteristika povreda, utvrđenih obdukcijom i podataka o okolnostima slučaja, mogli imati vizuelni kontakt, te bili i svesni predstojećeg letalnog ishoda i one koji to nisu. No rezultati u ovom smislu nisu pokazali statistički značajne razlike: vrednosti 5-HT, DA i NA u cerebrospinalnoj tečnosti nisu pokazale statistički značajne razlike ($p > 0.05$), a i njihove srednje vrednosti su pokazale tek minimalne razlike između grupa. Slični rezultati su dobijeni i za koncentracije KH u serumu, bez statističkih značajnosti. Stoga, možemo priznati da je ideja, u ovom momentu bila van mogućnosti ove studije, ali može biti podsticaj za neke buduće.

Iako se sa sudskomedicinskog aspekta mogu napraviti jasne razlike u mehanizmu umiranja kroz različite uzroke smrti, naša studija na monoaminima nije dala nikakve statistički značajne rezultate u ovom smislu. Vrednosti 5-HT su bile najviše u trovanju CO, slično i u smrtima nastalim dejstvom šiljka i oštrice, dok su niže bile kod vešanja i u srčanim smrtima, a najniže izmerene u hipotermiji. Vrednosti DA su u CST bile daleko najviše kod trovanja ugljenmonoksidom, a najniže u smrtima nastalim dejstvom šiljka i oštrice i tupine mehaničkog oruđa; vrednosti u slučajevima hipotermije su bile veoma bliske onima u srčanim smrtima. Koncentracije NA su u CST bile najniže izmerene u hipotermiji, a najviše kod ustrelina i u trovanjima CO. Serumske vrednosti KH pokazale su sledeće rezultate: koncentracije DA su bile najviše u smrtima usled ubodina i u trovanju CO, a najniže u ustrelinama i srčanim smrtima. Vrednosti NA su bile najviše u ubodinama, nešto više kod mehaničkih asfiksija, a najniže kod ustrelina. U slučajevima hipotermije, vrednosti su bile jako bliske onima u srčanim smrtima. Vrednosti AD su bile najviše u ubodinama, trovanju CO, ali i u hipotermiji. Uprkos velikim varijacijama u vrednostima, posmatrajući srednje vrednosti dobijenih koncentracija, među njima se uočavaju izvesne pravilnosti: u uzorcima CST, vrednosti 5-HT i DA su bile najviše u trovanju ugljenmonoksidom, (za šta su i vrednosti NA bile među najvišim), dok su za 5-HT i NA bile najniže u hipotermiji. Vrednosti kateholamina u serumu pokazuju veoma visoke vrednosti u ubodinama, a niske u dejstvu tupine mehaničkog oruđa i u ustrelinama. Za razliku od naših rezultata, neke prethodne studije, sprovedene na mnogo većem uzorku [49,50,60], pokazale su jasne statistički značajne rezultate u pogledu različitih uzroka smrti. Tako su rezultati studije koju su sprovedeli Quan i saradnici [50] pokazali značajno niže vrednosti u hipotermiji, dok su u grupama drugih uzroka smrti koncentracije pokazivale srednje vrednost – tu se ubrajaju i prirodne smrti kardijalnog porekla.

Trovanje CO je pokazalo izvesnu pravilnost u našim rezultatima. Arranz i saradnici su slično dobijene rezultate objasnili time da akutna hipoksija ove vrste veoma brzo i intenzivno utiče na hidrosilaciju aminokiselina tirozina i triptofana, prekursora u sintezi 5-HT i KH, što može biti objašnjenje za povišene vrednosti sva tri monoamina (5-HT, DA i NA) u likvoru [26], ali KH u većem, a 5-HT u nešto manjem obimu. Suprotno, Pare i saradnici [67] su ustanovili niže koncentracije 5-HT u moždanom stablu žrtava trovanja CO u odnosu na umrle usled srčane smrti, što može značiti da akutna hipoksija *per se* doprinosi ovim promenama.

