

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

KATJA GOTOVAC

**ODREĐIVANJE IMUNOREAKTIVNOSTI I HORMONSKOG
STATUSA U LJUDI S POSTTRAUMATSKIM STRESNIM
POREMEĆAJEM**

Doktorska disertacija
predložena Biološkom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja
doktora prirodnih znanosti biologije

ZAGREB, 2005.

Ova je disertacija izrađena u Imunološkom zavodu d.o.o., Odjel za istraživanje i razvoj, Odsjek za celularnu imunologiju u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Ante Sabioncella, u sklopu Sveučilišnoga poslijediplomskog studija pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Iskreno zahvaljujem mom dragom mentoru dr. sc. Anti Sabioncellu koji je usred pustinje crtao kutije i brnjice za moje ovce i pitao se sa mnom: «Čemu ružama služi trnje?».

Zahvaljujem akademiku Draganu Dekarisu, glavnom istraživaču na projektu koji me je «Imenovao svojim ambasadorom i naredio mi da putujem...», te prof. dr. sc. Sabini Rabatić, voditeljici Odsjeka za istraživanje i razvoj, koja je «izdavala samo razumne naredbe i zahtijevala puno, ali uvijek onoliko koliko možeš učiniti», a kada bih poželjela vidjeti zalazak sunca, «znala je ocijeniti kada su nastupili povoljni uvjeti» i naredila bi suncu da zađe.

Zahvaljujem dr. sc. Alenki Gagro i dr. sc. Alemki Markotić, što i «sada kada se ovaj planet okreće jedanput u minuti, jednako predano i bez odmora pale i gase svoje svjetiljke»... za mene, za nas. «To uopće nije smiješno, jer kada dan traje jednu minutu lako se skupe mjeseci i mjeseci razgovora, a u dvadeset i četiri sata ima tisuću četiri stotine i četrdeset zalazaka sunca». Njihov je planet zbilja poseban i zavoljela sam ga.

Mr. sc. Kreši Bendelji, Jagodi Baletić i Renati Jug zahvalna sam na pomoći u praktičnom dijelu izrade ovoga rada, a Anđelku Vidoviću za tehničku pomoć. «Pustinju čini lijepom to što ona negdje skriva bunar. U zoru smo, sveudilj hodajući, zajedno pronašli bunar. Ta voda nije bila obična. Bila je rođena u našem hodu pod zvijezdama, u pjesmi zarđalog kolotura, u naporu naših ruku ... bila je tako dobra».

Zahvaljujem dr. sc. Ivni Svobodi-Beusan «jer se veseli boji žitnoga polja i šumu vjetra u njemu i zna da je bitno očima nevidljivo...», kao i svima ostalima koji su mi na različite načine pomogli tijekom nastajanja ovog rada.

Prof. dr. sc. Rudolfu Gregureku, mr. sc. Hermanu Vukušiću te osoblju Odjela za psihološku medicinu KBC, Zagreb dugujem zahvalnost na suradnji.

Najveću zahvalnost dugujem Domenu, Jakovu i Brini jer su «odgovorni za ono što su pripitomili» te mojoj mami jer me je upoznala s Malim princom.

(...)Tired with all these, from these would I be gone,
Save that, to die, I leave my love alone(...)

(iz 66.Shakespeareova soneta)

Jakovu, Brini i Domenu

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Disertacija

ODREĐIVANJE IMUNOREAKTIVNOSTI I HORMONSKOG STATUSA U LJUDI S POSTTRAUMATSKIM STRESNIM POREMEĆAJEM

Katja Gotovac
Imunološki zavod d.o.o., Rockefellerova 10, Zagreb

Adaptivna reakcija na stres sastavni je dio alostatskih mehanizama kojima se aktivira adrenergički sustav te hormonska osovina hipotalamus-hipofiza-adrenalna žlijezda (HPA od engl. hypotalamic-pituitary-adrenal). Postavljena je hipoteza kako učestalo ili produljeno izlaganje stresnoj reakciji te neadekvatan odgovor stresnog sustava, može rezultirati alostatskim opterećenjem i dovesti do patoloških promjena. Biološke posljedice stresa istraživane su na različitim modelima akutnog i kroničnog stresa, psihijatrijskim poremećajima te u posttraumatskom stresnom poremećaju (PTSP). Istraživanja imunostatusa u PTSP-u su rijetka, a rezultati su oprečni. U našim dosadašnjim istraživanjima ispitali smo u dvije skupine ispitanika, ratnih veterana i profesionalnih vojnika, što se događa u ranim stadijima PTSP-a šest do osam godina nakon proživljene traume. U obje smo skupine uočili brojne promjene hormonskih i imunoloških varijabli, ali i djelomičnu nepodudarnost rezultata, koja bi se mogla objasniti psihosocijalnim faktorima, u prvom redu razlikom njihova socioekonomskog statusa. Prema literaturnim podacima, socioekonomski status je značajno povezan s rizikom oboljenja i smrtnošću. Nezaposlenost ili gubitak posla je teža životna trauma koja dovodi do promjena u funkcioniranju imunostatusa i kod zdravih ljudi, a najčešće dodatne traume koje se povezuju s ratnim PTSP-om su nezaposlenost, nizak socioekonomski status, rastava braka te teže bolesti. Poznato je da kroničan stres smanjuje sposobnost odupiranja bolestima. Nedavno je postavljena hipoteza kako stresni sustav (kateholamini i glukokortikoidi) pomiču Th1/Th2 ravnotežu prema Th2-tipu reakcije čime se narušava ravnoteža između stanične i humoralne imunosti. Želeći uzeti u obzir sve navedeno, cilj nam je bio ispitati novu skupinu veterana Domovinskog rata s kroničnim PTSP-om (n=41), otprilike deset godina nakon proživljene traume, te, kao kontrolu, skupinu zdravih, po dobi sličnih muškaraca (n=13) bez PTSP-a. Ispitanike s PTSP-om podijelili smo u dvije skupine: PTSD I (n=23), su bili ispitanici koji nisu bili izloženi novom traumatskom događaju unazad godinu dana, te PTSD II (n=18) ispitanici koji su, uz dijagnozu PTSP-a, izgubili mirovinsku naknadu ili drugi izvor primanja, što smo smatrali dodatnom traumatizacijom. Koristili smo se multiparametarskom imunofenotipizacijom pri određivanju: a) apsolutnog broja limfocita i monocita te postotka subpopulacija limfocita (CD4-, CD8- i memorijskih stanica), NK-stanica i površinskih Fc-receptora (CD16, CD32, CD64) na limfocitima, b) relativne količine glukokortikoidnih receptora (GCR) u citoplazmi limfocita te unutarstaničnog perforina u NK- i CD8-stanicama, c) unutarstanične ekspresije Th1/Th2 citokina (IFN- γ ili IL-4) nakon kratkotrajne (4 sata) stimulacije pune krvi s PMA i ionomicinom *in vitro* te proizvodnju proupalnih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α) u monocitima stimuliranim LPS-om (5 sati) *in vitro*. NK-staničnu aktivnost određivali smo metodom oslobađanja ^{51}Cr , a razine kortizola, dehidroepiandrosterona (DHEA) te testosterona u serumu enzimimunotestom (ELISA). Iznenadilo nas je da u najvećem broju praćenih varijabli (38) nismo našli promjena između ispitivanih skupina. Nije nađena razlika

u apsolutnom broju limfocita, postotcima njihovih osnovnih populacija, razini perforina, u Th1/Th2 odgovoru kao niti u proizvodnji proupalnih citokina u stimuliranim monocitima. Razlika nije pronađena niti u razinama hormona u serumu. Nasuprot tome, relativna količina GCR-a u limfocitima bila je povišena, a citotoksička aktivnost NK-stanica snižena u obje skupine bolesnika s PTSP-om u odnosu na zdrave kontrole. Dodatna trauma nije značajan faktor koji, u našem modelu, utječe na ispitivane varijable. Ovi rezultat potvrđuju pretpostavku o iscrpljujućem utjecaju pojačane aktivnosti HPA-osovine i alostatskom opterećenju koje se odražava u imunološkom statusu. Možemo zaključiti da promjene hormonskog i imunostava, kod osoba koje su izložene dugotrajnom stresu, nisu statične već ovisne o trajanju alostatskog pritiska, kao i o interakcijama koje su uključene u stresni odgovor.

(154 stranice, 27 slika, 28 tablica, 302 literarnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Školi narodnog zdravlja Andrija Štampar, Rockefellerova 4, Zagreb.

Ključne riječi: PTSP, imunofenotipizacija, NK-aktivnost, Th1/Th2, citokini, hormoni

Mentor: dr. sc. Ante Sabioncello, znanstveni savjetnik

Ocjenjivači: dr. sc. Tanja Marotti, znanstveni savjetnik, IRB
prof. dr. sc. Dragan Dekaris, akademik, HAZU
dr. sc. Ante Sabioncello, znanstveni savjetnik, Imunološki zavod
prof. dr. sc. Sabina Rabatić, znanstveni savjetnik, Imunološki zavod

Rad je prihvaćen: 26. travnja, 2005.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb Doctoral Thesis
Faculty of Science
Department of Biology

DETERMINATION OF IMMUNE REACTIVITY AND HORMONE STATUS IN PEOPLE WITH POSTTRAUMATIC STRESS DISORDER

Katja Gotovac
Institute of Immunology, Rockefellerova 2, Zagreb

Adaptive stress response involves activation of adrenergic and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and is an integrative part of allostasis. It is hypothesized that long-term effect of prolonged response to stress or malfunction in the stress system can result in a substantial allostatic load and have a pathologic outcome. The biological consequences of stress have been extensively studied in different models of acute and chronic stress, psychiatric or mood disorders, and in posttraumatic stress disorder (PTSD). Studies of the immune status in PTSD survivors are scarce and inconsistent results have been reported. In our previous studies we investigated two groups of PTSD sufferers, war veterans and professional soldiers, in the early periods (6 to 8 years) after traumatic experience. The two groups showed comparable alterations in some but not all immune and hormone variables. The discrepancy between the groups was assumed to result from their different socioeconomic background. Socioeconomic status is strongly associated with the risk of disease and mortality. Correlational studies indicated additional life stressors, particularly unemployment, low income or socioeconomic status, and disruption of relationships to be significantly associated with PTSD symptoms. Chronic stress can lead to a reduced capacity to resist disease. Recently, it has been suggested that stress system, glucocorticoids and catecholamines, causing a shift in the cytokine production from Th1-type to Th2-type pattern, may disrupt the fine balance between the cell-mediated and humoral immunity. In line with these hypotheses, our aim was to examine another group of Croatian war veterans with chronic, combat-related PTSD (n=41) approximately ten years after traumatization, and a group of healthy, age-matched men (n=13) without PTSD as controls. PTSD patients were divided into two subgroups: PTSD I, with no additional major stress experience during the last year, and PTSD II, including patients who, besides their primary diagnosis, had recently lost their job or rent. The multiparameter flow cytometric approach was used to determine the following: (a) absolute number of lymphocytes and percentage of main lymphocyte subsets (CD3, CD4, CD8, memory cells), NK-cells, and their surface Fc-receptors (CD16, CD32, CD64); (b) relative quantity of cytoplasmic glucocorticoid receptors (GCR) in lymphocytes and intracellular perforin in NK- and CD8-subsets; and (c) intracellular expression of Th1/Th2 cytokines (IFN- γ or IL-4) after short-term whole blood stimulation (4 hours) with PMA and ionomycin *in vitro* as well as proinflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated (5 hours) monocytes. Besides, NK-cell activity was measured by ^{51}Cr -release assays, and serum level of cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA) and testosterone were determined by ELISA. Surprisingly, most of immune and endocrine variables (n=38) investigated yielded no differences among the three groups of subjects. There were no differences in absolute lymphocyte number, percentage of main lymphocyte populations, level of perforin in lymphocyte subsets, or in either Th1/Th2 profile or level of proinflammatory cytokines in stimulated monocytes. No significant between-group differences were found in the levels of serum hormones (cortisol, DHEA and testosterone) either. On the other

hand, the relative quantity of GCR in lymphocytes was increased, whereas NK-cytotoxic activity was decreased in both PTSD groups as compared with control group. These results support the hypothesis of the exhaustive effect of allostatic load on the immune response through enduring overactivity of HPA axis. It is concluded that changes in the immune and endocrine system are not static in persons under prolonged stress but rather depend on the duration of allostatic load and its impact on the interactions involved in the response to stress.

(154 pages, 27 figures, 28 tables, 302 references, original in Croatian)

Thesis deposited in: Škola narodnog zdravlja Andrija Štampar, Rockefellerova 4, Zagreb

Keywords: PTSD, immunophenotyping, NK activity, Th1/Th2, cytokines, hormones

Supervisor: Ante Sabioncello, Ph.D.

Reviewers: Tanja Marotti, Ph.D., Scientific Adviser, IRB
Dragan Dekaris, Full Member of Croatian Academy of Sciences and Arts, 1991
Ante Sabioncello, Ph.D., Scientific Adviser, Institute of Immunology
Sabina Rabatić, Ph.D., Scientific Adviser, Institute of Immunology

Thesis accepted: 26th April, 2005.

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1	O NAZIVLJU I SHVAĆANJIMA STRESA.....	2
1.2	ALOSTAZA, ALOSTATSKO OPTEREĆENJE I STRES.....	4
1.2.1	<i>Vrste stresora i oblikovanje odgovora.....</i>	7
1.3	FIZIOLOŠKI MEHANIZMI STRESNIH REAKCIJA.....	10
1.3.1	<i>Akutni stres.....</i>	15
1.3.2	<i>Upala.....</i>	17
1.3.3	<i>Glukokortikoidi i mehanizmi kontrole stresne reakcije.....</i>	21
1.3.4	<i>Stres i Th1/Th2 ravnoteža.....</i>	27
1.3.5	<i>Urođenoubilačke stanice.....</i>	32
1.4	STRES I OSTALE NEUROENDOKRINE OSI.....	33
1.5	STRES I ZDRAVLJE - PSIHONEUROIMUNOLOGIJA.....	38
1.5.1	<i>Socioekonomski status i dodatna traumatizacija.....</i>	43
1.6	NEUROBIOLOGIJA POSTTRAUMATSKOG STRESNOG POREMEĆAJA.....	44
2.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	49
3.	MATERIJAL I METODE.....	51
3.1	ISPITANICI.....	51
3.2	UZORCI.....	52
3.3	MATERIJAL.....	53
3.3.1	<i>Medij i kemikalije za stimulaciju stanica u punoj krvi.....</i>	53
3.3.2	<i>Puferske otopine za imunofenotipizaciju.....</i>	53
3.3.3	<i>Monoklonska antitijela.....</i>	54
3.3.4	<i>Standardi za podešavanje citometra i određivanje apsolutnog broja stanica (konjugirani fluorokromima).....</i>	56
3.3.5	<i>Materijal za određivanje funkcionalne sposobnosti NK-stanica.....</i>	56
3.3.6	<i>Kompleti za određivanje hormona u serumu.....</i>	56
3.4	METODE.....	57
3.4.1	<i>Stimulacija stanica periferne pune krvi u kratkotrajnoj kulturi.....</i>	57
3.4.2	<i>Imunofenotipizacija stanica (protočna citometrija).....</i>	58
3.4.3	<i>Određivanje apsolutnog broja stanica protočnom citometrijom.....</i>	67
3.4.4	<i>Test citotoksičnosti NK-stanica.....</i>	68
3.4.5	<i>Određivanje hormona ELISA-om u serumu.....</i>	69
3.5	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	70
4.	REZULTATI.....	73
4.1	ANALIZA STRUKTURE PODATAKA S OBZIROM NA VRIJEDNOSTI KOJE NEDOSTAJU.....	73
4.2	APSOLUTNI BROJ LIMFOCITA I MONOCITA.....	74
4.3	SUBPOPULACIJE LIMFOCITA I MONOCITA – IMUNOFENOTIPIZACIJA BILJEGA NA POVRŠINI STANICA.....	76
4.3.1	<i>Subpopulacije NK-stanica.....</i>	77
4.3.2	<i>Fc-receptori na limfocitima i monocitima.....</i>	78
4.4	EKSPRESIJA UNUTARSTANIČNOG PERFORINA CITOTOKSIČKIM LIMFOCITIMA TE SUBPOPULACIJAMA NK-STANICA.....	81
4.5	UROĐENOUBILAČKA AKTIVNOST NK-STANICA.....	84
4.6	EKSPRESIJA UNUTARSTANIČNIH CITOKINA U LIMFOCITIMA ODNOSNO MONOCITIMA STIMULIRANIM <i>IN VITRO</i>	86
4.7	GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTORI.....	87
4.8	HORMONI U SERUMU.....	89
4.9	KORELACIJE IZMEĐU NEKIH ISPITIVANIH PARAMETARA.....	90
5.	RASPRAVA.....	94
6.	ZAKLJUČAK.....	104
7.	LITERATURA.....	106
8.	SAŽETAK.....	137
9.	SUMMARY.....	139
	POPIS KRATICA.....	141
	INDEKS SLIKA I TABLICA.....	143
	SLIKE.....	143
	TABLICE.....	146
	ŽIVOTOPIS.....	148
	POPIS RADOVA.....	150

1. UVOD

1. UVOD

U San Felieu de Guixols u Španjolskoj, 2002. g. održavao se redoviti dvogodišnji sastanak u organizaciji Euresco Conferences (European science foundation, European Research Conference) pod naslovom Neuroendocrine-Immune Interactions. Na tom sam sastanku od dr. F. Dhabhara, tijekom njegova predavanja, čula najslikovitiju (i možda najtočniju) definiciju stresa. Preko cijelog platna bila je prikazana fotografija colta uperenog prema nama, a ispod je pisalo: "Stress is a loaded gun" (Stres je nabijeni revolver). Dr. Dhabhar je u nastavku dodao: "The loaded gun can kill you but can also protect you." (Takav vas revolver može ubiti ali i zaštititi). Naslov njegova predavanja glasio je *Stress, glucocorticoids, and immune regulation: An evolutionary perspective* (Stres, glukokortikoidi i imunska regulacija: iz evolucijske perspektive). Navela sam ovo zbog jednostavnosti predočjenja kao i zbog potrebe da odmah na početku, barem dijelom, ublažim lošu reputaciju "dežurnog krivca za sve" loše što nam se događa, a koju je stres "prikupio" zadnjih godina. No, idemo redom.

Živi su organizmi podložni evolucijskom pritisku okoliša i njihova sposobnost zadovoljavajućeg odgovora na prijetnje i opasnosti iz najbliže okoline osnovni je preduvjet opstanka jedinke, a zatim i vrste. Preživi li jedna antilopa tigrov napad, sušu, poplavu ili infekciju i potom ima potomstvo, očuvala je svoju vrstu za sljedeću generaciju. Fiziološka podrška koja joj osigurava da preživi u kriznim situacijama, ustvari je stresna reakcija. Iako se moderan čovjek odavno ne mora brinuti o predatorima, fiziološka podrška koju pruža stresna reakcija još uvijek mu je na raspolaganju za sve nove i nove zahtjeve koji vrebaju iz njegove neposredne okoline i stavljaju na kušnju njegovu sposobnost prilagodbe i preživljavanja.

1.1 O nazivlju i shvaćanjima stresa

Naziv *stres* u fiziologiju uveo je Hans Selye posudivši ga iz područja fizike. Iako ga nije upotrijebio u svom prvom izvješću u *Nature* (Selye, 1936) jer ga je znanstvena javnost smatrala nedovoljno specifičnim i profanim, taj se termin kasnijim Selyevim radom ustalio te dobio i svoje izvedenice. Budući da je riječ *stres* koristio za samu reakciju, izveo je naziv *stresor* za pojavu koja izaziva takvu reakciju, dok je pojmovima *distres* i *eustres* odvojio stresore s negativnim i pozitivnim predznakom. U tom je radu Selye opisao kako su štakori, izloženi različitim neugodnim agensima (hladnoća, kirurško ranjavanje, spinalni šok ili intoksikacija), reagirali nizom sličnih fizioloških promjena (smanjio im se timus, slezena, limfni čvorovi i jetra, zadobili su edeme te gubili mišićni tonus, pojavile su se erozije gastrointestinalnog trakta i snizila im se tjelesna temperatura). Kada se utjecaj agensa nastavio i nakon 48 sati, opće stanje se prolazno popravilo, a ako bi se tretman nastavio, bilo im je sve lošije i na kraju bi ugibali. Selye je nazvao ovaj proces *generalnim adaptacijskim sindromom* i podijelio ga u tri osnovne faze: *uzbunu, prilagodbu i iscrpljivanje*. Uzbuna ili *alarmna faza* je trenutačni odgovor na akutno djelovanje stresora u kojem se u kratkom vremenu pokreću mehanizmi za adaptaciju, od kojih je najznačajniji oslobađanje hormona nadbubrežne žlijezde. U drugoj fazi jedinka se *prilagođava* novim uvjetima pa organizam kratkotrajno postaje otporniji na djelovanje stresora. Kada se povećani zahtjevi zbog produljenog djelovanja stresora nad organizmom nastavlja, dolazi do treće faze ili *iscrpljivanja* svih mehanizama prilagodbe, neotpornosti organizma te podlijevanju bolestima ili čak smrti (Selye, 1976). Prema Selyevoj teoriji *Stres je nespecifičan odgovor organizma prema bilo kojem zahtjevu koji mu se nameće* (Selye, 1974).

Cannon je 1929. g. uveo pojam, *homeostaza*, definirajući ga kao dinamičku ravnotežu unutar organizma, te prvi pokazao ulogu hormona nadbubrežne žlijezde pri adaptivnom odgovoru organizma na prijetnju narušavanju ravnoteže (Cannon, 1929 a). Vjerovao je kako nadbubrežna žlijezda i simpatički živčani sustav djeluju kao jedna, jedinstvena, simpatoadrenalna cjelina. Prema Cannonu u stresu brza aktivacija homeostatskog sustava, osobito njegova simpatoadrenalnog dijela, očuvat će cijelovitost organizma prilagođavanjem i time povećati mogućnost preživljavanja. Cannon je, kao i Selye, smatrao kako je, bez obzira na vrstu

prijetnje (izlaganje hladnoći, hipoglikemiji ili emocionalnim prijetnjama), odgovor organizma uvijek isti te da se simpatoadrenalni sustav aktivira isključivo u stresu (Cannon, 1929 b).

Danas su znanstvenici, uglavnom, napustili Cannonovo i Seleyovo shvaćanje stresne reakcije kao stereotipne, generalizirane i nespecifične reakcije. Moderne teorije (McEwen i Wingfield, 2003; Goldstein, 2003) vide stres kao prijetnju homeostazi ali u kojoj je odgovor pojedinca donekle specifičan, jer je ovisan o karakteru samog stresora, o percepciji te prethodnom iskustvu kao i o sposobnosti pojedinca da se nosi sa stresnom situacijom (eng. coping). Simpatički živčani sustav i hormoni nadbubrežne žlijezde svojim fluktuacijama podjednako sudjeluju u redovitim, svakodnevnim aktivnostima organizma, kao što su buđenje, probava, kretanje, aklimatizacija, dojenje, javni nastupi, a ne aktiviraju se isključivo u situacijama opasnosti. Ove adaptacije služe kako bi se održale i osigurale fiziološke potrebe organizma i odnose se na dotok krvi u mozak, očuvanje tjelesne temperature, krvni tlak ili osiguranje metaboličkog goriva organima, bez obzira na promjene tijekom dnevno-noćnih ciklusa ili sezonskih varijacija. Konačno razlikujemo simpatički živčani sustav, sustav hormona nadbubrežne žlijezde i dopaminski sustav kao tri periferna kateholaminska sustava od kojih svaki ima različite funkcije, način regulacije i uloge i čiji su odgovori različiti, ovisno o intenzitetu i vrsti stresora (Goldstein, 2003), što je prikazano u Tablici 1.

Pojam stres se sve češće koristi isključivo s negativnim predznakom, kao prijeteći događaj ili niz događanja koji nužno dovode do stanja kroničnog disbalansa unutar organizma. Međutim, sa stajališta opstanka jedinke najveći značaj stresnog odgovora jest upravo kratkoročna zaštita u nekoj prijetećoj situaciji. Stresna reakcija može značiti opasnost tek ako se često ponavlja ili traje duži vremensko razdoblje, ili ako je došlo do gubitka regulacije bilo kojeg sustava koji sudjeluje u njezinu pokretanju. Tek tada možemo govoriti o štetnim posljedicama stresa.

Tablica 1 : Odgovor pojedinih dijelova stresnog sustava na različite stresore.

Stanje	HPA-osovina*	Sustav hormona nadbubrežne žlijezde	Simpatički živčani sustav
srčani arest (bypass)	+++	++++	++
izlaganje hladnoći, hipotermija	+	++	++++
izlaganje hladnoći bez hipotermije	0	+	+++
vježbanje	+	++	+++
vježbanje do iscrpljenja	++	+++	++++
deprivacija glukoze	+++	++++	+
rukovanje štakorima	++	++	+
hemoragija s hipotenzijom	+++	+++	+
hemoragija bez hipotenzije	+	+	++
imobilizacija štakora	++++	++++	++++
mentalni zadatak u laboratorijskim uvjetima	++	++	+
bol	++	+++	++
javni nastup	++	+++	+
socijalni stres kod Rhesus majmuna	++	++	++
kirurški zahvat	+	+	+

(Prerađeno prema Goldsteinu, 2003).

Intenziteti aktivacije označeni su od 0 do ++++ prema literaturi. Općenito uža je veza između HPA-osovine i sustava nadbubrežne žlijezde nego nadbubrežne žlijezde i simpatičkog živčanog sustava.

* hormonska osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda

1.2 Alostaza, alostatsko opterećenje i stres

Sposobnost organizma da pojačava odnosno utišava pojedine vitalne funkcije kao odgovor na različite vanjske i unutarnje zahtjeve i time se prilagođava novonastalim uvjetima, Sterling i Eyer su definirali kao *alostazu* (Sterling i Eyer, 1988). Ako homeostazu opišemo kao stabilnost fizioloških sustava neophodnih za

održanje života - tjelesna temperatura, razina glukoze, zasićenost kisikom i pH - alostaza definira razliku između sustava koji su presudni za život i onih koji služe pri održavanju ravnoteže među njima, reagirajući na promjene okoline i samog organizma tijekom životnog vijeka. Drugim riječima, alostaza je postizanje stabilnosti putem stalnih promjena, a njezini primarni sustavi su hormoni osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HPA od engl. hypothalamic-pituitary-adrenal), kateholamini i citokini. Kod zdravog čovjeka fiziološki se mehanizmi lako i brzo prilagođavaju promjenama te "uključuju" i "isključuju" sinkronizirajući odgovor prema zahtjevima okoline. Amplituda alostaze viša je u zdravlju nego u bolesti i viša je kod mlađih jedinki u odnosu na starije. Učestale promjene fizioloških procesa u smislu povećanja i smanjenja aktivnosti postupno iscrpljuju organe i tkiva organizma te go dovode u stanje podložnosti prema bolestima, odnosno u stanje *alostatskog opterećenja*. Svaka adaptivna reakcija, naime, ako je kratkotrajna, za organizam znači zaštitu, međutim, njezina dugotrajna aktivacija postaje štetna. Jedan takav primjer su glukokortikoidi koji sudjeluju u alostatazi osiguravajući dostupnost energetske rezervama i potičući hranjenje, ali pretjerana aktivnost glukokortikoida, uslijed učestale i ponavljane aktivacije HPA-osovine dovodi do alostatskog opterećenja, porasta razine inzulina, odlaganja masti, arterioskleroze i hipertenzije (Brindley i Rolland, 1989; McEwen, 1999). Drugi sličan primjer je sudjelovanje kateholamina i steroidnih hormona u putovanju i pregrupiranju imunoloških stanica u organe i tkiva gdje se odvija upala, kao i njihov utjecaj na sekreciju citokina i kemokina unutar granica alostaze (Dhabhar i sur., 1995). Kronična aktivnost tih istih medijatora alostatsko je opterećenje zbog svog imunosupresivnog djelovanja (Dhabhar i McEwen, 1997; Dhabhar i McEwen, 1999).

Stresna je reakcija također sastavni dio alostaze, jer svojim fiziološkim i bihevioralnim reakcijama omogućava preživjeti u iznenadnoj opasnosti (gazela koja bježi pred lavom), a glavni medijatori tih reakcija su HPA-osovina i autonomni živčani sustav, oni isti koji sudjeluju u održavanju dnevnih ciklusa aktivnosti i mirovanja. Dok kateholamini osiguravaju dotok energije vitalnim organima, glukokortikoidi djeluju kao "antistresni" hormoni koji daju mogućnost da se ublaži ili isključi zaštitna reakcija koju je pokrenuo stresor (McEwen, 1998). Sve reakcije kojima se organizam nastoji vratiti u stanje složene ravnoteže zovemo *adaptacijskim reakcijama*. Adaptacijske reakcije su optimalan fiziološki odgovor

koji se odvija prema općem neurofiziološkom obrascu, a konačni cilj im je povratiti stanje ravnoteže organizma i zaustaviti izvor stresa. Zato ih možemo smatrati jednako korisnim i poželjnim odgovorom kao i bilo koje druge organske mehanizme unutar živog sustava (McEwen i Stellar, 1993; McEwen, 1998). No stres, kao prijetnja homeostazi, bez obzira na to je li stvaran ili zamišljen, znatno doprinosi alostatskom opterećenju. Dok je adaptivni odgovor posljedica kratkotrajne aktivacije HPA-osovine, patološki odgovor je najčešće rezultat prekomjerne produkcije stresnih hormona ili nemogućnosti da se utiša aktivirana HPA-osovina. Stres može dovesti do alostatskog opterećenja putem četiri osnovna mehanizma (McEwen, 1999): učestalim ponavljanjem stresne reakcije kroz duže vremensko razdoblje zbog niza različitih stresora koji slijede jedan za drugim ili su iznimno teški, pretjeranim izlaganjem stresnim medijatorima zbog nemogućnosti prilagodbe na istu vrstu stresora, nemogućnost organizma da "isključi" stresni sustav i konačno, kao posljedica neadekvatnog hormonskog odgovora u stresnoj reakciji, čime se omogućava ostalim sustavima, npr. upalnim citokinima, pretjerana aktivnost. Sposobnost adaptiranja ili pokretanja stresne reakcije može biti promijenjena uslijed genetičkih faktora ili ranijih životnih iskustava, a posebice u doba ranog razvoja, pa se tako znatno povećava mogućnost lošeg utjecaja stresa na kasniji tijek života. Stresori koji pogađaju interakciju majka-dijete a događaju se unutar vremenskog okvira ranog razvoja specifičnog za vrstu, rezultiraju trajno povišenom razinom hormona oslobađanja kortikotropina (CRH od eng. corticotropin-releasing hormon) i pretjeranom aktivnosti lokusa ceruleusa (LC), (Ladd i sur., 2000). Kronični stres može rezultirati trajnim povišenjem kortizola, međutim, ovisno o prirodi stresora, HPA-osovina može biti tonično inhibirana zbog kronične adaptacije na stresor (Heuser i Lammers, 2003). Posljedice pretjeranog ili preslabog fiziološkog odgovora stresnog sustava mogu pridonjeti razvoju već postojećih bolesti ili otvoriti mogućnost početku novih patoloških procesa. Osim toga, bihevioralni odgovor na stresor može se sastojati od poznate reakcije "borbe ili bijega" ili, pak, što je čest slučaj kod ljudi, uključiti ponašanja koja sama po sebi postaju prijetnjom zdravlju kao što su pretjerano uzimanje hrane, alkohola, pušenje ili bilo koji drugi oblik ovisnosti. Kada se radi o zamišljenim prijetnjama i potencijalno stresnoj situaciji u kojoj nema mogućnosti aktivno ukloniti izvor prijetnje, organizam dolazi u stanje pojačane tjeskobnosti i zabrinutosti što postaje osnova za razvoj psihičkih poremećaja (McEwen i Wingfield, 2003).

Najčešće bolesti povezane s trajnim ili produženim stresnim reakcijama su peptički ulkus, ulcerativni kolitis, reumatoidni artritis, astma, hipertenzija, zatim psihički poremećaji kao depresija i posttraumatski stresni poremećaj, neurodegenerativne bolesti (Alzheimerova bolest) te rak (McEwen i Stellar, 1993; Mayer, 2000; Reiche i sur., 2004).

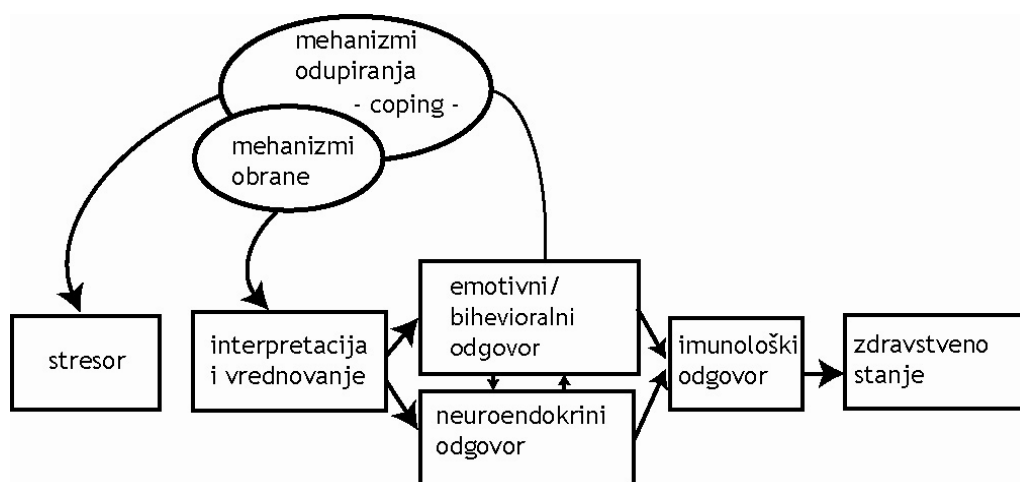
1.2.1 Vrste stresora i oblikovanje odgovora

Stresori mogu imati svoje izvorište u samom organizmu ili u njegovoj okolini, odnosno mogu biti vanjski i unutarnji, fizički i psihološki (Tablica 2). S obzirom na trajanje, stres može biti akutan, a, ukoliko je trajan i/ili se učestalo ponavlja, poprima karakter kroničnog (Chrousos i Gold 1992; Cohen i Herbert, 1996).

Tablica 2: Primjeri nekih vrsta stresora.

	AKUTNI STRESORI	KRONIČNI STRESORI
FIZIČKI (introceptivni)	toplina hladnoća	neizlječive bolesti dugotrajno gladovanje
	buka	dugotrajni fizički napor
	udar struje	
	fizički napor	
	kirurški zahvat	
	ranjavanje	
	infektivni agensi upala	
PSIHIČKI (ekstroceptivni)	strah nesigurnost	gubitak bračnog druga korota
	tjeskoba	rastava braka
	poniženost razočaranost	njegovanje teško oboljelog člana obitelji
	jako veselje	samoća
	odvajanje od majke	nezaposlenost
	socijalna izolacija	

Unatoč velikoj raznolikosti stresora, osnovni fiziološki principi stresne reakcije su slični. Ipak postoje uočljive individualne razlike u stresnom odgovoru (Tablica 1). Putovi aktivacije hipotalamičkih efektornih neurona tijekom introceptivnih stresora (crijevne infekcije, mukozne upale, unutrašnja krvarenja) jednostavni su refleksni odgovori posredovani na subkortikalnoj razini i funkcioniraju kao obrada visceralnih informacija. Ekstroceptivni (psihološki) stresori, međutim, uključuju moždane krugove u limbičkom sustavu te prefrontalni korteks, hipotalamus i amigdalnu. Uključivanje kortikalnih krugova igra važnu ulogu u podešavanju stresnog odgovora prema nekom kontekstu, odnosno prema fiziološkom statusu organizma, sjećanjima na prošla stresna iskustva, vjerovanja i subjektivnom značenju stresne situacije (Mayer, 2000). Konačni razvoj stresnog odgovora pojedinca znatno ovisi o dobi, spolu, reproduktivnom statusu, općoj psihosomatskoj reaktivnosti te njegovu općem zdravstvenom i nutritivnom stanju, njegovu prethodnom iskustvu, odnosno o nizu genetičkih i okolišnih faktora te o karakteru stresora (intenzitet, trajanje i učestalost) s druge strane (Henry i Stephensen, 1977; Kusnecov i Rabin, 1994; Baum i Posluzny 1999). Stresni sustav je dinamičan, prolazi kroz faze i donekle se, s vremenom, mijenja. Uočavanje promjena presudno je za razumijevanje odnosa između stresora i stresne reakcije (Eriksen i sur., 1999). Percepcija i vrednovanje stresora kao i specifičan, osoban način odupiranja stresu na različite načine utječe na stresni sustav. Produljena izloženost stresoru ili težim životnim stresorima može opteretiti nečiju sposobnost nošenja sa stresnim situacijama i dovesti osobu u stanje depresije. Istraživanja na životinjskim i humanim modelima pokazala su kako određeni tipovi stresora mogu promijeniti stresni odgovor i sustav povratne sprege smanjujući ekspresiju pre- i post-sinaptičkih receptora (adrenergičkih, serotonergičkih, glukokortikoidnih) (Fuchs i Fluegge, 1995; Fluegge, 1996) ili u najžešćem obliku izazvati strukturne promjene u regijama mozga (Bremner i sur., 1997 b).



Slika 1: Psihobiologija odupiranja stresu. (Prerađeno prema Olff, 1999).

Takve će promjene utjecati na individualni način odgovora kao i na generaliziranu stresnu reakciju koja će biti drukčija ili se odvijati u drukčijem smjeru. Opisane promjene u centralnoj adaptaciji na stresor su povećana sinteza i sekrecija CRH (Bremner i sur., 1997 a), pojačana aktivnost i osjetljivost centralnog noradrenergičkog (NA) sustava (Curtis i sur., 1995) te smanjena ekspresija i osjetljivost glukokortikoidnih receptora (GCR od engl. glucocorticoid receptor) (Yehuda i sur., 1995). Kao posljedice ovih promjena u središnjem stresnom sustavu mogu se dogoditi sekundarne promjene u receptornom sustavu perifernog tkiva. U patološkim situacijama promjene u oba ta sustava su trajne. Slika 1 pokazuje kako stresor najprije mora biti percipiran, interpretiran i vrednovan, a emotivni i bihevioralni odgovori koji potom uslijede određeni su specifičnim obrambenim mehanizmima kao i individualnim načinima odupiranja osobe (Tablica 3). Tako će se npr. pojedinac s instrumentalnim tipom odupiranja aktivno suprotstaviti stresoru i pokušati preuzeti kontrolu, dok će osoba s obrambenim tipom odupiranja promijeniti svoj način percepcije stvarnosti želeći tako umanjiti ili čak potisnuti vlastitu emotivnu reakciju. Palijativni mehanizam odupiranja nastoji umanjiti uzbuđenje koje stresor izaziva metodama relaksacija ili pak alkoholom, nikotinom ili drogama (Olff, 1999).

Tablica 3 : Moguće reakcije na stres.

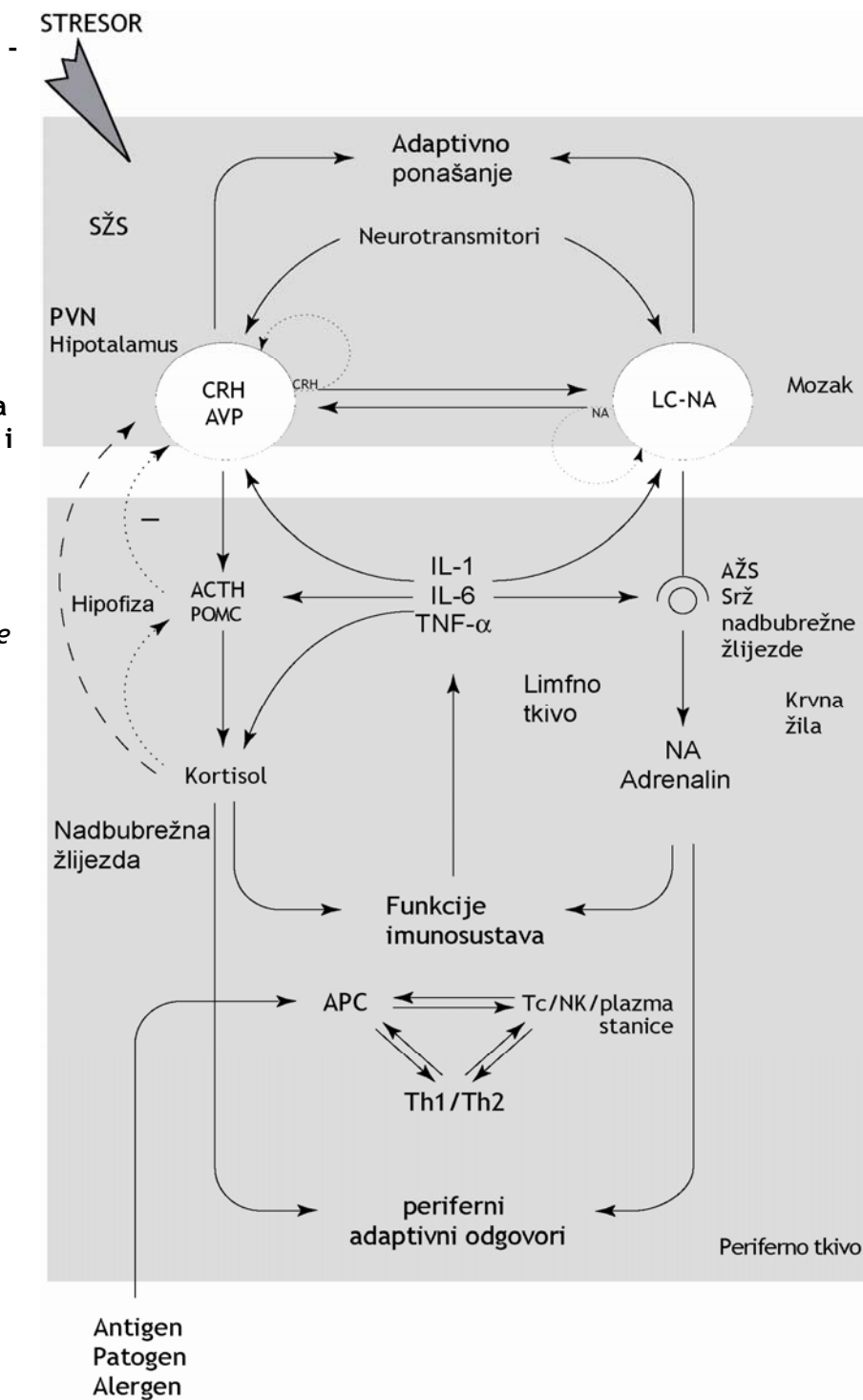
Emocionalne posljedice	Kognitivne posljedice	Fizičke posljedice	Promjene interpersonalnih odnosa
šok	oslabljena koncentracija	umor, iscrpljenost	konfliktnost
prestravljenost	nemogućnost donošenja odluke	nesanica	povlačenje od društva
preosjetljivost	oslabljeno pamćenje	opterećenje krvožilnog sustava	gubitak intimnosti
sram	nevjerica	iznenađenost	otuđenost
ljutnja	košmar	pretjerana pobudljivost	oslabljena radna sposobnost
krivica	noćne more	tjelesna bol	oslabljena sposobnost učenja
potištenost i tuga	gubitak samopoštovanja	oslabljena imunološka zaštita	nemogućnost zadovoljenja
emotivna otupjelost	gubitak samopoticanja	glavobolje	nepovjerenje
bespomoćnost	samookrivljavanje	probavne smetnje	eksternalizacija krivnje
gubitak osjećaja zadovoljstva	prisilne misli	gubitak teka	eksternalizacija osjetljivosti
gubitak osjećaja sreće	disocijativnost	podložnost bolestima	osjećaj napuštenosti/odbačnosti
gubitak osjećaja ljubavi	radikalne promjene stavova	oslabljen libido	pretjerana brižnost

(Prerađeno prema: <http://www.linkinwithvictims.org/resource/reactions.php>).

1.3 Fiziološki mehanizmi stresnih reakcija

Nadzor i upravljanje homeostazom te kontrolu u komunikaciji s okolnim svijetom osiguravaju tri sustava: središnji živčani sustav (SŽS), hormonski sustav i imunostav. Svaki od njih je zasebna cjelina sa svojim pravilima i zakonitostima, ali međusobno surađuju, izmjenjuju informacije i nadopunjuju se. Preduvjet za održanje ravnoteže je brz protok informacija u svim smjerovima, te integracija širokog repertoara fizioloških i mentalnih reakcija (Slika 2). Složena višesmjerna komunikacija između sustava temelji se na komunikacijskoj mreži solubilnih molekula (neurotransmitori, neuropeptidi, hormoni i citokini) te njihovih receptora na površini stanica.

Slika 2 : Shematski prikaz međudjelovanja živčanog, hormonskog i imunostava. AŽS, autonomni živčani sustav;
LC, lokus ceruleus;
NA, noradrenalin;
PVN, paraventricularne jezgre;
CRH, hormon oslobađanja kortikotropina;
AVP, arginin vazopresin;
SŽS, središnji živčani sustav;
POMC, proopiomelanokortin;
ACTH, adenokortikotropni hormon;
APC, antigen-prezentirajuće stanice;
Tc, T-citotoksički limfociti;
NK, urođenobilačke stanice
(Prerađeno prema Elenkovu i Chrousosu, 1999).



Koncept dvosmjerne komunikacije između imunostava i živčanog tkiva (Sternberg, 1989; Goetzl i Sreedharan, 1992; Couraud, 1994; Blalock, 1994; Weigent i Blalock, 1995) temelji se na tri činjenice :

1. Živčani završeci izravno inerviraju primarne i sekundarne limfne organe i u bliskom su kontaktu sa stanicama imunostava. Noradrenergička i peptidergička inervacija limfnih organa najbolje je opisana kod štakora. U parenhimu koštane

srži, timusa, slezene, limfnih čvorova i limfnom tkivu mukoze gusto su rasprostranjeni neuropeptidni živčani završeci iz kojih se otpuštaju supstancija P, somatostatin ili vazoaktivni intestinalni peptid (Felten i Felten, 1994). Svjetlosnim i elektronskim mikroskopom u slezeni su uočeni noradrenalinski živčani završeci u blizini limfocita. Ove veze su neposrednije od veza živčanih završetaka s glatkim mišićnim stanicama i opisane su kao sinapsama slične veze koje karakterizira oslobađanje transmittora u sinaptičku pukotinu i postsinaptička aktivacija receptora. U koštanoj srži, slezeni i timusu opisani su živčani završeci postganglijskih simpatičkih NA-neurona. NA-inervacija primarno zahvaća područja u kojima se nalaze T-limfociti (periarteriolarne limfne omotač slezene, parakortikalna zona limfnog čvora i korteks timusa) i područja bogata makrofazima (marginalna zona slezene i medula limfnog čvora) (Felten i Felten, 1994).

2. Stanice živčanog, endokrinog i imunostava imaju iste receptore i ligande (Tablica 4 i 5). Na površini leukocita nalaze se vezna mjesta za neurotransmitore (α - i β -adrenoceptori za kateholamine, muskarinski i nikotinski receptori za acetilkolin, dopaminski receptori), hormone i neuropeptide (Madden i Felten, 1995). Nadalje limfociti mogu, osim citokina, proizvoditi neurohormone, neuropeptide i neurotransmitore (kateholamini i acetilkolin) koji na mjestu upale djeluju autokrino i parakrino. U nestimuliranim normalnim leukocitima utvrđena je mRNA CRH. Humani i mišji limfociti mogu sintetizirati mRNA za proopiomelanokortin (POMC od engl. proopiomelanocortin), prekursor adenokortikotropina (ACTH od engl. adenocorticotrophic hormone), a ovaj se može naći u limfocitima potaknutim s CRH-om i arginin vazopresinom (AVP) (Weigent i Blalock, 1995).

S druge strane, u hormonskim stanicama prednjeg režnja hipofize nađen je interleukin (IL)-1 β i njegova mRNA, a astrociti i mikroglia stanice stimulirane lipopolisaharidom (LPS) otpuštaju IL-6 (Weigent i Blalock, 1995). Receptori za citokine, faktor nekroze tumora (TNF od engl. tumor necrosis factor)- α , IL-1 i IL-6, nalaze se u gotovo svim regijama mozga i eksprimirani su kako na infiltriranim leukocitima tako i na glija-stanicama, moždanim epitelnim stanicama, te na neuronima (Tablica 5) (Van Dam i sur., 1996; Rothwell i sur., 1996).

Tablica 4 : Receptori za neuropeptidne hormone na stanicama imunostava.

Receptor	Vrsta stanice
adrenokortikotropin	T- i B- limfociti štakorske slezene
β -endorfin	slezena
tirotropin	neutrofili, monociti, B-limfociti
prolaktin	humani i mišji T- i B-limfociti
GH	štakorski, mišji i humani limfociti periferne krvi te stanice
CRF	humani limfociti periferne krvi
TRH	T-stanične linije
LHRH	timociti štakora
SOM	humani limfociti periferne krvi
NA, A	T-limfociti, NK-stanice

(Prema Weigentu i Blalocku, 1995).

Tablica 5 : Neki citokini i njihovi receptori identificirani na različitim tipovima živčanih stanica.

Citokin	Neuron	Astrocit	Oligodendrocit	Mikroglia
IL-1	C/R	C/R	C/R	C
IL-2	C/R		R	R
IL-3	C/R	C/R	R	R
IL-4		R	R	R
IL-5		C		C/R
IL-6	C/R	C/R		C/R
IL-7		R	R	R
IL-8	R	C/R		R
IL-9		R		
IL-10		C/R		C/R
IL-11		C		
IL-12				C
IL-15		C		C
TNF- α	R	C/R	R	C/R
IFN- γ		C/R		R
TGF- β		C/R	C/R	C/R
GM-CSF	R	C/R	R	R
M-CSF		C	R	C/R

C-citokin; R-receptor (Prema Sternberg, 1997)

3. *Interakcija receptora s ligandom dovodi do promjene u funkciji stanica obaju sustava.* Nakon 30 minuta od davanja kateholamina ili akutnog stresa limfociti se mobiliziraju u periferiju te dolazi do prolazne limfocitoze. Ubrzo slijedi porast broja granulocita. Istraživanja su pokazala da kateholamini pretežno djeluju na cirkulaciju urođenoubilačkih (NK od engl. natural killer) stanica i granulocita dok broj T- i B-limfocita ostaje u većini slučajeva nepromijenjen. Glavni izvori novo recirkulirajućih limfocita su marginalne zone venula (marginalni pul) i slezena, a granulociti prelaze u cirkulaciju uglavnom iz marginalnog pula i pluća. Promjene u recirkulaciji limfocita posreduju β_2 -adrenoceptori dok α -adrenoceptori posreduju pri premještanju granulocita (Bachen i sur., 1995; Benschop i sur., 1996 a i b; Schedlowski i sur., 1996). Istraživanja *in vitro* su pokazala da nazočnost noradrenalina ili drugih β -agonista na početku stanične kulture pojačava proizvodnju primarnih antitijela i citotoksičnost T-limfocita. Nasuprot tome, dodavanje NA ili β -agonista u efektorskoj fazi dovodi do supresije ispitivanih staničnih funkcija. Može se zaključiti kako stanični odgovor ovisi o trenutku prijenosa signala, vrsti stanica koja prima signal, kao i stupnju aktivacije same stanice (Felten i Felten, 1994).

Citokini, s druge strane, djeluju na funkcije neuroendokrinog sustava (Tablica 6).

Tablica 6 : Djelovanje citokina na različite neuroendokrine sustave.

Citokin	Neuroendokrini hormon				
	ACTH	TSH [*]	PRL ^{**}	GH ^{***}	IH ^{****}
IL-1	+	-	+	+	-
IL-2	+	+	+	-	-
IL-6	+	-	0	-	0
TNF	+	-	+	+	?
IFN- γ	+	-	0	-	?

(Prema Weigentu i Blalocku, 1995).

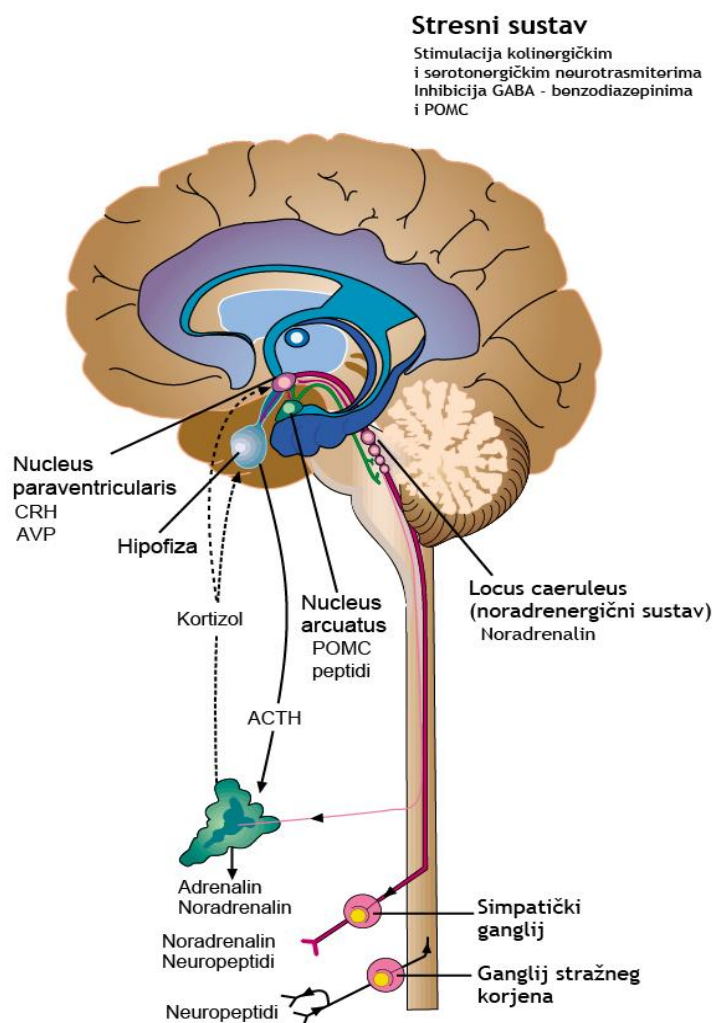
faktor oslobađanja tireotropina; ^{*} prolaktin; ^{**} hormon rasta; ^{***} luteinizirajući hormon

Pokazano je da citokini djeluju na oslobađanje mnogih neurotransmitora (NA, serotonin, acetilkolin) i neuropeptida (CRH, somatostatin, supstancija P, opioidi, vazoaktivni intestinalni peptid) u različitim regijama mozga. Za pojedine citokine (IL-6, TNF- α , IL-8, IL-4, IL-2) se zna da su važni u procesima diferencijacije i rasta neurona kao i u preživljavanju te obnavljanju oštećenih neurona *in vitro*. Funkcije neurona su pod izravnim utjecajem glija-stanica koje su važan izvor citokina i mjesto njihova djelovanja u mozgu (Rothwell i Hopkins, 1995; Hanisch i Quirion, 1996; Tomimoto i sur., 1996).

1.3.1 Akutni stres

Odgovor organizma na stres započinje integracijom moždanih struktura kao što su subregije hipotalamusa (paraventrikularne jezgre, PVN) amigdala te grisea periaqueductalis. U ove strukture informacije stižu visceralnim, somatskim aferentnim putovima te iz kortikalnih područja. Kortikalni impulsi stižu iz prefrontalnog korteksa i limbičkih subregija (anterior cingulae te insular cortices). Kao odgovor moždana mreža šalje izlazne impulse u hipofizu i pontomedularne jezgre iz kojih započinju neuroendokrini odnosno autonomni signali prema tijelu. Ovaj centralni stresni krug pod kontrolom je povratne sprege serotonergičkih i noradrenergičkih monoamina te glukokortikoidima koji ostvaruju inhibitornu kontrolu putem receptora u medijalnom prefrontalnom korteksu i hipokampusu. Osim ovih središnjih, usporedni izlazni signali su: autonomni živčani sustav, HPA-osovina, endogeni sustav za kontrolu boli i ascendentni aminergički put (Slika 3) (Mayer, 2000).

Slika 3 : Glavne komponente centralnog i perifernog stresnog sustava. Prikazane su paraventrikularne jezgre i locus caeruleus (noradrenergički sustav) te dijelovi perifernog stresnog sustava, osovina hipofiza-nadbubrežna žlijezda i simpatički živčani sustav. Detaljan opis slike nalazi se u tekstu. CRH, hormon oslobađanja kortikotropina; ACTH, adrenokortikotropin; AVP, arginin vazopresin; POMC, proopiomelanokortin. (Prema Chrousos, 1995).



Za nekoliko minuta od akutnog stresa neuroni paraventricularnih jezgara hipotalamusa luče CRH koji, otpušten u portalni krvotok hipofize, potiče izlučivanje POMC-a iz bazofilnih stanica prednjeg režnja hipofize. Proopiomelanokortin se cijepa na ACTH i β -endorfin. ACTH u kori nadbubrežne žlijezde izaziva lučenje glukokortikoida, napose kortizola. Hipotalamus i sustav lokus ceruleusa međusobno su povezani pozitivnom povratnom spregom u kojem svaki od sustava potiče rad onog drugog. CRH stimulira produkciju tirozin-hidroksilaze, enzima važnog za sintezu noradrenalina, te time pospješuje njegovu sintezu i izravno aktivira simpatički živčani sustav, a noradrenalin pojačava sintezu CRH u paraventricularnim jezgrama hipotalamusa (Axelrod i Reisine, 1984; Harbuz i Lightman, 1992; Sternberg i sur., 1992; Madden i Felten, 1995; Herman i Cullinan, 1997). Funkcija CRH nije ograničena samo na prijenos signala iz hipotalamusa u hipofizu već služi i kao neurotransmitor unutar SŽS koji pokreće autonomni i bihevioralni odgovor na stres (Heuser i Lammers, 2003). Kada se inicira izravno u mozak CRH izaziva stanje depresije i potištenosti te aktivira periferne kateholamine. Aktivacija noradrenergičkih neurona lokusa ceruleusa putem CRH iz amigdale presudna je za bihevioralni odgovor na stresor, a odvija se preko CRH₁-tipa receptora (Heuser i Lammers, 2003).

U stresu snažna aktivacija simpatičkog sustava, koja se naziva *simpatičkim masovnim izbijanjem* (Guyton, 1989 a), ima za cilj osposobiti organizam za obavljanje napornog rada kako bi se prevladao stresor i organizam izvukao iz stresne situacije. Ova reakcija još je poznata kao reakcija *borbe ili bijega*, a da bi se izvršila potrebna je pojačana aktivnost svih sustava organizma koji će osigurati obavljanje zahtjevnog mišićnog rada i staviti organizmu na raspolaganje sve izvore raspoložive energije (Tablica 7). Fiziološke funkcije kao što su nagon za hranjenjem i reprodukcijom te seksualno ponašanje i rast, u stresu su inhibirane jer, evolucijski gledano, nisu presudne za opstanak jedinke u momentu stresa (Rivier i sur., 1986; Guyton, 1989 b; Gamulin, 1995).

Tablica 7 : Stresni adaptacijski mehanizmi.

Fiziološki adaptacijski mehanizmi
adaptivno preusmjeravanje energije
preusmjeravanje kisika i hranjivih tvari u SŽS i mišiće
Promjena kardiovaskularnog tonusa, povišen krvni tlak i broj srčanih otkucaja
pojačanje respiracije
ubrzanje metabolizma (glukoneogeneza i lipoliza)
detoksifikacija
inhibicija rasta i reproduktivnog sustava
Adaptacijski mehanizmi ponašanja
adaptivno preusmjeravanje ponašanja
akutno pojačanje adaptivnih i inhibicija neadaptivnih živčanih puteva
pojačana pobudljivost i opreznost
Pojačana spoznajnost, budnost i fokusiranje pažnje
potisnut nagon za hranjenjem
potisnut nagon za reprodukcijom

(Prerađeno prema Chrousos i Goldu, 1992).

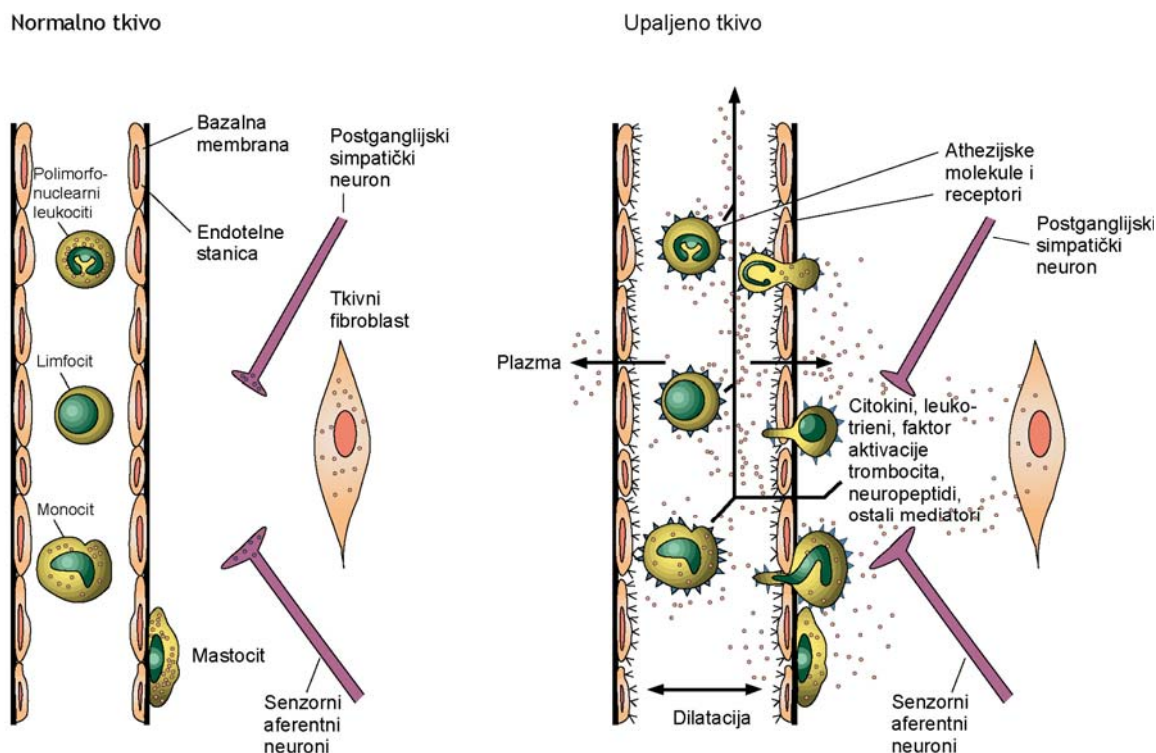
1.3.2 Upala

Najčešći introceptivni stresori su infekcije patogenima te oštećenost tkiva iritacijom ili ranjavanjem, što pokreće upalnu reakciju. Na mjestu upale, aktivirani leukociti iz tkiva i oni privučeni iz cirkulacije, endotelne stanice i živčani završeci neurona izlučuju brojne medijatore upale (Slika 4): citokine, neuropeptide, neurohormone, prostanoide, faktore aktivacije trombocita (Tablica 8).

Tablica 8: Citokini i ostali medijatori upale koji izravno djeluju na HPA-osovinu.

<i>Proupalni citokini</i>	
	TNF- α
	IL-1 α i IL-1 β
	IL-6
<i>Ostali citokini</i>	
	IFN- α
	IFN- γ
	IL-2
<i>Faktori rasta</i>	
	faktor transformirajućeg rasta (TGF- β)
	epidermalni faktor rasta (EGF)
<i>Lipidni medijatori</i>	
	prostanoidi
	faktor aktivacije trombocita (PAF)

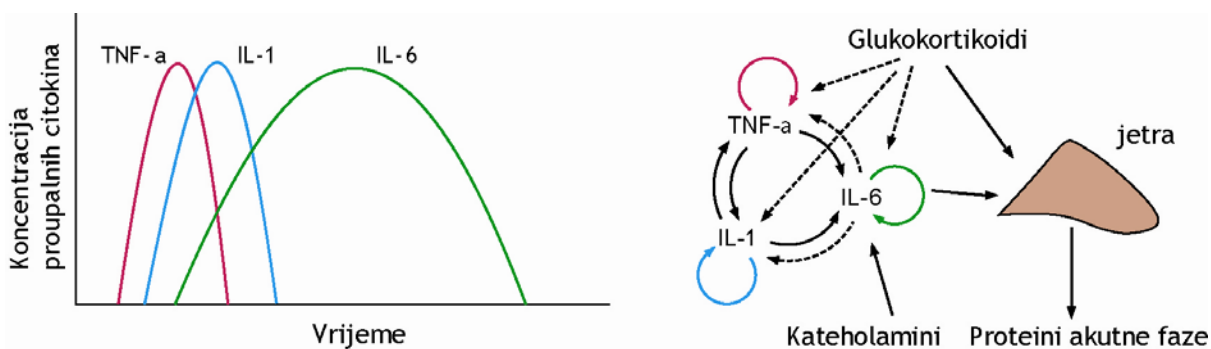
(Preuzeto od Chrousosa, 1995).



Slika 4 : Zbivanja u upali i prijenos signala u mozak. Cirkulirajući leukociti, stanice imunostava u tkivu, terminalni završetci postganglijskih simpatskih i osjetilnih aferentnih neurona prikazani su na lijevoj slici u normalnom tkivu. Na desnoj slici su zbivanja u upaljenom tkivu. Aktivirani leukociti i endotelne stanice eksprimiraju adhezijske molekule i njihove receptore na svojoj površini. Stanice, privučene kemotaksijskim gradijentom, priljubljuju se za stijenke kapilara i dijapedezom prelaze u upaljeno tkivo. Migrirajući leukociti, tkivni makrofagi, stanice tkiva i periferni živci izlučuju citokine, leukotrijene, faktor aktivacije trombocita, neuropeptide, neurohormone i druge medijatore upale. Neke od tih tvari kao što su leukotrijeni, IL-6, IL-8, TGF- β i CRH imaju kemotaktička svojstva. Proupalni citokini IL-1, IL-6 i TNF- α prelaze u cirkulaciju izazivajući sistemske efekte kao što su sinteza proteina akutne faze, "bolesno ponašanje", porast temperature i aktivaciju HPA-osovine. Upalni medijatori podražuju živčane završetke aferentnih osjetilnih neurona i autonomnog živčanog sustava čim se informacija o upali prenosi do mozga. (Preuzeto od Chrousosa, 1995).

Među najvažnije medijatore upalne reakcije spadaju *proupalni citokini* - TNF- α , IL-1 i IL-6 koje proizvode i otpuštaju aktivirani monociti. TNF- α se obično pojavljuje prvi te, s malim vremenskim razmakom slijede IL-1 β , a potom IL-6 (Slika 5) (Akira i sur., 1990; Hesse i sur., 1988; van Deventer i sur., 1990). Lokalno, ovi citokini djeluju parakrino pojačavajući vlastitu sintezu i upalnu reakciju. TNF- α i IL-1 β uzajamno se stimuliraju i zajedno potiču proizvodnju IL-6, dok IL-6 inhibira njihovu sekreciju. Oni ulaze u cirkulaciju i uz sistemska reakcija izazivaju akutnu stimulaciju HPA-osovine bilo samostalno ili u sinergiji (Perlstein i sur., 1993).

Putem svojih receptora u mozgu proupalni citokini izazivaju porast temperature, umor, pospanost, gubitak apetita, interesa i letargiju, dakle stanja koja nazivamo *bolesnim ponašanjem* (Rothwell, 1991; Gemma i sur., 1997; Dantzer, 2001). Takvi se simptomi mogu potaknuti kod zdrave jedinice centralnim ili perifernim davanjem rekombinantnih citokina ili bakterijskog lipopolisaharida. Osim toga, u bolesne jedinice simptomi bolesti mogu se dokinuti davanjem antagonista citokina, blokiranjem njihovih receptora ili davanjem kortikosteroida koji kočje njihovu sintezu i otpuštanje (Chrousos, 1995; Watkins i sur., 1995 a). Pojava simptoma bolesti prilikom virusne ili bakterijske infekcije značajan je dokaz uzajamne komunikacije živčanog i imunostava.

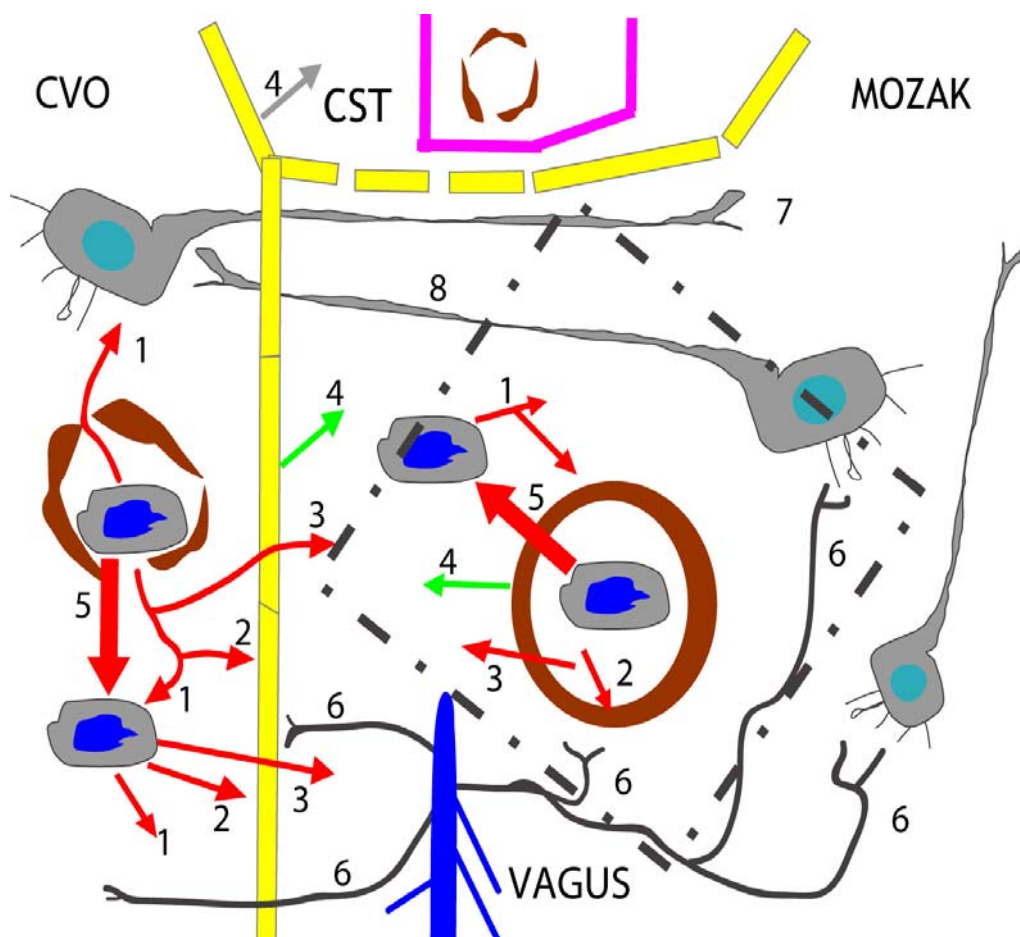


Slika 5 : Međusobno djelovanje proupalnih citokina te utjecaj glukokortikoida i kateholamina. Lijeva slika prikazuje dinamiku pojavljivanja citokina na mjestu upale. *TNF- α* se izlučuje prvi, slijedi *IL-1*, a *IL-6* je posljednji. Svaki od tih citokina stimulira vlastito izlučivanje (desna slika). *TNF- α* i *IL-1* stimuliraju se uzajamno i sinergistički potiču lučenje *IL-6*. *IL-6* koči lučenje *TNF- α* i *IL-1*. Glukokortikoidi inhibiraju lučenje sva tri citokina kao i njihovo djelovanje na ciljna tkiva, osim u slučaju otpuštanja proteina akutne faze u jetri gdje djeluju sinergistički s *IL-6*. Kateholamini kontroliraju upalnu reakciju potičući proizvodnju *IL-6* koji koči ostale citokine. Pune crte znače stimulaciju, a isprekidane inhibiciju. (Preuzeto od Chrousosa, 1995).

Mehanizam aktivacije HPA-osovine djelovanjem proupalnih citokina temelji se na poticanju sekrecije CRH i AVP-a u hipotalamusu, a pri povišenoj koncentraciji ili zbog produženog izlaganja, ovi citokini direktno stimuliraju otpuštanje ACTH iz hipofize te glukokortikoida iz nadbubrežne žlijezde (Wilder, 1995) Svi ostali medijatori upale pospješuju i pojačavaju ove procese. Interleukin-1 β je snažan aktivator otpuštanja CRH i AVP-a iz hipotalamusa i može izravno stimulirati hipofizu na produkciju ACTH u prisutnosti CRH (Rothwell, 1991; Xia i sur., 1996 a). Kod ljudi *IL-6* povišuje koncentraciju CRH, AVP-a i kortizola u plazmi (Sapolsky i sur., 1987; Perlstein i sur., 1993; Komaki i sur., 1994), s glukokortikoidima

sinergistički stimulira proizvodnju proteina akutne faze u jetri, a njegova koncentracija povišena je u serumu nakon stresa što je, najvjerojatnije, posredovano djelovanjem kateholamina preko β_2 -adrenergičkih receptora (van Gool i sur., 1990; Hirano i sur., 1990). Postavlja se pitanje na koji način citokini, oslobođeni na periferiji, prenose informacije u mozak? Postoji niz različitih mehanizama kojima proupalni citokini dopiru do moždanih neurona (Slika 6) (Banks i Kastin, 1991; Watkins i sur., 1995 a).

Citokini mogu potaknuti endotelne i glija stanice s luminalne strane vaskularnog endotela na izlučivanje prostanglandina koji, kao sekundarni medijatori, mogu doseći hipotalamičke neurone odgovorne za sintezu CRH i AVP-a (Imura i sur., 1991; Tilders i sur., 1994). Drugi način je da citokini mogu sami dosegnuti CRH- i AVP-neurone u području medije eminence izvan krvno-moždane barijere (Perlstein i sur., 1993; de Simoni i sur., 1990). Upala, potom, može aktivirati HPA-osovinu indirektno preko stimulacije noradrenergičkog središnjeg stresnog sustava putem neurona u području areje postreme koja je također izvan krvno-moždane barijere, a uključuje kaskadu endotel-glija-neuroni. Nadalje, u upaljenom tkivu nalaze se živčani završeci aferentnih somatosenzoričkih i visceralnih neurona te neurona koji prenose osjete boli i koji signaliziraju kroz leđnu moždinu ili cerebralne nervne puteve u noradrenergički i CRH-centralni stresni sustav (Watkins i sur., 1995 b; Goehler i sur., 1999). Mehanizmi prijenosa signala s periferije uključuju i citokinsku stimulaciju vagusnih aferentnih puteva te signalizaciju kroz krvno-moždanu barijeru. U obrnutom smjeru glukokortikoidi direktno inhibiraju stanice imunostava. Neuropeptidi, koje lokalno proizvode senzorni aferentni živčani završeci, simpatički postganglijski neuroni i stanice imunostava, djeluju endokrino. Autonomni sustav utječe na stanice imunostava preko specifičnih simpatičkih postganglijskih neurona, lokalnom sekrecijom pro- i antiupalnih tvari i humoralno putem cirkulirajućih kateholamina koji suprimiraju staničnu aktivnost urođenoubilačkih NK-stanica, a potiču sintezu IL-6 (Chrousos, 1995).



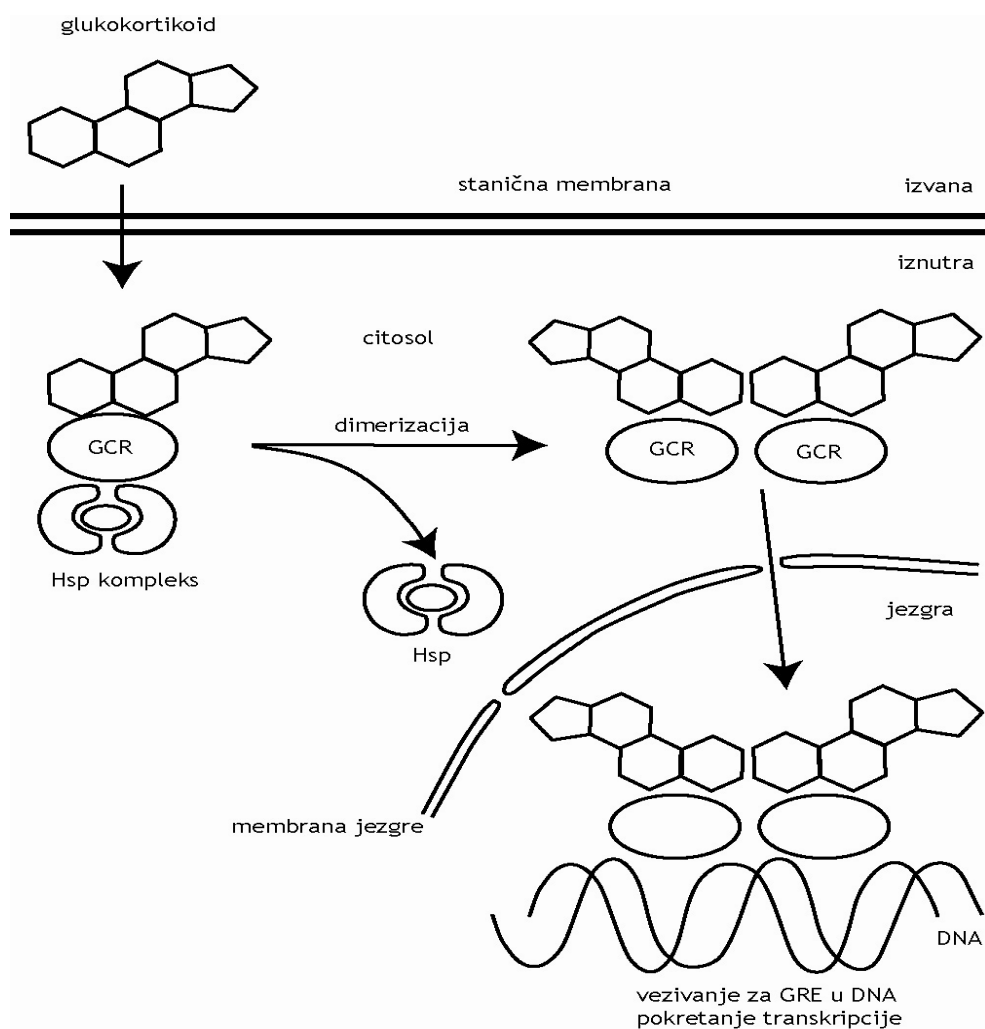
Slika 6: Neuroimunološki komunikacijski putevi. Prikazani su vagus i tri odjeljka: CVO, cirkumventrikularni organi; CST, cerebrospinalna tekućina i ostala moždana tkiva.

Smeđe: krvne žile, propusne u CVO-u i CST-u; u mozgu nisu propusne i tvore krvno-moždanu barijeru. Ružičasta: ependimal tvori koroidni plexus. Žuto: taničitična i ependimalna barijera između CVO-a i CST-a te CVO-a i moždana tkiva; propusna je između CST-a i moždana tkiva. Plavozeleno: jezgre neurona. Sivo s plavim jezgrama: su stanice imunostava u cirkulaciji ili tkivu. Plavo: vagus. Velike crvene strjelice pokazuju prijelaz imunoloških stanica između cirkulacije u odjeljak; male crvene stanice su neuroimunološke tvari koje potječu iz cirkulacije ili stanica imunostava; zelene strjelice su sekretorne tvari stanica krvno-moždane barijere (ependimalne, endotelne); crne linije su projekcije vagusa. Iscrtkani kvadrat je neurovaskularna jedinica. Neuroimunološke tvari podrijetlom iz cirkulacije ili iz stanica imunostava u cirkulaciji (5) mogu djelovati na tkivo u neposrednoj blizini (1), uključujući stanice krvno-moždane barijere (2) ili mogu proći kroz barijeru (3). Stanice barijere koje također mogu izlučivati neuroimunološke tvari (4). Projekcije vagusa (6) na stanice barijere, krvne žile, neurone i CVO. Neuronske projekcije iz CVO-a u moždano područje (7) i neurane projekcije iz moždanog tkiva u CVO (8). (Preuzeto od Banksa, 2004).

1.3.3 Glukokortikoidi i mehanizmi kontrole stresne reakcije

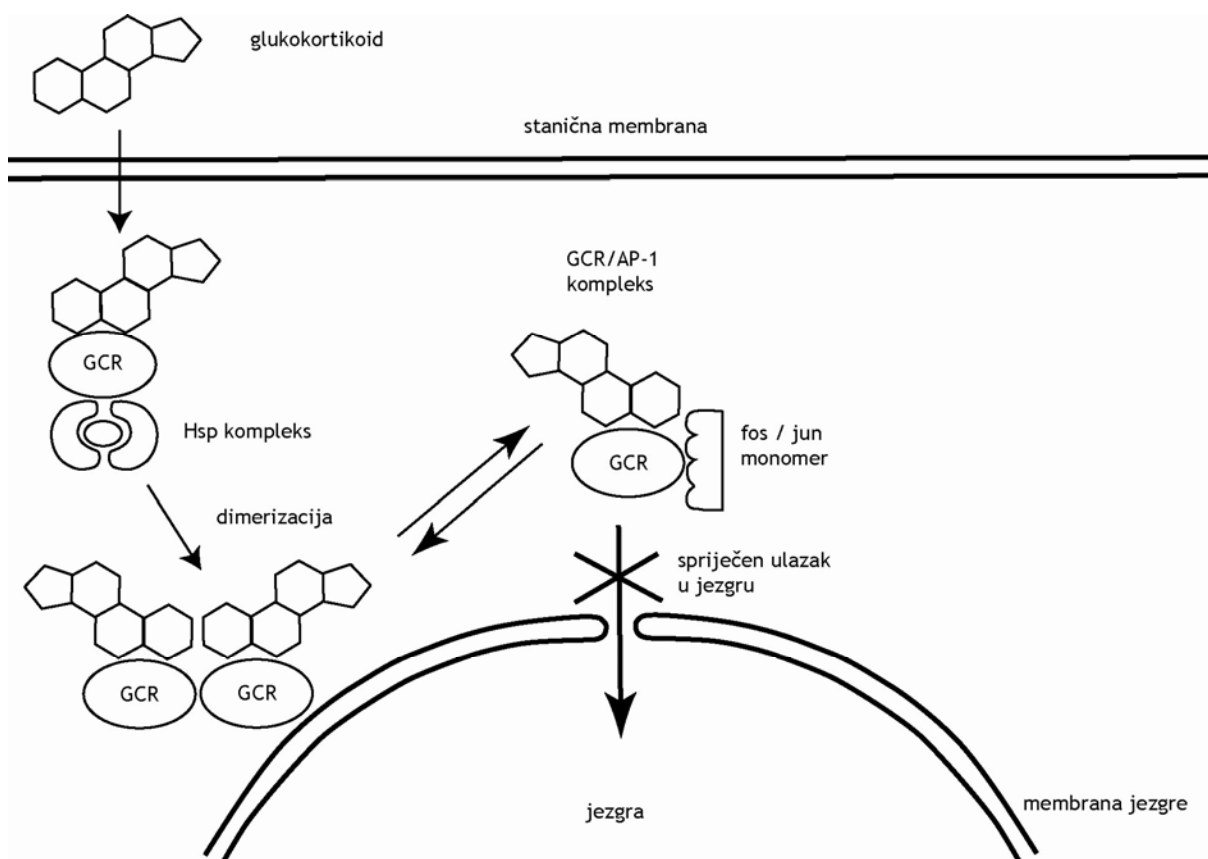
Uz CRH drugi važan medijator stresne reakcije je kortizol. Cjelokupna aktivnost HPA osovine, naime, regulirana je putem binarnog sustava glukokortikoidnih receptora (GCR) u hipokampusu. Kortizol se oslobađa iz kore

nadbubrežne žlijezde pod djelovanjem adrenokortikotropina iz hipofize. Njegova funkcija je preusmjeriti energiju za trenutne potrebe organizma u stresu, pa djeluje katabolički pojačavajući glukoneogenezu, razgradnju bjelančevina i lipolizu te povisuje razinu glukoze u jetri. Tijekom infekcije djeluje imunosupresivno i smanjuje upalne procese, a njegova razina je najviša u vrijeme maksimalne proizvodnje antitijela. Međutim, treba naglasiti kako su imunosupresivni učinci glukokortikoida uočeni *in vitro* posljedica korištenja mnogo većih koncentracija glukokortikoida od fizioloških te u određenim uvjetima upravo fiziološke koncentracije kortikosteroida mogu pospješiti imunološke funkcije (Ader i sur., 1995). Glukokortikoidi djeluju putem unutarstaničnih receptora (Slika 7).