Hipotermija Hirvonen i saradnici su našli značajno povišene vrednosti NA i AD u urinu i njihovih metabolita u CST, te predložili da KH mogu biti forenzički korisni indikatori smrti usled hipotermije [68]. Oni su istakli da u hipotermiji, stresom izazvana hiperglikemija, dovodi do oslobađanja insulina, koji zauzvrat, aktivacijom insulinskih receptora stimuliše izmenu (*turnover*, engl.) monoamina u CNS [33], što bi mogla biti osnova za dalja istraživanja korelacije vrednosti glukoze i/ili insulina i ovih promena u moždanoj aktivnosti monoamina u uslovima hipotermije. Oni su pokazali i da progresivno snižavanje telesne temperature dovodi do postepene relaksacije mišića i na kraju gubitak odgovarajućih mišićnih refleksa kada rektalna temperature eksperimentalnih životinja dostigne oko 28°C. Oni su pokazali i značajno opadanje vrednosti NA u mezencefalonu, produženoj moždini i moždanoj kori tokom hipotermije, ali i brzi oporavak nakon utopljanja. U njihovoj studiji hipotermija nije izazvala značajne promene moždanog sadržaja DA u ispitivanim delovima mozga, ali je pokazala porast vrednosti njegovih metabolite DOPAC i HVA. Njihovi su rezultati pokazali i iznačajno opadanje vrednosti 5-HT u mezencefalonu, produženoj moždini i malom mozgu [33]. Zhu i saradnici su dokazali da su serumske vrednosti AD, NA i DA najniže u slučajevima hipotermije, iako su i one bile više od kliničkih referentnih vrednosti [6]. Uopšte, ovo manje ukazuje na poremećaj kardiovaskularne funkcije, a više na poremećaj na nivou simpatičkih nervnih završetaka tokom agonije u uslovima hipotermije. Biliakov je poredjenjem AD i NA vrednosti u likvoru žrtava vešanja i srčanih smrti ukazao da su vrednosti oba KH bile više kod vešanika, te predložio da se ovaj porast koncentracija u likvoru može koristiti kao indikator umiranja usled asfiksija [69]. Uopšteno, druge studije su generalno pokazale da različite vrednosti 5-HT pre korespondiraju sa različitim uzrocima smrti nego sa različitim poreklom smrti [50]. U našoj studiji nisu ustanovljene statistički značajne razlike u vrednostima adrenalina i noradrenalina između različitih uzroka smrti u serumu i likvoru, kakve nisu ustanovili ni Wilke i saradnici [48]. Vrednosti AD u perifernom serumu su u studiji Zhu-a i saradnika [6] bile statistički značajno više u slučajevima asfiksije, utopljenju i naprasnoj srčanoj smrti, dok su niže vrednosti zabeležene u mehaničkim povredama i hipotermiji. Njihove vrednosti za NA u perifernom serumu su bile statistički značajno više u asfiksijama, dok su niže bile u hipotermiji, a vrednosti DA nisu pokazivale značajne razlike [6]. Hipoksija, kao jedno od glavnih, po život opasnih, stanja, dovodi do trenutne, veoma jake reakcije organizma, koja uključuje i oslobađanje noradrenalina i dopamina iz nadbubrega u krv. Ovaj skok njihovih vrednosti može biti vitalna reakcija u dijagnozi

sufokacije, što se teško može dokazati standardnim metodama kada nema vidljivih spoljašnjih znakova povređivanja, ali postavljanje KH kao markera asfiktivne smrti, kao i bilo koje druge uostalom, je veoma diskutabilno, jer agonalne promene u njihovim vrednostima mogu biti maskirane postmortalnim promenama [47]. Ni drugi autori, kao ni mi, nisu našli nikakve posebnosti u vrednostima KH u odnosu na naprasnu srčanu smrt [6]. Ishikawa i saradnici su istakli da su, u odnosu na uzrok smrti, vrednosti AD i NA u CST, bile generalno više u mehaničkim povredama, intoksikaciji i utopljenju i naprasnoj srčanoj smrti, što ukazuje na intenzivnu aktivaciju ili disfunkciju simpatičko/adrenomedularnog sistema dok su bile niže u hipotermiji, što odražava slabiju aktivnost ovog sistema u slučajevima hipotermije; vrednosti NA u CST su bile više u mehaničkim povredama, a niže u utopljenju i hipotermiji [5]. Upečatljivo visoke vrednosti su ovi autori ustanovili i kod trovanja CO, kao i vrednosti DA [5].