Slika 7 : Aktivacija i djelovanje glukokortikoidnog receptora (GCR). *Hsp*, heat shock protein; *GRE*, elementi za odgovor na glukokortikoide u DNA. (Preuzeto od Waala, 1994).

Ti se receptori nalaze u gotovo svim stanicama koje imaju jezgru i zbog svog ubikvitarnog rasporeda glukokortikoidi mogu utjecati na sve stanice organizma. U odsutnosti hormona receptori se nalaze u citoplazmi u kompleksu s proteinima odgovornim za otpornost na povišenost temperature, Hsp 90 (od. engl. heat-shock protein), Hsp 56 (imunofilin) i kalretikulinom. Hormon slobodno difundira u stanicu gdje se veže za receptor s kojim tvori neaktivni kompleks. Receptor se sastoji od velike podjedinice (100 kDa) koja ima jedno vezno mjesto za hormon i dvije molekule Hsp 90 (90-kDa). Kompleks se aktivira otpuštanjem Hsp-a 90 i tako oslobađa vezno mjesto za DNA na veznoj podjedinici receptora. Kompleks prelazi u jezgru gdje se dimerizira te veže za nuklearne strukture tvoreći nuklearni kompleks. U jezgri receptor djeluje kao transkripcijski faktor i posebnom veznom domenom se veže za specifične sekvence DNA u ciljnom genu. Te se sekvence nazivaju elementi za odgovor na glukokortikoide (GRE od engl. glukocorticoid response elements). Vezanjem za GRE modulira se transkripcija pojedinih gena te ona može biti potaknuta ili potisnuta. Geni koje GRE pozitivno regulira uključuju one koji sudjeluju u glukoneogenezi (npr. tirozin-aminotransferaza u hepatocitima, alanin aminotransferaza) ili lipolizi (fosfoenol piruvat karboksikinaza), te direktnim djelovanjem glukokortikoida na DNA, razina ovih proteina raste. Geni koje GRE negativno regulira su npr. geni za pro-opiomelanokortin i prolaktin. Iako se zna kako glukokortikoidi utječu na ekspresiju različitih medijatora imunostava kao što su citokini ili atehzijske molekule, još nije definiran niti jedan primarni ciljni gen u stanicama imunostava kojeg bi GRE pozitivno regulirao niti bio odgovoran za supresivno djelovanje glukokortikoida. Takva regulacija je, zacijelo, sekundarni efekt (Munck i Guyre, 1991). Osim kao samostalni transkripcijski faktor, glukokortikoidi mogu ulaziti u interakcije s drugim transkripcijskim faktorima kao što su aktivator protein-1 (AP-1) i NF- κ B. Ovi su faktori odgovorni za aktivaciju gena čiji produkti sudjeluju u upali. Mehanizmom koji nazivamo ometanjem transkripcije, glukokortikoidi ulaze u interakciju s AP-1 (Newton, 2000) ili NF- κ B (Scheinman i sur., 1995) te sprječavaju njihovo transkripcijsko djelovanje (Slika 8). Novija istraživanja upućuju kako glukokortikoidi mogu interferirati u signalnom putu mitogenom-aktiviranom proteinskom kinazom (MAP kinaza) koji se također aktivira u upali (Lasa i sur., 2000; Saklatvala, 2002).



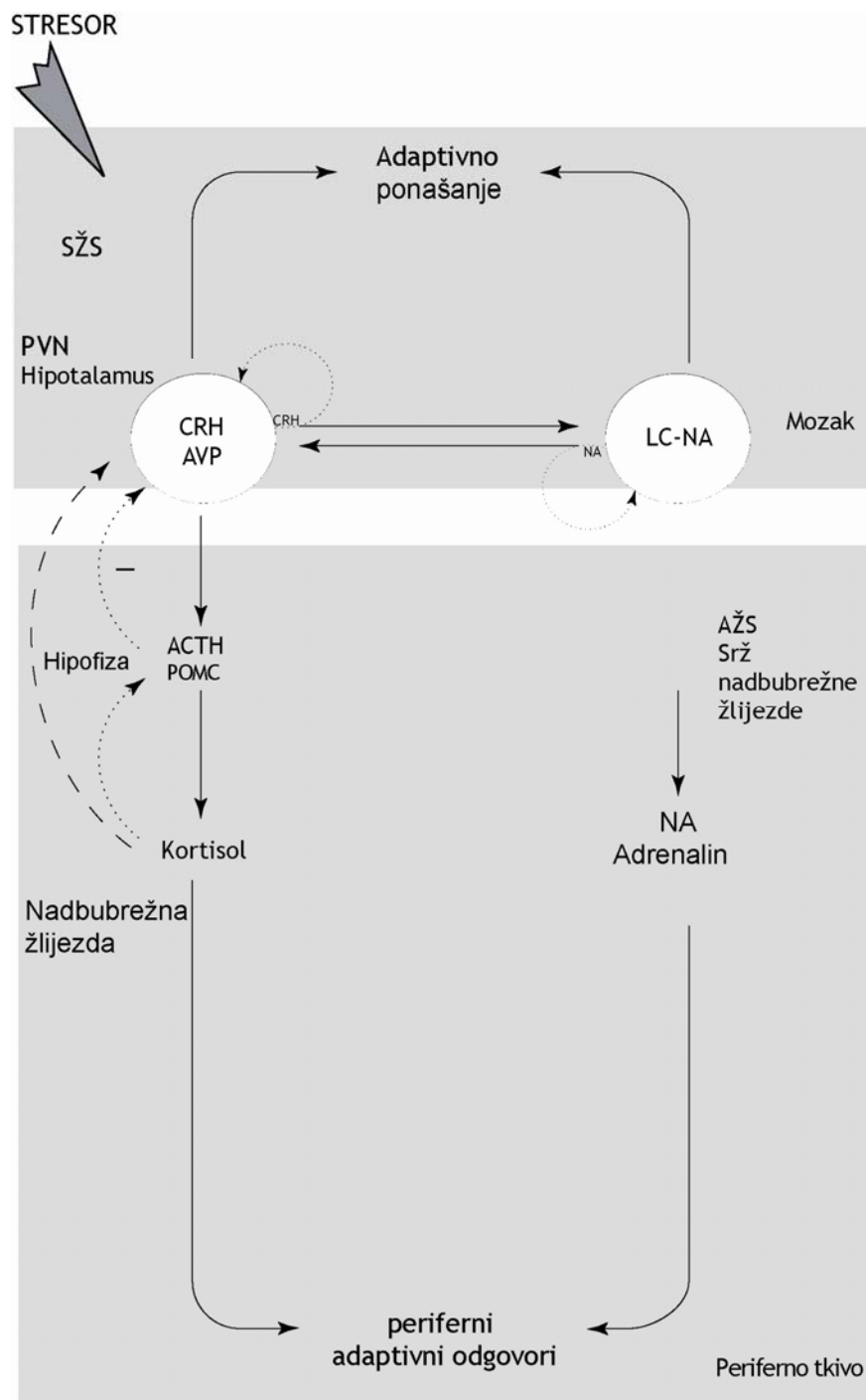
Slika 8: Prikaz interakcija glukokortikoidnog receptora (GCR) i transkripcijskog faktora AP-1 koje dovode do inhibicije transkripcije gena. (Preuzeto od Waala, 1994).

GCR spada u veliku superporodicu steroidnih receptora koja obuhvaća najpoznatije transkripcijske faktore eukariota, a uključuje receptore za mineralokortikoide, glukokortikoide, progesteron, estrogen, androgen, receptor za hormon štitnjače, vitamin D₃ i *trans*-retinoičnu kiselinu (McEwan i sur., 1997, Soontjens i sur., 1996). Receptori za navedene tvari pokazuju visoku homologiju u redosljedu aminokiselina u pojedinim domenama i zato postoji određena razina promiskuiteta tih receptora. Posebno visoka sličnost u građi receptora postoji između GCR-a i receptora za mineralokortikoide (MCR od engl. mineralocorticoid receptor) koji visokim afinitetom podjednako vezuju kortikosteroide i aldosteron. Glukokortikoidi djeluju putem dva podtipa unutarstaničnih receptora - tip I su MCR-i, a tip II su GCR-i. MCR-i imaju visoki afinitet za endogene kortikosteroide (kortizol kod ljudi i kortikosteron kod štakora) i glavna im je funkcija odgovor na dnevna bazalna kolebanja kortikosteroida i cirkardijalni ritam HPA-osovine (kod zdrave

osobe bazalna razina kortizola raste od 0,5 nM u večernjim satima do dnevnog maksimuma od 50 nM u ranim jutarnjim satima). Tip II ili GCR-i, s druge strane, imaju niži afinitet za endogene kortikosteroide od receptora tipa I i zato su značajni u akutnom stresu kada je razina glukokortikoida povišena (razina kortizola u stresu je iznad 150 nM) (Pariante i sur., 1995; Funder, 1996). U akutnom stresu glukokortikoidi koče sintezu CRH putem svojih receptora u paraventricularnim jezgrama hipotalamusa (Swanson i sur., 1989).

Budući da su stresne reakcije vrlo zahtjevne za organizam, zbog povišene aktivnosti svih sustava, potrebno ih je zaustaviti kako ne bi dovele do njegova potpunog iscrpljivanja. Glavni homeostatski mehanizam kontrole stresnih reakcija je negativna povratna sprega kojom se zaustavlja djelovanje pojedinih hormona HPA-osovine. Mehanizmi kontrole negativnom povratnom spregom djeluju na svim razinama od mozga do nadbubrežne žlijezde (Slika 9). Noradrenalin u lokusu ceruleus i CRH u paraventricularnim jezgrama zaustavlja vlastito lučenje ultrakratkom negativnom povratnom spregom. Njihovo lučenje koči i hormonom iz hipofize, ACTH, kao i glukokortikoidi (kratka i duga negativna povratna sprega) kore nadbubrežne žlijezde. Glukokortikoidi svojom negativnom spregom koče otpuštanje ACTH-a iz hipofize, a time i vlastito otpuštanje iz kore nadbubrežne žlijezde (Guyton, 1989 b; Sternberg i sur., 1992; Black, 1994; Gamulin, 1995). Za vrijeme infekcije povišenje glukokortikoida osigurava kontrolu imunoreakcija negativnom povratnom spregom kojom se koči proizvodnja upalnih, a potiče proizvodnja antiupalnih citokina, IL-10 i faktor transformirajućeg rasta (TGF, od engl. transforming growth factor)- β , snižava sinteza i ekspresija citokinskih receptora, koči proliferacija limfocita, ekspresija adhezivnih molekula, te utječe na pregrupiranje leukocita. (Claman, 1993; Watkins, 1995 a; Brattstand i Linden, 1996).

Sposobnost negativne povratne sprege u obuzdavanju HPA-osovine može biti oslabljena zbog stresa proživljenog u vrlo ranoj životnoj dobi, starenja ili iskustava s kroničnim i teškim emocionalnim/fizičkim stresorima (Van Cauter i sur., 1996; Heim i Nemeroff 2001; Heuser i Lammers, 2003). U bazalnom stanju HPA-osovinu karakterizira široki raspon varijacija uzrokovan dnevnim cirkadijarnim ritmom, dok je raspon kronično opterećene HPA-osovine znatno manji i uz trajnu hipersekreciju CRH cijeli se sustav ne može resetirati (Heuser i Lammers, 2003).



Slika 9 : Shematski prikaz kontrolnih mehanizama stresnih reakcija. *Hormon oslobađanja kortikotropina (CRH) koji otpuštaju neuroni hipotalamusa potiče (pune strjelice) aktivnost noradrenergičkih jezgara lokusa ceruleusa uz lučenje noradrenalina (NA) koji opet aktivira rad CRH-neurona. Ta međusobna pozitivna povratna sprega pod autokontrolom je ultrakratkih negativnih povratnih sprega (točkaste strjelice). Adrenokortikotropin (ACTH), čije lučenje iz hipofize potiče CRH, kratkom negativnom povratnom spregom (crkana strelica) zaustavlja aktivnost CRH-neurona i izaziva lučenje glukokortikoida iz kore nadbubrežne žlijezde. Glukokortikoidi kratkom negativnom povratnom spregom koče lučenje ACTH a dugom negativnom povratnom spregom (isprekidana strjelica) aktivnost CRH-neurona. (Prerađeno prema Elenkovu i Chrousosu, 1999).*

1.3.4 Stres i Th1/Th2 ravnoteža

Imunoreakcija je regulirana s jedne strane antigen-prezentirajućim stanicama (APC od eng. antigen presenting cells) - monociti/makrofagi, dendritičke stanice - koje su dio urođene imunosti a s druge strane citokinima različitih tipova ponoćničkih T-stanica (Th od engl. T helper) - Th1 i Th2 - koje su komponente stečene ili adaptivne imunosti. Th1-stanice prvenstveno izlučuju interferon (IFN)- γ , IL-2 i TNF- β , koji potiče efektorske mehanizma stanične imunosti, dok Th2-stanice luče IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13, kojima potiču i reguliraju mehanizme humoralne imunosti (Trinchieri, 1995; Mosmann i Sad, 1996; Elenkov i Chrousos, 1999). Mehanizmima stanične imunosti osigurava se zaštita od unutarstaničnih bakterija, protozoa, gljivica te nekih virusa, a mehanizmima humoralne imunosti od višestaničnih parazita, ekstracelularnih bakterija, nekih virusa, solubilnih toksina i alergena.

Naivni CD4-limfociti (Th0), koji još nisu susreli antigen, bipotentni su i služe kao prekursori za Th1- i Th2-stanice. Za proces diferencijacije Th-limfocita u jedan ili drugi tip presudni su citokini koje proizvode stanice urođene imunosti. Tako je upravo IL-12, koji izlučuju monociti/makrofagi i druge APC-e, jedan od značajnih citokina za usmjeravanje diferencijacije Th0-stanica u Th1. Ovaj citokin, uz IFN- γ , podrijetlom iz NK-stanica, i TNF- α , spona je između urođene i stečene imunosti, a svojim imunomodulacijskim djelovanjem potiče efektorske funkcije T-citotoksičkih (Tc) limfocita, NK-stanica i aktiviranih makrofaga, dakle, svih stanica koje su odgovorne za mehanizme stanične imunosti (Trinchieri, 1995). Zbog svog značaja pri usmjeravanu imunoreakcija u ranoj fazi upale, IL-12, IFN- γ i TNF- α smatraju se glavnim proupalnim citokinima.

Th1- i Th2-tip staničnog odgovora međusobno se isključuju. Interleukin-12 inhibira lučenje citokina tipa 2, a IL-4 i IL-10 citokine tipa 1. Stimulacijom rasta i aktivacijom mastocita i eozinofila te poticanjem diferencijacije B-limfocita u plazma-stanice kao i prekapčanje imunoglobulina u IgE, IL-4 i IL-10 promoviraju humoralnu imunost. Nasuprot tome, ovi citokini inhibiraju aktivaciju makrofaga, proliferaciju T-limfocita i proizvodnju proupalnih citokina (Trinchieri, 1995; Fearon i Locksley, 1996; Mosmann i Sad, 1996). Iz tih se razloga IL-4 i IL-10 smatraju glavnim antiupalnim citokinima.

Stres utječe na ravnotežu između Th1- i Th2-tipa staničnih reakcija, pomičući ravnotežu prema citokinima tipa 2 (Agarwal i Marshall, 1998; Elenkov i Chrousos, 1999; Glaser i sur., 1999; Kiecolt-Glaser i sur., 2002; Moynihan, 2003). Pokazano je da glukokortikoidi koče proizvodnju IL-2, TNF- α i IFN- γ *in vitro* i *in vivo* u životinja i ljudi (Boumpas i sur., 1993). Vjeruje se kako djeluju putem svog receptora na APC-ima ukidajući proizvodnju IL-12 *in vitro* i *ex vivo* (Elenkov i sur., 1996; Blotta i sur., 1997). Budući da IL-12 iznimno snažno pojačava sintezu IFN- γ a ujedno inhibira sintezu IL-4 u T-limfocitima, inhibicija sinteze IL-12 u APC-ima može biti glavni mehanizam kojim glukokortikoidi utječu na Th1/Th2 ravnotežu. Monociti/makrofagi tretirani glukokortikoidima proizvode znatno manje IL-12, čime se smanjuje kapacitet ovog citokina za poticanje sinteze IFN- γ iz antigenom potaknutih CD4 T-limfocita. Ovo je u uskoj vezi s gubitkom inhibitornog djelovanja IL-12 na Th2-stanice, što rezultira povećanom proizvodnjom i otpuštanjem IL-4 u T-limfocitima (DeKruyff i sur., 1998). Nadalje, glukokortikoidi snizuju ekspresiju receptora za IL-12 na T- i NK-stanicama (Wu i sur., 1998). Iako glukokortikoidi imaju direktan supresivan učinak na Th1-stanice, ukupna inhibicija proizvodnje IFN- γ uglavnom je rezultat indirektnog djelovanja glukokortikoida putem kočenja proizvodnje IL-12 iz APC-a i dokidanja odgovora NK- i Th1-stanica na stimulaciju IL-12.

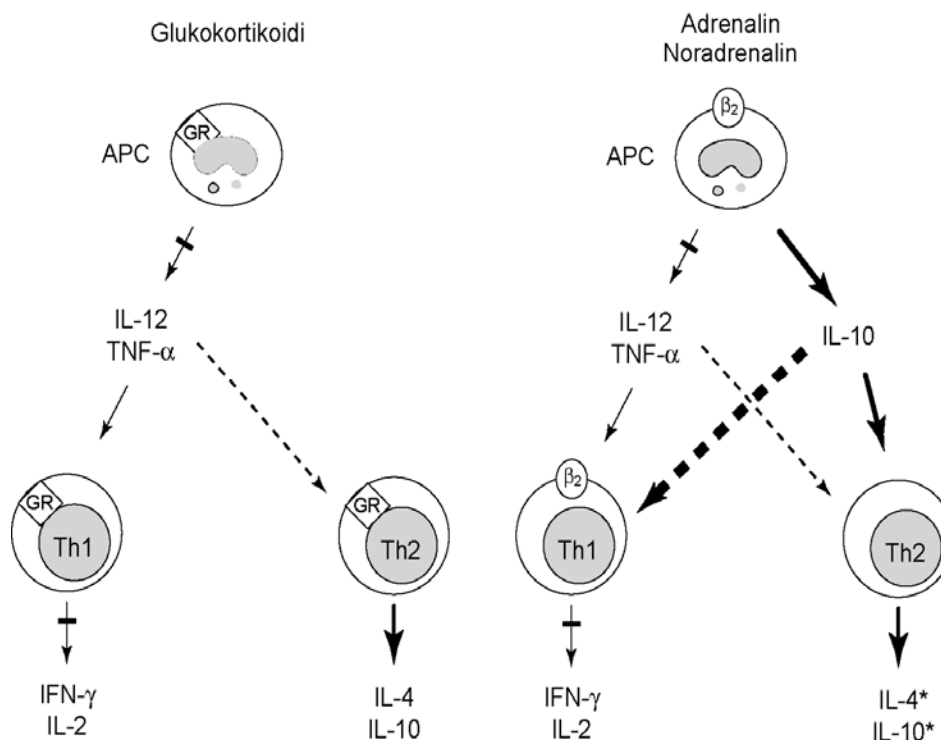
Vrlo je značajno da glukokortikoidi nemaju nikakva utjecaja na proizvodnju IL-10 u monocitima (Elenkov i sur., 1996; van der Poll i sur., 1996), međutim mogu povećati proizvodnju tog citokina u limfocitima. Štakorski CD4 T-limfociti prethodno tretirani deksametazonom imaju povišenu razinu mRNA za IL-10 (Ramierz i sur., 1996). Slično tome, pacijenti s kardiopulmonarnom prenosnicom, endotoksemijom ili multiplom sklerozom, liječeni glukokortikoidima, imaju povišenu razinu IL-10 u plazmi (van der Poll i sur., 1996; Tabardel i sur., 1996; Gayo i sur., 1998). To može biti rezultat izravnog djelovanja glukokortikoida na T-limfocite kao i indirektnog prekida supresivnog djelovanja IL-12 i IFN- γ na proizvodnju IL-10 u monocitima.

Kateholamini također pomiču ravnotežu prema Th2-tipu reakcije, a djelovanje ostvaruju na razini APC-a i Th1-stanica (Elenkov i Chrousos, 1999). Noradrenalin i adrenalin snažno inhibiraju IL-12 i pojačavaju proizvodnju IL-10 u kulturama humanih stanica periferne pune krvi koje su stimulirane LPS-om *ex vivo* (Elenkov i sur., 1996). Djelovanje se ostvaruje β -adrenoreceptorima (AR) i potpuno

dokida propranololom koji je njihov antagonist. Neselektivni β - i selektivni β_2 -AR agonisti inhibiraju proizvodnju IL-12 *in vitro* i *in vivo* (Panina-Bordignon i sur., 1997, Hasko i sur., 1998), a β_2 -AR agonisti dodatno inhibiraju razvoj stanica tipa Th1, a potiču diferencijaciju stanica u Th2-tip (Panina-Bordignon i sur., 1997).

β_2 -AR eksprimirani su na Th1-, ali ne i na Th2-stanicama (Sanders i sur., 1997), čime se pojašnjavaju mogući dodatni mehanizmi utjecaja kateholamina na Th1/Th2 ravnotežu. Kod glodavaca, kao i kod ljudi, β_2 -AR agonisti inhibiraju proizvodnju IFN- γ u Th1-stanicama, ali nemaju utjecaja na proizvodnju IL-4 u Th2-limfocitima (Sanders i sur., 1997). Primjena β_2 -AR agonista salbutamola u ljudi rezultira smanjenjem proizvodnje IL-12 *ex vivo* (Panina-Bordignon i sur., 1997). Akutno oštećenje mozga, koje dovodi do masovnog otpuštanja kateholamina, uzrokuje sekreciju znatne količine sistemskog IL-10 (Woiciechowsky i sur., 1998).

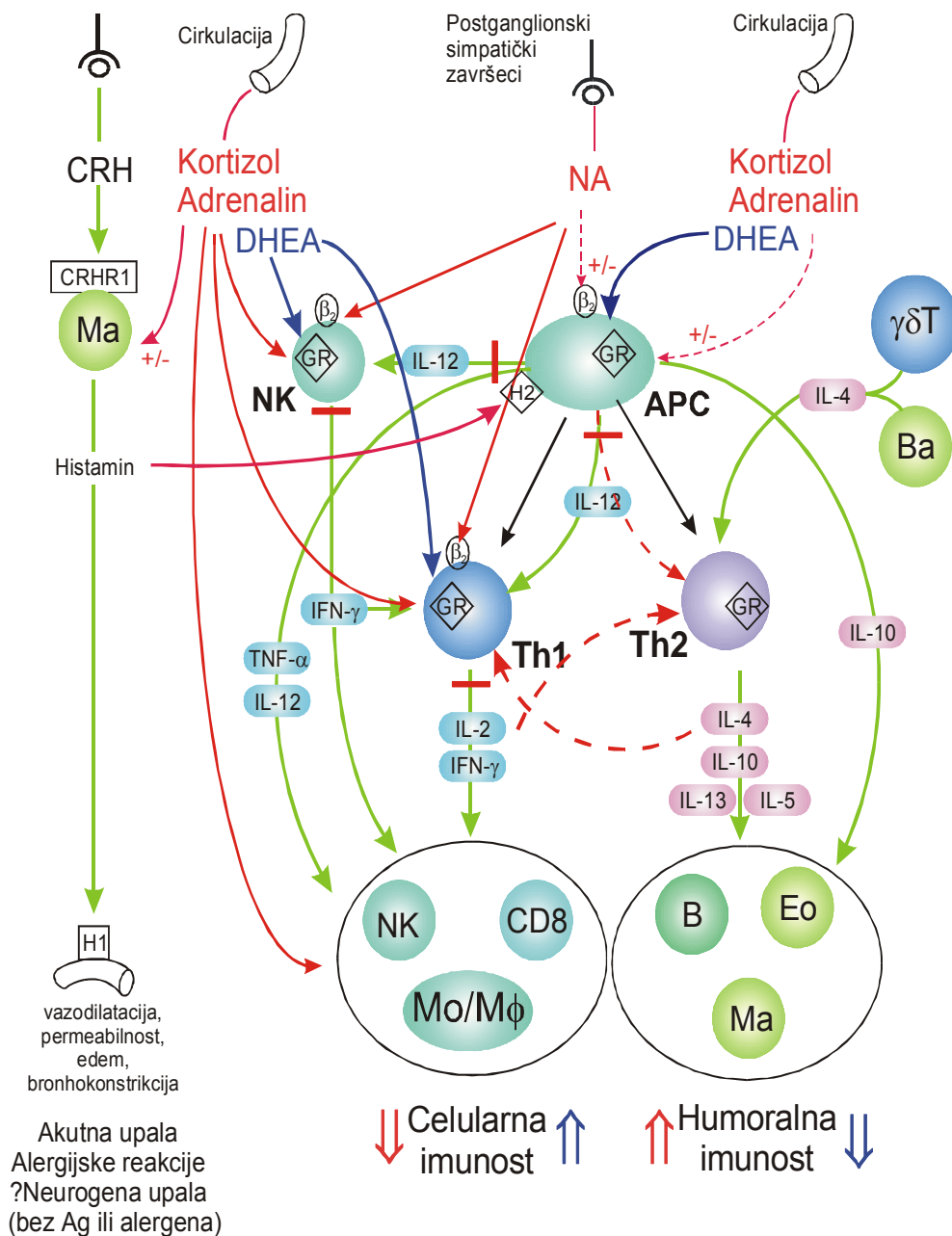
Sistemske glukokortikoidi i kateholamini, dakle, inhibicijom proizvodnje citokina tipa 1, odnosno stimulacijom proizvodnje citokina tipa 2, izazivaju selektivnu supresiju stanične imunosti pomicanjem ravnoteže prema Th2-posredovanoj humoralnoj imunosti (Slika 10).



Slika 10 : Sistemske učinci stresnih hormona na proizvodnju citokina tipa 1 i 2. Glukokortikoidi ne utječu na produkciju IL-10 iz monocita/makrofaga, ali pospješuju proizvodnju IL-10 i IL-4 u Th2-stanicama. Kateholamini potiču lučenje IL-10 u monocitima/makrofagima, ali nemaju direktan utjecaj na Th2-stanice (Th2 stanice imaju malo ili uopće nemaju β -adrenergičkih receptora). Indirektno, međutim, kateholamini mogu pospješiti proizvodnju citokina Th2-tipa jer isključuju njihov glavni inhibitor, IL-12. (Preuzeto od Elenkova i Chrousos, 2002).

Ovo je potvrđeno i istraživanjima koja pokazuju kako stresni hormoni inhibiraju efektorske funkcije stanične imunosti kao što su citotoksička aktivnost NK-stanica te aktivnost Tc i makrofaga. Kateholamini inhibiraju aktivnosti NK-stanica direktno preko β_2 -AR ili indirektno putem supresije proizvodnje IL-12 i IFN- γ koji su presudni za njihovu aktivnost (Elenkov i sur., 1996). Poznato je kako su upravo NK-stanice vrlo osjetljive na učinke stresa i njihova funkcija se nerijetko koristi kao pokazatelj imunosupresije.

Treba imati na umu kako utjecaj stresa na ravnotežu ne mora podlijegati istim principima kada se radi o lokalnoj imunosti. Tako glukokortikoidi pojačavaju sintezu TGF- β , još jednog antiupalnog citokina, u humanim T-stanicama a suprimiraju je u glija-stanicama (Batuman i sur., 1995). Kateholamini općenito pojačavaju lokalnu imunoreakciju pojačanom proizvodnjom IL-8 u monocitima i tako utječu na pregrupiranje polimorfonuklearnih leukocita na mjesto upale (Kavelaars i sur., 1997; Linden, 1996). Zaključimo da stresni hormoni koče Th1-, a pospješuju Th2-stanični odgovor na sistemskoj razini (Slika 11), ali lokalno mogu djelovati drukčije te su potrebna nova istraživanja koja bi to pobliže pojasnila. Sistemsko djelovanje stresnih hormona važan je mehanizam negativne povratne sprege koji štiti organizam od prejakog djelovanja te prevelike količine proupalnih citokina i ostalih produkata upale koji imaju snažan potencijal za oštećenje tkiva. Situacije koje su povezane sa značajnim promjenama u aktivnosti stresnog sustava, kao što su akutni i kronični stres, dugotrajno iscrpljujuće vježbanje, teži kirurški zahvati, trudnoća i babinje, modulacijom sistemske i lokalne ravnoteže proupalnih i antiupalnih citokina mogu suprimirati ili pojačati autoimunosne, kardiovaskularne i alergijske bolesti, te tumore (Elenkov i Chrousos, 1999; Kieckolt-Glaser i sur., 2002).



Slika 11 : Sistemsko djelovanje stresnih hormona, glukokortikoida i kateholamina, na imunosustav. NK, urođenoubilačne stanice; CD8, T-citotoksički limfociti; Mo/M ϕ , monociti/makrofagi; B, B-limfociti; Eo, eozinofili; Ma, mastociti; APC, antigen-prezentirajuće stanice; Ba, bazofili; CRHR1, receptor za CRH; β_2 , adrenergički receptor; H1, histaminski receptori; GR, glukokortikoidni receptor; CRH, hormone oslobađanja adrenokortikotropina; DHEA, dehidroepiandrosteron; NA, noradrenalin. Zelene strjelice označavaju djelovanje citokina, crvene i plave hormona, a ispekidane supresiju. (Prerađeno prema Reiche i sur., 2004).

1.3.5 Urođenoubilačke stanice

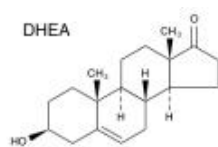
Urođenoubilačke stanice su veliki granulirani limfociti koji imaju sposobnost ubijanja ciljnih stanica u direktnom kontaktu. Dio su urođene imunosti i proizvode imunoregulatorne citokine potrebne za rane procese upale (Zompi i Colucci, 2005). Humane NK-stanice obuhvaćaju 15% cirkulirajućih limfocita i fenotipski se definiraju ekspresijom CD56 i nedostatkom CD3 biljega na površini (Robertson i Ritz, 1990). Ove stanice sudjeluju u ranom imunološkom odgovoru te ubijaju virusom inficirane stanice, štite od nekih unutarstaničnih patogena, ili ubijaju tumorske stanice slično kao što to rade citotoksički T-limfociti (CTL). Njihovu aktivnost stimuliraju IFN- γ , IFN- β i IL-12. Tijekom virusne infekcije razina ovih citokina brzo raste, a slijedi ih val porasta NK-stanica, otprilike nakon tri dana od početka infekcije. NK-stanice osiguravaju prvu liniju obrane protiv virusa kontrolirajući virus u periodu potrebnom da bi se pokrenula stečena imunost. U citoplazmi NK-stanica nalaze se granule bogate perforinom i granzimima. Za razliku od CTL-a, koji se moraju aktivirati da bi poprimili efektorsku funkciju, NK-stanice su konstitutivno citotoksične. Kada su ciljne stanice "oblijepljene" (*opsonizirane*) specifičnim antitijelima, mehanizam ubijanja NK-stanicama još je djelotvorniji. Iako su mehanizmi ubijanja NK-stanica nespecifični, opsonizacija antitijelima osigurava određen stupanj specifičnosti, pa takvu reakciju nazivamo o antitijelima ovisna stanična citotoksičnost ili ADCC (od engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Nakon priljublivanja NK-stanica za ciljnu stanicu, sekretne granule koncentriraju se u blizini spoja te dolazi do degranulacije i oslobađanja perforina i granzima u pukotinu između dviju stanica. Perforin se izbacuje egzocitozom u obliku monomera. Kada dosegne membranu ciljne stanice, zbog konformacijske promijene, amfipatske domene se izlože i to mu omogućava ugradnju u membranu ciljne stanice. U membrani se monomeri polimeriziraju u prisutnosti Ca⁺⁺ iona i formiraju cilindrične pore. Perforin pokazuje homologiju sa sekvencom C9-komponente komplementa te ovako formirane pore olakšavaju ulazak granzima u ciljnu stanicu (Liu i sur., 1995). Ti egzogeni granzimi aktiviraju u ciljnoj stanici mehanizme koji dovode do apoptoze (Leibson, 1997). Nadalje, NK-stanice kao i CTL-i, mogu aktivirati apoptozu putem FAS-a (CD95, člana porodice receptora za TNF koji sadrži "death" domenu). Za razliku od CTL-a, NK-stanice ne ekspimiraju antigen-specifični receptor (TCR) niti CD3, a prepoznavanje ciljne stanice nije

ograničeno MHC-om. Na temelju količine biljega CD56 na površini se mogu fenotipski i funkcionalno razlikovati dvije populacije NK-stanica (Lanier i sur., 1986). NK-stanice s manjim brojem molekula CD56 (CD56^{dim}) na površini imaju jaču citotoksičku aktivnost (Robertson i Ritz, 1990), eksprimiraju visoku razinu imunoglobulinima sličnih NK-receptora i FcγRIII (CD16) nego populacija NK-stanica s manjim brojem (CD56^{bright}) biljega po stanici. Ove potonje, nakon aktivacije proizvode veće količine citokina ali im je citotoksička aktivnost nešto slabija te imaju nižu ekspresiju CD16 (Cooper i sur., 2001). CD56 antigen je izoforma adhezivne molekule živčanih stanica (NCAM od engl. neural cell adhesion molecule) s nepoznatom funkcijom na humanim NK-stanicama (Lanier i sur., 1989), iako neke studije ukazuju na značaj tog antigena u interakciji NK-stanica s ciljnim stanicama (Suzuki i sur., 1991). CD16 je nisko afinitetni receptor za IgG (FcγRIII) kojim veže Fc-fragment antitijela koja opsoniziraju ciljnu stanicu.

1.4 Stres i ostale neuroendokrine osi

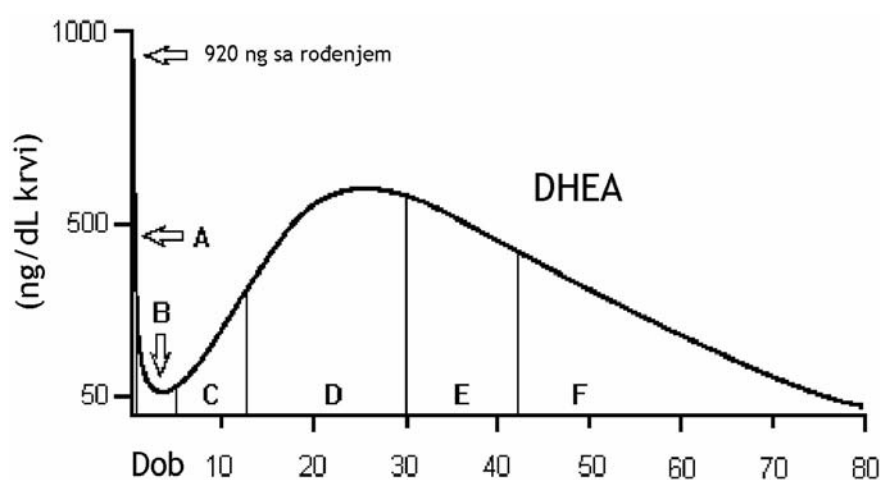
Uz kateholamine i kortizol, dehidroepiandrosteron (DHEA) (Slika 12) je još jedan važan medijator stresnog sustava (McEwen i Seeman, 1999). DHEA je najobilniji hormon u serumu primata i čovjeka (štakori imaju vrlo nisku razinu DHEA). Proizvodi ga kora nadbubrežne žlijezde (zona reticularis) te se otpušta istovremeno kada i kortizol (Rosenfeld i sur., 1971). Razina DHEA je pod nadzorom CRH i ACTH, ali je dijelom neovisna o toj hormonskoj kaskadi (Ohashi i sur., 1986). U cirkulaciji se nalazi u obliku DHEA-sulfata (DHEA-S) vezan na albumin. U tom je obliku topiv u vodi i metabolički neaktivan. Nakon vezanja za stanice prelazi u DHEA i postaje metabolički aktivan.

Biosinteza DHEA započinje od kolesterola koji se, u tkivima koja sintetiziraju steroidne hormone (nadbubrežna žlijezda i gonade), reakcijama dezmolaza prevodi u glavni steroidni prekursor, pregnenolon. Novo sintetizirani pregnenolon iz mitohondrija prelazi u endoplazmatski retikulum gdje citokrom P45017 α katalizira sintezu DHEA iz pregnenolona. Iz istog prekursora nastaju ostali steroidni hormoni; najprije progesteron, a zatim estrogini (estriol, estron i beta-estradiol), aldosteron u zoni glomerulosa te kortizol u zoni fasciculata i reticularis.



Slika 12 : Kemijska struktura molekule DHEA.

DHEA i DHEAS služe kao prekursori za spolne hormone, pa 50% testosterona odraslog muškaraca i 75% estrogena kod žene u premenopauzi potječe od DHEA. Ovaj je hormon široko rasprostranjen u svim tkivima organizma, no najintenzivnije je zastupljen u mozgu što upućuje na njegovu neuroendokrinu ulogu. Za razliku od kortizola, lučenje DHEA ne podliježe cirkadijalnom ritmu, ali koncentracija mu se jako mijenja tijekom života (Slika 13). Za vrijeme intrauterinog razvoja proizvode ga placenta i adrenalna žlijezda fetusa, pa je neposredno nakon poroda razina DHEA vrlo visoka. U to se doba uvelike koristi za razvoj mozga, koncentracija u krvi naglo mu pada i ostaje niska do između 5. i 7. godine života, nakon čega (period adrenahe) njegova razina u serumu ponovno raste tijekom puberteta, a najveću doseže između 20. i 30. godine života. Poslije toga započinje progresivno padati brzinom od 2% godišnje. Između 50. i 60. godine života zadržava se oko 60% sinteze, a između 70. i 80. ostaje samo 10-20% od najviše koncentracije DHEA (Labrie i sur., 1997).



Slika 13 : Promjena razine cirkulirajućeg DHEA tijekom ljudskog života.

Točan mehanizam djelovanja DHEA i DHEA-S za sada je nepoznat. Epidemiološki podaci upućuju kako razina DHEA opada u mnogim degenerativnim bolestima povezanim sa starenjem kao što su rak, kardiovaskularne bolest, Alzheimer, demencija, ateroskleroza, pad imunosti (antivirusne, antibakterijske) te progresija AIDS-a. Studije na životinjskim modelima ukazale su na niz korisnih utjecaja DHEA kao što su poticanje imunoloških funkcija, ublažavanje stresnih učinaka, prevencija tumora, ateroskleroze, diabetesa i osteoporoze (Leowattana, 2004). Mnoga od navedenih svojstava DHEA posljedica su njegova antagonističkog djelovanja kortizolu (May i sur., 1990; Wright i sur., 1992). Receptor za DHEA nađen je u citosolu mišjih CD4- i CD8-limfocita (Meikle i sur., 1992), a hormon može dokinuti supresiju T-limfocita, apoptozu timocita izazvanu deksametazonom (Blauer i sur, 1991), sniziti razinu kortizola (Wolf i Kirshbaum, 1999) te, suprotno kortizolu, pospješiti memoriju i sprječiti amneziju (Baulieu i Robel, 1996). Opsežno istraživanje sprovedeno na američkim rendžerima izloženim vrlo stresnim i iscrpljujućim vježbama kroz duže vrijeme pokazalo je, osim pada testosterona na razinu kakvu opažamo kod kastriranih pojedinaca te drastičnog pada razine tiroidnih hormona, snižen omjer DHEA i kortizola te, zacijelo posljedično, oslabljenu celularnu, a dijelom očuvanu humoralnu imunost (Bernton i sur., 1995). Osim svojim antiglukokortikoidnim djelovanjem, DHEA sudjeluje u regulaciji Th1/Th2 ravnoteže direktnim pomicanjem ravnoteže (i opet suprotno kortizolu) prema Th1 tipu reakcije (Rook i sur., 1994). Stimulirani T-limfociti pod utjecajem DHEA pojačano proizvode IL-2, IL-3 i IFN- γ i to naročito u sekundarnim limfnim organima čija je sposobnost pretvaranja DHEA-S u aktivni metabolit najveća (Suzuki i sur., 1991). U kasnijoj životnoj dobi, kad razina DHEA opada, imunološki poremećaji uočeni kod starijih miševa mogu se ukinuti davanjem DHEA (Araneo i sur., 1993). Neki od tih defekata (hiperplazija prostate, demineralizacija kostiju) rezultat su spontanog oslobađanja IL-6, a DHEA zaustavlja njegovo spontano oslobađanje (Daynes i sur., 1993). Općenito se smatra kako je niska razina DHEA i povišena razina kortizola štetna za organizam (Morales i sur., 1994), a upravo određeni omjer ova dva steroida trebala bi biti prava mjera njihove aktivnosti (Goodyer i sur., 2001). Unutar populacije depresivnih osoba opisane su, naime, dva hormonska profila: osobe s visokom razinom kortizola i normalnom razinom DHEA kao i osobe sa sniženom razinom DHEA i normalnom razinom kortizola (Goodyer i sur., 2001).

Osim na HPA-osovinu stres utječe i na ostale neuroendokrine osovine kao što su sustav hipotalamus - hipofiza s prolaktinom (PRL) i hormonom rasta (GH od engl. growth hormone) te osovine hipotalamus - hipofiza - tireoideja (HPT) i hipotalamus - hipofiza - gonade (HPG). Uz povišenost CRH-a, kortikosteroida i kateholamina, stres rezultira pojačanim otpuštanjem β -endorfina i drugih opioida (dinorfina, met-enkefalini) koji utječu na sprječavanje osjeta boli. Akutni stres popraćen je prolaznim porastom GH-a i PRL-a, a u kroničnom stresu, CRH-om potaknuti somatostatin zaustavlja lučenje GH-a, dok dopamin snižava razinu PRL-a. Za razliku od glukokortikoida, GH i PRL djeluju imunostimulativno i prijeko su potrebni za normalno funkcioniranje imunostava kao i za odupiranje infekciji (Reber, 1993).

Tijekom epizode akutnog stresa HPT-osovina je suprimirana. Ta se supresija ostvaruje djelovanjem somatostatina koji zaustavlja lučenje tireotropina (TSH od engl. thyroid-stimulating hormone) te glukokortikoida koji sprječavaju konverziju relativno neaktivnog tiroksina u biološki aktivniji trijodtironin. Ovi su mehanizmi adaptivni kako bi spriječili pretjerano iskorištavanje energije (Wilder, 1995). Postoje dokazi da se, uz kortizol, kateholamine i PRL, tireoidni hormoni mogu također svrstati u "stresne hormone" (Mason i sur., 1986; Nemeroff, 1989; Mason i sur., 1994).