Iako je napredak u tanatohemiji evidentan, naročito u poslednjih 20 godina, postoji odsustvo korespondencije između literature i praktične upotrebe rezultata ovih analiza u rutinskoj sudskomedicinskoj praksi, što dovodi u pitanje stvarni značaj procesa istraživanja i njegovu praktičnu korist. Razlozi za to mogu biti veoma različiti: od nedostatka poverenja u naučnu literaturu u vezi sa ovim aspektom, sve do ignorisanja niza mogućnosti koje nude biohemijske analize na leševima. Jedan od osnovnih razloga zbog kojih se rezultati tanatohemijskih analiza ne uvode u svakodnevnu sudskomedicinsku praksu je interpretacija dobijenih rezultata, koja ne može biti pravilna u odsustvu studija na dovoljno velikom broju uzoraka kako bi se utvrdili referentni rangovi „normalnih“ vrednosti ispitivanih analita, što je veoma veliki problem [2]. Ali, dovoljno veliki uzorak i pravilan odabir ispitanika je samo jedan od parametara koji bi morali biti uzeti u obzir. Na to se nadovezuju i potreba za jedinstvenim načinom uzimanja uzoraka, jedinstvena mera čuvanja, priprema uzoraka, analitička metoda, neophodnost utvrđivanja rangova normalnih vrednosti i u skladu sa njima interpretacija dobijenih rezultata kako bi se svi konačno integrisali u jedan model.

Velike razlike u dobijenim rezultatima u navođenim studijama potvrđuju činjenicu da vrednosti monoamina, pokazuju veoma velike individualne varijacije. One zahtevaju brojniji uzorak, kako bi na njega mogli biti primenjeni odgovarajući statistički testovi. Ali vrednosti ispitivanih analita u velikoj meri zavise i od metodologije

uzorkovanja i analiziranja, te odabira uzorka u skladu sa postavljenim kriterijumima za njihovo uključanje i isključenje iz studije. No, kako je ova studija sprovedena na obdukcionom materijalu koji pokriva područje ne veće od dvomilionskog i u periodu od oko tri godine i uz sve prethodno navedeno, uzorak nije mogao biti veći. Ali veći uzorak, uz već primećenu tendenciju razlikovanja vrednosti ispitivanih analita prema pojedinim grupama i uzrocima smrti, svakako bi dao rezultate sa većom statističkom značajnošću.

Uprkos velikoj varijabilnosti, rezultati pokazuju izvesnu pravilnost u pogledu pojedinih ispitivanih parametara: pre svega u odnosu na poreklo i uzrok smrti. Hipoteza da vrednosti monoamina pokazuju izvesnu pravilnost u pogledu porekla i uzroka smrti se pokazala tačnom: vrednosti monoamina su pokazale više vrednosti u nasilnim smrtima u odnosu na prirodne – a za dva monoamina, serotonin i dopamin u cerebrospinalnoj tečnosti, i sa statističkom značajnošću. Takođe, vrednosti su dale i izvesnu pravilnost u odnosu na pojedine uzroke smrti.

Iako se monoamini, kao hemijski nosioci odgovora organizma na stres, proglašavaju biomarkerima stresnog odgovora, diskutabilno je da li ustanovljene razlike u njihovom odgovoru treba posmatrati kroz pretpostavljeni psihički ili fizički stres ili pre sa aspekta patofizioloških promena u sklopu disfunkcije CNS i drugih organa u mehanizmu umiranja u različitim uzrocima smrti. Na primer: serumske vrednosti KH su svejedno bile povišene u slučajevima koji su uključivali brzi gubitak svesti (npr. kod vešanja), a relativno niže vrednosti u likvoru u utopljenjima koje prate ekstremna fizička reakcija i ekstremno negativan psihički doživljaj.

Praktična upotreba određivanja njihovih vrednosti, uprkos velikim interindividualnim karakteristikama, bila bi, uz kompletnu autopsijsku dijagnostiku, korisna u evaluaciji uzroka i porekla smrti u slučajevima kada su morfološke karakteristike često minimalne ili čak odsutne, kakav je slučaj kod mehaničkih asfiksija, intoksikacija ili hipotermije, kao i u evaluaciji magnitude psihičkog i fizičkog odgovora tokom procesa umiranja.

U širem kontekstu, magnituda stresa o kojoj bi se moglo govoriti na osnovu dobijenih vrednosti analita u vezi sa poreklom i uzrokom smrti, mogla bi, uz kompletnu autopsijsku dijagnostiku i okolnosti pod kojima smrt nastaje, imati i implikacije u sudskomedicinskoj ekspertizi krivičnih dela, u situacijama “gledanja smrti u oči”,

nemogućnosti spašavanja, brutalnosti i svireposti krivičnih dela, što bi imalo koristi i u krivičnompravnom sistemu.

6. ZAKLJUČCI

1. Vrednosti serotonina, dopamina i noradrenalina u cerebrospinalnoj tečnosti i kateholamina u serumu pokazuju prvilnost u odnosu na poreklo smrti: svi su ispitivani monoamini imali više vrednosti u grupi nasilnih smrti, dok je za razlike u vrednostima serotonina i dopamina, između grupa porekla smrti, utvrđena i statistička značajnost.
2. Vrednosti monoamina u cerebrospinalnoj tečnosti i serumu su pokazale pravilnost u odnosu na uzroke smrti, posebno u trovanju ugljen-monoksidom i hipotermiji.
3. Za serotonin i dopamin određene su granične vrednosti u cerebrospinalnoj tečnosti iznad kojih koncentracije ukazuju na nasilnu smrt.
4. Odsustvo korelacije između vrednosti monoamina u postmortalnim uzorcima cerebrospinalne tečnosti i seruma ukazuje na njihovu nezavisnu aktivnost kao neurotransmitera u centralnom nervnom sistemu i hormona na periferiji.
5. Određivanje vrednosti monoamina u cerebrospinalnoj tečnosti i serumu, uz kompletnu autopsijsku dijagnostiku, može biti korisno u evaluaciji uzroka i porekla smrti u odsustvu morfoloških karakteristika, kakav je čest slučaj kod mehaničkih asfiksija, intoksikacija ili hipotermije.
6. Tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom, uz optimizovane uslove metode i pripreme uzoraka koji su postavljeni u ovoj studiji, preporuka su za određivanje monoamina u postmortalnim uzorcima cerebrospinalne tečnosti i seruma.

7. LITERATURA

1. Di Maio VJ, Di Maio D. Forensic Pathology. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2001.
.
2. Luna A. Is postmortem biochemistry really useful? Why is it not widely used in forensic pathology? *Legal Med.* 2009; 11: 527-30.
3. Maeda H, Zhu B, Ishikawa T, Michiue T. Forensic molecular pathology of violent deaths. *Forensic Sci Int.* 2010; 203: 83-92.
4. Maeda H, Ishikawa T, Michiue T. Forensic biochemistry for functional investigation of death: concept and practical application. *Legal Med* 2011; 13: 55-67.
5. Ishikawa T, Quan L, Michiue T, Kawamoto O, Wanga Qi, Chen JH, Zhu BL, Maeda H. Postmortem catecholamine levels in pericardial and cerebrospinal fluids with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Forensic Sci Int* 2013; 228: 52–60.
6. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Quan L, Oritani S, Bessho Y, Maeda H. Postmortem serum catecholamine levels in relation to the cause of death. *Forensic Sci Int.* 2007; 173(2-3):122-9
7. Pines John PJ. *Biopsychology*, 8th edition. Boston: Pearson Education Inc.: 2011.
8. Webster RA. Neurotransmitter Systems and Function Overview. In: Webster RA editor. *Neurotransmitters, Drugs and Brain function*. John Wiley & Sons: 2011.
9. Gnagy ME. Catecholamines. In: Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry – Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology*. 8th ed. Academic Press. Elsevier: 2012.
10. Iversen SD, Iversen LL. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.* 2007; 30(5): 188-93.