Povišena razina CRH-a ukida aktivnosti HPG-osovine, inhibirajući lučenje faktora koji oslobađa hormon luteinizacije (LHRH od engl. luteinizing hormone releasing hormone) na jednoj razini osi i, putem kortikosteroida, koji direktno inhibiraju otpuštanje hormona luteinizacije (LH), na drugoj razini osi. Kortikosteroidi također izravno inhibiraju proizvodnju hormona gonada te ujedno prekidaju djelovanje spolnih hormona na tkiva (Bullen i sur., 1985; Rivier i sur., 1986; Loucks i sur., 1989; Xiao i sur., 1996).

Androgeni hormoni spadaju u grupu prirodnih antiupalnih medijatora zbog svog supresivnog djelovanja kako na humoralnu tako i na staničnu imunost. Estrogeni su, međutim, snažni stimulatori proizvodnje antitijela. U tjelesnim tekućinama (serum, sinovijska tekućina, slina) muških i ženskih pacijenata s reumatoidnim artritismom nađene su snižene razine spolnih (testosteron/dihidrotestosteron) i adrenalnih (DHEA i DHEA-S) androgena, kao i sniženi omjer androgena i estrogena, što upućuje na značaj ovih imunosupresivnih androgena u patološkim procesima i upali. Osim toga, pokazano je da steroidni

hormoni (estrogeni i androgeni) inhibiraju proizvodnju proupalnih citokina IL-1 β i TNF- α u monocitima i makrofagima. Druga istraživanja pokazuju kako, pak, estradiol inhibira citokine tipa 1, a testosteron tipa 2 (Burger i Dayer, 2002).

Testosteron je spolni hormon koji je, osim za seksualnost, važan u reguliranju čuvstva, agresije, spoznajnih procesa i osobnosti. U različitim psihijatrijskim oboljenjima opisane su promijenjene razine androgena, a u stresu kod ljudi uočena je značajna supresija testosterona. Međutim, postoje i suprotni nalazi koji opisuju porast razine testosterona u potencijalno stresnoj situaciji kod osoba s posttraumatskim stresnim poremećajem (Spivak i sur., 2003).

Može se zaključiti kako su gotovo svi hormoni, na neki način, podložni djelovanju stresa, a ujedno imaju imunomodulacijska djelovanja u različitim segmentima imunoreakcija (Tablica 9).

Tablica 9: Neurotransmitori, neuropeptidi, neurohormoni ili neurohormonske efektorske molekule s imunomodulacijskim djelovanjem.

Molekule
<i>Neurotransmitori</i>
noradrenalin
serotonin (5-hidroksitriptamin)
acetilkolin
opijati
dopamin
<i>Neuropeptidi</i>
arginin vazopresin
supstancija P
vazoaktivni intestinalni peptid
kolecistokinin
oksitocin
melatonin
<i>Neurohormoni</i>
CRH
kortikotropin
kortikosteroidi
hormon rasta
prolaktin
somatostatin
<i>Neuroendokrine efektorske molekule</i>
adrenalin
spolni steroidi
tiroksin
trijodtrionin

(Preuzeto od Black, 1994).

1.5 Stres i zdravlje - psihoneuroimunologija

Tijekom zadnjih 20-ak godina eksperimentalni pristupi različitim područjima psihologije, neurobiologije i imunologije ukazali su na usku suradnju živčanog, hormonskog i imunostava. Istraživanje dvosmjernih neuroimunoloških komunikacija čine temelj multidisciplinarnog pristupa u području psihoneuroimunologije. Ispitivanja humanih i animalnih modela pokazala su da imunoreakcije regulira SŽS te da su promjene tih reakcija posredovane psihološkim promjenama ponašanja i raspoloženja, ali i stresom (Dantzer i Mormede, 1995). Podaci su, međutim, nerijetko oprečni što je posljedica utjecaja specijes-specifičnih razlika, činjenice da različite vrste stresora kao i njihovo trajanje različito djeluju na pojedine stanice imunostava te individualnih razlika u sposobnosti prihvaćanja i odupiranja stresorima. Poznato je da stanice imunostava slijede cirkaldijalne ritmove i različito reagiraju na stres ovisno o dobu dana, menstrualnom ciklusu te godišnjem dobu (Petito i sur., 1992; Giordano i sur., 1993; Olff, 1999).

Nezadovoljavajući ili promijenjen odgovor stresnog sustava povezan je s pojačanom osjetljivošću prema autoimunskim i upalnim bolestima (Chrousos, 1995). Pretjerano jaka reakcija HPA-osovine u upali može imitirati hiperkortizolemiju ili stanje stresa te tako povećati podložnost infektivnim agensima i tumorima, ali i pružiti zaštitu od autoimunskih ili upalnih bolesti. Suprotno tome, oslabljena HPA-osovina može imitirati stanje nedostatka glukokortikoida, slijedom čega će se povećati opasnost od razvoja autoimunskih i upalnih bolesti. Takve karakteristike opisane su kod dva soja štakora: funkcioniranje HPA-osovine je oslabljeno kod soja štakora Lewis, a pojačano kod soja Fischer (Sternberg i sur., 1989 a i b). Kao posljedica toga, Lewis štakori jako su podložni razvoju različitih eksperimentalno izazvanih upalnih bolesti, HPA-osovina im slabije odgovara u stresu a hipotalamički CRH neuroni se otežano stimuliraju različitim neurotransmiterima. Ove životinje imaju kronično povišen AVP, a njihovo ponašanje podsjeća na depresivno ponašanje u ljudi. Kod pacijenata s aktivnim reumatoidnim artritismom pokazana je snižena ili normalna cirkardijalna razina ACTH i kortizola, unatoč povišenim razinama IL-1 i IL-6 (Neeck i sur., 1990). Ti su pacijenti slabije odgovarali na stres izazvan operativnim zahvatom (Chikanza i sur., 1992) te su slično soju Lewis štakora, imali povišenu razinu AVP-a i CRH u sinovijskoj tekućini upaljenih zglobova. U tablici 10 navedeni su primjeri stanja i bolesti u kojima je

promjena u funkcioniranju HPA-osovine povećala opasnost od autoimunskih bolesti ili aktivacije imunostava (Chrousos i Gold, 1992; Dekaris i sur., 1993; Sternberg, 1993; Cizza i Sternberg, 1994; Chrousos, 1995).

Tablica 10 : Bolesti povezane s defektnom HPA-osovinom ili njezinim ciljnim tkivima.

SUPRIMIRANA UPALNA REAKCIJA	AKTIVIRANA UPALNA REAKCIJA
<p>Pojačana aktivnost HPA osovine</p> <p>Cushingov sindrom melankolična depresija kronični alkoholizam trudnoća (zadnji trisemestar) dugotrajno, obimno vježbanje u modelu soja štakora Fischer</p>	<p>Snižena aktivnost HPA osovine</p> <p>adrenalna insuficijencija reumatoidni artritis atipična ili sezonska depresija sindrom kroničnog umora fibromialgija posttraumatski stresni poremećaj babinje nakon kroničnog stresa nakon glukokortikoidne terapije nakon tretmana Cushingova sindroma u modelu soja štakora Lewis model autoimunskog tiroiditisa kod debelih kokoški</p> <p>Otpornost na glukokortikoide</p> <p>reumatoidni artritis astma otporna na glukokortikoide degenerativni osteoartritis sistemski lupus eritematosus</p>

(Prerađeno prema Chrousosu, 1995).

Dokazi o utjecaju stresa na zdravstveno stanje proizlaze iz korelacijskih analiza kojima je pokazano kako su epizode akutnog stresa ili kronični stres značajni rizični faktori za razvoj pojedinih bolesti. Za ulcerativni kolitis npr. poznato je kako se simptomi bolesti mogu pogoršavati ili jenjavati, ovisno o općem stanju pacijentova duha (pesimizam ili optimizam), odnosno, o proživljenim stresnim epizodama (Brindley i Rolland, 1989; Duffi i sur., 1991; Bosma i sur., 1997;

Raikkonen i sur., 1996; Herman i Culinan, 1997; McEwen i Stellar, 1993). Različita psihološka stanja i poremećaji raspoloženja, te stresni doživljaji, povezani su s promjenama imuniteta (Dantzer i Kelley, 1989; O'Leary, 1990; Herbert i Cohen, 1993; Ader i sur., 1995; Vanderpompe i sur., 1998). Stresom izazvane učestale ili dugotrajno promijenjene imunoloških funkcija alostatsko su opterećenje koje može pogodovati razvoju bolesti. Najčešće ispitivan model utjecaja akutnog stresa na imunološke funkcije je visoka razina stresa kod studenata u vrijeme ispita (Kiecolt-Glaser i sur., 1984; Glaser i sur., 1985, 1986, 1987, 1993). Imunološki status studenata određivan je neposredno prije samog ispita kao i u vrijeme ispita. Tijekom stresnog perioda uočena je smanjena aktivnost NK-stanica, snižena mitogenima ili antigenima potaknuta proliferativna sposobnost limfocita, snižena proizvodnja INF- γ te povišena proizvodnja antitijela na herpesvirus. Pojedina istraživanja su ukazala na povećani rizik razvoja virusnih infekcija gornjih dišnih puteva nakon stresnih situacija (ispit) ili u obiteljima s nesređenim životnim situacijama. Negativna iskustva odražavala su se na težinu i trajanje virusne infekcije (Stone i sur., 1992; Cohen i sur., 1991, 1993). U prospektivnoj studiji u kojoj je praćena grupa ispitanika koji su izgubili posao uočene su brojne promjene neuroendokrinih i imunoloških funkcija. U kraćem razdoblju poslije gubitka posla ispitanici su imali povišene razine kortizola, prolaktina, ukupnog kolesterola te sniženu sposobnost proliferacije limfocita u testu s fitohemaglutininom. Ove su promjene bile prolaznog karaktera, međutim, rizični faktori za kardiovaskularne bolesti opstali su i dvije godine nakon gubitka namještenja (Arnetz i sur., 1991).

Stres je usko povezan s rekurentnim infekcijama herpesvirusom, što se može objasniti supresijom stanične imunosti, koja u normalnim uvjetima održava kontrolu nad latentnim virusom. Supresija stanične imunosti omogućava virusu da se aktivira i dolazi do razvoja virusnih lezija, najčešće kao posljedica iscrpljujućih ili neugodnih iskustava (Friedman i sur., 1977; Cohen i Herbert, 1996). Vršena su mnoga ispitivanja o utjecaju stresa kao kofaktora u reaktivaciji različitih latentnih virusa i razvoju bolesti u ljudi (Tablica 11).

Tablica 11 : Vrste stresa, virusna patogeneza i antivirusna imunost kod ljudi.

Virus	Ispitanici	Vrsta studije	Stresor	Nalaz
Herpes simplex virus	pacijenti s genitalnim herpesom	retrospektivna	psihijatrijske bolesti	↑ rekurencija
		retrospektivna	svakodnevni događaji	↑ trajanje bolesti
		retrospektivna	svakodnevni događaji, društvena podrška	↑ rekurencija
		prospektivna	svakodnevni događaji, raspoloženje	↑ rekurencija
		prospektivna	svakodnevni stres	nema učinka
	stanovnici uz nuklearnu centralu (TMI ^b)	usporedna	život u blizini TMI	↑ antitijela na HSV-1
	rastavljeni muškarci	usporedna	bračna nesloga	↑ antitijela na HSV-1
Epstein-Barr virus	studenti medicine	prospektivna	ispit	↑ antitijela na EBV
	osobe koje se brinu za oboljelog od Alzheimerove bolesti	usporedna	briga	↑ antitijela na EBV
	rastavljeni muškarci	usporedna	bračna nesloga	↑ antitijela na EBV
Citomegalovirus	stanovnici uz nuklearnu centralu (TMI ^b)	usporedna	život u blizini nuklearne centrale	↑ antitijela na CMV
Influenca	dobrovoljci	prospektivna	osobnost, svakodnevni događaji	↑ nazalna sekrecija
	članovi obitelji	prospektivna	nesloga u obitelji	↑ učestalost infekcije
Rinovirusi	dobrovoljci	prospektivna	osobnost, svakodnevni događaji	↑ nazalna sekrecija
	dobrovoljci	prospektivna	osobnost, svakodnevni događaji	↑ učestalost infekcije
RSV	dobrovoljci	prospektivna	osobnost, svakodnevni događaji	↑ učestalost infekcije
HIV-1	homoseksualci	prospektivna	potvrđivanje serostatusa	nema učinka
	seropozitivni homoseksualci	retrospektivna	svakodnevni događaji	↓ totalni broj limfocita
	seropozitivne odrasle osobe	prospektivna	svakodnevni događaji, raspoloženje	nema učinka
	seropozitivne odrasle osobe	prospektivna	društvena podrška	nema učinka
hepatitis B	studenti medicine	prospektivna	svakodnevni događaji	↑ antitijela na cjepivo
	studenti medicine	prospektivna	ispiti, društvena podrška	odgođeno stvaranje antitijela na cjepivo, ↓ T-stanični odgovor

(Prerađeno prema Sheridanu i sur., 1994.)

^a ↑ porast; ↓ pad

^b nuklearna centrala Three Mile Island; EBV, Epstein-Barr; CMV, Citomegalovirus

Utjecaj kroničnog stresa na imunost također je istraživana na nekoliko modela (McCinnon i sur., 1989; O'Leary, 1990; Cohen i Herbert, 1996). Ispitivane su osobe iz obitelji u kojih jedan član boluje od Alzheimerove bolesti, što se zbog težine i dužine te bolesti smatra kroničnim stresom za osobe koje se brinu o bolesniku. U usporedbi s kontrolnim ispitanicima istog sociodemografskog statusa, ispitanici koji su se brinuli za oboljelog člana obitelji, imali su viši titar antitijela protiv Epstein-Barrovog virusa (EBV), što ukazuje na kompromitiranu celularnu imunost, snižen postotak ukupnih T-limfocita kao i pomoćničkih T-limfocita te snižen omjer pomoćničkih i citotoksičkih (CD4:CD8) T-limfocita (Kiecolt-Glaser i sur., 1987). U

modelu kroničnog stresa zbog dugotrajne nezaposlenosti, kod ispitivane skupine žena koje su bile bez posla u trajanju od devet mjeseci, otkrivena je slaba proliferativna reaktivnost limfocita na fitohemaglutinin (PHA), odnosno na purificirani proteinski derivat tuberkulina (PPD). Nisu uočene promjene brojčanih odnosa subpopulacija limfocita kao ni kortizola u serumu (Arnetz i sur., 1987).

Utjecaj psihološkog stanja na imunološki status možda je najviše istraživano kod depresije. Tu postoje brojni, nerijetko nedosljedni rezultati. Depresivna stanja popraćena su promjenama brojnih imunoloških i hormonskih parametara kao npr. oslabljena proliferativna reakcija limfocita na mitogene, snižena citotoksička aktivnost NK-stanica, promjene u broju leukocita periferne krvi te povišena razina kortizola u serumu (Schleifer i sur., 1984). Broj cirkulirajućih neutrofila i monocita, kao i razina proupalnih interleukina u plazmi povišeni su u osoba s depresijom (Maes i sur., 1995 a, 1995 c). Za razliku od toga, ukupni broj limfocita je snižen, a to se odražava na sve populacije (NK-, B- i T-limfociti) kao i na subpopulacije T-limfocita (pomoćnički i citotoksički T-limfociti). Omjer pomoćničkih i citotoksičkih T-limfocita također je snižen u osoba s depresijom (Olff, 1999). Postoje, međutim, radovi kod kojih nisu nađene bitne razlike u imunološkim parametrima između osoba s depresijom i skupine zdravih osoba (Schleifer i sur., 1989; Anesi i sur., 1994). Takva se nedosljednost rezultata pokušava objasniti time što ispitivane populacije u različitim radovima nisu bile ujednačene s obzirom na niz faktora kao što su godine, spol, ambulantno odnosno bolničko liječenje, ali i to što se pojedinci koji pate od depresije međusobno razlikuju u odnosu na mehanizme odupiranja problemima (Schleifer i sur., 1989). Iako snižena aktivnost NK-stanica te oslabljena proliferativnost mitogenom potaknutih limfocita, direktno ukazuju na imunosupresiju u depresivnim poremećajima, neka istraživanja opisuju da depresivno stanje može biti popraćeno snažnom višestrukom aktivacijom imunosustava (Maes i sur., 1995 b; Maes i sur., 1995 c; Sluzewska i sur., 1996). Ta se aktivacija očituje u povišenom broju neutrofila, monocita, aktiviranih T- i B-limfocita u perifernoj krvi (Maes i sur., 1991), povišenoj razini proteina akutne faze (haptoglobin, C-reaktivni protein) i citokina (IL-1 β , IL-6) u serumu (Maes i sur., 1995 a, 1995 d). Prema Maesovoj hipotezi, povišena razina ovih citokina u depresiji čini osnovni mehanizam sistemske aktivacije imunosustava, a uz hiperaktivnost HPA-osovine, ti mehanizmi sudjeluju u patogenezi i patofiziologiji depresije (Maes i sur., 1999 b).

1.5.1 Socioekonomski status i dodatna traumatizacija

Način odgovora stresnog sustava, kako smo ranije detaljno opisali, može se promijeniti zbog proživljenih trauma. Također smo naveli neka istraživanja utjecaja težih životnih trauma, kao što je briga o teško oboljelom članu obitelji, gubitak posla, rastava braka, tuga te žalovanje za preminulom bliskom osobom, na imunost i zdravlje (O'Leary, 1990). Postavlja se pitanje da li i do koje mjere zbrajanje i akumulacija negativnih životnih iskustava dodatno pridonosi alostatskom opterećenju? Istraživanja potvrđuju kako oboljeli od PTSP-a imaju znatno veću incidenciju dodatnih negativnih životnih iskustava nakon primarne traume. Veterani koji su sudjelovali u Libanonskom ratu a kod kojih se razvio PTSP, u poratnom vremenu imali su poteškoća uklopiti se u normalna društvena zbivanja i dnevni život (Solomon i Mikulincer, 1987). Najčešće dodatne traume koje se povezuju s ratnim PTSP-om su nemogućnost ili gubitak zaposlenja, nizak socioekonomski status, rastave braka te teža oboljenja (Goldberg i sur., 1990; Kulka i sur., 1990; McCarren i sur., 1995; King i sur., 1998). Ukupan broj i težina dodatnih trauma, nakon one koja je izazvala PTSP, značajno je povezan s težinom same bolesti i to naročito sa simptomima depresije i izbjegavanja (Maes i sur., 2001). Neka su se istraživanja osvrnula na ispitivanje odnosa kroničnog PTSP-a i socioekonomskog statusa. Egendorf je ispitao 1440 vijetnamskih veterana i otkrio da su oni koji su patili od posljedica ratnog stresa češće bili nezaposleni, teže su pronalazili posao, imali su niža primanja i nižu razinu obrazovanja (Egendorf i sur., 1981). Drugo istraživanje, na još većem broju ispitanika, potvrdilo je takve nalaze te ukazalo da je nizak socioekonomski status više povezan s ratovanjem nego sam PTSP (Goldberg i sur., 1990; Kulka i sur., 1990). Socioekonomski status usko je povezan sa zdravljem, s obzirom na to da postoji jasna gradacija u odnosu između zdravlja i socioekonomskog statusa ljudi svrstanih prema visini primanja i stupnju obrazovanja. Siromašni su, prosječno, lošijeg zdravstvenog stanja i ranije umiru od pripadnika srednje klase, koji su, pak, slabijeg zdravlja od onih s vrlo visokim primanjima i visokim stupnjem obrazovanja. Pokušaji da se ova pojava objasni na temelju raspoloživosti medicinske skrbi ili utjecajem pušenja nije dala zadovoljavajuće rezultate (Adler i sur., 1993; Adler i sur., 1994). Ta sistematska varijacija zdravlja i mortaliteta određena visinom prihoda i obrazovanja posljedica je složenog zbira različitih faktora kao što su zdravlje okoliša, zaposlenje,

međuljudski odnosi, zajedništvo, obrazovanje i prakticiranje zdravog načina prehrane te vježbanje. Ti faktori zajedno imaju kumulativni učinak na ponašanje i alostatski pritisak. Postoje dokazi kako je niski socioekonomski status povezan s depresijom, shizofrenijom i ovisnošću o drogama (McEwen i Wingfield, 2003). Međutim, postavlja se pitanje uzročnosti, odnosno je li nizak socioekonomski status uzrokuje poremećaj ili poremećaj dovodi do niskog socioekonomskog statusa. U slučaju shizofrenije i ovisnosti vrlo je vjerojatno da samo stanje vodi u siromaštvo. S druge strane, činjenica je da nizak socioekonomski status lako može biti izvor depresije i tjeskobe (McEwen i Wingfield, 2003).

Pretraživanjem literature nismo pronašli niti jedan rad koji bi se bavio ispitivanjem utjecaja dodatnih trauma na već postojeće psihijatrijske bolesti ili njihovom akumulacijom tijekom života na funkcioniranje imunološkog i/ili hormonskog statusa. Iz navedenog postoje dovoljni razlozi za takvu vrstu istraživanja.

1.6 Neurobiologija posttraumatskog stresnog poremećaja

Posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) psihičko je stanje snažne i dugotrajne tjeskobe i depresije koje se razvija kao reakcija na proživljenu tešku traumu, a povezano je s jakim strahom, boli ili užasom. Takva traumatska iskustva su npr. ratne traume, prometne i industrijske nesreće, prirodne katastrofe, terorizam, nasilje u obitelji, silovanja i slično. Prema Američkom dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje, DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994), dijagnostički kriteriji za PTSP su:

- a) Izloženost ili nazočnost doživljajima koji mogu izazvati stvarnu ili prijeteću mogućnost smrti, odnosno prijetnju fizičkom integritetu vlastite osobe ili drugih, a povezuje ih snažan osjećaj straha, bespomoćnosti i užasa.
- b) Učestalo proživljavanje traumatskog doživljaja koje se očituje kao ponavljana i nametljiva, uznemirujuća prisjećanja na traumatski događaj, česti uznemirujući snovi, ponašanje ili osjećaji kao da se događaj ponavlja, psihološka reaktivnost na znakove koji simboliziraju ili nalikuju traumi.
- c) Izbjegavanje podražaja povezanih s traumom kao što su: izbjegavanje misli i osjećaja te razgovora koji su bilo kako povezani s traumom, izbjegavanje aktivnosti, mjesta ili osoba koji mogu podsjetiti na traumu, nesposobnost prisjećanja bitnih aspekata traumatskog doživljaja, umanjen interes za

aktivnosti koje su nekada bile značajne, osjećaji izdvojenosti i otuđenosti te smanjen raspon osjećaja. Prema klasifikaciji DSM-IV, moraju biti izražena najmanje tri od navedenih simptoma.

- d) Trajna pojačana pobudljivost koja se očituje nesanicom, iritabilnošću i izljevima bijesa, teškoćama u koncentraciji, pojačanom oprežnošću ili pretjeranom plašljivošću. Moraju biti izražena najmanje dva od navedenih simptoma.
- e) Simptomi moraju trajati najmanje mjesec dana, a stanje se neprestano pogoršava.

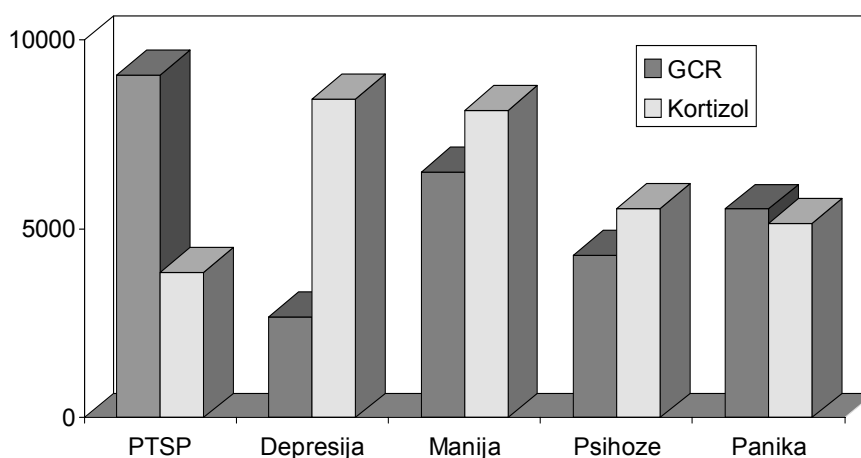
Oporavak od PTSP-a može se zbiti tijekom prve godine, ali 15 do 25% onih koji su proživjeli traumu pati od kroničnog PTSP-a. Kod njih simptomi mogu trajati nekoliko desetaka godina ili čak doživotno (Blank, 1983; Shalev i sur., 1996). Najtipičniji primjeri su žrtve holokausta. Osim karakterističnih simptoma bolesti temem kojih se utvrđuje dijagnoza, u gotovo 80% slučajeva, PTSP je popraćen komorbiditetom s drugim psihološkim poremećajima, od kojih su najčešći simptomi depresije, tjeskobe, afektivni poremećaji, fobije te alkoholizam i ovisnost o drogama (McFarlane i Papay, 1992; Bremner i sur., 1996).

Unatoč visokom stupnju komorbiditeta i preklapanju simptoma PTSP-a s drugim psihološkim poremećajima, biološka istraživanja su pokazala specifične psihoneuroendokrine promjene značajne za PTSP (Bremner i Charney, 1994). Mnogi, prethodno opisani simptomi, kao što su poremećaji spavanja, iritabilnost, pobudljivost te pretjerana plašljivost, upućuju na moguće promjene u autonomnom, NA-sustavu. Iako istraživanja nisu posve jednoznačna, ipak ukazuju kako pacijenti s PTSP-om pokazuju povećanu aktivnost simpatoadrenalnog sustava. U usporedbi sa zdravim kontrolama i skupinom ratnih veterana bez PTSP-a, pacijenti s PTSP-om imaju povišen krvni tlak i ubrzan puls u mirovanju (Blanchard i sur., 1982). Nakon izlaganja zvukovima ili natuknicama koji podsjećaju na rat, kod vijetnamskih veterana bio je uočen povišen sistolički tlak i puls u odnosu na te parametre kod veterana bez PTSP-a (Blanchard i sur., 1986) te onih s drugim psihičkim poremećajima (Malloy i sur., 1983) i zdravih kontrola (Shalev i sur., 1992). Nadalje, u urinu pacijenata s PTSP-om nađena je povišena koncentracija noradrenalina i adrenalina u usporedbi s bolesnicima drugih psihičkih poremećaja i zdravim kontrolama (Kosten i sur., 1987; Mason i sur., 1988). Koncentracija adrenalina (McFall i sur., 1990) i noradrenalina (Blanchard i sur., 1991) u plazmi

kod vijetnamskih veterana s PTSP-om izloženih prisjećanju na traumatski događaj, bila je povišena u odnosu na zdrave kontrole. Taj je nalaz u suglasju s nalazom o sniženom broju α_2 -adrenergičkih receptora na trombocitima kod pacijenata s PTSP-om (Perry i sur., 1990; Yehuda i sur., 1993 b). Navedeni rezultati ukazuju na promjene u funkcioniranju SŽS-a, no potrebna su daljnja istraživanja da bi se kod PTSP-a točno odredila vrsta promjena koja se odvija u kateholaminskom sustavu.

Osim kateholamina, u PTSP-u su istraživane i druge hormonske osovine pa su tako uočene promijene u bazalnoj razini serumskog testosterona (Mason i sur., 1990), povišene razine hormona štitnjače (Mason i sur., 1994; Wang i Mason, 1999), dok je ispitivanje supresije prolaktina pokazalo da veterani s PTSP-om pokazuju jaču supresiju u odnosu na zdrave, kontrolne ispitanike (Grossman i sur., 1996).

Ispitivanja HPA-osovine u PTSP-u pružila su niz dokaza temeljem kojih se može zaključiti kako su promjene kod PTSP-a upravo suprotne onima kod depresivnih i drugih psihijatrijskih poremećaja te akutnog i kroničnog stresa (Yehuda i sur., 1993 a, 1996, 1998) (Slika 14).



Slika 14: Usporedba razine glukokortikoidnih receptora (GR) i kortizola u urinu bolesnika s PTSP-om i drugim psihijatrijskim poremećajima.

(Preuzeto iz Yehude i sur., 1993 a).

U usporedbi sa zdravim kontrolama ili pacijentima s drugim psihičkim poremećajima, pacijenti s PTSP-om imaju sniženu razinu kortizola praćenu u urinu tijekom 24 sata (Mason i sur., 1986; Yehuda i sur., 1991 a, 1995 b), sniženu bazalnu razinu kortizola u plazmi (Yehuda i sur., 1994), povećan broj GCR-a u citosolu limfocita (Yehuda i sur., 1991 b; Yehuda i sur., 1995 a;) te pojačan supresivni odgovor kortizola u testu s deksametazonom (Yehuda i sur., 1993 b). Kod ratnih

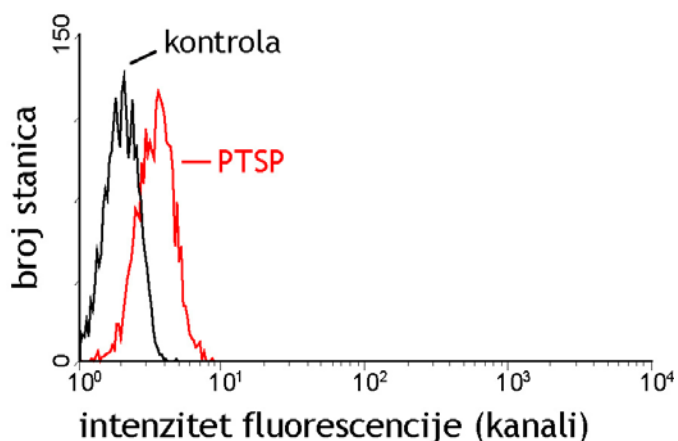
veterana s PTSP-om utvrđeno je smanjeno lučenje kortikotropina potaknuto CRF-om (Smith i sur., 1989). Takvi nalazi idu u prilog hipotezi da promjene HPA-osovine u PTSP-u odražavaju stanje pojačane negativne povratne sprege na jednoj ili više razina. Prema tom modelu, primarno se povećava osjetljivost i broj GCR-a u moždanim strukturama (hipokampus), što rezultira pojačavanjem negativne povratne sprege i padom bazalne razine kortikotropina i kortizola, te pojačanim supresivnim odgovorom kortizola na egzogeno dati deksametazon u usporedbi s normalnim ispitanicima (Yehuda i sur., 1995 a). Iako ove promjene odražavaju osnovne karakteristike neurobiologije PTSP-a, moguće je da su one odraz normalnog funkcioniranja HPA-osovine te da, upravo takva "oslabljena" HPA-osovina, određuje način reagiranja pojedinca na stres, odnosno da prethodno "oslabljena" HPA-osovina povećava rizik za razvoj PTSP-a nakon proživljene traume (Yehuda i sur., 1998).

Istraživanje funkcioniranja imunostava u PTSP-u relativno je oskudno u usporedbi s onim iz neurobiologije ili s imunološkim istraživanjima kod depresivnih poremećaja. Mosnaim i sur., 1993. nisu pronašli razlike između vijetnamskih veterana s PTSP-om i zdravih kontrola u bazalnoj aktivnosti NK-stanica, dok su Watson i sur., 1993. pokazali da veterani s PTSP-om imaju pojačanu staničnu imunost u odnosu na civilne kontrole. Stanovnici s područja koji je poharao uragan Andrew, a razvili su simptome PTSP-a imali su sniženu citotoksičku aktivnost NK-stanica te broj CD4- i CD8-stanica u perifernoj krvi, dok je broj NK-stanica bio povišen. Aktivnost NK-stanica u tih osoba negativno je korelirala sa simptomima intruzivnog prisjećanja (Ironson i sur., 1997). Konačno, Spivak i sur., 1997. su, u odnosu na zdrave kontrole, pokazali povišenu razinu serumskog IL-1 β kod ratnih veterana s PTSP-om.

U našim dosadašnjim istraživanjima ispitali smo što se događa u ranim stadijima PTSP-a (6 do 8 godina nakon proživljene traume) u dvije skupine ispitanika, sudionika Domovinskog rata, ratnih veterana i profesionalnih vojnika. U obje smo skupine uočili brojne promjene hormonskih i imunoloških varijabli, ali i djelomičnu nepodudarnost rezultata, koja bi se mogla objasniti psihosocijalnim faktorima, u prvom redu razlikom njihova socioekonomskog statusa. U literaturi nismo našli na radove o utjecaju dodatne traume kod već utvrđene dijagnoze PTSP-a, bilo na hormonski, bilo na imunostav. Međutim, nezapostlenost ili

gubitak posla opisane su kao najčešća dodatna trauma koja pogađa oboljele od PTSP-a. Tijekom ispitivanja GCR-a na dijagramu fluorescencije za izotipske kontrole pojavio se jaki pomak udesno kod ispitanika s PTSP-om za razliku od kontrolnih ispitanika (Slika 15).

Slika 15: Pomak u desno na dijagramu fluorescencija za izotipske kontrole kod ispitanika s PTSP-om.



Pretpostavili smo da bi taj pomak mogao biti posljedica povišene razine FC-receptora na površini limfocita. Osim toga, kako smo detaljno ranije opisali, nedavno je predložena hipoteza o utjecaju stresa na pomak Th1/Th2 ravnoteže prema Th2-tipu reakcije. Prema našim saznanjima, djelovanje stresa na Th1/Th2 tip reakcije u modelu PTSP-a do sada još nije opisano. Ovaj se rad oslanja na gore navedena saznanja te želeći ih uzeti u obzir i povezati, odabrali smo i ispitali novu skupinu veterana Domovinskog rata s kroničnim PTSP-om.

Mnoga pitanja vezana uz imunologiju PTSP-a ostaju još otvorena, jer to je široko područje istraživanja, a PTSP je dobar model za proučavanje neuro-hormonalno-imunoloških međuovisnosti i interakcija. Vjerujemo da bi praćenje ispitanika kroz dulje vremensko razdoblje (longitudinalno istraživanje) te epidemiološke studije, moglo odgovoriti na pitanje koje su promjene imunoreaktivnosti karakteristične za PTSP te da li i kako sudjeluju u nastanku te bolesti.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Stres je pojava s kojom se svaki pojedinac susreće tijekom života. Danas, kada su učestali ratovi, prirodne katastrofe, teroristički napadi, utjecaj tih traumatskih zbivanja može pogoditi ne samo neposredne žrtve već i članove obitelji, prijatelje, spasitelje, osoblje medicinske i mentalne skrbi, djelatnike medija i čitavu zajednicu, naročito djecu. Adaptivnom reakcijom na stres aktivira se simpatički sustav i hipotalamo-hipofizo-adrenalna (HPA) os kojom se postže stabilnost unutar relativno širokih alostatskih granica. Pretpostavlja se da dugotrajna aktivacija sustava izaziva znatno alostatsko opterećenje koje može promijeniti stresni sustav te imati patološki učinak. Biološke posljedice stresa intenzivno se istražuju, ali je uvriježeno stajalište da akutni stres potiče a kronični suprimira imunološke funkcije. Pri procjeni odgovora stresnog sustava treba svakako voditi računa o osobinama stresora ali i o nizu individualnih karakteristika pojedinca.

Posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) psihički je poremećaj dugotrajne tjeskobe koja se razvija kao posljedica proživljene traume (ratna iskustva, izbjeglištvo, teža ranjavanja, prirodne katastrofe, silovanje i sl.). Neurendokrinološka istraživanja PTSP-a ukazala su na pojačanu aktivnost simpatoadrenalnog sustava te na promjene u funkcioniranju HPA-osovine. Negativna povratna sprega HPA-osovine opisana je kao PTSP-u svojstvena značajka slijedom porasta broja glukokortikoidnih receptora centralno u hipotalamusu. Treba naglasiti da su ovakvi nalazi dobiveni istraživanjem kroničnog PTSP-a (desecima godina nakon proživljene traume), najčešće kod veterana vijetnamskog rata, žrtava holokausta ili seksualnog zlostavljanja u djetinjstvu.

Istraživanja imunoreaktivnosti na modelu PTSP-a još nisu dosljedna, a radovi kojima su istodobno praćeni hormonski i imunološki parametri na istim ispitanicima, vrlo su rijetki. Ostaje otvorenim pitanje, kakav je stvarni odraz psiholoških i hormonskih poremećaja na imunološki status ovih ljudi.

Ranije smo ispitivali imunoreaktivnost i hormonski status u ranim stadijima PTSP-a (6 do 8 godina nakon proživljene traume) u dvije nezavisne skupine sudionika Domovinskog rata - profesionalnih vojnika i ratnih veterana - kod kojih je potvrđena dijagnoza PTSP-a. U obje smo skupine uočili promjene brojnih imunoloških i hormonskih parametara, međutim, opazili smo među njima i razlike.

Djelomična nepodudarnost rezultata za pojedine varijable između dviju skupina sudionika Domovinskog rata mogla bi se objasniti razlikom u psihosocijalnim faktorima. Profesionalni vojnici su, naime, svi bili zaposleni dok je među ratnim veteranima bilo oko 40% nezaposlenih i znatno više razvedenih. Iz literature je poznato kako je socioekonomski status općenito usko povezan sa zdravstvenim stanjem te da su nezaposlenost, niska primanja i lošije obrazovanje znatno češći kod oboljelih od PTSP-a. Međutim, nismo naišli na istraživanja koja bi opisivala utjecaj dodatne traume na imunoreaktivnost ili hormone kod već prisutne dijagnoze PTSP-a.

Ovo istraživanje izravno se nastavlja na naša prethodna, s obzirom na to da smo željeli ispitati utjecaj gubitka zaposlenja ili mirovine, kao dodatne traume, u ispitanika oboljelih od PTSP-a. Osim toga,, nastojali smo pobliže pojasniti neke prijašnje nalaze ulazeći dublje u istraživanje funkcionalnih sposobnosti stanica imunostava (ekspresija perforina u T-citotoksičkim i NK-stanicama, sposobnost monocita da proizvode proupalne citokine nakon stimulacije *in vitro*, pomak u Th1/Th2 ravnoteži *in vitro*), ekspresije specifičnih biljega (FcγRI, FcγRII i FcγRIII) te promjena i utjecaja hormona (kortizol, dehidroepiandrosteron, testosteron) koji su značajni kako za etiologiju PTSP-a tako i za odnose hormonskog i imunostava. Prema našim saznanjima ovo je prvo istraživanje koje se bavi utjecajem dodatne traume na imunoreaktivnost te, koristeći metodu protočne citometrije, ispituje ekspresiju unutastaničnih citokina nakon *in vitro* stimulacije limfocita odnosno monocita, na modelu PTSP-a.

Cilj našeg rada je istražiti mehanizme međudjelovanja živčanog, hormonskog i imunostava kojima stres utječe na mentalno i fizičko zdravlje. Očekujemo da će rezultati takvih istraživanja pružiti saznanja o učincima psihološkog stresa i traume na biološke sustave temeljem kojih će se moći razraditi procjena i prevencija te liječenje posljedica kroničnog stresa. Razumijevanje patofiziologije kroničnog stresa omogućila bi procjenu rizika od zaraznih, autoimunskih, kardiovaskularnih te malignih oboljenja.

3. *MATERIJAL I METODE*

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Ispitanici

Ispitali smo ukupno 54 muškarca, 41 s utvrđenom dijagnozom PTSP-a kao posljedicom ratnog iskustva i 13 zdravih, kontrolnih ispitanika odgovarajuće dobi. Ispitanike s PTSP-om podijelili smo u dvije skupine prema kriteriju jesu li doživjeli dodatnu traumatizaciju ili ne, godinu dana prije ispitivanja. Prvu skupinu, PTSP I, činila su 23 ispitanika koji su imali osiguran redovit izvor prihoda za život te unutar zadanog vremenskog perioda nisu proživjeli novi traumatski događaj (npr. gubitak prihoda, smrt bliske osobe ili rastava braka). Drugu skupinu, PTSP II, sačinjavalo je 18 ispitanika koji su, osim dijagnoze PTSP-a, tijekom zadnje godine ostali bez mirovinske naknade ili drugih primanja, što smo okarakterizirali kao uzrok dodatne traumatizacije.

U procjeni psihičkog statusa ispitanika koristili smo niz psihometrijskih testova, koji su validirani kao mjerni instrumenti za postavljanje dijagnoze PTSP-a, uz osobnu procjenu liječnika psihijatra, a prema kriterijima DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994). Dijagnoza PTSP-a postavljena je na temelju testova Mississippi Scale for Combat-Related PTSD (**M-PTSD**) (Keane i sur., 1988), Impact of Event Scale (**IES**) (Horowitz i sur., 1979), Los Angeles Symptom Checklist (**LASC**) (Foy i sur., 1984) i PTSD-Intervju (**PTSD-I**) (Watson i sur., 1991). Svi su bolesnici bili ambulantni pacijenti Klinike za psihološku medicinu KBC Zagreb.

Pri odabiru ispitanika vodili smo računa o sljedećim kriterijima: aktivno sudjelovanje u Domovinskom ratu na području Republike Hrvatske te PTSP kao posljedica ratnih iskustava i trauma, dijagnoza PTSP-a bez komorbiditeta s drugim psihičkim poremećajima ili ovisnostima (npr. depresija, alkoholizam), odsutnost psihičkih poremećaja prije odlaska u rat kao i bilo kojih kroničnih bolesti ili bolesti koje zahvaćaju jedan od ispitivanih sustava (hormonski, imunološki). Nadalje, nastojali smo da ispitanici budu ujednačeni prema broju i tipu traume (npr. ranjavanje) te prema motiviranosti za odlazak u rat (dobrovoljci ili mobilizirani). U ispitivanje smo uvrstili samo pojedince koji su u trenutku uzorkovanja bili fizički zdravi (bez infekcija, alergija, autoimunskih ili tumorskih oboljenja) te nisu koristili lijekove (npr. antibiotike) koji bi na bilo koji način mogli utjecati na rezultate istraživanja. Ono što se nije moglo izbjeći, zbog prirode same bolesti, je uporaba psihofarmaka, no nastojali smo da terapija bude ujednačena. Liječnik-

psihijatar ispitanike je temeljito upoznao sa svrhom i tijekom cijelog istraživanja, pa smo krv mogli vaditi isključivo uz njihov dobrovoljni pristanak.