-
11. Webster RA. Dopamine. In: Webster RA editor. Neurotransmitters, Drugs and Brain function. John Wiley & Sons: 2011.
 12. Vaessen T, Hernaus D, Myin-Germeys I, van Amelsvoort T. The dopaminergic response to acute stress in health and psychopathology: a systematic review. *Neurosci. Biobehav Rev.* 2015; 56: 241-51.
 13. Ganong`s Review of Medical Physiology. 25th ed. Mc Graw-Hill Education: 2016.
 14. Björklund A, Dunnett SB. Fifty years of dopamine research. *Trends Neurosci* 2007; 30(5):185-7.
 15. Schultz W. Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci* 2007; 30(5): 203-10.
 16. Pitchot W, Hansenne M, Moreno AG, Pinto E, Reggers J, Fuchs S, Pirard S, Anseau M. Reduced dopamine function in depressed patients is related to suicidal behavior but not its lethality. *Psychoneuroendocrinology* 2001; 26:689–96.
 17. Song P, Mabrouk OS, Hershey ND, Kennedy RT. In Vivo Neurochemical Monitoring Using Benzoyl Chloride Derivatization and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 2012, 84 (1): 412–19.
 18. Stanford SC. Noradrenaline. In: Webster RA editor. Neurotransmitters, Drugs and Brain function. John Wiley & Sons: 2011.
 19. Rang HP, Dale MM. Pharmacology. 6th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003
 20. Jokinen John, Peter O, Nordstrom J. Noradrenergic function and HPA axis dysregulation in suicidal behavior. *Psychoneuroendocrinology* 2010; 35:1536-42.
 21. Eisenach JC, Detweiler DJ, Tong C, D'Angelo R, Hood DD. Cerebrospinal fluid norepinephrine and acetylcholine concentrations during acute pain. *Anesth Analg.* 1996; 82(3):621-6.

-
22. Hensler JG. Serotonin. In: Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL, editors. Basic Neurochemistry – Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology. 8th ed. Academic Press. Elsevier: 2012
 23. Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. *J.vet. Pharmacol. Ther.* 2008; 31:187-99.
 24. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* 2009; 60:355–66.
 25. Olivier B, Serotonin: A never-ending story. *Eur. J. Pharmacol.* 2015; 753:2–18.
 26. Arranz B, Blennow K, Eriksson A, Mansson JE, Marcusson J. Serotonergic, noradrenergic and dopaminergic measures in suicide brains. *Biol. Psychiatry* 1997; 41:1000-9.
 27. Webster RA. Acetylcholine. In: Webster RA editor. *Neurotransmitters, Drugs and Brain function.* John Wiley & Sons: 2011.
 28. Platt B, Gernot R. The cholinergic system, EEG and sleep. *Behav Brain Res* 2011; 221(2):499–504.
 29. Aloisi AM, Casamenti F, Scali C, Pepeu G, Carli G. Effects of novelty, pain and stress on hippocampal extracellular acetylcholine levels in male rats. *Brain Res.* 1997; 748: 219-26.
 30. Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nature Rev Neurosci.* 2009; 10(6):459-66.
 31. Mora F, Segovia G, del Arco A, de Blas M, Garrido P. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Res.* 2012;1476(2):71-85.

-
32. Mahar I, Bambico FR, Mechawar N, Nobrega JN. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neurosci. Biobehav Rev.* 2014; 38:173-92.
33. Okuda C, Saito A, Miyazaki M, Kuriyama K. Alteration of the turnover of dopamine and 5-hydroxytryptamine in rat brain associated with hypothermia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986; 24(1):79-83.
34. Steimer Th. The biology of fear and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci.* 2002; 4(3):231-49.
35. Mann JJ, Currier D, Quiroz JA, Manji HK. Neurobiology of Severe Mood and Anxiety Disorders. In: Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry – Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology.* 8th ed. Academic Press. Elsevier: 2012.
36. Madea B. Is there recent progress in the estimation of the postmortem interval by means of thanatochemistry? *Forensic Sci Int.* 2005; 151(2-3):139-49.
37. Arroyo A, Rosel P, Marron T. Cerebrospinal fluid: postmortem biochemical study. *J Clin Forensic Med.* 2005; 12: 153–6.
38. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 2010; 37:13-5.
39. Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* (2011) 128, 309-16.
40. Brinker T, Stopa E, Morrison J, Klinge P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS* 2014;11:10.
41. Johanson CE, Duncan III JA, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Review. Cerebrospinal Fluid Res.* 2008; 5:10.
-

-
42. Brian O, Tom P, Wang D, et al. Relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2010; 7:15.
43. Harrington MG, Salomon RM, Pogoda JM, et al. Cerebrospinal fluid sodium rhythms. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2010; 7:3.
44. Strawn JR, Ekhtator NN, Geraciotti Jr TD. In-use stability of monoamine metabolites in human cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr. B* 2001; 760:301-6.
45. Malm J, Kristensen B, Ekstedt J, Wester P. CSF concentration gradients of monoamine metabolites in patients with hydrocephalus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 1026-33.
46. Kauert G, Zucker T, Gilg T, Eisenmenger W. Measurements of Biogenic Amines and Metabolites in the CSF of Suicide Victims and Nonsuicides. In: Möller H, Schmidtke A, Welz R. , editors. *Current Issues of Suicidology*. Berlin, Heidelberg: Springer. 1988. p. 252-62
47. Hirvonen J, Huttunen P. Postmortem changes in serum noradrenaline and adrenaline concentrations in rabbit and human cadavers. *Int J Legal Med.* 1996; 109(3): 143-6.
48. Wilke N, Janßen H, Fahrenhorst C, Hecker H, Manns MP, Brabant E-G, Tröger HD, Breitmeier D. Postmortem determination of concentrations of stress hormones in various body fluids - is there a dependency between adrenaline/noradrenaline quotient, cause of death and agony time? *Int J Legal Med.* 2007; 121(5):385–94.
49. Musshoff F, Menting T, Madea B. Postmortem serotonin (5-HT) concentrations in the cerebrospinal fluid of medicolegal cases. *Forensic Sci Int* 2004; 142:211-19.
50. Quan L, Ishikawa T, Hara J, Michiue T, Chen J-H, Wang Q et al. Postmortem serotonin levels in cerebrospinal and pericardial fluids with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg Med.* 2011; 13: 75-8.

-
51. Fang L, Li Y, Sheng X, Yao S. Sensitive, Rapid and Easy Analysis of Three Catecholamine Metabolites in Human Urine and Serum by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr Sci.* 2012;50:450–6.
52. Côté L, Deckers C. Urinary Catecholamines, Metanephrines, and 3-Methoxytyramine in a Single LC/MS/MS Run. Agilent Technologies Canada St-Laurent, Québec, Canada. www.agilent.com/chem/clinicalresearch
53. Hirano I, Toyama A, Hayakawa Y. High-sensitivity quantitation of intact and derivatized catecholamines in plasma by triple-quadrupole mass spectrometry. <https://www.shimadzu.eu/sites/default/files/msacl2015>
54. Kovac A, Somikova Z, Zilka N, Novak M. Liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for determination of panel of neurotransmitters in cerebrospinal fluid from the rat model of tauopathy. *Talanta.* 2014; 119:284-90.
55. Pyo WY, Jo CH, Myung SW. An Effective High-Performance Liquid Chromatographic–Mass Spectrometric Assay for Catecholamines, as the N(O,S)-Ethoxycarbonyl Ethyl Esters, in Human Urine. *Chroma* 2006; 64: 731-7.
56. Wang J, Huang ZH, Gage DA, Watson JT. Analysis of amino acids by gas chromatography-flame ionization detection and gas chromatography-mass spectrometry: simultaneous derivatization of functional groups by an aqueous-phase chloroformate-mediated reaction. *J Chromatogr A* 1994; 4: 71-8.
53. Wong JMT, Malec PA, Mabrouk OS, Ro J, Dus M, Kennedy RT. Benzoyl chloride derivatization with liquid chromatography-mass spectrometry for targeted metabolomics of neurochemicals in biological samples. *J. Chromatogr. A* 2016; 1446(13):78-90.
54. GrumbACH ES, Diehl DM, Mazzeo JR. A method for choline and acetylcholine using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) and mass spectrometry Waters Application note. Waters Corporation, 2004.