Kod svih ispitanika određivali smo relativne omjere (postotke) osnovnih populacija limfocita i njihovih subpopulacija prema specifičnim površinskim biljezima, zatim, relativnu količinu unutarstaničnih biljega kao što su glukokortikoidni receptori u limfocitima odnosno perforin u NK- i CD8⁺-stanicama, razinu hormona kortizola, DHEA i testosterona u serumu te citotoksičku aktivnost NK-stanica (Sabioncello i sur., 1981). Neuroendokrini status smo procijenjivali određivanjem razine hormona a o aktivnosti HPA-osovine zaključivali smo temeljem odnosa razine glukokortikoidnih receptora u limfocitima i razine kortizola u serumu. Razinu glukokortikoidnih receptora u limfocitima određivali smo metodom protočne citometrije (Bèrky i sur., 1998; Gotovac i sur., 2003).

Osim navedenih testova, kod jednog dijela ispitanika određivali smo razinu proupalnih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α) u monocitima nakon *in vitro* stimulacije lipopolisaharidom (Gagro i sur., 1999; Gagro i sur., 2004), te ekspresiju citokina karakterističnih za pojedini tip imunoreakcije (IFN- γ za Th1 i IL-4 zaTh2) u CD4⁺ stanicama nakon njihove nespecifične stimulacije *in vitro* (Bendelja i sur., 2000).

Kontrolnu skupinu ispitanika sačinjavalo je ukupno 13 fizički i psihički zdravih muškaraca odgovarajuće dobi, a sastojala se, uglavnom, od osoblja Imunološkog zavoda. Iz tehničkih razloga nije bilo moguće u svih ispitanika odrediti sve parametre, pa je zbog toga broj ispitanika po pojedinom parametru različit.

3.2 Uzorci

Uzorke periferne krvi skupljali smo iz antekubitalne vene između 7.00 i 8.00 sati. Po 20 mL krvi skupljalo se u dvije Vakuteiner-epruvete s heparinom (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA) i po 10 mL u Vacutainer-epruvete bez antikoagulansa, kako bi se izdvojio serum. Izolirani serumi pohranjeni su na -80 °C do određivanja koncentracije hormona.

Za *in vitro* stimulaciju limfocita, odnosno monocita, kao i za imunofenotipizaciju površinskih i unutarstaničnih biljega limfocita na protočnom citometru, koristili smo punu hepariniziranu krv. Za određivanje citotoksične aktivnosti NK-stanica uzimali smo mononuklearne stanice (**PBMC** od engl. *peripheral blood mononuclear cells*) izolirane kao bijeli sloj iz periferne krvi na gradijentu gustoće Ficoll-Hypaque (d=1,130g/mL, Pharmacia, Fine Chemicals AB,

Uppsala, Sweden). Stanice smo izolirali tako da smo, uz dodatak dekstrana, izdvojili plazmu i nadslojili je nad otopinu Ficoll-a u omjeru 1:1, a zatim centrifugirali na 800 x g 15 minuta. Pasterovom pipetom pažljivo smo pokupili "lebdeći" bijeli prsten mononuklearnih stanica i dva puta ih isprali u mediju 199 centrifugiranjem na 400 x g najprije 10, a zatim 5 minuta.

3.3 Materijal

3.3.1 Medij i kemikalije za stimulaciju stanica u punoj krvi

a) stimulacija limfocita periferne krvi

Neomicin (Sigma, St.Louis, USA)

RPMI 1640 medij s neomicinom (Imunološki zavod, Zagreb, Hrvatska)

Forbol-12-miristat-13-acetat, **PMA** (Sigma)

Ionomicin (Sigma)

Brefeldin A, **BFA** (Sigma)

b) stimulacija monocita periferne krvi

Neomicin

RPMI 1640 medij s neomicinom

Lipopolisaharid, LPS (Sigma)

Brefeldin A

3.3.2 Puferske otopine za imunofenotipizaciju

a) za obilježavanje biljega na površini stanica

Puferirana fiziološka otopina (PBS) (Imunološki zavod, Zagreb)

8,47 g NaCl 145 mM

3,14 g K₂HPO₄ 18 mM

1,36 g KH₂PO₄ 10 mM

dest. H₂O do 1000 mL

pH podešen na 7,2 - 7,4 pomoću 0,1 M NaOH ili 0,1 M HCl

Otopina za ispiranje (A)

50 mg NaN₃ 0,01%

20 mL fetalni teleći serum (Dipro, Austrija) 4%

dest. H₂O do 500 mL

Otopina za fiksiranje (F1)

5 mL 36%-tnog formaldehida (Kemika, Zagreb) 1%

175 mL otopine A

Otopina za liziranje eritrocita

FACS Brand Lysing Solution, 10 x koncentrirana (BD Biosciences, San Jose, California, SAD)

b) za obilježavanje unutarstaničnih biljega (perforin, glukokortikoidni receptor, citokini)

Dulbeccov PBS, puferirana fiziološka otopina bez Ca^{++} i Mg^{++} (Imunološki zavod)

8 g NaCl	137 mM
2 g KCl	3 mM
2 g KH_2PO_4	1 mM
14,2 g Na_2HPO_4	8 mM
1 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,5 mM
1,47 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 mM
dest. H_2O do 1000 mL	

pH podešen na 7,2 - 7,4 pomoću 0,1 M NaOH ili 0,1 M HCl

Otopina za obilježavanje i ispiranje (B)

500 mg NaN_3	0,1%
5 mL fetalni teleći serum	1%
Dulbeccovog PBS do 500 mL	

Otopina za fiksiranje (F2)

20 mL 36%-tnog formaldehida	4%
160 mL Dulbeccovog PBS	

Otopina za permeabiliziranje (C)

500 mg saponina (Sigma)	0,1%
500 mg NaN_3	0,1%
5 mL fetalni teleći serum	1%
Dulbeccovog PBS do 500 mL	

3.3.3 Monoklonska antitijela

- a) za obilježavanje površinskih staničnih biljega na humanim leukocitima (BD Biosciences, San Jose, California, SAD) konjugirana fluorescein izotiocijanatom (FITC od eng. fluorescein isothiocyanate), fikoeritriinom (PE od eng. phycoerythrin) ili peridinin-klorofil A proteinom (PerCp od eng. peridinin chlorophyll protein)

PE- ili PerCP-konjugirani anti-**CD3**
 FITC- ili PerCP- konjugirani anti-**CD4**
 PerCP-konjugirani anti-**CD8**
 PerCP-konjugirani anti-**CD19**
 FITC- ili PE-konjugirani anti-**CD16**
 PE-konjugirani anti-**CD56**
 FITC-konjugirani anti-**CD45RA**
 PE-konjugirani anti-**CD45RO**
 FITC-konjugirani anti-**CD32(Fc γ II)**
 FITC-konjugirani anti-**CD64 (Fc γ I)**
Simultest™ LeucoGATE™ (CD45FITC/CD14PE)
TriTEST™ (CD4 FITC/ CD8 PE/ CD3PercP)

b) za direktno obilježavanje unutarstaničnih biljega

FITC-konjugirani anti-**glukokortikoidni receptor, α -GCR** (dar od dr. Timea Bérki, Pecs, Mađarska)

izotip: mišji IgG₁; klon: 5E4-B1

FITC-konjugirani anti-**PERFORIN** (BD Biosciences, BD PharMingen)

izotip: mišji IgG_{2b}; klon:27-35

citokini:

(BD Biosciences, BD PharMingen)

FITC-konjugirani anti- IL-6	korištene koncentracije: (0.5 mg/mL); 0.25 μ g/1x10 ⁶ st
izotip: štakorski IgG ₁ ; klon: MQ2-13A5	
FITC-konjugirani anti- IFN-γ	(0.5 mg/mL); 0.25 μ g/1x10 ⁶ st
PE-konjugirani anti- IL-1β	(0.003 mg/mL)
izotip: mišji IgG ₁ ; klon: AS10	
PE-konjugiran anti- IL-4	(0.2 mg/mL); 0.2 μ g/1x10 ⁶ st
alofikocijanin (APC) -konjugirani anti- TNF-α	(0.2 mg/mL); 0.1 μ g/1x10 ⁶ st
izotip: mišji IgG ₁ ; klon:MAb11	

c) Izotipske kontrole za određivanje nespecifičnog vezanja

(BD Biosciences)

mišji FITC-konjugirani anti-**IgG₁**

mišji FITC-konjugirani anti-**IgG_{2b}** (za perforin)

mišji PE-konjugirani anti-**IgG₁**

mišji PerCP-konjugirani anti-**IgG₁**

mišji APC-konjugirani anti-**IgG₁** (0.2 mg/mL) 0.2 μ g/1x10⁶st

štakorski FITC-konjugirani anti-**IgG₁** (0.5 mg/mL) 0.1 μ g/1x10⁶st

3.3.4 Standardi za podešavanje citometra i određivanje apsolutnog broja stanica (konjugirani fluorokromima)

a) Standardi

CaliBRITE 3 (BD Biosciences) - kuglice za kalibraciju (neobilježene, obilježene s FITC, PE, PerCP i APC)

Flow-Count™ Fluorospheres (Coulter Corporation, Miami, Florida, SAD) - polistirenske kuglice (promjer 10 μm) za određivanje apsolutnog broja stanica s emisijom u crvenom dijelu spektra (koncentracija 1022/μL)

3.3.5 Materijal za određivanje funkcionalne sposobnosti NK-stanica

Radioaktivni krom ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$), 185 MBq/mL (ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA, USA)

Detergent, Triton X-100 (Calbiochem, CA, USA)

Ovčji eritrociti (Imunološki zavod)

Kunićji antiserum protiv ovčjih eritrocita (Hemolizin, Imunološki zavod)

3.3.6 Kompleti za određivanje hormona u serumu

a) Enzimski imunotestovi (ELISA)

DHEA, Cortisol, Testosteron (DRG International Inc., 1167 U.S. Hwy. 22 E. Mountainside, NJ 07092, USA)

DHEA: osjetljivost: 0,02 μg/mL; preciznost: CV< 3,13%;

reproducibilnost: CV< 3,66%

Kortizol: osjetljivost: 2,5 μg/mL; preciznost: CV< 4,96%;

reproducibilnost CV< 4,70%

Testosteron: osjetljivost: 0,069 ng/mL; preciznost: CV< 5,15%;

reproducibilnost CV< 4,44%

3.4 Metode

3.4.1 Stimulacija stanica periferne pune krvi u kratkotrajnoj kulturi

Postavljanje kratkotrajne kulture pune krvi za *in vitro* stimulaciju limfocita, odnosno monocita, vršili smo u sterilnoj jedinici s okomitim strujanjem zraka. U sterilnim polistirenskim epruvetama, 12 x 75 mm s plastičnim čepom (Falcon ®, BD Biosciences), uzorke svježe heparinizirane krvi razrijedili smo u omjeru 1:1 s jednakim volumenom medija RPMI 1640 s neomicinom.

Limfocite smo stimulirali s 50 ng/mL PMA i 0,75 ng/mL ionomicina. Ova kombinacija tvari omogućava poliklonsku, nespecifičnu stimulaciju T-limfocita pri čemu PMA aktivira protein kinazu C, a ionomicin povećava propusnost kalcijevih kanala i povisuje koncentracija Ca^{2+} iona u stanici. Time se oponašaju procesi koji se odvijaju u stanicama nakon aktivacije preko TCR-kompleksa. Kratkotrajna poliklonska stimulacija potiče sintezu onih citokina za koje se u stanici već nalazi glasnička RNK (gRNK).

Za stimulaciju monocita koristili smo LPS u koncentraciji od 100 ng/mL. Lipopolisaharid, sastojak stanične stjenke gram-negativnih bakterija, potiče monocite i makrofage ljudi na sintezu i izlučivanje proupalnih citokina (IL-1, IL-6, TNF- α). Molekule LPS-a tvore komplekse s LPS-veznim proteinom u plazmi a mijeloidni diferencijacijski antigen CD14 na površini monocita receptor je za takve komplekse. Točan signalni put kroz plazmatsku membranu još nije poznat, ali se čini kako u njemu sudjeluju i druge površinske molekule (npr. Tool-like).

Tijekom stimulacije važno je zadržati *de novo* sintetizirane molekule citokina unutar stanica, pa se stimulacija treba odvijati uz dodatak blokatora proteinske sekrecije. Koristili smo brefeldin A (BFA) u koncentraciji od 10 μ g/mL koji sprječava transport proteina iz endoplazmatskog retikuluma u cisterne Golgi-jeva aparata koji se pokazao potentnijim te manje toksičnim od monenzina (Schuerwegh i sur., 2001).

Kultivacija stanica se, osim u prisutnosti stimulatora, odvijala i u samom mediju uz dodatak BFA, što nam je poslužilo kao kontrola, s obzirom na to da se u takvim uvjetima nije očekivala proizvodnja niti detekcija citokina.

Limfocite smo kultivirali 4, a monocite 5 sati u termostatu na 37 °C s 5% CO₂ (Heraeus, Osterode, Njemačka).

3.4.2 Imunofenotipizacija stanica (protočna citometrija)

Metoda protočne citometrije omogućava istovremeno obilježavanje pojedine stanice s više monoklonskih antitijela konjugiranih različitim fluorokromima koji, pobuđeni laserskom zrakom, emitiraju svjetlost različitih valnih dužina (boja). Ovisno o broju upotrijebljenih monoklonskih antitijela, mogu se odrediti tri (kod dvostrukog obilježavanja), odnosno osam (kod trostrukog obilježavanja) različitih subpopulacija limfocita (Afar i sur., 1991; Mandy i sur., 1992). Noviji aparati s dva ili više lasera omogućavaju istodobno obilježavanje stanica s dvanaest boja.

Kombinacije monoklonskih antitijela i subpopulacije stanica koje smo njima odredili prikazane su u Tablici 12.

Tablica 12: Kombinacije površinskih i unutarstaničnih biljega koje smo određivali monoklonskim antitijelima konjugiranim FITC-om (prvonavedena), PE-om (drugonavedena) i PerCP-om ili APC-om* (trećenavedena), te subpopulacije limfocita koje pojedine od tih kombinacija određuju.

KOMBINACIJA BILJEGA	SUBPOPULACIJE
CD4/CD8/CD3	pomoćnički T-limfociti (CD3 ⁺ CD4 ⁺) citotoksički T-limfociti (CD3 ⁺ CD8 ⁺)
CD45RA/CD45RO	naivni limfociti (CD45RA ⁺ CD45RO ⁻) prijelazni limfociti (CD45RA ⁺ CD45RO ⁺) memorijski limfociti (CD45RA ⁻ CD45RO ⁺)
CD16/CD56/CD3	NK-stanice (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺) (CD3 ⁻ CD16 ⁺) (CD3 ⁻ CD56 ⁺)
CD32/CD19	B-limfociti (CD19 ⁺) ekspresija receptora Fc γ RII na limfocitima (CD32 ⁺)
CD64	ekspresija receptora Fc γ RI na monocitima (CD64 ⁺)
CD45/CD14 (LeucoGATE TM)	precizno razlikovanje limfocita i monocita
GCR	ekspresija unutarstaničnog GCR-a u limfocitima
Perforin/CD3/CD8	ekspresija perforina u citotoksičkim T-limfocitima (CD3 ⁺ CD8 ⁺ PER ⁺)
Perforin/CD16/CD3	ekspresija perforina u NK-stanicama (CD3 ⁻ CD16 ⁺ PER ⁺)
Perforin/CD56/CD3	ekspresija perforina u NK-stanicama (CD3 ⁻ CD56 ⁺ PER ⁺)
IFN- γ /IL-4/CD4	ekspresija IL-4 ili IFN- γ u pomoćničkim T-limfocitima
IL-6/IL-1 β /TNF- α *	ekspresija proupalnih citokina u monocitima

Monoklonska antitijela koja smo koristili za obilježavanje površinskih i unutarstaničnih biljega bila su konjugirana fluorescein-izotiocijanatom (FITC) maksimalne emisije u području zelene svjetlosti (520 nm), fikoeritriinom (PE), maksimalne emisije u području narančaste svjetlosti (578 nm), peridinin-klorofilom A proteinom (PerCP), maksimalne emisije u području crvene svjetlosti (673 nm), odnosno alofikocijaninom (APC), maksimalne emisije također u području crvene svjetlosti (660 nm).

3.4.2.1. Obilježavanje biljega na površini stanica

Na dno polistirenske epruvete okruglog dna (12x75 mm, Falcon ®, BD Biosciences) stavljali smo po 5 µL konjugiranog monoklonskog antitijela iz svake kombinacije. Na to smo dodali 50 µL pune krvi s antikoagulansom i uzorak dobro resuspendirali "Vortex" miješalicom. Suspenziju smo inkubirali 15 minuta u tami na 25 °C (sobna temperatura). Eritrocite smo uklonili dodajući 1 mL lizirajuće otopine (Lysing solution), te nakon blagog resuspendiranja inkubirali 15 minuta na sobnoj temperaturi, u tami. Uzorke smo centrifugirali 5 minuta na 300 x g i nadtalog odlili naglim okretanjem epruvete. Talog obilježenih stanica resuspendirali smo u 2 mL otopine za ispiranje A i ponovili postupak centrifugiranja. Nadtalog smo naglo odlili, posušili stjenke epruvete i na talog dodali 0,5 mL otopine za ispiranje, resuspendirali i stanice fiksirali s 50 µL otopine za fiksiranje F1. Tako pripremljene uzorke propuštali smo na protočnom citometru unutar sljedećih sat vremena.

3.4.2.2. Izravno obilježavanje unutarstaničnih biljega (GCR, perforin) u stanicama periferne krvi ili u stanicama nakon in vitro stimulacije (citokini) - MULTIPARAMETARSKA analiza

Metoda omogućava multiparametarsku analizu fenotipskih i/ili funkcionalnih karakteristika pojedinačne stanice unutar heterogene populacije a zasniva se na istovremenom obilježavanju jednog ili više unutarstaničnih biljega u određenim stanicama koje razlikujemo na temelju obilježavanja površinskih biljega. Tako je npr., istodobnim obilježavanjem površinskog biljega karakterističnog za pomoćničke, CD4, T-limfocite i dva unutarstanična citokina karakteristična za pojedini tip imunoreakcije (IL-4 i IFN-γ), moguće, nakon adekvatne stimulacije, odrediti relativne odnose stanica određenog citokinskog profila. U monocitima je moguće analizirati ekspresiju različitih proupalnih citokina unutar iste stanice koja

ih proizvodi ili njihove međusobne omjere, odnosno pratiti citokinski odgovor karakterističan za specifični stimulans.

Osnovni princip ove metode jest u tome da se, nakon obilježavanja površinskih biljega i fiksacije, stanice privremeno permeabiliziraju, što omogućava ulaz monoklonskog antitijela u stanicu i vezanje za unutarstanični biljeg. Osim fiksacije, drugi ključni korak ovog postupka jest temeljito ispiranje nevezanog antitijela iz unutrašnjosti stanice. Rezultat za GCR, odnosno perforin, izražavamo kao relativnu količinu tih biljega u pojedinoj populaciji stanica ili, u slučaju citokina, učestalost određenog tipa stanica koje eksprimiraju jedan ili kombinaciju više unutarstaničnih biljega.

A) Obilježavanje perforina i GCR-a

Na dno polistirenske epruvete (12 x 75 mm, Falcon) ukapali smo 5 μ L monoklonskih antitijela za površinske biljege konjugirane s PE-om odnosno PerCp-om i 50 μ L pune krvi. Uzorke smo promiješali "Vortex" miješalicom i inkubirali 15 minuta na sobnoj temperaturi, u tami. Eritrocite smo razorili dodajući 1 mL 10 x razrijeđene otopine za liziranje (Lysing solution) i u njoj stanice ostavili stajati tijekom 15 minuta, u tami. Zatim smo ih isprali u 4 mL otopine za obilježavanje i ispiranje (B) i centrifugirali 5 minuta na 600 x g. Nadtalog smo naglo odlili, a talog resuspendirali u 100 μ L otopine za fiksaciju (F2). Slijedila je inkubacija 20 minuta na 4 °C u tami. Ukoliko je potrebno, postupak obilježavanja se ovdje može prekinuti, a stanice se mogu preko noći pohraniti na 4 °C u otopini F2. Mi smo nastavljali s obilježavanjem, pa smo stanice ponovno isprali u 4 mL otopine B, centrifugirali 5 minuta na 600 x g te odlili supernatant i posušili epruvete na listovima staničevine. U uzorke smo dodavali po 50 μ L otopine za permeabiliziranje (C), resuspendirali stanice "Vortex" miješalicom te ukapali 10 μ L FITC-om konjugiranog monoklonskog antitijela za perforin ili 10 μ L monoklonskog antitijela za izotipsku kontrolu (IgG_{2a} FITC). Stanice smo inkubirali 20 minuta na 4 °C u tami, a potom ih isprali dva puta, najprije u 4 mL otopine za permeabilizaciju, a potom u 4 mL otopine B. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 600 x g odlili smo nadtalog a talog resuspendirali u 500 μ L otopine za fiksaciju, F2.

Postupak obilježavanja GCR-a sličan je prethodnom, no u ovim uzorcima nismo obilježavali površinske biljege. Nakon razaranja eritrocita i ispiranja stanica

u otopini B (prema gore opisanom postupku), u jednu epruvetu dodali smo 50 μL otopine za permeabiliziranje i 5 μL izotipske kontrole (IgG₁FITC), a u drugu 50 μL FITC-om konjugiranog monoklonskog antitijela za GCR, razrijeđenog 1:500 u otopini za permeabilizaciju. Stanice smo inkubirali 20 minuta na 4 °C u tami, a potom ih isprali u 4 mL otopine C, centrifugirali 5 minuta na 600 x g i talog resuspendirali u 500 μL otopine za fiksaciju F1.

Uzorke smo propuštali kroz protočni citometar isti dan i analizirali CELLQuest programom.

B) Obilježavanje citokina

Nakon stimulacije, uzorci su promiješani "Vortex" miješalicom i po 100 μL razrijeđene pune krvi preneseno je u nove polistirenske Falcon epruvete okruglog dna. Stanice smo isprali u 4 mL otopine B centrifugiranjem 5 minuta na 600 x g. Odlili smo nadtalog te na dno epruvete ukapali 5 μL monoklonskog antitijela za površinske biljege obvezno mijenjajući nastavke pipetora između pojedinih epruveta. Reagens LeucoGATE (vidi Tablicu 12) koristili smo za precizno razlikovanje limfocita i monocita metodom "beck-gatinga" (objašnjenje kasnije u tekstu). Uzorke stimuliranih limfocita površinski smo obilježili i s anti-CD4 PerCp-om, odnosno izotipskom kontrolom konjugiranom istim fluorokromom. Nakon 15 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, u tamnom dodali smo 2 mL lizirajuće otopine (Lysing solution), ponovno inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi u tami, centrifugirali 5 minuta na 600 x g, odlili nadtalog i isprali stanice u 4 mL otopine B. Nakon centrifugiranja odlili smo nadtalog i epruvete posušili na listovima staničevine. Stanice smo resuspendirali u 100 μL otopine F2 i tako fiksirane pohranili na 4 °C do sljedećeg dana. Sljedeći dan stanice smo isprali najprije u 4 mL otopine B, centrifugirali, odlili nadtalog a zatim u 4 mL hladne otopine C. Otopina C sadrži detergent, saponin, u čijem je prisustvu membrana permeabilna. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 600 x g, odlili smo nadtalog i epruvete posušili na listovima staničevine. Unatoč "sušenju", na talogu je zaostalo oko 50 μL otopine C što omogućuje ulazak monoklonskih antitijela u stanice. Talog smo promiješali "Vortex" miješalicom kako bi se stanice odlijepile od dna te smo na dno epruveta dodali monoklonska antitijela za unutarstanične citokine: anti-IL-4 PE i anti-IFN- γ FITC u limfocite, te anti-IL-6 FITC, anti-IL-1 β PE i anti-TNF- α APC u monocite. Za

svako od tih monoklonskih antitijela prethodno smo odrediti optimalnu koncentraciju titriranjem pri točno određenim uvjetima kultivacije. Korištene koncentracije navedene su u poglavlju 3.3.3. Monoklonska antitijela. Nakon dodavanja monoklonskih antitijela uzorke smo inkubirali 30 minuta na 4 °C u tami a zatim isprali, prvo s 4 mL otopine C, centrifugirali 5 minuta na 600 x g i potom isprali u 4 mL otopine B. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 600 x g, nadtalog smo odlili, epruvete posušili na listovima staničevine i talog s obilježenim monocitima resuspendirali u 400 µL otopine F2, a onaj s limfocitima u 500 µL otopine B. Uzorke smo odmah propuštali na protočnom citometru, postavljajući ogradu metodom "back-gatinga" oko limfocita, odnosno monocita. Unutar limfocitne ograde prikupili smo 5000 signala (eng. events), a unutar monocitne 3000.

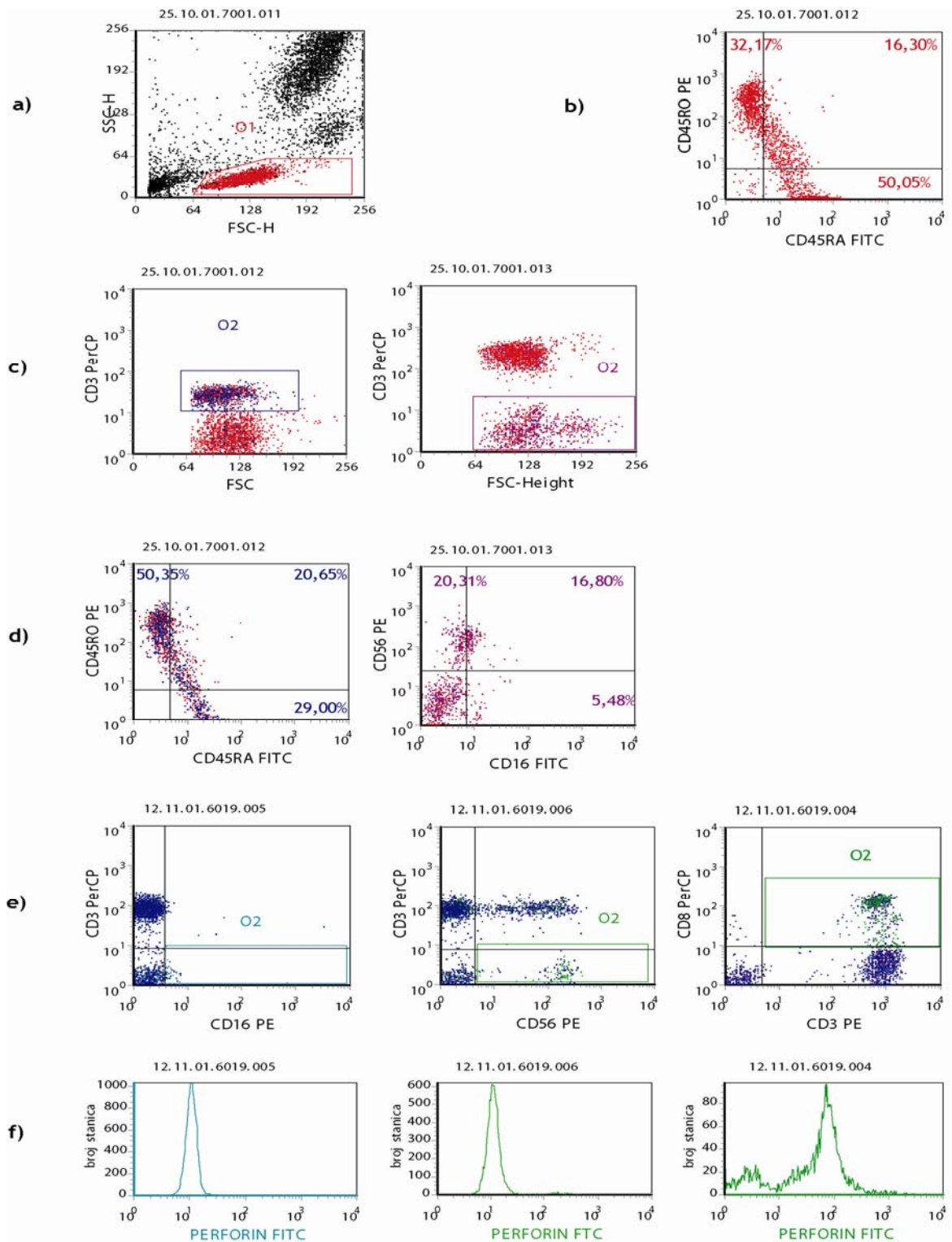
3.4.2.3. Propuštanje uzoraka i analiza rezultata na protočnom citometru

Sve uzorke, osim stimuliranih stanica, analizirali smo isti dan na protočnom citometru (FACSCalibur, BD Biosciences) s dva lasera: argonskim, snage 15 mW i pobudne zrake valne duljine od 488 nm te s crvenim diodnim laserom valne duljine od 635 nm. Optimalne uvjete za rad citometra (voltažu detektora, razdvajanje signala od pozadine za svaki od pet mjerenih parametara, kompenzaciju za djelomično preklapanje emisijskih spektara pojedinih fluorokroma), podešavali smo na početku svakog dana pomoću kuglica za kalibraciju (CaliBRITE 3). Diodni laser koristili smo samo prilikom propuštanja uzoraka stimuliranih monocita, jer je monoklonsko antitijelo za TNF- α bilo konjugirano s APC-om za čiju je pobudu potrebna crvena svjetlost valne duljine 633-640 nm. Za prikupljanje, pohranu i analizu podataka koristili smo CELLQuest program (BD Biosciences).

Na dvoparametarskom ("točkastom") dijagramu koji prikazuje odnos veličine (FSC od engl. forward scatter) i znatosti (SSC od engl. side scatter) stanica, razlikujući osnovne populacije leukocita, postavili smo elektronsku ogradu (engl. gate) oko populacije limfocita koje smo u daljnjem postupku analizirali (Slika 16 a). U svakom uzorku analizirali smo 5000 limfocita unutar ograde, uz optimalnu brzinu propuštanja od 400 do 600 stanica u sekundi. Subpopulacije limfocita obilježene specifičnim monoklonskim antitijelima također smo odredili na dvoparametarskim dijagramima koji prikazuju odnose fluorescencija površinskih

biljega. Rezultate smo izrazili kao postotak limfocita koji eksprimiraju jedan, drugi ili oba biljega, a određuju se u kvadrantima omeđenim graničnicima (engl. cursor), postavljenim na temelju izotipske kontrole (Slika 16 b).

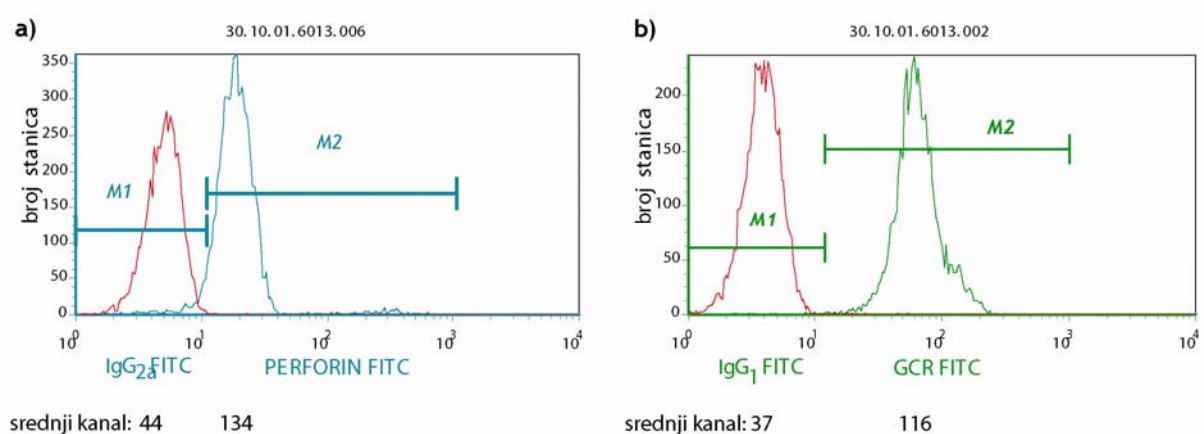
Rezultati se, osim kao postotak limfocita, mogu izraziti i kao postotak populacije definirane drugom elektronskom ogralom. Kod trostrukog obilježavanja postavili smo drugu elektronsku ogradu oko odabrane populacija limfocita, $CD4^+$, odnosno $CD3^-$ (Slika 16 c), te analizirali ekspresiju preostala dva biljega na površini (Slika 16 d). Kod analize perforina postavili smo drugu ogradu oko $CD3^-CD16^+$, $CD3^-CD56^+$, odnosno $CD3^+CD8^+$ (Slika 16 e), te određivali ekspresiju perforina u unutrašnjosti stanica (Slika 16 f).



Slika 16: Imunofenotipizacija s dvostrukim i trostrukim obilježavanjem. (a) Elektronska ograda (O1) postavljena oko populacije limfocita definiranih na temelju veličine (FSC) i znatosti (SSC) stanica. (b) Postotak limfocita koji ekspiriraju jedan, drugi ili oba biljega u kvadrantima omeđenim graničnicima (engl. cursor), postavljenim na temelju izotipske kontrole. (c) Kod trostrukog obilježavanja druga elektronska ograda (O2) postavljena je oko populacije CD4⁺ (u slučaju CD45RA FITC/CD45RO PE/CD4 FITC) ili CD3⁺ limfocita (u slučaju CD16 FITC/CD56 PE/CD3 PerCP). (d) Subpopulacije CD4⁺ limfocita koji ekspiriraju različite kombinacije biljega CD45RA i CD45RO izražene kao postotak CD4⁺ limfocita iz O2 i subpopulacije CD3⁺ limfocita koje ekspiriraju različite kombinacije biljega CD16 i CD56 izražene kao postotak CD3⁺ limfocita iz O2. (e) Druga elektronska ograda postavljena oko različitih subpopulacija citotoksičkih stanica (CD3⁺CD16⁺, CD3⁺CD56⁺ ili CD3⁺CD8⁺). (f) Ekspresija perforina u unutrašnjosti citotoksičkih stanica.

Relativnu količinu biljega na ili u stanicama određivali smo nakon postavljanja druge elektronske ograde na dvoparametarskom dijagramu zrnatosti i fluorescencije oko željene (sub)populacije. Intenzitet fluorescencije unutar te ograde, proporcionalan količini vezanog monoklonskog antitijela protiv ispitivanog biljega, prikazali smo na jednoparametarskom histogramskom prikazu (Slika 17 za GCR i perforin). Na istom smo histogramu prikazali fluorescenciju izotipske kontrole konjugirane istim fluorokromom i odredili vrijednosti srednjih kanala fluorescencije, (eng. mean channel value) biljega te kontrole. Relativna količina biljega izražena je kao intenzitet specifične fluorescencije (mfi od eng. mean fluorescence intensity), umanjena za intenzitet fluorescencije nespecifično vezanih antitijela (izotipska kontrola). Izračunali smo je prema formuli:

$$mfi = \text{srednji kanal fluorescencije biljega} - \text{srednji kanal fluorescencije izotipske kontrole}$$

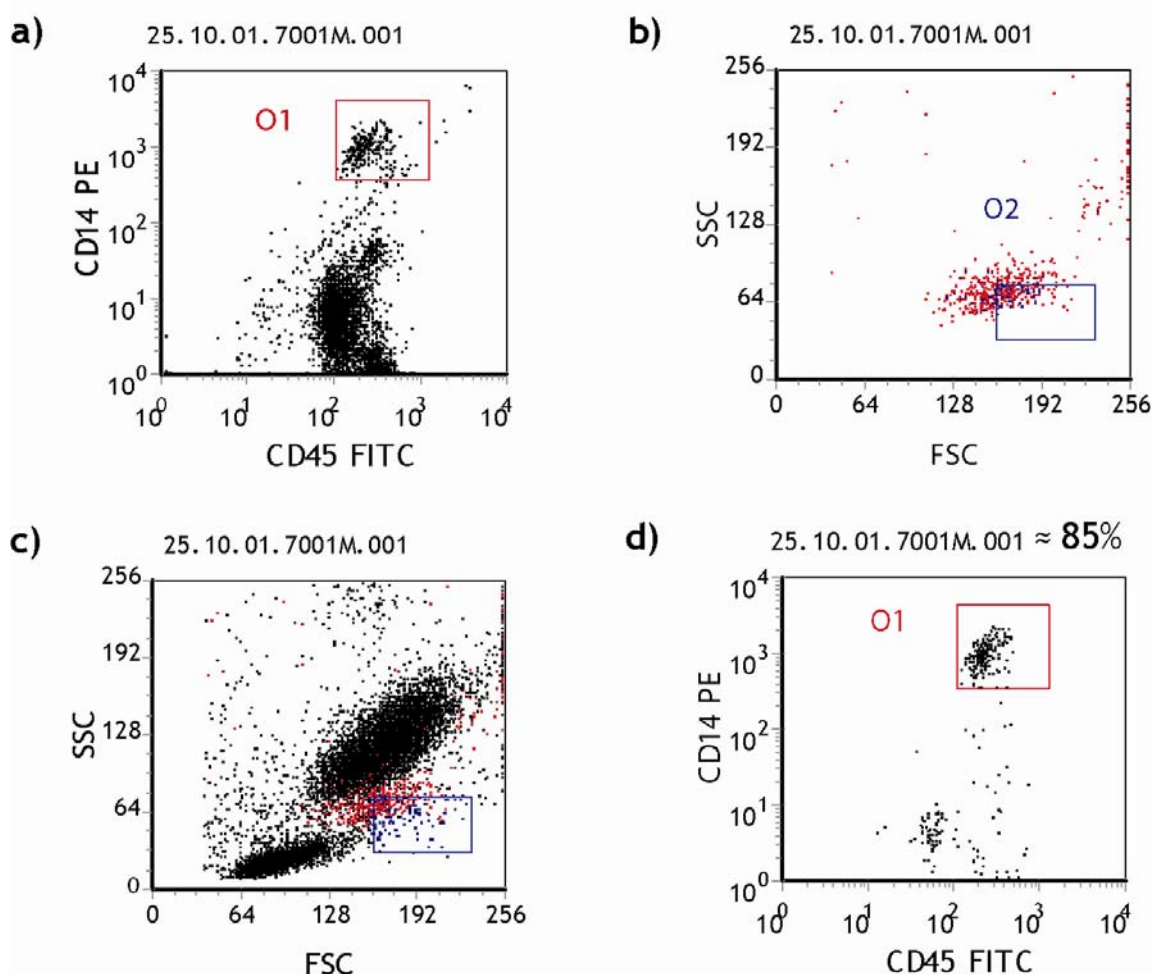


Slika 17: Određivanje relativne količine unutarstaničnog biljega na temelju vrijednosti srednjeg kanala fluorescencije (mfi) za perforin (a) i za GCR (b).

Postavljanje elektronske ograde oko monocita retrogradnom metodom ("back gating")

Proupalne citokine, IL-1 β , IL-6 i TNF- α , proizvode i izlučuju monociti, i važni su posrednici neuroimunološke komunikacije. Standardnim metodama izolacije monocita iz pune krvi dolazi do njihova gubitka i aktivacije. Kako bismo to izbjegli, stimulirali smo ih LPS-om u kulturi pune krvi te smo za postavljanje ograde oko monocita koristili multiparametarsku analizu koja definira monocite, istodobno na temelju njihove veličine i zrnatosti (FSC/SSC) i koekspresije biljega CD45 i CD14 (Slika 18). Uzorci krvi se nakon stimulacije obilježavaju reagensom LeucoGATE te

se temeljem specifičnih fluorescencija postavlja prva elektronska ograda, O1, oko stanica karakteriziranih visokom ekspresijom oba biljega (CD14 i CD45) (Slika 18 a). Stanice unutar ograde O1 prikazuju se zatim na dijagramu veličine i zrnatosti (Slika 18 b) te se postavlja nova ograda, O2, i to tako da obuhvati maksimalan postotak monocita iz O1. Potom se na istom dijagramu, prikažu svi leukociti i istovremeno se na dijagramu fluorescencija (Slika 18 c) prati sastav stanica iz O2. Ograda 2 može se korigirati tako da uključi najveći postotak monocita (oko 85%), uz najmanje onečišćenje ostalim stanicama (Slika 18 d). Unutar tako postavljene ograde analizira se sadržaj proupalnih citokina u stimuliranim monocitima.

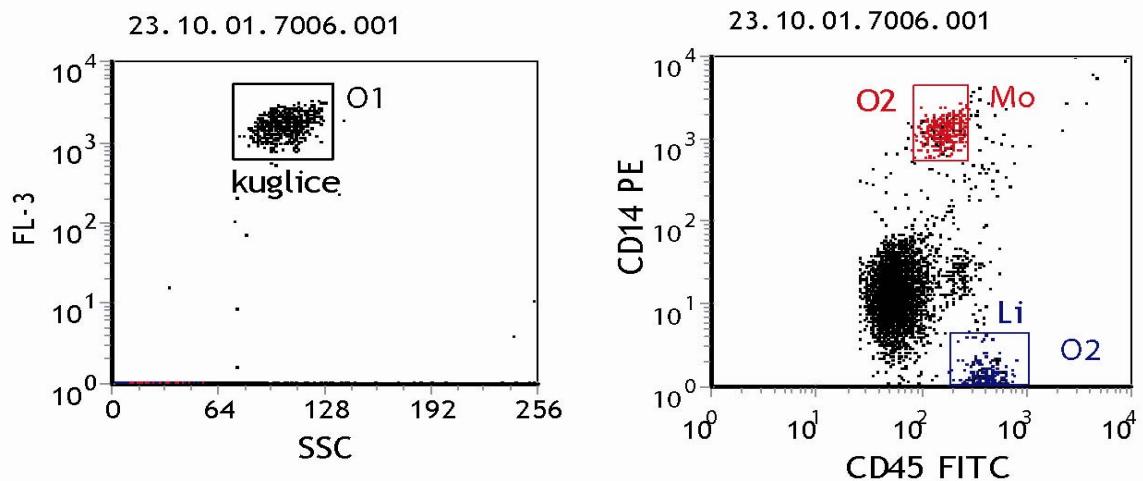


Slika 18: Retrogradna metoda postavljanja optimalne ograde ili "back gating". (a) Na temelju specifičnih fluorescencija postavlja se prva elektronska ograda, O1, oko stanica koje karakterizira visoka ekspresija biljega CD14 i CD45. (b) Stanice unutar ograde O1 prikazuju se na dijagramu FSC/SSC te se postavlja nova ograda, O2, tako da obuhvati maksimalan postotak monocita iz O1. (c) Na istom se dijagramu prikazuju i svi leukociti te se vrši korekcija ograde O2, prateći sastav stanica unutar O2 na dijagramu fluorescencije CD45/CD14, tako da konačno uključuje maksimalan postotak monocita.

3.4.3 Određivanje apsolutnog broja stanica protočnom citometrijom

Apsolutni broj stanica u volumenu krvi može se odrediti pomoću poznate koncentracije polistirenskih mikrokuglica (Flow-Count™ Fluorospheres) za koje je vezana boja. Miješanjem jednakih volumena pune krvi i suspenzije kuglica poznate koncentracije, te analizom uzorka na protočnom citometru, određujemo broj stanica i broj mikrokuglica u propuštenom (nepoznatom) volumenu uzorka.

Prema prethodno opisanoj metodi imunofenotipizacije, obilježili smo 50 μL pune krvi s reagensom LeucoGATE nakon čega smo dodali 50 μL dobro promiješanih mikrokuglica (Flow-Count™). Kombinacija monoklonskih antitijela CD45 i CD14 (LeucoGATE) dobro definira limfocite kao CD45 jako pozitivne te CD14 negativne stanice. Prilikom propuštanja uzorka, na dvoparametarskom dijagramu crvene fluorescencije (FL3) i zrnatosti (SSC) postavili smo prvu ogradu oko kuglica i u njoj skupili najmanje 2000 signala (kuglica). Analizirajući uzorak, postavili smo drugu ogradu oko limfocita ili monocita na dijagramu koji prikazuje odnos CD45 i CD14 (Slika 19) te odredili broj stanica u propuštenom uzorku.



Slika 19 Određivanje apsolutnog broja limfocita ili monocita pomoću kuglica poznate koncentracije. Broj limfocita iz O2 dijeli se s brojem kuglica iz O1 i množi s poznatom koncentracijom kuglica.

Budući da je koncentracija kuglica poznata, broj stanica u volumenu krvi može se izračunati prema sljedećoj formuli:

$$\text{broj stanica} / \mu\text{L} = \frac{\text{broj propuštenih stanica}}{\text{broj propuštenih mikrokuglica}} \times \text{koncentracija mikrokuglica}$$

3.4.4 Test citotoksičnosti NK-stanica

Test se zasniva na određivanju sposobnosti urođenoubilačkih stanica da razore ciljane stanice koje, pritom, oslobađaju radioaktivni biljeg kojim su prethodno bile označene (Saksela i sur., 1979, Ikić i sur., 1983). Kao ciljane stanice koristili smo kontinuiranu staničnu kulturu mijeloične leukemije K562. Stanice K562 smo resuspendirali u mediju RPMI 1640 s 10% fetalnog telećeg seruma (FCS) tako da im koncentracija ne prelazi 6×10^6 /mL. Obilježavali smo ih inkubiranjem 0,5 mL takve suspenzije s $1,85 \text{ MBq Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ u vodenoj kupelji na 30°C u trajanju od 60 minuta, uz stalno miješanje. Nevezani ^{51}Cr odstranili smo trostrukim ispiranjem stanica u mediju RPMI 1640 s 10% FCS te im koncentraciju podesili na 2×10^5 /mL. Efektorske, NK-stanice, izdvojili smo na gradijentu gustoće (vidi 3.2. Uzorci). Koncentraciju efektorskih stanica podesili smo na 5×10^6 /mL i napravili još dva dvostruka razrjeđenja. 200 μL tih suspenzija (1×10^6 , 5×10^5 i $2,5 \times 10^5$) miješali smo s 50 μL suspenzije obilježenih ciljnih stanica (1×10^4 /mL) tako da su konačni omjeri efektorskih i ciljnih stanica bili 100:1, 50:1 i 25:1 (konačni volumen iznosio je 250 μL). Svaki stanični omjer rađen je u triplikatu. Stanice smo inkubirali 3 sata na 37°C uz 5% CO_2 . Spontano otpuštanje kroma mjerili smo u suspenziji ciljnih stanica nakon dodavanja medija bez efektorskih stanica, a maksimalno otpuštanje u suspenziji ciljnih stanica koje smo inkubirali s 200 μL detergenta Triton X-100 razrijeđenog s fiziološkom otopinom u omjeru 1:250. Nakon isteka inkubacije, u svaku epruvetu dodali smo 750 μL fiziološke otopine. Uzorke smo centrifugirali 5 minuta na $120 \times g$ i iz svakog uzorka, pažljivo da se ne uzdigne talog, prenijeli 500 μL nadtaloga u novu epruvetu. Radioaktivnost uzoraka, izraženu kao broj otkucaja u minuti (cmp od engl. counts per minute), mjerili smo gama-brojačem (1272 ClininGamma, LKB Wallac, Turku, Finska). Postotak oslobođene radioaktivnosti (O) za svaki uzorak izračunali smo prema formuli:

$$O = \frac{N \times 2}{P + N} \times 100$$

gdje je N radioaktivnost (cpm) u 500 μL nadtaloga, a P radioaktivnost (cpm) preostalog uzorka (500 μL nadtaloga i talog).

Citotoksičnu aktivnost izrazili smo kao postotak citotoksičnosti (C) i izračunali je prema formuli:

$$C = \frac{O_E - O_s}{O_M - O_s} \times 100$$

gdje je O_E posto oslobođene aktivnosti u kulturi efektorskih i ciljnih stanica, O_s posto oslobođene aktivnosti spontano otpuštenog kroma, a O_M posto oslobođene aktivnosti pri maksimalnom otpuštanju kroma.

3.4.5 Određivanje hormona ELISA-om u serumu

Hormone - kortizol, DHEA i testosteron -u serumu određivali smo enzimskim imunotestom, **ELISA** (od engl. enzyme-linked immunosorbent assay). To je kvantitativna enzimska tehnika koja se temelji na principu kompeticije nepoznate količine hormona u ispitivanom uzorku te poznate količine istog hormona konjugiranog s peroksidazaom iz hrena za slobodno vezno mjesto specifičnog antitijela za traženi hormon, vezanog za mikrotitaracijsku pločicu. Nakon inkubacije u trajanju od jednog sata, ispiranjem mikrotitracijske pločice, zaustavlja se reakcija kompeticije. Dodatkom supstrata razvija se boja koja se određuje fotometrijski, a njezin intenzitet obrnuto je proporcionalan koncentraciji traženog hormona. Serume i sve potrebne kemikalije za izvođenje testa ostavili smo da se zagriju na sobnoj temperaturi prije početka korištenja. Jednom započeto, test je izvođen bez prekida, do kraja. U redosljedu postupaka kao i u pogledu korištenih količina kemikalija pridržavali smo se uputa proizvođača. Na dno bazenčića mikrotitracijskih pločica, u duplikatima smo ukapali određenu količinu standarda u sedam koncentracija (počevši od 0; S_0) i istu količinu seruma ispitanika, pazeci da između različitih seruma mijenjamo plastični nastavak pipetora. Zatim smo u sve bazenčiće dodali 200 μ L konjugata, hormona s peroksidazom (*Enzyme-Conjugate*), lagano protresli pločicu i inkubirali je jedan sat na sobnoj temperaturi. Četrdeset puta koncentriranu otopinu za ispiranje (*Wash Solution*) razrijedili smo deioniziranom vodom do konačnog volumena od 1200 mL. Po isteku inkubacije, naglim pokretom ruke izlili smo sav sadržaj iz pločice, te na snopu papirnatih ručnika snažnim udaranjem potpuno posušili bazenčiće. Potom smo, u tri slijedeća navrata ispirali pločicu dodavanjem 300 μ L otopine za ispiranje u svaki bazenčić te, ponavljajući gornji postupak, svaki put posušili pločicu.

Frakciju konjugata vezanog za antitijela na mikrotitracijskim pločicama izmjerili smo dodavanjem 100 μL chromogena (3,3'-5,5' tetrametilbenzidin, TMB) /supstrata (H_2O_2 , vodikov peroksid). Ovisno o količini hormona, u bazenčićima se počela razvijati plava boja različitog intenziteta. Nakon 15 minuta inkubacije u tami, enzimsku reakciju prekinuli smo dodavanjem 100 μL "stop" otopine (*Stop Solution*, 0,5 M H_2SO_4) čime se boja iz plave promijenila u žutu. Optičku gustoću (O.D.) očitavali smo pri 450 nm spektrofotometrijskim čitačem mikrotitracijskih pločica (Multiskan[®] MCC/340, Labsystems, Helsinki, Finland). Računalni program korigirao je očitane O.D. (odbijajući O.D. za S_0), izračunao kalibracijsku krivulju (pomoću četveroparametarske logističke jednačbe), te na temelju krivulje i korigiranih optičkih gustoća uzoraka odredio koncentracije hormona. Vrijednosti za kortizol i testosteron izražavali smo u ng/mL, a za DHEA u $\mu\text{g/mL}$.

3.5 Statistička obrada podataka

Analizirali smo ukupno 38 varijabli. Distribuciju svake varijable provjerili smo Shapiro-Wilkovim W-testom (STATISTICA v.6.1, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Kod varijabli koje nisu imale normalnu distribuciju, primijenili smo eksponencijalnu, Box-Coxovu transformaciju oblika: $X' = (X^\lambda - 1) / \lambda$. Transformacijski parametar λ , za svaku varijablu koju je trebalo normalizirati, odredili smo makronaredbom "BoxCox.stb" statističkog programa STATISTICA v.5.5. Nakon izvršene transformacije normalnost distribucije kod transformiranih varijabli ponovno smo provjerili W-testom.

Mjereći tako velik broj varijabli za svakog ispitanika, iz tehničkih je razloga neminovno došlo do gubitka pojedinih rezultata. Strukturu baze podataka s obzirom na rezultate koji nedostaju, analizirali smo postupkom Missing Value Analysis (SPSS12.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), uz primjenu Littleova testa potpune slučajnosti nedostatka vrijednosti (**MCAR** od engl. missing completely at random). Procjenu vrijednosti za podatke koji nedostaju izvršili smo metodom višestrukih imputacija pomoću programa NORM for Windows, v. 2.03 (besplatno dostupan na <http://www.stat.psu.edu/~jls/misoftwa.html>). Izvršili smo 5 imputacija, te odredili prosječne vrijednosti na temelju pet dobivenih baza s imputiranim podacima i tu smo bazu koristili za statističku analizu. Normalnost distribucije za svaku varijablu nakon imputacije još smo jednom provjerili W-testom a homogenost varijanci unutar tri grupe ispitanika Leveneovim testom.

Nakon toga, 18 je varijabli zadovoljavalo uvjete za primjenu parametarske statistike. Prikladna metoda je multivarijatna analiza varijance (MANOVA), no ta metoda ima dodatne zahtjeve u pogledu odnosa broja varijabli i veličine uzorka: veličina najmanjeg uzorka mora biti veća od broja varijabli uključenih u analizu. Budući da u ovom istraživanju to nije bio slučaj, primijenili smo 5 zasebnih multivarijatnih analiza za pojedine grupe srodnih varijabli, 4 MANOVA-e i jedan Hotellingov T^2 -test (za citokine koje smo određivali kod svega 23 ispitanika, 10 s PTSP-om i 13 kontrola). U slučaju MANOVA-a u obzir smo uzimali Pillajev kriterij jer je najpogodniji u slučaju nejednakih uzoraka, iako su i ostali kriteriji (Wilksov, Hotellingov i Royev) davali istoznačne rezultate. Homogenost varijanci uzoraka kontrolirali smo Leveneovim, a matrica varijanci i kovarijanci Boxovim M -testom. Da bismo zadržali ukupnu vjerojatnost pogrešnog odbacivanja nul-hipoteza na razini od 5%, pojedinačne p -vrijednosti korigirali smo Holmovim postupkom (Holm, 1979): $p' = (k - i + 1) * p$, gdje je k broj ukupnih usporedbi, odn. broj p -vrijednosti (u našem slučaju $k = 5$) a i uzlazni rang pojedine originalne p -vrijednosti. Kod multivarijatnih analiza čija je p' -vrijednost bila značajna, vršili smo univarijatne analize varijance (ANOVA) za svaku varijablu, ponovno uz Holmovu korekciju. U tom slučaju k je bio broj varijabli uključenih u pojedinu MANOVA-u. Konačno, za značajne varijable, vršili smo Tukeyjev "post-hoc" test (HSD od engl. honest significant digit) za nejednake uzorke, kako bismo utvrdili koji se uzorci dotične varijable razlikuju.

Varijable koje nisu zadovoljavale navedene uvjete parametarske statistike, analizirali smo Kruskal-Wallisovim ili Mann-Whitneyjevim testom (citokini). Takvih je varijabli bilo 22 pa je Holmova korekcija prekonzervativna. Stoga smo, umjesto da kontroliramo ukupni stupanj pogreške (family error rate), $\alpha_{\mathcal{F}}$, na razini od 5% ($\alpha_{\mathcal{F}} = 0,05$), kontrolirali stupanj pogrešnog zaključka (FDR od engl. false discovery rate) $f_{\mathcal{F}}$ (Benjamini i Hochberg, 1995), tj. očekivanu frakciju pogrešno odbačenih nul-hipoteza, na istoj razini ($f_{\mathcal{F}} = 0,05$). Postupak se sastoji u rangiranju pojedinačnih p -vrijednosti i izračunavanju kritičnih razina značajnosti, d_i^* , za svaku p -vrijednost kao $d_i^* = (i/k) * f_{\mathcal{F}}$. Za razliku od p' (korigirana p -vrijednost), d_i^* granična je vrijednost s kojom uspoređujemo originalni p i ukoliko je $p \leq d_i^*$, razliku smatramo značajnom na razini od 5%. Kod varijabli kod kojih je Kruskal-Wallisov test, nakon kontrole pogrešnog zaključka bio značajan, Mann-Whitneyjevim smo

testom, uz Holmovu korekciju dobivenih p-vrijednosti, analizirali koje se skupine ispitanika međusobno razlikuju.

Odnose između hormonskih i imunoloških varijabli analizirali smo Spearmanovom rang korelacijom. Stupanj pogrešnog zaključka (FDR) uslijed višestrukih korelacija kontrolirali smo na razini od 5%, računajući kritične razine (d_i^*).

4. REZULTATI

4. REZULTATI

4.1 Analiza strukture podataka s obzirom na vrijednosti koje nedostaju

Istraživanje poput ovog, koje uključuje velik broj varijabli, zahtijeva primjenu multivarijatne analize rezultata. S druge strane u takvim istraživanjima iz raznih je razloga praktički nemoguće prikupiti potpune rezultate.

Tablica 13: Analiza baze podataka s obzirom na vrijednosti koje nedostaju. Za svaku je varijablu prikazan broj postojećih rezultata (*n*) te broj i postotak vrijednosti koje nedostaju.

br.	varijabla*	<i>n</i>	nedostaje vrijednosti	
			broj	posto
1	Li	35	19	35,2
2	Mo	34	20	37,0
3	CD3 ⁺ CD4 ⁺	52	2	3,7
4	CD3 ⁺ CD8 ⁺	52	2	3,7
5	CD45RO ⁺ CD45RA ⁻	51	3	5,6
6	CD45RO ⁺ CD45RA ⁺	52	2	3,7
7	CD45RO ⁻ CD45RA ⁺	54	0	0,0
8	CD3 ⁻ CD56 ⁺	50	4	7,4
9	CD3 ⁻ CD16 ⁺	50	4	7,4
10	CD3 ⁻ CD56 ⁻ CD16 ⁺	43	11	20,4
11	CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺	50	4	7,4
12	CD32 ⁺ T	54	0	0,0
13	mfi CD32 T	53	1	1,9
14	CD64 Mo	52	2	3,7
15	mif CD64 Mo	50	4	7,4
16	mfi GCR T	54	0	0,0
17	CD3 ⁺ CD8 ⁺ PER ⁺	53	1	1,9
18	mfi CD3 ⁺ CD8 ⁺ PER ⁺	53	1	1,9
19	CD3 ⁻ CD16 ⁺ PER ⁺	50	4	7,4
20	mfi CD3 ⁻ CD16 ⁺ PER ⁺	51	3	5,6
21	CD3 ⁻ CD56 ⁺ PER ⁺	47	7	13,0
22	mfi CD3 ⁻ CD56 ⁺ PER ⁺ T	53	1	1,9
23	NK (1:25)	51	3	5,6
24	NK (1:50)	51	3	5,6
25	NK (1:100)	51	3	5,6
26	Kortizol	53	1	1,9
27	Testosteron	52	2	3,7
28	DHEA T	54	0	0,0
29	IFN- γ	18	5	21,7
30	mfi IFN- γ	19	4	17,4
31	IL-4	18	5	21,7
32	mfi IL-4	21	2	8,7
33	IL-1 β	21	2	8,7
34	mfi IL-1 β	23	1	4,3
35	TNF	21	2	8,7
36	mfi TNF	21	2	8,7
37	IL-6	21	2	8,7
38	mfi IL-6	21	2	8,7

*transformirane varijable imaju oznaku T

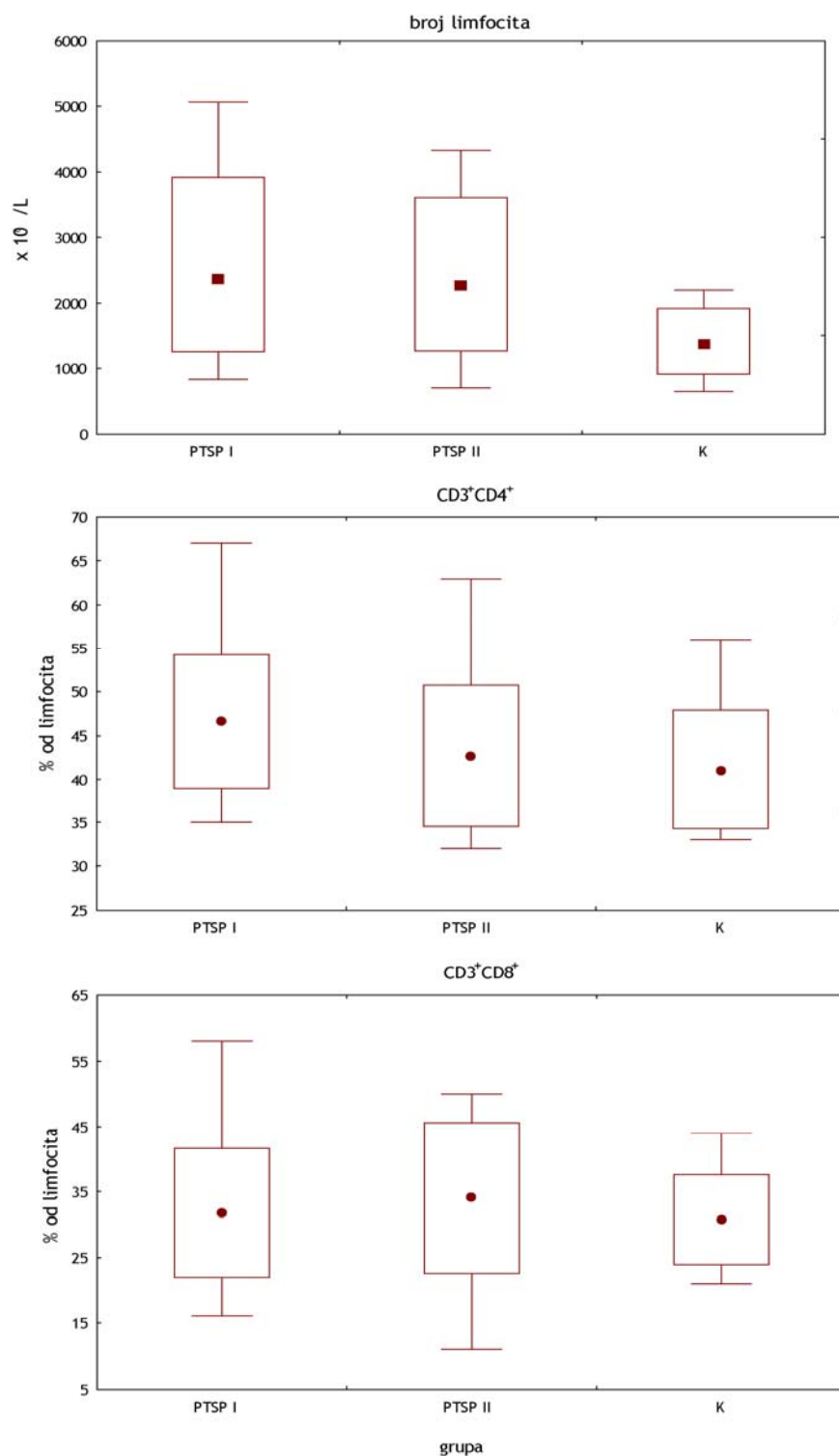
Budući da multivarijatne analize u takvom slučaju ne uzimaju u obzir ispitanike kojima, u bilo kojoj varijabli nedostaje vrijednost, bitno je, prije nego li se pristupi analizi, ispitati strukturu baze podataka (Tablica 13). Kao što se iz tablice vidi, u pojedinim varijablama nedostaje od 0 do 37% vrijednosti. Imputaciju je moguće vršiti samo za varijable s normalnom distribucijom (varijable br. 3-9, 11-13, 15-19, 22, 26-28), s obzirom na to da je kod tih varijabli struktura vrijednosti koje nedostaju potpuno slučajna (MCAR) ili slučajna (MAR od engl. missing at random). Na temelju Littleova testa ($\chi^2=273,3$; $df=211$; $p=0,104$) potpune slučajnosti, možemo zaključiti da naši podaci zadovoljavaju uvjete MCAR-a te je za te varijable izvršena imputacija, tj. statistička analiza vršena je s potpunim podacima.

4.2 Apsolutni broj limfocita i monocita

Apsolutni broj limfocita i monocita određivali smo u uzorku pune krvi metodom protočne citometrije pomoću polistirenskih kuglica točno poznate koncentracije. Budući da varijable nisu imale normalnu distribuciju, primijenili smo neparametarsku analizu varijance. Rezultati su prikazani u Tablici 14. Iako broj limfocita u obje skupine oboljelih od PTSP-a pokazuje tendenciju porasta, s obzirom na to da je razina značajnosti dobivena Kruskal-Wallisovim testom viša od granične vrijednosti (d_i^*), možemo zaključiti da nema razlike između triju skupina ispitanika (Slika 20).

Tablica 14: Apsolutni broj ($\times 10^9/L$) limfocita (Li) i monocita (Mo). Prikazan je broj ispitanika (n), medijan (Med), prvi i treći kvartil ($Q1-Q3$), razina značajnosti temeljem Kruskal-Wallisova testa ($K-W p$) i granična vrijednost na temelju stupnja pogrešnog zaključka ($FDR d_i^*$).

	PTSP I			PTSP II			K			K-W p	FDR d_i^*
	n	Med	$Q1-Q3$	n	Med	$Q1-Q3$	n	Med	$Q1-Q3$		
Li	14	2067	1547-3769	8	2205	1729-3208	12	1404	1050-1778	0,0238	0,0136
Mo	14	363	207-808	8	418	347-636	12	227	163-384	0,1261	0,0250



Slika 20: Apsolutni broj limfocita te relativan odnos (postotci) pomoćničkih (CD3⁺CD4⁺) i citotoksičkih (CD3⁺CD8⁺) T-limfocita u skupini ispitanika s PTSP-om bez dodatne traume (PTSP I), s dodatnom traumom zbog gubitka sredstava za život (PTSP II) te zdravim kontrolama. Prikazani su medijani (■) ili aritmetičke sredine (●) s interkvartilnim rangom, odnosno standardnom devijacijom (□) te minimalne (⊥) i maksimalne (⊊) vrijednost.

4.3 Subpopulacije limfocita i monocita - imunofenotipizacija biljega na površini stanica

Glavne subpopulacije limfocita određivali smo metodom protočne citometrije, nakon dvostrukog ili trostrukog obilježavanja površinskih biljega leukocita u perifernoj punoj krvi. Rezultati relativnih omjera (postotaka) za pomoćničke (CD3⁺CD4⁺) i citotoksičke (CD3⁺CD8⁺) T-limfocite te ukupne naivne (CD45RO⁻CD45RA⁺) limfocite analizirali smo multivarijatnom analizom varijance (MANOVA). Budući da Pillaiev test ($F_{(6,100)}=1,55$) nije bio značajan ($p=0,1687$), nismo dalje računali univarijatnu statistiku, već smo zaključili da se niti u jednoj varijabli skupine ne razlikuju (Slika 20). Deskriptivna statistika prikazana je u Tablici 15.

Tablica 15: Relativni omjeri za subpopulacije pomoćničkih, citotoksičnih te naivnih limfocita. Prikazan je broj ispitanika (n), aritmetička sredina (\bar{x}) te standardna devijacija (sd).

	PTSP I			PTSP II			K		
	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd
CD4	23	47	7,6	18	43	8,1	13	41	6,8
CD8	23	32	9,8	18	34	11,5	13	31	6,8
CD45RO ⁻ CD45RA ⁺	23	45	9,9	18	44	7,0	13	51	9,0

Preostale dvije varijable, dvostruko pozitivne ili prijelazne limfocite (CD45RO⁺CD45RA⁺) i čiste memorijske limfocite (CD45RO⁺CD45RA⁻) analizirali smo Kruskal-Wallisovim testom, a rezultati su prikazani u Tablici 16. Prilikom aktivacije potaknute antigenom, čisti naivni limfociti počinju ekspimirati biljeg CD45RO te su jedno kraće vrijeme prisutna oba biljega na površini. Budući da se istovremeno prekida ekspresija CD45RA, čisti memorijski limfociti ekspimiraju samo CD45RO. Niti za jednu od navedenih populacija nismo pronašli razliku među skupinama ispitanika.

Tablica 16: Relativni omjeri za subpopulacije prijelaznih i memorijskih limfocita. Prikazan je broj ispitanika (n), medijan (Med) te prvi i treći kvartil ($Q1-Q3$), razina značajnosti temeljem Kruskal-Wallisova testa (K-W p) i granična vrijednost na temelju stupnja pogrešnog zaključka (FDR d_i^*).

	PTSP I			PTSP II			K			K-W p	FDR d_i^*
	n	Med	$Q1-Q3$	n	Med	$Q1-Q3$	n	Med	$Q1-Q3$		
CD45RO ⁺ CD45RA ⁺	23	18	15-22	18	23	18-25	13	18	10-27	0,1810	0,0273
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻	23	32	27-39	18	31	27-37	13	29	23-38	0,7123	0,0477

U planu istraživanja predvidjeli smo odrediti i ukupne B-limfocite (CD19), međutim, zbog tehničkih poteškoća s monoklonskim antitijelom CD19 (konjugiranim PerCp-om), često nismo mogli odrediti vrijednosti za tu varijablu. Kako su podaci nedostajali u većem broju slučajeva, nismo bili u mogućnosti napraviti analizu podataka s obzirom na vrijednosti koje nedostaju, pa smo ovu varijablu morali potpuno izostaviti.

4.3.1 Subpopulacije NK-stanica

NK-stanice, kao efektorske stanice urođene imunosti, ne eksprimiraju specifičan receptor za antigen niti biljeg CD3. Stoga se fenotipski definiraju kao CD3⁻-stanice. Druga dva površinska biljega koja određuju NK-stanice su: CD56, izoforma adhezivne molekule živčanih stanica (NCAM) te Fc γ RIII (CD16), nisko afinitetni receptor za Fc-fragment IgG-antitijela. Gustoća ovih molekula na površini nije uvijek ista te stoga možemo razlikovati više subpopulacija NK-stanica. Subpopulacije smo određivali trostrukim obilježavanjem, postavljajući drugu elektronsku ogradu oko CD3⁻-stanica, a rezultate smo izražavali kao postotak od CD3⁻-populacije. Četiri subpopulacije definirane različitom ekspresijom navedenih biljega analizirali smo MANOV-om. Budući da Pillaiev test ($F_{(8,98)}=1,81$) nije bio značajan ($p=0,0832$), nismo računali univarijatnu statistiku, već smo zaključili da se niti kod jedne subpopulacije NK-stanica skupine ne razlikuju. Deskriptivna statistika prikazana je u Tablici 17.

Tablica 17: Relativni omjeri subpopulacija NK-stanica. Prikazan je broj ispitanika (n), aritmetička sredina (\bar{x}) te standardna devijacija (sd).

	PTSP I			PTSP II			K		
	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd
CD3 ⁻ CD56 ⁺	23	35	15,2	18	42	14,5	13	47	15,5
CD3 ⁻ CD16 ⁺	23	32	16,1	18	37	16,0	13	39	22,8
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺	23	27	14,0	18	32	14,4	13	29	18,3
CD3 ⁻ CD56 ⁻ CD16 ⁺ T ^a	23	3	1,6	18	4	1,8	13	4	1,9

^aDeskriptivna statistika za transformiranu varijablu računata su na temelju inverzne transformacije: $x = (x'\lambda + 1)^{1/\lambda}$.

4.3.2 Fc-receptori na limfocitima i monocitima

Membranski receptori za Fc-fragment imunoglobulina (FcR) povezani su s efektorskim funkcijama stanica kao što su fagocitoza, endocitoza, ADCC te degranulacija. Zbog nedoumica o pojačanom nespecifičnom vezanju izotipske kontrole na stanice ispitanika s PTSP-om u ranijim istraživanjima, željeli smo ispitati ekspresiju FcγRI (CD64) na monocitima i FcγRII (CD32) na limfocitima. Određivali smo postotak stanica koje ekspimiraju pojedini receptor i relativnu količinu receptora po stanici (srednji intenzitet fluorescencije, mfi). Postotak monocita koji ekspimiraju CD64 analizirali smo Kruskal-Wallisovim testom i nismo našli razliku među skupinama ispitanika (Tablica 18). Razlike nije bilo niti u intenzitetu fluorescencije tog biljega (Tablica 19). Ostale tri varijable (postotak CD32⁺-limfocita i relativnu gustoću Fc-receptora na monocitima i limfocitima) analizirali smo MANOVA-om. Budući da je Pillajev test ($F_{(6,100)}=5,55$) i nakon Holmove korekcije bio značajan ($p'=0,0003$), izvršili smo univarijatne testove (Tablica 19). Iznenadio nas je, međutim, snižen postotak (Slika 21) i intenzitet fluorescencije (Slika 22) biljega CD32 (FcγRII) na limfocitima u obje skupine ispitanika s PTSP-om u odnosu na kontrole.

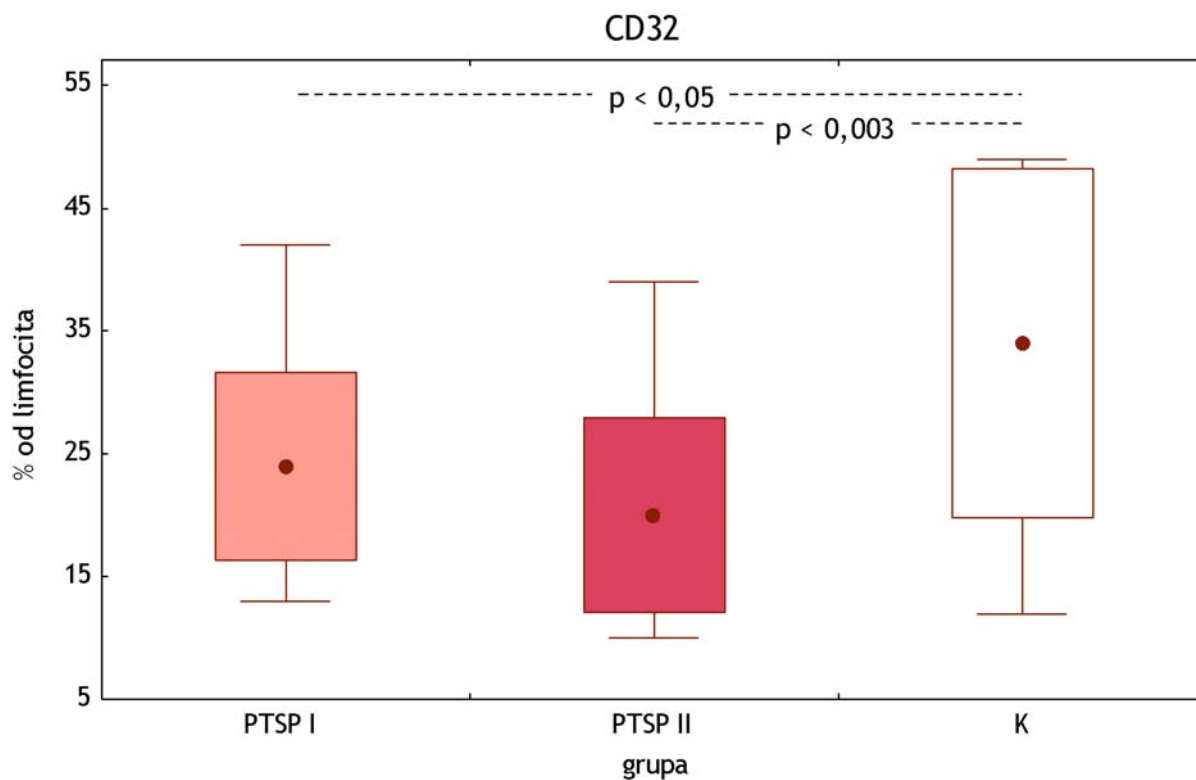
Tablica 18: Relativan omjer (postotak) monocita koji ekspimiraju CD64. Prikazan je broj ispitanika (n), medijan (Med) te prvi i treći kvartil ($Q1-Q3$), razina značajnosti temeljem Kruskal-Wallisova testa (K-W p) i granična vrijednost na temelju stupnja pogrešnog zaključka (FDR d_i^*).

	PTSP I			PTSP II			K			K-W p	FDR d_i^*
	n	Med	$Q1-Q3$	n	Med	$Q1-Q3$	n	Med	$Q1-Q3$		
CD64 Mo	21	94	92-95	18	94	92-96	12	91	85-95	0,4049	0,0386

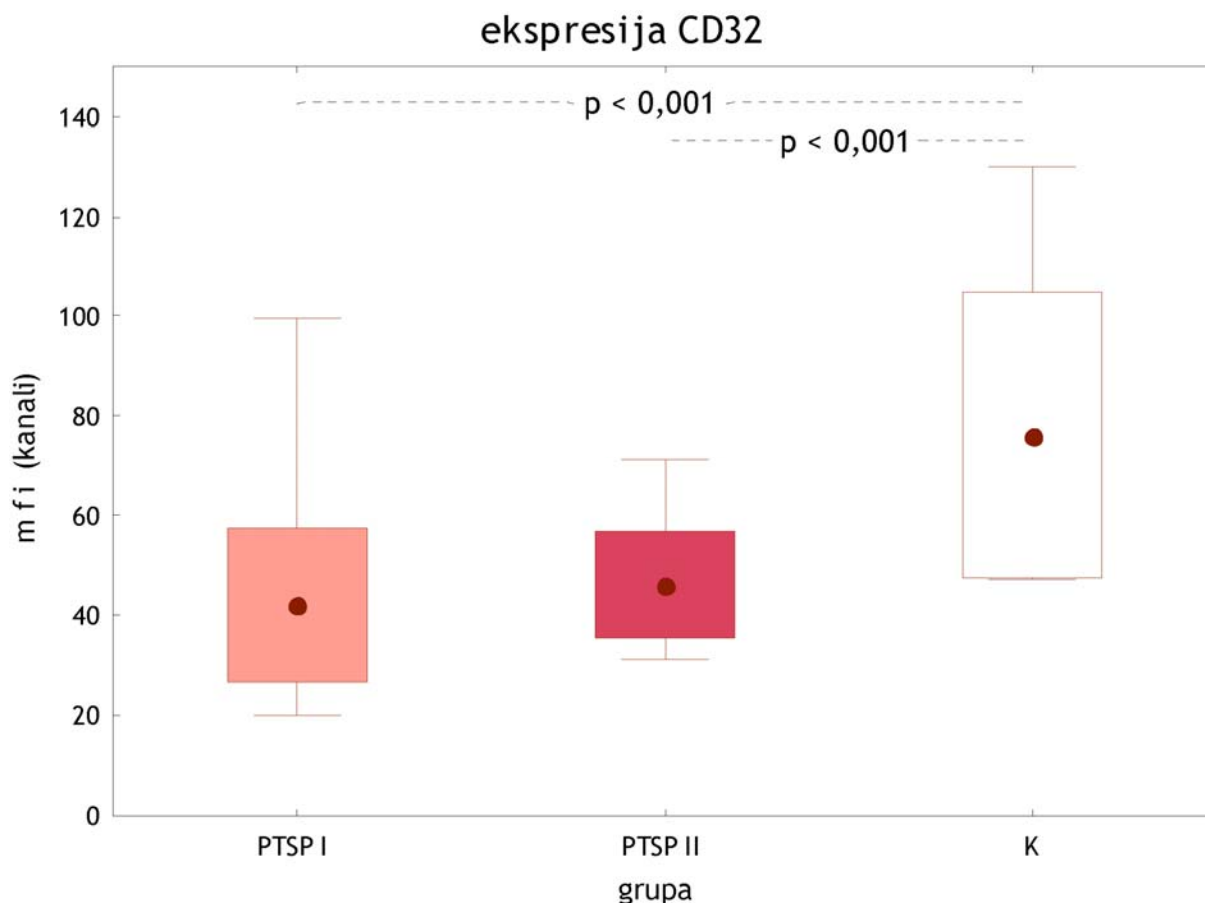
Tablica 19: Relativan omjer (postotak) limfocita koji ekspimiraju CD32 i relativna količina (mfi) CD32 na limfocitima, odnosno CD64 na monocitima. Prikazan je broj ispitanika (n), aritmetička sredina (\bar{x}), standardna devijacija (sd) i korigirane (Holmovom metodom) p -vrijednosti (p') za univarijatne testove. Značajne p -vrijednosti otisnute su masno.

	PTSP I			PTSP I			K			p'
	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd	
CD32 ⁺ T ^a	23	24	7,7	18	21	7,9	13	35	13,3	0,00129
mfi CD32 T	23	42	15,5	18	46	10,7	13	76	28,6	0,00003
mfi CD64 ⁺ Mo	23	76	5,3	18	76	4,7	13	72	4,9	0,10007

^aDeskriptivna statistika za transformiranu varijablu računata je na temelju inverzne transformacije: $x = (x\lambda + 1)^{1/\lambda}$.



Slika 21: Razlika u relativnom omjeru (postotku) limfocita koji ekspimiraju CD32 (FcγRII) kod ispitanika s PTSP-om bez dodatne traume (PTSP I) i s dodatnom traumom zbog gubitka sredstava za život (PTSP II) u odnosu na zdrave kontrole. Prikazana je aritmetička sredina (●) sa standardnom devijacijom (□) te minimalna (⊥) i maksimalna (⊤) vrijednost. Navedene p-vrijednosti dobivene su Tukeyjevim "post-hoc" testom za nejednake uzorke.



Slika 22: Razlika u srednjem intenzitetu fluorescencije (mfi) za ekspresiju CD32 biljega na limfocitima ispitanika s PTSP-om bez dodatne traume (PTSP I) te onih s dodatnom traumom zbog gubitka sredstava za život (PTSP II) u odnosu na zdrave kontrole. Prikazana je aritmetička sredina (●) sa standardnom devijacijom (□), minimalna (┴) i maksimalna (┴) vrijednost. Navedene p-vrijednosti dobivene su Tukeyjevim "post-hoc" testom za nejednake uzorke.

4.4 Ekspresija unutarstaničnog perforina citotoksičkim limfocitima te subpopulacijama NK- stanica

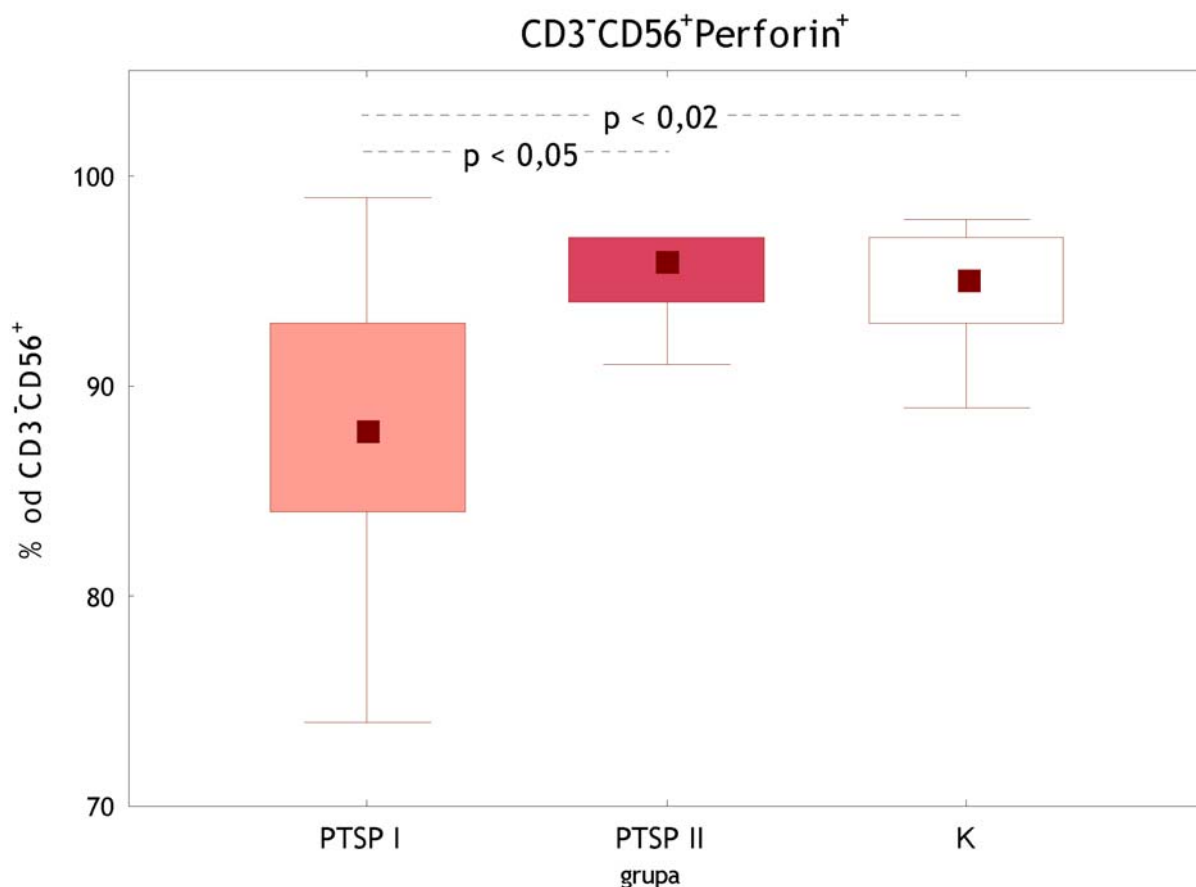
Perforin je citolitički protein, pohranjen u citoplazmatskim granulama citotoksičkih limfocita i NK-stanica, koji se, u bliskom kontaktu s ciljnim stanicama, oslobađa u međustanični prostor. Struktura perforina djelomično je podudarna s komponentom komplementa, C9, te u membrani ciljnih stanica formira pore. Time je omogućen ulazak proteolitičkih enzima u stanicu, što dovodi do njezine smrti. Metoda kojom smo se koristili za određivanje ekspresije perforina omogućava određivanje unutarstaničnog biljega na razini pojedinačne stanice, a stanične subpopulacije možemo razlikovati istovremenim obilježavanjem površinskih biljega. Analizom se određuje relativna količina perforina na temelju srednjeg intenziteta specifične fluorescencije (mfi) umanjenog za srednji intenzitet fluorescencije izotipske kontrole. Osim relativne količine perforina u citotoksičkim limfocitima (mfi CD3⁺CD8⁺PER⁺), gdje smo mogli primijeniti parametarsku analizu varijance (Tablica 20), ostale varijable nisu bile normalno distribuirane te smo ih analizirali neparametarski (Tablica 21). Jedino je kod relativnog omjera CD56⁺ NK-stanica Kruskal-Wallisov test ($H_{(2, N=47)} = 9,841$) bio značajan ($p=0,007 < d_i^*=0,011$). Da bismo odredili koje se skupine ispitanika razlikuju primijenili smo Mann-Whitneyjevev test uz Holmovu korekciju te zaključili da ispitanici bez dodatne traume (PTSP I) imaju niži postotak CD3⁺CD56⁺PRE⁺-stanica u odnosu na preostale dvije skupine (Slika 23).