-
55. Lame ME, Chambers EE, Fountain KJ. Development of a quantitative UPLC/MS/MS assay for the simultaneous quantification of acetylcholine, histamine, and their metabolites in human cerebrospinal fluid (CSF) using a CORTECS UPLC HILIC column to improve peak resolution, sensitivity, and speed of analysis. Waters Application note. Waters Corporation, Milford, MA, USA, 2013
56. Audhya T, Adams JB, Johansen L. Correlation of serotonin levels in CST, platelets, plasma and urine. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1820:1496–1501.
57. Hyland K. Clinical utility of monoamine neurotransmitter metabolite analysis in cerebrospinal fluid. *Clin. Chem* 2008; 54(4): 633–41.
58. Anderson GM, Mefford, Tolliver TJ, Riddle MA, Ocame DM, Leckman JF, Cohen D. Serotonin in human lumbar cerebrospinal fluid: a reassessment. *Life Sci.* 1990;46: 247-55.
59. Suominen T. Analysis of neurotransmitters, neurosteroids and their metabolites in biological samples. *E - thesis* URN: ISBN:978-951-51-1176-0.
<http://hdl.handle.net/10138/154349>
60. Duvoisin RC, Dettbarn W-D. Cerebrospinal fluid acetylcholine in man. *Neurology.* 1967; 17:1077-82.
61. Schneider FL, AChaval M, Rocha de Barros V, Contu P. Postmortem persistence of acetylcholinesterase activity in the subfornical organ of the rat. *Acta Anat.(Basel)* 1984;118(3):164-6.
62. Frölich L, Dirr A, Götz ME, Gsell W, Reichmann H, Riederer P, Maurer K. Acetylcholine in human CST: methodological considerations and levels in dementia of Alzheimer type. *J Neural Transm (Vienna).* 1998;105(8-9):961-73.
63. Jia JP, Jia JM, Zhou WD, Xu M, Chu CB, Yan X, Sun YX. Differential acetylcholine and choline concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Chin Med J.* 2004 Aug;117(8):1161-4.
-

-
64. Sjöström R, Ekstedt J, Änggård E. Concentration gradients of monoamine metabolites in human cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1975;38:666-8.
65. Loonen, A.J.M., Ivanova, S.A. Circuits regulating pleasure and happiness in major depression. *Medical Hypotheses* 2016; 87; 14–21.
66. Ohmori T, Arora R, Meltzer H. Serotonergic measures in suicide brain: The concentration of 5-HIAA, HVA and tryptophan in frontal cortex of suicide victims. *Biol Psychiatry* 1992; 32:57-71.
67. Pare CM, Yeung DP, Price K, Stacey RS. 5-hydroxytryptamine, noradrenaline, and dopamine in brainstem, hypothalamus, and caudate nucleus of controls and of patients committing suicide by coal-gas poisoning. *The Lancet* 1969; 294(7612): 133-5.
68. Hirvonen J, Lapinlampi T. Plasma and urine catecholamines and cerebrospinal fluid amine metabolites as hypothermia markers in guinea-pigs. *Med Sci Law* 1989;29(2):130-5.
69. Biliakov AM. Significance of the quantitative cerebrospinal fluid content of catecholamines in the diagnosis of asphyxia in hanging. *Lik. Sprava* 5-6: 41-43.

BIOGRAFIJA

Dr Irina Damjanjuk, rođena Banjanin, rođena je 1973. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet u Beogradu je upisala 1992. godine, na kome je diplomirala 2001. godine, sa prosečnom ocenom 8,14. Volontersku specijalizaciju iz sudske medicine upisala je 2002. godine, a specijalistički ispit položila 2005. godine sa odličnom ocenom. Na Institutu za sudsku medicinu Medicinskog fakulteta u Beogradu zaposlena je od aprila 2004. godine, kao asistent pripravnik. Magistarsku tezu pod nazivom "Dijagnostički problemi u sudskomedicinskoj ekspertizi leševa iz požara" odbranila je 2010. U zvanje asistenta izabrana je 2011., a reizabrana 2015. godine. U periodu od 2014. do 2017. godine obavljala je funkciju Sekretara katedre za sudsku medicinu.

Član je Sekcije za sudsku medicinu Srpskog lekarskog društva i Lekarske komore Srbije.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Mr. dr Irina Damjanjuk

broj upisa _61206-650/2-14

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Sudskomedicinski značaj određivanja postmortalne koncentracije katecholamina, serotoninina i acetilholina u odnosu na uzrok i poreklo smrti

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 22.3.2018



Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Irina Damjanjuk**

Broj upisa 61206-650/2-14

Studijski program **sudska medicina**

Naslov rada **Sudskomedicinski značaj određivanja postmortalne koncentracije kateholamina, serotonina i acetilholina u odnosu na uzrok i poreklo smrti**

Mentor: **Prof. dr Vesna Popović**

Potpisani Irina Damjanjuk

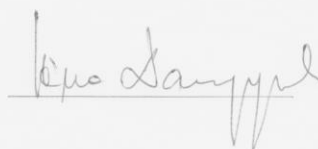
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 22.3.2018. god



Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Sudskomedicinski značaj određivanja postmortalne koncentracije kateholamina, serotonina i acetilholina u odnosu na uzrok i poreklo smrti

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 22.3.2018. god.