Tablica 20: Relativna količina (mfi) perforina u citotoksičkim limfocitima. Prikazan je broj ispitanika (n), aritmetička sredina (\bar{x}), standardna devijacija (sd), razina značajnosti temeljem univarijatne analize varijance (ANOVA p) i granična vrijednost na temelju stupnja pogrešnog zaključka (FDR d_i^*).

	PTSP I			PTSP II			K			ANOVA p	FDR d_i^*
	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd		
mfi CD3 ⁺ CD8 ⁺ PER ⁺	23	65	19,6	18	76	17,3	13	69	11,8	0,1323	0,0273

Tablica 21: Relativni omjer (postotak) citotoksičkih limfocita i subpopulacija NK-stanica koji eksprimira perforin i relativna količina (mfi) perforina u subpopulacijama NK-stanica. Prikazan je broj ispitanika (n), medijan (Med), prvi i treći kvartil (Q1-Q3), razina značajnosti temeljem Kruskal-Wallisova testa (K-W p) i granična vrijednost na temelju stupnja pogrešnog zaključka (FDR d_i^*). Značajna p-vrijednost otisnuta je masno.

	PTSP I			PTSP II			K			K-W <i>p</i>	FDR d_i^*
	<i>n</i>	<i>Med</i>	<i>Q1-Q*</i>	<i>n</i>	<i>Med</i>	<i>Q1-Q3</i>	<i>n</i>	<i>Med</i>	<i>Q1-Q3</i>		
CD3 ⁺ CD8 ⁺ PER ⁺	23	44	13-60	18	49	33-74	13	50	37-57	0,4155	0,0409
CD3 ⁺ CD56 ⁺ PER ⁺	21	88	83-91	14	96	94-97	12	95	93-97	0,0073	0,0114
mfi CD3 ⁺ CD56 ⁺ PER ⁺	23	107	62-128	17	121	107-135	13	100	95-109	0,1425	0,0295
CD3 ⁺ CD16 ⁺ PER ⁺	23	83	66-90	15	95	88-96	12	83	63-93	0,0251	0,0159
mfi CD3 ⁺ CD16 ⁺ PER ⁺	23	111	66-130	18	118	106-139	13	104	91-115	0,0951	0,0205



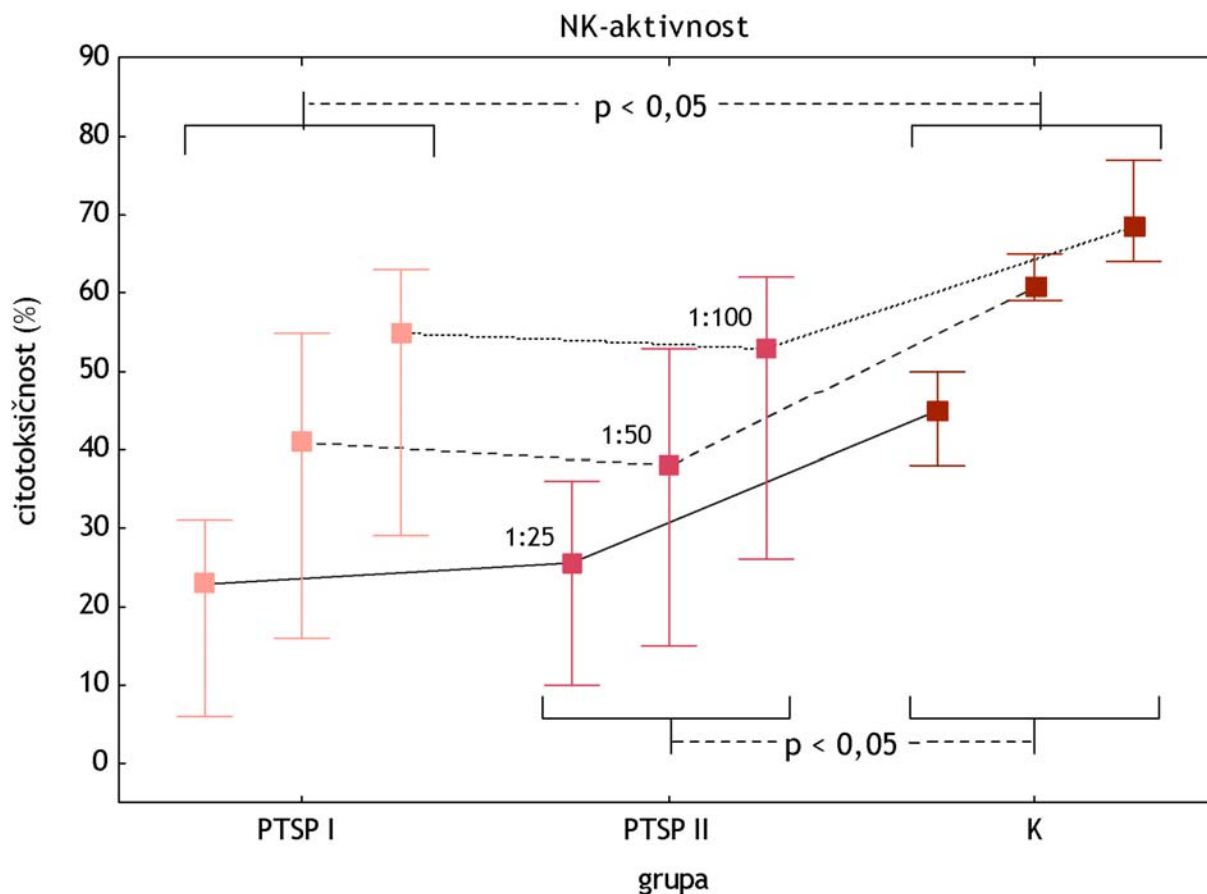
Slika 23: Razlika u relativnom omjeru (postotku) NK-stanica koje eksprimiraju perforin između skupine ispitanika s PTSP-om bez dodatne traume (PTSP I) i onih s dodatnom traumom zbog gubitka sredstava za život (PTSP II) te zdravih kontrola. Prikazan je medijan (■) s interkvartilnim rangom (□) te minimalna (⊥) i maksimalna (⊢) vrijednost. Skupine su uspoređivane Mann-Whitneyjevim testom a navedene su *p*-vrijednosti dobivene nakon Holmove korekcije.

4.5 Urođenoubilačka aktivnost NK-stanica

NK-stanice su vrlo osjetljive na učinke stresa i njihova funkcija se može koristiti kao pokazatelj imunosupresije. Funkcionalan test kojim se mjeri njihova citotoksička aktivnost temelji se na mjerenju otpuštanja radioaktivnog ^{51}Cr iz obilježenih ciljnih stanica, K562, nakon što ih NK-stanice ubiju u direktnom kontaktu. Efektorske i ciljne stanice smo kultivirali u tri omjera - 1:25, 1:50 i 1:100 i rezultate analizirali Kruskal-Wallisovim testom. Test je bio značajan u sva tri omjera (Tablica 22) pa smo Mann-Whitneyjevim testom (uz Holmovu korekciju) analizirali razliku između skupina ispitanika. Možemo zaključiti da obje skupine s PTSP-om, bez obzira jesu li doživjele dodatnu traumu (PTSP II) ili nisu (PTSP I), pokazuju nižu citotoksičku aktivnost NK-stanica u sva tri omjera efektorskih i ciljnih stanica (Slika 24).

Tablica 22: Razlika citotoksičke aktivnosti NK-stanica između ispitanika s PTSP-om koji nisu doživjeli dodatnu traumu (PTSP I), i onih s iskustvom dodatne traume zbog gubitka sredstava za život (PTSP II) te zdravih kontrola. Prikazan je broj ispitanika (n), medijan (Med), prvi i treći kvartil ($Q1-Q3$), razina značajnosti temeljem Kruskal-Wallisova testa ($K-W p$) i granična vrijednost na temelju stupnja pogrešnog zaključka ($FDR d_i^*$). Značajne p-vrijednosti otisnute su masno.

omjer ciljne:efektorske stanice	PTSP I			PTSP II			K			K-W p	FDR d_i^*
	n	Med	$Q1-Q3$	n	Med	$Q1-Q3$	n	Med	$Q1-Q3$		
1:25	23	23	6-31	18	26	10-36	10	45	38-50	0,0048	0,0091
1:50	23	41	16-55	18	38	15-53	10	61	59-65	0,0028	0,0045
1:100	23	55	29-63	18	53	26-62	10	69	64-77	0,0044	0,0068



Slika 24: Razlika u citotoksičnosti NK-stanica između skupine ispitanika s PTSP-om bez dodatne traume (PTSP I), s dodatnom traumom zbog gubitka sredstava za život (PTSP II) te zdravih kontrola. Prikazana je citotoksička aktivnost u tri omjera efektorskih i ciljnih stanica (1:25; 1:50; 1:100) kao medijan (■) s prvim (⊥) i trećim (⊔) kvartilom. Skupine su uspoređivane Mann-Whitneyjevim testom a navedene su p-vrijednosti dobivene nakon Holmove korekcije.

4.6 Ekspresija unutarstaničnih citokina u limfocitima odnosno monocitima stimuliranim *in vitro*

Ekspresiju unutarstaničnih citokina u stimuliranim limfocitima odnosno monocitima, iz tehničkih razloga, mogli smo određivati samo kod manjeg dijela ispitanika. Za ove varijable ispitanike s PTSP-om nismo podijelili u dvije skupine prema iskustvu dodatne traume, već smo ih svrstali u jednu skupinu definiranu kao oboljele od PTSP-a i uspoređivali ih sa zdravim kontrolama. Ekspresiju proupalnih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α) u monocitima, te citokina karakterističnih za pojedini tip imunoreakcije (IFN- γ za Th1 i IL-4 za Th2) u CD4⁺-limfocitima, određivali smo protočnom citometrijom nakon nespecifične stimulacije pune krvi LPS-om, odnosno s PMA i ionomicinom *in vitro*. Određivali smo postotak stanica koje ekspimiraju pojedini citokin, kao i relativnu količinu citokina (srednji intenzitet fluorescencije, mfi) u pojedinoj stanici. S obzirom na distribuciju rezultata, varijable smo analizirali neparametarskim (Tablica 23) ili parametarskim (Tablica 24) metodama. Budući da Hotellingov test nije bio značajan (Tablica 24), nismo uključene varijable analizirali pojedinačno. Kruskal-Wallisov test također nije bio značajan niti za jednu varijablu (Tablica 23), pa smo zaključili da se ekspresija citokina kod ispitanika s PTSP-om ne razlikuje od one zdravih kontrola, niti u postotku stanica niti u relativnoj količini.

Tablica 23: Ekspresija unutarstaničnih citokina u limfocitima, odnosno monocitima, nakon kratkotrajne nespecifične stimulacije *in vitro* prikazana kao postotak stanica koje ekspimiraju pojedini citokin i relativna količina citokina (mfi) u pojedinoj stanici. Prikazan je broj ispitanika (*n*), medijan (*Med*), prvi i treći kvartil (*Q1-Q3*), razina značajnosti temeljem Kruskal-Wallisova testa (K-W *p*) i granična vrijednost na temelju stupnja pogrešnog zaključka (FDR *d_i).**

	PTSD I+II			K			M-W <i>p</i>	FDR <i>d_i*</i>
	<i>n</i>	<i>Med</i>	<i>Q1-Q3</i>	<i>n</i>	<i>Med</i>	<i>Q1-Q3</i>		
IFN- γ	10	5	1-7	8	0	0-1	0,2863	0,0364
IL-4	10	1	0-1	8	2	0-6	0,4772	0,0432
mfi IL-1 β	10	31	23-44	13	47	35-58	0,1210	0,0227
IL-6	10	14	6-21	13	12	2-52	0,9013	0,0500
mfi IL-6	10	29	24-32	11	24	20-41	0,6221	0,0455
TNF- α	10	453	339-467	13	902	517-1200	0,0182	0,9420

Tablica 24: Relativni omjer (postotak) monocita koji eksprimiraju IL-1 β i relativna količina citokina (mfi) u limfocitima, odnosno monocitima, nakon kratkotrajne nespecifične stimulacije *in vitro*. Prikazan je broj ispitanika (*n*), aritmetička sredina (\bar{x}) i standardna devijacija (*sd*). Rezultati su analizirani Hotellingovim T²-testom, oblikom multivarijatne analize varijance za dva uzorka ($T^2=12,97$; $F_{(4,16)}=2,73$; $p=0,066$).

	PTSP (I+II)			K		
	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>
IL-1 β	10	48	30,7	11	37	29,0
mfi IFN- γ	10	29	8,3	13	18	11,2
mfi IL-4	10	14	4,5	13	17	9,0
mfi TNF- α	10	459	226,6	13	896	484,5

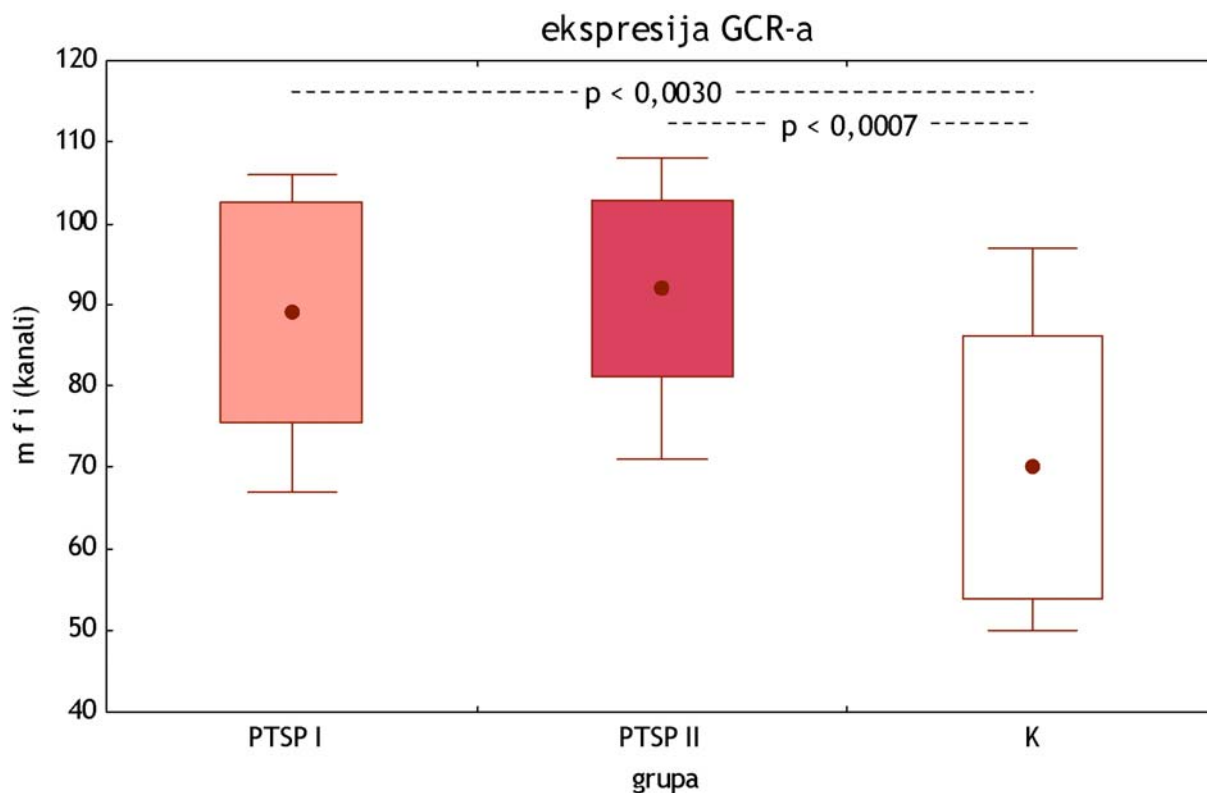
4.7 Glukokortikoidni receptori

Temeljem podataka o količini glukokortikoidnih receptora te razini kortizola u serumu, može se zaključivati o funkcioniranju HPA-osovine. GCR je receptor za kortizol koji je u inaktivnom obliku smješten u citoplazmi stanice. Razina GCR-a u stanicama regulirana je negativnom povratnom spregom kortizola. Relativnu količinu GCR-a u limfocitima određivali smo metodom protočne citometrije za obilježavanje unutarstaničnih biljega, a izražavali je srednjim intenzitetom specifične fluorescencije (mfi), umanjene za vrijednost intenziteta fluorescencije izotipske kontrole. Budući da je ANOVA ($F_{(2,51)}=11,57$; $p=0,0001 < d_i^*=0,0023$) bila značajna (Tablica 25), Tukeyjevim "post-hoc" testom za nejednake uzorke ispitali smo, koje se skupine ispitanika razlikuju. Na temelju toga mogli smo zaključiti da obje skupine ispitanika s PTSP-om (PTSP I i PTSP II) imaju povišenu relativnu količinu GCR-a u odnosu na zdrave kontrole (Slika 25).

Tablica 25: Relativna količina (mfi) unutarstaničnog glukokortikoidnog receptora (GCR) u limfocitima. Prikazan je broj ispitanika (*n*), aritmetička sredina (\bar{x}), standardna devijacija (*sd*), razina značajnosti temeljem univarijatne analize varijance (ANOVA *p*) i granična vrijednost na temelju stupnja pogrešnog zaključka (FDR d_i^*). Značajna *p*-vrijednost otisnuta je masno.

	PTSP I			PTSP II			K			ANOVA <i>p</i>	FDR d_i^*
	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>		
mfi GCR T ^a	23	88	14,6	18	91	11,1	13	68	15,3	0,0001	0,0023

^aDeskriptivna statistika računata je na temelju inverzne transformacije: $x = (x'\lambda + 1)^{1/\lambda}$.



Slika 25: Razlike u relativnoj količini glukokortikoidnih receptora izraženoj srednjim intenzitetom fluorescencije (mfi) u populaciji limfocita između skupine ispitanika s PTSP-om bez dodatne traume (PTSP I), onih s dodatnom traumom zbog gubitka sredstava za život (PTSP II) i zdravih kontrola. Prikazana je aritmetička sredina (●) sa standardnom devijacijom (□) te minimalna (⊥) i maksimalna (⊢) vrijednost. Navedene p-vrijednosti dobivene su Tukeyjevim "post-hoc" testom za nejednake uzorke.

4.8 Hormoni u serumu

O neuroendokrinom statusu ispitanika možemo zaključivati temeljem određivanja hormona značajnih za međusobnu komunikaciju živčanog, hormonskog i imunostava. Enzimskim imunotestom određivali smo razine kortizola, DHEA i testosterona u uzorcima seruma. Rezultati za kortizol i testosteron bili su normalno distribuirani pa smo ih analizirali MANOVA-om (Tablica 26). Iako je Pillajev test ($F_{(4,102)}=2,78$) bio značajan ($p=0,0308$), nakon Holmove korekcije za višestruke usporedbe značajnost se izgubila ($p'=0,0925$), tj. moglo se zaključiti da je bila posljedica slučaja. Stoga nismo računali univarijatnu statistiku, već smo zaključili da se razina tih hormona među ispitivanim skupinama ne razlikuje. Do istog smo zaključka došli i za DHEA (Tablica 27) temeljem Kruskal-Wallisovog testa ($H_{(2, N=54)}=2,554$) čija je razina značajnosti ($p=0,279$) bila viša od granične vrijednosti pogrešnog zaključka ($d_i^*=0,0341$).

Tablica 26: Razina kortizola (ng/mL) i testosterona (ng/mL) u serumu. Prikazan je broj ispitanika (n), aritmetička sredina (\bar{x}) te standardna devijacija (sd).

	PTSP I			PTSP II			K		
	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd
Kortizol	23	118,9	42,05	18	130,1	42,48	13	113,6	45,29
Testosteron	23	3,8	1,14	18	4,6	0,93	13	4,9	1,29

Tablica 27: Razina DHEA ($\mu\text{g/mL}$) u serumu. Prikazan je broj ispitanika (n), medijan (Med) te prvi i treći kvartil ($Q1-Q3$).

	PTSP I			PTSP II			K		
	n	Med	$Q1-Q3$	n	Med	$Q1-Q3$	n	Med	$Q1-Q3$
DHEA	23	2,4	2,1-2,8	18	2,7	2,5-3,7	13	2,8	2,2-3,0

4.9 Korelacije između nekih ispitivanih parametara

Analizom odnosa između imunoloških i hormonskih parametara (Tablica 28) uočili smo pozitivnu korelaciju između razine kortizola u serumu i apsolutnog broja limfocita (Slika 26), odnosno monocita (Slika 27).

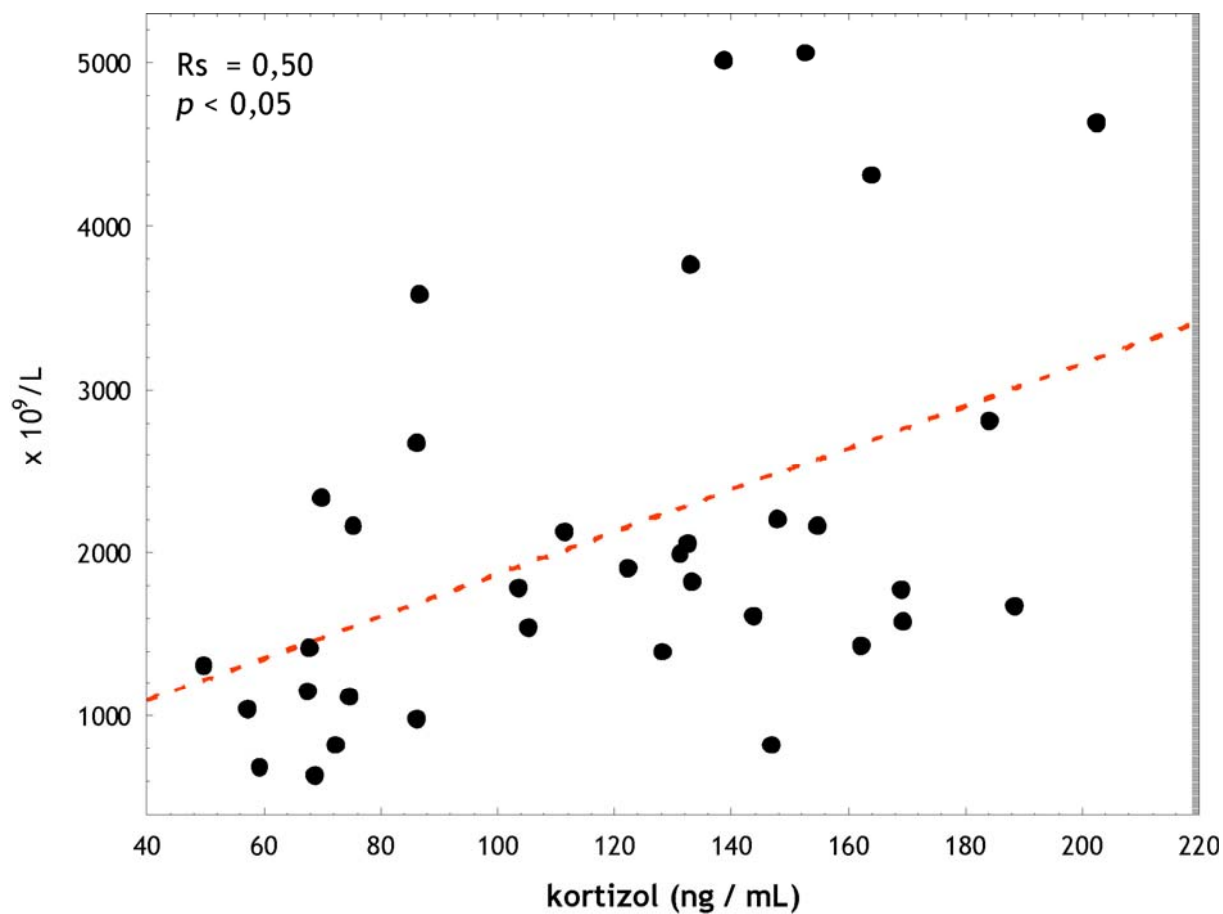
Tablica 28: Korelacija između imunoloških i hormonskih varijabli. Prikazan je broj ispitanika (n), Spearmanov koeficijent korelacije (R_S), razina značajnosti (p) i granična vrijednost na temelju stupnja pogrešnog zaključka (FDR d_i^*). Značajne p -vrijednosti otisnute su masno.

	n	R_S	p	FDR d_i^*
kortizol:				
Li	35	0,500560	0,002195	0,005882
Mo	34	0,525134	0,001428	0,002941
CD3	53	-0,217564	0,117599	0,017647
RO ⁺ RA ⁻	54	-0,266008	0,051872	0,008824
RO ⁺ RA ⁺	54	0,077168	0,579148	0,032353
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺	54	0,217820	0,113592	0,014706
mfi CD3 ⁺ CD8 ⁺ PER ⁺	54	0,088368	0,525156	0,029412
mfi CD3 ⁻ CD56 ⁺ PER ⁺	53	0,208438	0,134193	0,020588
NK- aktivnost	51	-0,037407	0,794395	0,047059
mfi IFN- γ	23	-0,074111	0,736822	0,041176
mfi IL-4	23	-0,053360	0,808931	0,050000
mfi IL-6	21	-0,403896	0,069399	0,011765
mfi IL-1- β	23	-0,120553	0,583749	0,035294
mfi TNF- α	23	0,120553	0,583749	0,038235
mfi GCR T ^a	54	0,158467	0,252420	0,023529
DHEA:				
mfi IFN- γ	23	0,198617	0,363609	0,026471
mfi IL-4	23	-0,060277	0,784696	0,044118

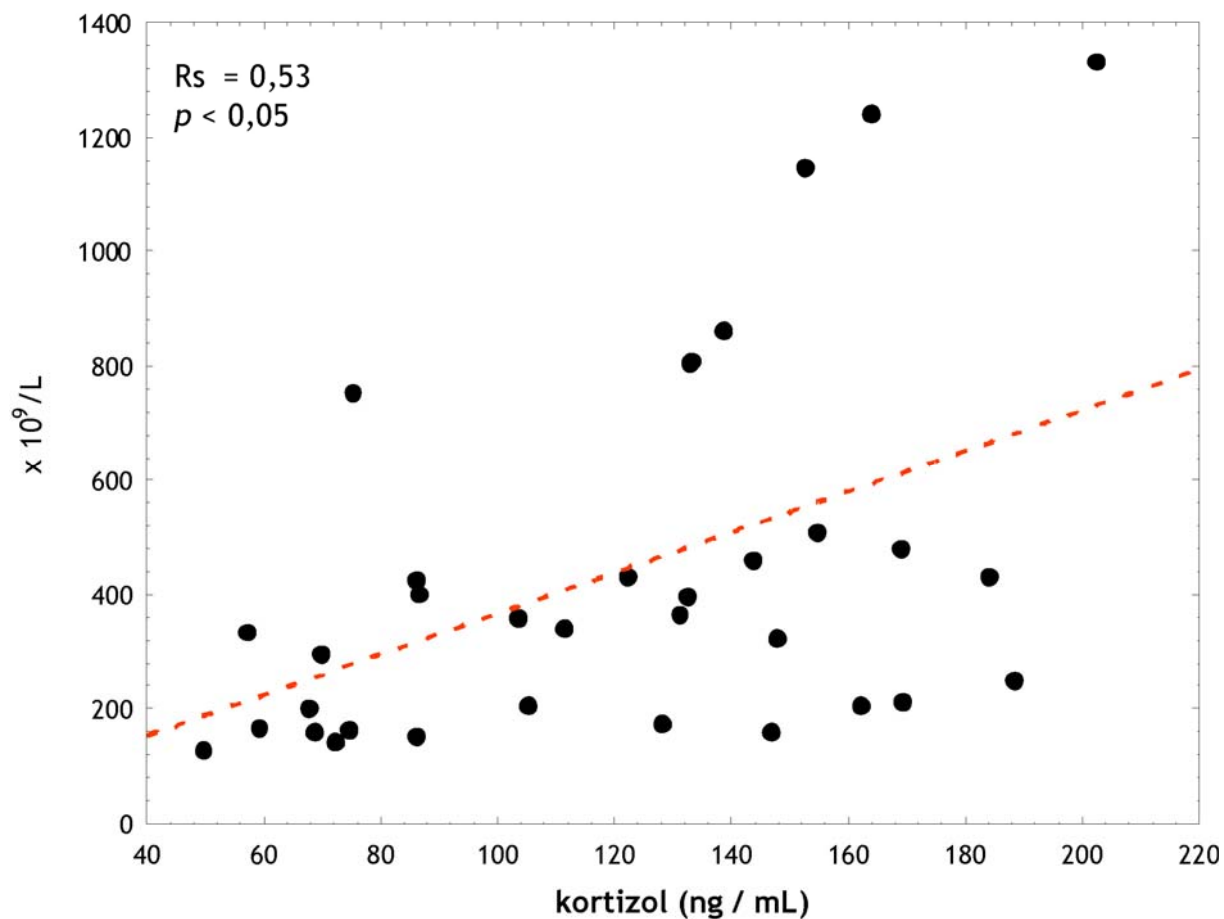
**transformirane varijable imaju oznaku T*

Iako su dobro poznata brojna imunomodulatorna svojstva kortizola, nismo našli korelacije između tog hormona i ostalih imunoloških varijabli za koje smo smatrali da ima smisla ispitati odnos. Nismo našli korelaciju niti između razine kortizola i ekspresije proupalnih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α) u monocitima, niti s ispitivanim citokinima karakterističnim za Th1/Th2-tip reakcije (IFN- γ i IL-4) u limfocitima stimuliranim *in vitro*. Budući da je kod ispitanika s PTSP-om razina glukokortikoidnih receptora u limfocitima povišena, a koncentracija kortizola u serumu nepromijenjena, statistički smo analizirali njihov odnos, no nismo ga potvrdili očekivanom negativnom korelacijom. Također nismo našli korelaciju između DHEA i ekspresije Th1/Th2-citokina, IFN- γ i IL-4. Odsutnost korelacija

između Th1/Th2-citokina i hormona donekle iznenađuje. Poznato je, naime, da DHEA i kortizol imaju suprotan učinak, pri čemu kortizol pomiče Th1/Th2-ravnotežu prema Th2-, a DHEA prema Th1-tipu reakcije.



Slika 26: Korelacija između razine serumskog kortizola i apsolutnog broja limfocita. Prikazan je Spearmanov koeficijent korelacije (R_s) te odgovarajuća razina značajnosti (p).



Slika 27: Korelacija između razine serumskog kortizola i apsolutnog broja monocita. Prikazan je Spearmanov koeficijent korelacije (R_s) te odgovarajuća razina značajnosti (p).

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

Dobro je poznato da izlaganje traumatskom događaju može povećati opasnost od fizičkih i psihičkih oboljenja. Oboljeli od PTSP-a, prema epidemiološkim studijama, mnogo se češće žale na brojne fizičke simptome nego zdrave osobe ili one s dijagnozom nekog drugog psihičkog poremećaja. Najčešći simptomi koje opisuju su glavobolja, bolni zglobovi, svrbež kože, poteškoće s cirkulacijom, probavom i disanjem, fibromijalgija, pretjerani umor te neurokognitivne poteškoće (Schnurr i Spiro, 2000). Gotovo isti zbir poteškoća opisan je kod veterana Zaljevskog rata pa je zbog učestalog pojavljivanja taj problem nazvan Gulf war-sindromom (Everson i sur., 1999; Engel i sur., 2000; Ferguson i Cassaday, 2002; Vojdani i Thrasher 2004). Brojni nalazi upućuju na vezu između traume, raznih fizičkih simptoma i bolesti no, u ovom je trenutku, njihova biološka povezanost prilično nejasna (Engel i sur., 2000; Schnurr i Spiro, 2000). Postavljene su neke pretpostavke i hipoteze, ali mogući odgovor na ta pitanja možemo dobiti samo multidisciplinarnim pristupom problemu (Biomdi i Pancheri, 1995). Psihoneuroimunološka istraživanja PTSP-a značajna su za upoznavanje, kako bioloških osnova ovog poremećaja tako i odnosa PTSP-a i drugih bolesti te psihičkih poremećaja (Wong, 2002). U proteklih dvadeset godina od kada je PTSP definiran kao dijagnostički entitet u psihijatriji (Andreasen, 1980) objavljeno je mnoštvo radova, ne samo o njegovim kliničkim, već i o biološkim aspektima. Baza podataka PILOTS (Published International Literature On Traumatic Stress), američkog Nacionalnog centra za posttraumatski stresni poremećaj, dostupna je na Internetu (<http://www.ncptsd.org>) i sadrži radove iz svih područja (psihijatrija, medicina, imunologija, endokrinologija) koja su od interesa u tom entitetu. Pretraživanjem te baze, pronašli smo trinaest radova u kojima se govori o imunološkim aspektima PTSP-a (Mosnaim i sur., 1993; Watson i sur., 1993; Ironson i sur., 1997; Spivak i sur., 1997; Laudenslager i sur., 1998; Boscarino i Chang, 1999; Maes i sur., 1999 a; Wilson i sur., 1999; Baker i sur., 2001; Kawamura i sur., 2001; Altemus i sur., 2003; Rohleder i sur., 2003; Tucker i sur., 2004), a u šest od njih istovremeno se ispituju imunološki i hormonski parametri. Treba naglasiti da su ta istraživanja sprovedena duže vrijeme (desetke godina) nakon doživljene traume, dakle, kod ispitanika s kroničnim simptomima PTSP-a (Hockings i sur., 1993, Mason i sur., 1986; Mason i

sur., 1988; Mason i sur., 1990; Yehuda i sur., 1995 a i b). Najčešće su to bili vijetnamski veterani, stradalnici holokausta ili žrtve seksualnog nasilja u djetinjstvu.

Plan ovog istraživanja temeljen je, najvećim dijelom, na našim dosadašnjim saznanjima i istraživanjima PTSP-a te kroničnog stresa i proizašao je iz namjere da odgovorimo na pitanja koja su se otvarala tijekom ranijih radova, ali i da razjasnimo moguće mehanizme pojedinih pojava. Uz to, pokušali smo u njih uklopiti i novije spoznaje o utjecaju stresa na Th1/Th2 ravnotežu te ih zajednički povezati. U dosadašnjim smo istraživanjima ispitivali što se događa u ranim stadijima PTSP-a, u vremenskom razdoblju od 6 do 8 godina nakon proživljene traume, testirajući dvije skupine sudionika Domovinskog rata, profesionalne vojnike i ratne veterane s PTSP-om (Gotovac Borčić, 2000). U obje smo skupine uočili brojne promjene koje bi se mogle opisati pojačanom aktivnošću imunostava. Razlike smo opazili i u hormonskim parametrima.

Broj leukocita, te broj i relativni omjer subpopulacija limfocita u perifernoj krvi odraz je otpuštanja tih stanica iz primarnih limfnih organa i njihova pregrupiranja između sekundarnih organa i perifernih tkiva. Na recirkulaciju leukocita i nazočnost pojedinih populacija stanica u perifernoj krvi, u trenutku uzorkovanja, utječu brojni faktori. Iako određivanje njihova broja i odnosa može donekle odražavati aktivnost imunostava kao cjeline, uočene promjene koje opažamo u cirkulaciji ne moraju korelirati s funkcionalnom aktivnošću tih stanica u limfnim ili perifernim tkivima gdje se imunoreakcije odvijaju. U ovom radu, kod ispitanika s PTSP-om nismo uočili promjene apsolutnog broja limfocita i monocita u odnosu na zdrave kontrole. Sličan su rezultat objavili Rohleder i sur. (2004) kod bosanskih ratnih izbjeglica, Laudenslager i sur. (1998) u veterana Vijetnamskog rata te Wilson i sur. (1999) u žena koje su razvile PTSP kao posljedicu seksualnog nasilja u djetinjstvu. Međutim, Boscarino i Chang (1999) su u istraživanju kod vijetnamskih veterana našli povišen broj ukupnih leukocita, limfocita te postotke T-, CD4- i CD8-stanica. Mi smo također u dosadašnjim istraživanjima ranog stadija PTSP-a, u obje skupine ispitanika (profesionalnih vojnika i ratnih veterana) uočili povišene vrijednosti brojnih enumerativnih imunoloških parametara što se, tada, moglo objasniti akutnim stadijem bolesti. Nakupljanje limfocita u perifernoj krvi u PTSP-u može se povezati s izrazitom aktivnošću simpatičkog i noradrenergičkog sustava, jer je pokazano da kateholamini induciraju leukocitozu (Benschop i sur.,

1996 b). Nepromijenjen broj ukupnih limfocita i monocita kao i postotaka osnovnih populacija limfocita kod naših ispitanika danas, desetak godina nakon traume, ne začuđuje s obzirom na to da smo kod njih našli normalnu razinu kortizola. Osim toga, razina kortizola bila je u pozitivnoj korelaciji s apsolutnim brojem limfocita i monocita. Poznato je, naime, da pri fiziološkim razinama kortikosteroidi utječu na redistribuciju leukocita potičući njihovu ekstravazaciju. To se, u prvom redu, odnosi na akutni stres (Dhabhar i sur., 1995; Dhabhar i McEwen, 1997) i fiziološke cirkadijalne varijacije u koncentraciji steroidnih hormona i populacija limfocita. Razlog ekstravazacije leukocita na periferiju u akutnom stresu evolucijski se objašnjava potrebom za lakom dostupnošću stanica imunostava, ukoliko dođe do ranjavanja i prodora infektivnog agensa. Kod kroničnog stresa, pak, organizam se postupno prilagođuje mijenjajući reaktivnost svih sustava, a jedan od oblika adaptacije je smanjena reaktivnosti na kortizol. Dhabhar i McEwen (1997) su ustvrdili da se kod kroničnog stresa u štakora narušava cirkadijalni ritam kortikosterona i s njim povezana dinamika redistribucije limfocita. Možemo pretpostaviti da je, nakon deset godina trajanja simptoma bolesti, došlo do prilagodbe imunostava te da su se brojčane vrijednosti enumerativnih parametara povratile u okvire fizioloških granica.

U ranijim smo istraživanjima unutarstaničnih glukokortikoidnih receptora uočili pojačano vezanje izotipske kontrole kod ispitanika s PTSP-om, za razliku od kontrolnih ispitanika. Kako se monoklonska antitijela, koja koristimo u protočnoj citometriji, mogu nespecifično vezati Fc-fragmentom za Fc-receptore na površini stanica, pretpostavili smo da bi to mogla biti posljedica pojačane ekspresije Fc-receptora kod ispitanika s PTSP-om. Membranski receptori za Fc-fragment imunoglobulina (FcR-i) su glikoproteini, čija je osnovna uloga povezivanje specifičnosti odgovora antitijela s raznolikim efektorskim funkcijama hematopetskih stanica kao što su fagocitoza, endocitoza, ADCC, degranulacija, otpuštanje reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala, uklanjanje imunokompleksa i aktivacija citokinskih i kemokinskih gena (Ravetch i Bolland, 2001). Budući da su monoklonska antitijela koja smo koristili bila IgG-klase, željeli smo ispitati ekspresiju sva tri tipa Fc-receptora za IgG: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) te FcγRIII (CD16). Nikakvu razliku nismo našli u ekspresiji CD64 i CD16 među ispitanim skupinama, ali nas je iznenadio snižen postotak i relativna količina FcγRII (CD32) biljega na limfocitima. Taj je nalaz u potpunoj suprotnosti s našim očekivanjima i

smatramo da su potrebna dodatna istraživanja kako bi se mogao u cijelosti pojasniti. Ostaje mogućnost, koju je također potrebno ispitati, da je pojačano vezanja izotipskih kontrola posljedica postupka permeabilizacije stanica prilikom unutarstaničnog obilježavanja. No, najviše zbunjuje činjenica da, prilikom ovog istraživanja, takva pojava nije uočena, pa bi se prijašnji nalaz mogao smatrati artefaktom.

Pokazano je da nakon akutnog stresa broj i aktivnost NK-stanica raste (Ackerman i sur., 1996; Benschop i sur., 1996 a), dok je za depresivne poremećaje karakteristična njihova smanjena aktivnost (Petitto i sur., 1992; Herbert i Cohen, 1993; Barlett i sur., 1995; Schleifer i sur., 1999). U našim istraživanjima ranih faza PTSP-a, ratni veterani i profesionalni vojnici imali su povišenu aktivnost NK-stanica kakva je opisana i u jednoj studiji kod veterana Vijetnamskog rata (Laudenslagera i sur. 1998). Literarni podaci o aktivnosti tih stanica u PTSP-u nisu jednoznačni. Tako, Mosnaim i sur. (1993) nisu našli razliku u bazalnoj aktivnosti NK-stanica između civilnih kontrola i veterana s PTSP-om, dok obje skupine naših ispitanika s PTSP-om, deset godina nakon traume, imaju oslabljenu citotoksičku aktivnost NK-stanica u odnosu na kontrolne ispitanike. Snižena NK-aktivnost opisana je i u osoba s kroničnim stresom, 48 sati nakon oslobađanja iz koncentracijskog logora (Dekaris i sur., 1993), osoba s depresijom (Irwin i sur., 1986) te u osoba koje su razvile PTSP kao posljedicu prirodne katastrofe (uragan) unutar 4 mjeseca nakon traume (Ironson i sur., 1997). Poznato je da je depresija čest komorbiditet PTSP-u, no ovdje treba naglasiti da smo pri odabiru naših ispitanika isključili one s depresivnim poremećajima. Iz svega navedenog proizlazi da je u početku razvoja posttraumatskog stresnog poremećaja NK-aktivnost povišena. Općenito bismo mogli reći da imunološki status bolesnika u ranom stadiju PTSP-a više odgovara "slici" statusa kakav je uočen u akutnom stresu, a tijekom vremena pojedini se parametri postupno mijenjaju i poprimaju karakteristike kakve su opisane u bolesnika s kroničnim simptomima PTSP-a, nekoliko desetaka godina nakon doživljene traume. Taj bi se obrat mogao pojasniti trajnim utjecajem stresnog sustava koji je u ranijim fazama vrlo aktivan, zacijelo zbog čestih prisjećanja na traumatski događaj, dok se ostali organski sustavi nastoje tijekom vremena prilagoditi. Takva učestala ili dugotrajna aktivacija stresnog sustava jako je alostatsko opterećenje za sve sustave organizma pa je za adaptaciju potrebno duže vrijeme. Za glukokortikoide i kateholamine, kao glavne medijatore stresnog sustava, poznato je da inhibiraju

aktivnosti NK-stanica, izravno preko GCR-a, odnosno β_2 -adrenergičkih receptora, ili indirektno, supresijom proizvodnje IL-12 i IFN- γ koji su neophodni za njihovo normalno funkcioniranje (Doornen, 1994; Irwin, 1994; Elenkov i sur., 1996). Upravo su NK-stanice vrlo osjetljive na učinke stresa i njihova funkcija se nerijetko koristi kao pokazatelj imunosupresije. Snižena citotoksička aktivnost NK-stanica kod ispitanika s PTSP-om deset godina nakon doživljene traume, mogla bi biti posljedica dugotrajnog alostatskog opterećenja kakav je opisan u kroničnom stresu.

Pojačana citotoksička aktivnost NK-stanica kakvu smo uočili u ranijim istraživanjima, ponukala nas je na detaljnije istraživanje ekspresije površinskih biljega NK-stanica (CD56 i CD16) i razine perforina u njima, ali i u CD8-limfocitima. Uporabom monoklonskih antitijela moguće je razlikovati subpopulacije NK-stanica s obzirom na gustoću pojedinih površinskih i citoplazmatskih biljega. Još je 1989. Nagler utvrdio da su NK-stanice s niskom ekspresijom CD56 (CD56^{dim}) jače granulirane od onih s visokom ekspresijom tog biljega (CD56^{bright}), dok su Cooper i sur., 2001 pokazali da CD56^{dim}-stanice imaju visoku ekspresiju CD16 (Fc γ RIII) i izraženu citotoksičku aktivnost. Za razliku od njih, CD56^{bright}-stanice su bitne za proizvodnju citokina i imunoregulaciju ranih upalnih procesa. Mi smo u ovom istraživanju pronašli da ispitanici s PTSP-om, koji nisu doživjeli dodatnu traumu unatrag godine dana (PTSP I), imaju niži postotak NK-stanica (CD3⁻CD56⁺) s perforinom, što bi moglo objasniti sniženu citotoksičku aktivnost, barem u tih ispitanika.

Proupalni citokini, glukokortikoidi i kateholamini glavni su prijenosnici informacija u dvosmjernoj komunikaciji između imunostava i središnjeg živčanog i hormonskog sustava (Claman, 1993; Couraud, 1994; Ader i sur., 1995; Hass i Schauenstein, 1997). U stresnoj reakciji na introceptivne stresore, kao što su infekcija, upala ili ozljeda, proupalni citokini aktiviraju HPA-osovinu (Fukata i sur., 1993; Turnbull i Rivier, 1999), pojačavaju neurotransmisiju kateholamina u pojedinim regijama mozga (Besedovsky i sur., 1983) i utječu na ponašanje, potičući *bolesno ponašanje* (Smith, 1991; Yirmia, 1997). Tako imunostav pomoću proupalnih citokina obavještava živčani sustav o narušavanju homeostaze introceptivnim stresorima. Također je pokazano kako psihološki akutni stresori, za koje je od prije poznato da aktiviraju HPA-osovinu i sustav kateholamina, potiču stvaranje proupalnih i drugih citokina (Maes i sur., 1998 b; Marshall i sur., 1998). U ranijim istraživanjima potvrdili smo pretpostavke o aktivaciji sustava proupalnih

citokina u psihološkim poremećajima. Obje naše skupine ispitanika imale su povišenu razinu IL-6, dok je u ratnih veterana bio povišen i TNF- α . Iako postoje dva rada koja pokazuju povišenu razinu IL-1 β u serumu ratnih veterana s PTSP-om (Spivak i sur. 1997; Tucker i sur., 2004), naš nalaz, uz nalaze drugih autora o povišenom IL-6 u serumu (Maes i sur., 1999 a) ili cerebrospinalnom likvoru (Baker i sur., 2001), ukazuju kako je upravo taj citokin važan za psihoneuroendokrine mehanizme i regulacijske procese u PTSP-u. Sekretiju IL-6, međutim, suprimiraju glukokortikoidi a stimuliraju kateholamini, dok neurobiologiju PTSP-a, kako smo prije opisali, karakterizira povišena razina kateholamina i snižena razina kortizola. Proupalne citokine proizvode i izlučuju monociti, a odgovarajućom stimulacijom LPS-om *in vitro*, moguće je, upotrebom protočne citometrije, odrediti ekspresiju proupalnih citokina na razini jedne stanice (Sander i sur., 1991; Jung i sur., 1993; Prussin i Metcalfe, 1995). Standardnim metodama izolacije monocita iz pune krvi dolazi do njihova gubitka i aktivacije, pa smo metodu prilagodili kultivaciji u punoj krvi. Lipopolisaharidi djeluju na monocite prenoseći stimulacijske signale preko CD14 i potiču ih na sintezu citokina te tako oponašaju zbivanja u bakterijskoj upali. U ovom istraživanju nismo našli razlike kod ispitivanih skupina u ekspresiji proupalnih citokina nakon stimulacije monocita *in vitro*. Možda je trebalo određivati proupalne citokine u serumu. Bez takvog podatka teško je decidirano tvrditi da ispitanici s PTSP-om nemaju izmijenjene razine citokina. Postoji, naime, istraživanje na modelu stresa, uslijed iscrpljujućeg trčanja, koje sugerira da cirkulirajući monociti nisu izvor povišene razine IL-6 i TNF- α u serumu, te da stresni hormoni djeluju supresivno na proizvodnju citokina u LPS-om stimuliranim monocitima nakon epizode trčanja (Starkie i sur., 2000, 2001). Kako je broj ispitanika kojima smo, zbog tehničkih razloga, bili u mogućnosti određivati unutarstanične citokine relativno malen, vjerujemo da bi se detaljnijim istraživanjem uz istovremeno određivanje serumske razine citokina došlo do preciznijih saznanja. Takvi bi podaci bili od značaja jer kronično aktivirani upalni procesi, prvenstveno posredovani nespecifičnim medijatorima, štetno utječu na mnoge organske sustave, pospješuju procese osteoporoze i ateroskleroze, izazivaju stanje slično bolesnom ponašanju, somatske probleme, bolove, te neprekidno aktiviraju HPA-osovinu. Također je poznato da razina IL-6 raste s godinama te doprinosi procesima starenja (Hirano i sur., 1990; Ershler i sur., 1994).

Podaci iz literature o utjecaju stresa na Th1/Th2 odnos uputili su nas na ispitivanje mogućeg pomaka u ravnoteži ovog poremećaja. Iako stres, odnosno stresni hormoni, usmjeravaju imunoreakciju, potičući, uglavnom *in vitro*, stvaranje citokina tipa 2 (Webster i sur., 1997; Agarwal i Marshall, 1998; Marshall i sur., 1998; Elenkov i Chrousos, 1999), malo je vjerojatno da bismo taj pomak mogli utvrditi mjereći razinu dotičnih citokina u uzorcima seruma, budući da oni uglavnom djeluju autokrino ili parakrino. Zato smo limfocite stimulirali u kratkotrajnoj kulturi pune krvi s PMA i ionomicinom *in vitro* te zatim određivali ekspresije unutarstaničnih citokina protočnom citometrijom. Prema našem saznanju, ovo je prvo ispitivanje Th1/Th2 ravnoteže na modelu PTSP-a korištenjem ove metode. U ispitanika s PTSP-om nismo našli razlike u proizvodnji IL-4 i IFN- γ u odnosu na zdrave kontrole. Kawamura i sur., (2001) su ispitivali ta dva citokina u japanskih radnika koji su u prošlosti bolovali od PTSP-a i uspoređivali su ih s ispitanicima koji su imali slična traumatska iskustva, ali bez PTSP-a. U supernatantu kultura stanica stimuliranih s fitohemaglutininom (PHA) razina IFN- γ i IL-4 bila je niža u osoba s PTSP-om. Općenito se može reći da PTSP prati aktivacija nespecifične imunosti i upalnih procesa dok je, barem se tako čini, adaptivna imunost ili nepromijenjena ili suprimirana (Rohleder i sur., 2004). Treba ipak napomenuti nalaz pojačane reakcije kasnog tipa preosjetljivosti kod žena seksualno zlostavljanih u djetinjstvu (Altemus i sur., 2003).

U ranijim smo istraživanjima kod ratnih veterana i profesionalnih vojnika opazili razlike kako u imunološkim, tako i hormonskim parametrima od kojih je iznimno zanimljiv nalaz bio povišena razina kortizola i snižena relativna količina GCR-a u svim ispitivanim populacijama limfocita (Gotovac i sur., 2003). Ova su dva parametra bila u negativnoj korelaciji, što je za očekivati s obzirom na njihovu fiziološku povezanost. Međutim, takav je nalaz bio u direktnoj suprotnosti s nalazima Yehude i njezinih suradnika. Prema modelu koji su oni predložili na temelju istraživanja djelovanja HPA-osovine (Yehuda i sur., 1991 a, 1991 b, 1993 a i b, 1994, 1995, 1998), kod PTSP-a dolazi do stanja pojačane negativne povratne sprege. Nalazi pokazuju da bolesnici s PTSP-om imaju sniženu razinu kortizola u plazmi i urinu te povišeni broj GCR-a u periferiji, što je upravo suprotno nalazima u depresivnim poremećajima. Prema predloženom modelu, najprije dolazi do povećanja broja GCR-a centralno u hipokampusu, a djelovanjem negativne

povratne sprege konačno se snižava razina kortikotropina i kortizola i takva se «oslabljena» HPA-osovina smatra karakterističnom promjenom za PTSP. Postoje, međutim, nalazi drugih autora koji ukazuju da razina kortizola praćena tijekom dvadeset i četiri sata u urinu može biti povišena kod bolesnika s PTSP-om (Pitman i Orr, 1990; Meas i sur., 1998 a) ili da uopće nije promijenjena (Altemus i sur., 2003; Tucker i sur., 2004). Međutim, treba ponovno naglasiti da je većina njihovih istraživanja sprovedena na modelu kroničnog PTSP-a, dok su naši ispitanici testirani u kraćem intervalu nakon proživljene traume. Pretpostavili smo da u samom početku bolesti HPA-osovina djeluje pojačano, kao posljedica učestalog ponovljenog proživljavanja traumatskog događaja kroz prisjećanja i snove. U tome aktivno sudjeluju i proupalni citokini potičući djelovanje HPA-osovine. S vremenom se sustav “iscrpljuje” i “pronalazi” mehanizme prilagodbe prigušivanjem djelovanja HPA-osovine, najvjerojatnije padom broja GCR-a u hipokampusu. Ostalo je otvorenim pitanje u kojem trenutku i kako se to događa. U prilog prethodnom zaključku ide ovaj nalaz povišene relativne količine GCR-a u limfocitima ispitanika s PTSP-om deset godina nakon proživljene traume. Iako za kortizol nismo našli razliku u odnosu na kontrole, a bilo bi za očekivati da mu je razina snižena, ostaje velika vjerojatnost da se će se u daljnjem tijeku bolesti i nastavku alostatskog opterećenja razina kortizola snizi. Hipokortizolemija je česta pojava u patogenezi bolesti koje su povezane sa stresnim sustavom (Heim i sur., 2000). Mehanizam kojim snižena razina kortizola doprinosi bolestima još nije u cijelosti objašnjen. Osim kod bolesnika s PTSP-om, hipokortizolemija je opisana i kod zdravih osoba izvrgnutih kroničnom stresu, u sindromu kroničnog umora, fibromialgiji, reumatoidnom artritisu i astmi (Heim i sur., 2000). Nedostatak kortizola tijekom vremena može potaknuti i pojačati osjetljivost prema bolestima, a predloženi mehanizam je pretjerana aktivnost imunostava, u prvom redu upalnog dijela, uslijed nedostatka supresivnog djelovanja glukokortikoida (Heim i sur., 2000; Altemus i sur., 2003).

Na temelju svih dosadašnjih ispitivanja možemo zaključiti kako postoji dinamika promjena živčanih, imunoloških i hormonskih parametara s obzirom na trajanje samog PTSP-a (od akutnog do kroničnog). Izgleda da je za drugu fazu izrazitijih promjena potrebno vrijeme od desetak godina od ishodišnog doživljaja traume. U tom se razdoblju očituje pomak od prvotne aktivacije imunostava u ranim fazama PTSP-a do sada zatečenog stanja, u kojem većina imunoloških i

hormonskih parametara više ne odstupaju od normalnih fizioloških granica. Možemo pretpostaviti da će daljnje alostatsko opterećenje dovesti do nove faze značajnijih promjena u budućnosti.

Dehidroepiandrosteron (DHEA) je androgeni neurosteroid čiji su učinci suprotni učincima kortizola. U PTSP-u može poticati rad HPA-osovine te dokinuti štetne posljedice kortizola na moždane neurone kod oboljelih od PTSP-a (Rasmusson i sur., 2003), ali svojim djelovanjem može utjecati i na raspoloženje te doprinijeti simptomima tjeskobe, depresije i povlačenja kod oboljelih (Spivak i sur., 2000). DHEA nam je bio interesantan, napose, zbog svog imunomodulatornog djelovanja i pomicanja ravnoteže u suprotnom smjeru od kortizola, dakle, prema Th1. Nismo, međutim, našli razliku u razini DHEA u serumu između ispitivanih skupina kao niti korelaciju između hormona i citokina koji čine pojedini tip reakcije. Značaj ovog hormona kod PTSP-a nedavno je utvrđen, pa su radovi koji ga ispituju još malobrojni i oprečni. Laudenslager i sur. (1998), također, nisu našli razliku u razini DHEA kod vijetnamskih veterana, dok Spivak i sur. (2000) opisuju povišene razine DHEA i DHEA-sulfata (DHEA-S) u ispitanika s kroničnim, netretiranim PTSP-om kao posljedicom ratne traume. Drugi hormon koji smo ispitivali je testosteron za koga se zna da je, osim u regulaciji seksualnosti, važan za kontrolu ljudske agresije te da je podložan djelovanju psihičkog stresa. Opisano je kako razina cirkulirajućeg testosterona opada poslije akutnog, no nalazi su oprečni kada se radi o kroničnom stresu. Naši se ispitanici, poput onih Spivaka i sur. (2003) ili Bauera i sur. (1994), nisu razlikovali od zdravih kontrola. Moguće je da se HPG-osovina adaptira pod kroničnim opterećenjem. Ima, naravno, i suprotnih nalaza kao što je snižena razina u cerebrospinalnoj tekućini i plazmi (Mulchahey i sur., 2001), odnosno povišena razina kod PTSP-a u odnosu na druge psihijatrijske poremećaje poput depresije, shizofrenije i bipolarnu maniju (Mason i sur., 1990).

U prethodnim istraživanjima naišli smo, nadalje, na djelomičnu nepodudarnost rezultata za pojedine varijable između dviju skupina sudionika Domovinskog rata koje bi se, vjerojatno, mogle objasniti, ponajprije, razlikom u psihosocijalnim faktorima. Profesionalni vojnici su, naime, svi bili zaposleni dok je među ratnim veteranima bilo oko 40% nezaposlenih te znatno više razvedenih. Ranije smo, u Uvodu, opisali kako su to stresori koji značajno mogu utjecati na

aktivnost imunostava i kod zdravih ljudi, te da su nezaposlenost i nizak socioekonomski status često povezani s PTSP-om. U literaturi nismo našli podataka o istraživanjima utjecaja dodatne traume kod već utvrđene dijagnoze PTSP-a ili nekog drugog psihičkog poremećaja, bilo na hormonski bilo na imunostav. Kao dodatnu traumu u ovom istraživanju, prema literarnim navodima, odabrali smo gubitak mirovine ili posla. Prema našim rezultatima, dodatna trauma nema velikog utjecaja, jer se ispitanici koji su ostali bez prihoda nisu značajno razlikovali od ispitanika s PTSP-om bez dodatne traume kao ni od zdravih kontrola. Moguće je pretpostaviti da je zbog produženog trajanja bolesti i opterećenja stresnog sustava došlo do promjene njegova funkcioniranja ili čak neosjetljivosti na dodatne stresore. U raspoloživoj literaturi nismo naišli na istraživanja dodatnih trauma u PTSP-u ili nekom drugom psihičkom poremećaju, pa je ovo, prema našem saznanju, prvi opis takve vrste.

Možemo zaključiti da PTSP odražava čitav niz međusobno uvjetovanih promjena u hormonskom i imunostavu. Treba, međutim, imati na umu da mnogi od parametara tih dvaju sustava pokazuju cirkadijalne varijacije te da uočene promjene mogu biti posljedica samo promijenjenog ritma a ne ukupne funkcije. Nadalje, ponavljanje istraživanja u istih bolesnika svakih nekoliko godina odgovorilo bi na pitanje koje su od tih promjena karakteristične za PTSP, odnosno koje bi od njih mogle sudjelovati u patofiziologiji bolesti te da li promjene izazvane ratnim stresom, ostaju iste, pojačavaju se ili se gube. Takva longitudinalna istraživanja pružila bi saznanja o učincima psihološkog stresa i traume na biološke sustave, na temelju kojih bi se poboljšalo razumijevanje stresom uzrokovanih bolesti te mogućnosti njihove dijagnoze, prognoze te liječenja. Ukoliko bi se utvrdilo kako je imunoreaktivnost trajno oštećena, to bi upućivalo da ratni stres može povećati osjetljivost na infekcije i/ili druge bolesti. Razumijevanje patofiziologije kroničnog stresa omogućilo bi, nadalje, razradu programa i načina procjene, prevencije i liječenja posljedica kroničnog stresa te bi unaprijedilo i procjenu rizika od zaraznih, autoimunskih, kardiovaskularnih te malignih bolesti. Osim toga, bilo bi korisno izraditi epidemiološku studiju na populaciji veterana Domovinskog rata s PTSP-om koja bi pokazala postoji li u njih učestala pojavnost određenih psihosomatskih, tumorskih ili autoimunskih bolesti te koje su bolesti najčešće.

6. ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

- PTSP, koji se razvija kao posljedica izlaganja ratnoj traumi, popraćen je promjenama u živčanom, hormonskom i imunostavu te je dobar model za ispitivanje odnosa među njima.
- Temeljem svih dosadašnjih ispitivanja možemo zaključiti kako postoji dinamika promjena živčanih, hormonskih i imunoloških parametara s obzirom na trajanje PTSP-a (od akutnog prema kroničnom).
- Čini se da je za drugu fazu izrazitijih promjena, potrebno vrijeme od desetak godina od ishodišnog doživljaja traume. U tom se razdoblju očituje pomak od prvotne aktivacije imunostava u ranim fazama PTSP-a, do sada zatečenog stanja u kojem većina imunoloških i hormonskih parametara više ne odstupa od normalnih fizioloških granica.
- Može se očekivati da će u narednom periodu kroničnost PTSP-a uzrokovati nove promjene ispitivanih sustava, najvjerojatnije u smjeru imunosupresije, a naznake toga, kod ispitanika s PTSP-om, već sada nalazimo u povišenoj razini GCR-a te sniženoj citotoksičkoj aktivnosti NK-stanica.
- Snižena citotoksička aktivnost NK-stanica kod ispitanika s PTSP-om deset godina nakon doživljene traume, mogla bi biti posljedica dugotrajnog alostatskog opterećenja kakav je opisan u kroničnom stresu.
- Uočene promjene moguće je objasniti dugotrajnom pojačanom aktivnosti HPA-osovine koja je alostatsko opterećenje za organizam, pa adaptacijski mehanizmi tijekom vremena mijenjaju njezino funkcioniranje prema predloženom modelu: ponajprije se povisuje ekspresija GCR-a centralno u hipotalamusu, potom periferno u tkivima, a slijedom toga opada razina bazalnog kortizola.

- U prilog prethodnom zaključku govori povišena relativna količina GCR-a u limfocitima koju smo našli kod ispitanika s PTSP-om.
- Prema tom modelu, HPA-osovina postaje hipoaktivnom tek u kroničnom PTSP-u, desetak i više godina nakon proživljene traume i dugotrajnog iscrpljivanja, što je opisano u literaturi kao karakteristika PTSP-a.
- Između ispitivanih skupina nismo našli razliku u određivanju ekspresije unutarstaničnih citokina protočnom citometrijom nakon *in vitro* stimulacije monocita odnosno limfocita. Prema našem saznanju, ovo je prvo opisano korištenje ove metode u psihoneuroimunološkim istraživanjima PTSP-a. Ujedno, ovo je i prvo ispitivanje mogućeg utjecaja stresa na Th1/Th2 ravnotežu u tom entitetu.
- Pojačano vezanje izotipske kontrole kakvo smo ranije opazili u bolesnika s PTSP-om ne može se objasniti povišenim brojem Fc-receptora, no ostaje mogućnost koju je potrebno ispitati, da je to posljedica postupka permeabilizacije stanica prilikom unutarstaničnog obilježavanja.
- Dodatna trauma kod ovih ispitanika nema značajan utjecaj na ispitivane parametre. Moguće je pretpostaviti da je zbog produženog trajanja bolesti i opterećenja stresnog sustava došlo do promjene njegova funkcioniranja ili čak neosjetljivosti na dodatne stresore. U raspoloživoj literaturi nismo naišli na istraživanja dodatnih trauma u PTSP-u ili nekom drugom psihičkom poremećaju, pa je ovo, prema našem saznanju, prvi opis takve vrste.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

- Ackerman KD, Martino M, Heyman R, Moyna NM, Rabin BS (1996) Immunologic response to acute psychological stress in MS patients and controls. *J Neuroimmunol* 68: 85-94
- Ader R, Cohen N, Felten D (1995) Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet* 345: 99-103
- Adler NE, Boyce T, Chesney MA, Cohen S, Folkman S, Kahn RL, Syme SL (1994) Socioeconomic status and health. The challenge of the gradient. *Am Psychol* 49: 15-24
- Adler NE, Boyce WT, Chesney MA, Folkman S, Syme SL (1993) Socioeconomic inequalities in health. No easy solution. *JAMA* 269: 3140-3145
- Afar B, Merrill J, Clark EA (1991) Detection of lymphocyte subsets using three-color/single-laser flow cytometry and the fluorescent dye peridinin chlorophyll-a protein. *J Clin Immunol* 11: 254-261
- Agarwal SK, Marshall GD Jr (1998) Glucocorticoid-induced type 1/type 2 cytokine alterations in humans: a model for stress-related immune dysfunction. *J Interferon Cytokine Res* 18: 1059-1068
- Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T (1990) Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J* 4: 2860-2867
- Altemus M, Cloitre M, Dhabhar FS (2003) Enhanced cellular immune response in women with PTSD related to childhood abuse. *Am J Psychiatry* 160: 1705-1707
- American Psychiatric Association (1980) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, III Ed.* Washington, DC, American Psychiatric Press
- American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, IV Ed.* Washington, DC, American Psychiatric Press

- Andreasen NC (1980) Posttraumatic stress disorder. *U*: Kaplan HI, Freedman AM, Sadock BJ (eds.) *Comprehensive Textbook of Psychiatry*. 3rd edn. Baltimore, Williams & Wilkins, 1517-1525
- Anesi A, Franciotta D, Di Paolo E, Zardini E, Melzi d'Eril GV, Zerbi F (1994) PHA-stimulated cellular immune function and T-lymphocyte subset in major depressive disorders. *Funct Neurol* 9: 7-22
- Araneo BA, Woods ML 2nd, Daynes RA (1993) Reversal of the immunosenescent phenotype by dehydroepiandrosterone: hormone treatment provides an adjuvant effect on the immunization of aged mice with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 167: 830-840
- Arnetz BB, Wasserman J, Petrini B, Brenner SO, Levi I, Eneroth P, Salovaara H, Hjelm R, Salovaara L, Theorell T, Petterson IL (1987) Immune function in unemployed woman. *Psychosom Med* 49: 3-12
- Arnetz BB, Brenner SO, Levi L, Hjelm R, Petterson IL, Wasserman J, Petrini B, Eneroth P, Kallner A, Kvetnansky R (1991) Neuroendocrine and immunologic effects of unemployment and job insecurity. *Psychother Psychosom* 55: 76-80
- Axelrod J, Reisine TD (1984): Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224: 452-459
- Bachen EA, Manuck SB, Cohen S, Muldoon MF, Raible R, Herbert TB, Rabin BS (1995) Adrenergic blockade ameliorates cellular immune responses to mental stress in humans. *Psychosom Med* 57: 366-372
- Baker DG, Ekhtor NN, Kasckow JW, Hill KK, Zoumakis E, Dashevsky BA, Chrousos GP, Geraciotti TD Jr (2001) Plasma and cerebrospinal fluid interleukin-6 concentrations in posttraumatic stress disorder. *Neuroimmunomodulation* 9: 209-217
- Banks WA (2004) Neuroimmune networks and communication pathways: the importance of location. *Brain Behav Immun* 18: 120-122

- Banks WA, Kastin AJ (1991) Blood to brain transport of interleukins links the immune and central nervous system. *Life Sci* 48: PL117-PL121
- Bartlett JA, Schleifer SJ, Demetrikopoulos MK, Keller SE (1995) Immune changes associated with depression in children. *Biol Psychiatry* 38: 771-774
- Batuman OA, Ferrero A, Cupp C, Jimenez SA, Khalili K (1995) Differential regulation of transforming growth factor beta-1 gene expression by glucocorticoids in human T and glial cells. *J Immunol* 155: 4397-4405
- Bauer M, Priebe S, Gräf K-J, Kürten I, Baumgartner A (1994) Psychological and endocrine abnormalities in refugees from East Germany: Part II, Serum levels of cortisol, prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and testosterone. *Psychiatry Research* 51:75-85
- Baulieu EE, Robel P (1996) Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate as neuroactive neurosteroids. *J Endocrinol* 150 Suppl: S221-239
- Baum A, Posluszny MD (1999) Health psychology: mapping biobehavioral contributions to health and illness. *Annu Rev Psychol* 50: 137-163
- Bendelja K, Gagro A, Baće A, Lokar-Kolbas R, Kršulović-Hrešić V, Draženović V, Mlinarić-Galinović G, Rabatić S (2000) Predominant type-2 response in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection demonstrated by cytokine flow cytometry. *Clin Exp Immunol* 121: 332-338
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* 57: 289-300
- Benschop RJ, Jacobs R, Sommer B, Schurmeyer TH, Raab HR, Schmidt RE, Schedlowski M (1996 a) Modulation of the immunologic response to acute stress in humans by beta-blockade or benzodiazepines. *FASEB J* 10: 517-524
- Benschop RJ, Rodriguez-Feuerhahn M, Schedlowski M (1996 b) Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav Immun* 10: 77-91

- Bérki T, Kumánovics G, Kumánovics A, Falus A, Újhelyi E, Németh P (1998) Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J Immunol Methods* 214: 19-27
- Bernton E, Hoover D, Galloway R, Popp K (1995) Adaptation to chronic stress in military trainees. Adrenal androgens, testosterone, glucocorticoids, IGF-1, and immune function. *Ann N Y Acad Sci* 774: 217-231
- Besedovsky H del Rey A, Sorkin E (1983) The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Science* 221: 564-567
- Biondi M, Pancheri P (1995) Clinical research strategies in psycho-immunology: a review of 46 human research studies (1972-1992). *U: Leonard B, Miller K (eds.) Stress, the Immune System and Psychiatry. Wiley, Chichester, 85-112*
- Black PH (1994) Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1-6
- Blanchard EB, Kolb LC, Pallmeyer TP, Gerardi RJ (1982) A psychophysiological study of posttraumatic stress disorder in Vietnam veterans. *Psychiatr Q* 54: 220-229
- Blanchard EB, Kolb LC, Prins A, Gates S, McCoy GC (1991) Changes in plasma norepinephrine to combat-related stimuli among Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *J Nerv Ment Dis* 179: 371-373
- Blank AS (1983) The longitudinal course of posttraumatic stress disorder. *U: Davidson JRT, Foa EB (eds.) Posttraumatic Stress Disorder: DMS IV and Beyond. Washington, DC, American Psychiatric Press*
- Blauer KL, Poth M, Rogers WM, Bernton EW (1991) Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation. *Endocrinology* 129: 3174-3179
- Blalock JE (1994) The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today* 15: 504-511

- Blotta MH, DeKruyff RH, Umetsu DT (1997) Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 158: 5589-5595
- Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE (1993) Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 119: 1198-1208
- Boscarino JA, Chang J (1999) Higher abnormal leukocyte and lymphocyte counts 20 years after exposure to severe stress: research and clinical implications. *Psychosom Med* 61: 378-386
- Bosma H, Marmot MG, Hemingway H, Nicholson AC, Brunner E, Stansfeld SA (1997) Low job control and risk of coronary heart disease in Whitehall II (prospective cohort) study. *BMJ* 314: 558-565
- Brattstand R, Linden M (1996) cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment Pharmacol Ther* 10: 81-90
- Bremner DJ, Charney DS (1994) Neurobiology of posttraumatic stress disorder. *U: Darcount G, Mendlewicz J, Racagni G, Brunello N (eds) Current Therapeutic Approaches to Panic and Other Anxiety Disorders, Int Acad Biomed Drug Res, Basel, Karger, 8: 171-186*
- Bremner DJ, Southwick SM, Darnell A, Charney S (1996) Chronic PTSD in Vietnam combat veterans: course of illness and substance abuse. *Am J Psychiatry* 153: 369-375
- Bremner JD, Licinio J, Darnell A, Krystal JH, Owens MJ, Southwick SM, Nemeroff CB, Charney DS (1997 a) Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 154: 624-629
- Bremner JD, Randall P, Vermetten E, Staib L, Bronen RA, Mazure C, Capelli S, McCarthy G, Innis RB, Charney DS. (1997 b) Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse--a preliminary report. *Biol Psychiatry* 41: 23-32

- Brindley D, Rolland Y (1989) Possible connections between stress, diabetes, obesity, hypertension and altered lipoprotein metabolism that may result in atherosclerosis. *Clin Sci* 77: 453-461
- Bullen BA, Skrinar GS, Beitins PZ, Von Mering G, Turnbull BA, McArthur JW (1985) Induction of menstrual disorders by strenuous exercise in untrained woman. *N Eng J Med* 312: 1349-1353
- Burger D, Dayer JM (2002) Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 966: 464-473
- Cannon WB (1929 a) Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rew* 9: 399-431
- Cannon WB (1929 b) Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. New York: D. Appleton & Co.
- Chikanza IC, Petrou P, Kingsley G, Chrousos G, Panayi GS (1992) Defective hypothalamic response to immune and inflammatory stimuli in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35: 1281-1288
- Chrousos GP, Gold PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267: 1244-1252
- Chrousos GP (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332: 1351-1362
- Cizza G, Sternberg EM (1994) The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in susceptibility to autoimmune/inflammatory disease. *Immunomethods* 5: 73-78
- Claman HN (1993) Corticosteroids as immunomodulators. *Ann New York Acad Sciences* 685: 288-292
- Cohen S, Tyrrell DAJ, Smith AP (1991) Psychological stress and susceptibility to the common cold. *N Eng J Med* 325: 606-612

- Cohen S, Tyrrell DAJ, Smith AP (1993) Negative life events, perceived stress, negative affect, and susceptibility to the common cold. *J Pers Soc Psychol* 64: 131-140
- Cohen S, Herbert TB (1996) Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. *Annu Rev Psychol* 47: 113-142
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22: 633-640
- Couraud P-O (1994) Interactions between lymphocytes, macrophages, and central nervous system cells. *J Leukoc Biol* 56: 407-415
- Curtis AL, Pavcovich LA, Valentino RJ (1995) Previous stress alters corticotrophin-releasing factor neurotransmission in the locus coeruleus. *Neuroscience* 65: 541-550
- Dantzer R (2001) Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun* 15: 7-24
- Dantzer R, Kelley KW (1989) Stress and immunity: an integrated view of the relationships between stress and the immune system. *Life Sci* 44: 1995-2008
- Dantzer R, Mormede P (1995) Psychoneuroimmunology of stress. *U: Leonard BE, Miller K (eds.) Stress, the Immune System and Psychiatry. Wiley, Chichester, 48-83*
- Daynes RA, Araneo BA, Ershler WB, Maloney C, Li GZ, Ryu SY (1993) Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative. *J Immunol* 150: 5219-5230
- Dekaris D, Sabioncello A, Mažuran R, Rabatić S, Svoboda-Beusan I, Ljubić Računica N, Tomašić J (1993) Multiple change of immunologic parameters in prisoner of war. *JAMA* 270: 595-599

- DeKruyff RH, Fang Y, Umetsu DT (1998) Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *J Immunol* 160: 2231-2237
- van Deventer SJ, Buller HR, ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A (1990) Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* Dec 76: 2520-2526
- Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL (1995) Effects of stress on immune cell distribution. *J Immunol* 154: 5511-5527
- Dhabhar FS, McEwen BS (1997) Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun* 11: 286-306
- Dhabhar FS, McEwen BS (1999) Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl acad Sci, USA*, 96: 1059-1064
- Doornen LJP (1994) Effects of β -adrenergic blockade on immunologic and cardiovascular changes induced by mental stress. *Circulation* 89: 762-769
- Duffy LC, Zielezny MA, Marshal JR (1991) Relevance of major stress events as an indicator of disease activity prevalence in inflammatory bowel disease. *Behav Med* 17: 101-110
- Egendorf A, Kadushin C, Laufer RS, Rohtbart G, Sloan L (1981) Legacies of Vietnam. Comparative adjustment of veterans and their peers. Government Printing Office, Washington, DS
- Elenkov IJ, Chrousos GP (1999) Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol Metab* 10: 359-368
- Elenkov IJ, Chrousos GP (2002) Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 966: 290-303

- Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP (1996) Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* 108: 374-381
- Engel CC Jr, Liu X, McCarthy BD, Miller RF, Ursano R (2000) Relationship of physical symptoms to posttraumatic stress disorder among veterans seeking care for gulf war-related health concerns. *Psychosom Med* 62: 739-745
- Eriksen HR, Olff M, Murison R, Ursin H (1999) The time dimension in stress responses: relevance for survival and health. *Psychiatry Res* 85: 39-50
- Ershler WB, Sun WH, Binkley N (1994) The role of interleukin-6 in certain age-related diseases. *Drugs Aging* 5: 358-365
- Everson MP, Kotler S, Blackburn WD Jr (1999) Stress and immune dysfunction in Gulf War veterans. *Ann N Y Acad Sci* 876: 413-418
- Fearon DT, Locksley RM (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272: 50-53
- Felten SY, Felten DL (1994) Neural-Immune interactions. *U: Bloom F (ed.) Progress in Brain Research* 100: 157-162
- Ferguson E, Cassaday HJ (2002) Theoretical accounts of Gulf War Syndrome: from environmental toxins to psychoneuroimmunology and neurodegeneration. *Behav Neurol* 13: 133-147
- Fluegge G (1996) Alterations in the central nervous alpha 2-adrenoceptor system under chronic psychosocial stress. *Neuroscience* 75: 187-196
- Foy DW, Sippelle RC, Rueger DB, Carroll EM (1984) Etiology of posttraumatic stress disorder in Vietnam veterans: analysis of premilitary, military, and combat exposure influences. *J Consult Clin Psychol* 52: 79-87
- Friedman E, Katcher AH, Brightman VJ (1977) Incidence of recurrent herpes labialis and upper respiratory infection: a prospective study of the influence of biologic, social and psychologic predictors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 43: 873-878

- Fuchs E, Fluegge G (1995) Modulation of binding sites for corticotrophin-releasing hormone by chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 20: 33-51
- Fukata J, Imura H, Nakao K (1993) Cytokines as mediators in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical function. *J Endocrinol Invest* 16: 141-155
- Funder JW (1996) Mineralocorticoid receptors and glucocorticoid receptors. *Clin Endocrinol* 45: 651-656
- Gagro A, Rabatić S, Ivančić I, Jelačić J, Sabioncello A, Mišulić J, Buneta D, Dekaris D (1999) Detection of intracellular cytokines in human lymphocytes and monocytes at the single cell level by flow cytometry. *Period Biol* 101: 17-26
- Gagro A, Tominac M, Kršulović-Hrešić V, Baće A, Matic M, Draženović V, Mlinarić-Galinović G, Kosor E, Gotovac K, Bolanča I, Batinica S, Rabatić S (2004) Increased Toll-like receptor 4 expression in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Immunol* 135: 267-272
- Gamulin S (1995) Odnos zdravlja i bolesti. *U: Gamulin S, Marušić M, Krvavica S i sur. (eds.) Patofiziologija. Medicinska naklada, Zagreb, 9-11*
- Gayo A, Mozo L, Suarez A, Tunon A, Lahoz C, Gutierrez C (1998) Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *J Neuroimmunol* 85: 122-130
- Gemma C, Imeri L, Grazia de Simoni M, Mancina M (1997) Interleukin-1 induces changes in sleep, brain temperature, and serotonergic metabolism. *Am J Physiol* 272: R601-R606
- Giordano M, Vermeulen M, Palermo MS (1993) Seasonal variations in antibody-dependent cellular cytotoxicity regulation by melatonin. *FASEB J* 7: 1052-1054
- Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Speicher CE, Holliday JE (1985) Stress, loneliness, and changes in herpesvirus latency. *J Behav Med* 8: 249-260

- Glaser R, Pearson GR, Bonneau RH, Esterling BA, Atkinson C, Kiecolt-Glaser JK (1993) Stress and the memory T-cell response to the Epstein-Barr virus in healthy medical students. *Health Psychol* 12: 435-442
- Glaser R, Rabin B, Chesney M, Cohen S, Natelson B (1999) Stress-induced immunomodulation: implications for infectious diseases? *JAMA* 281: 2268-7220
- Glaser R, Rice J, Scheridan J Fertel R, Stout JC (1987) Stress-related immune suppression: health implications. *Brain Behav Immun* 1: 7-20
- Glaser R, Rice J, Speicher CE, Stout JC, Kiecolt-Glaser JK (1986) Stress depresses interferon production by leukocytes concomitant with a decrease in natural killer cell activity. *Behav Neurosci* 100: 675-678
- Goehler LE, Gaykema RPA, Nguyen KT, Lee JE, Tiders FJH, Maier SF, Watkins LR (1999) Interleukin-1 β in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *J Neurosci* 19: 2799-2806
- Goetzl EJ, Sreedharan SP (1992) Mediators of communication and adaptation in the neuroendocrine and immune systems. *FASEB J* 6: 2646-2652
- Goldberg J, True WR, Eisen SA, Henderson WG (1990) A twin study of the effects of the Vietnam War on posttraumatic stress disorder. *JAMA* 263: 1227-1232
- Goldstein DS (2003) Catecholamines and stress. *Endoc Regula* 37: 69-80
- Goodyer IM, Park RJ, Netherton CM, Herbert J (2001) Possible role of cortisol and dehydroepiandrosterone in human development and psychopathology. *Br J Psychiatry* 179: 243-249
- van Gool J, van Vugt H, Helle M, Aarden LA (1990) The relation among stress, adrenalin, interleukin-6 and acute phase proteins in the rat. *Clin Immunol Immunopathol* 57: 200-210
- Gotovac Borčić (2000) Imunoreaktivnost ljudi s posttraumatskim stresnim poremećajem. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek

- Gotovac K, Sabioncello A, Rabatić S, Bérki T, Dekaris D (2003) Flow cytometric determination of glucocorticoid receptor (GCR) expression in lymphocyte subpopulations: lower quantity of GCR in patients with post-traumatic stress disorder (PTSD). *Clin Exp Immunol* 131: 335-339
- Grossman R, Yehuda R, Boisoneau D, Schmeidler J, Giller EL Jr (1996) Prolactin response to low-dose dexamethasone challenge in combat-exposed veterans with and without posttraumatic stress disorder and normal controls. *Biol Psychiatry* 40: 1100-1105
- Guyton AC (1989 a) Autonomni živčani sustav; srž nadbubrežne žlijezde. *U: Medicinska fiziologija, X hrvatsko izdanje, Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb, 990-991*
- Guyton AC (1989 b) Hormoni kore nadbubrežne žlijezde. *U: Medicinska fiziologija, X hrvatsko izdanje, Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb, 1303-1305*
- Haas HS, Schauenstein K (1997) Neuroimmunomodulation via limbic structures-the neuroanatomy of psychoimmunology. *Prog Neurobiol* 51: 195-222
- Hanisch U-K, Quirion R (1996) Interleukin-2 as a neuroregulatory cytokine. *Brain Res Rev* 21: 246-284
- Harbuz MS, Lightman SL (1992) Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J Endocrino* 134: 327-339
- Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Salzman AL, Vizi ES (1998) Stimulation of beta-adrenoceptors inhibits endotoxin-induced IL-12 production in normal and IL-10 deficient mice. *Neuroimmunol* 88: 57-61
- Heim C, Nemeroff CB (2001) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49: 1023-1039
- Heim C, Ehlert U, Hellhammer DH (2000) The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology* 25: 1-35

- Henry JP, Stephense PM (1977) Stress, health, and the social environment: a sociobiologic approach to medicine. New York, Springer, Verlag
- Herbert TB, Cohen S (1993) Depression and immunity: a meta-analytic review. Psychol Bull 113: 472-486
- Herman JP, Cullinan WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Trends Neurosci 20: 78-84
- Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manogue KR, Palladino MA Jr, Cerami A, Shires GT, Lowry SF (1988) Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. Surg Gynecol Obstet 166: 147-153
- Heuser I, Lammers CH (2003) Stress and the brain. Neurobiol Aging Suppl 1: S69-76; rasprava S81-82
- Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T (1990) Biological and clinical aspects of interleukin-6. Immunol Today 11: 443-449
- Hockings GI, Grice JE, Warren K, Walters MM, Jansen GR, Jackson RV (1993) Hypersensitivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to naloxone in post-traumatic stress disorder. Biol Psychiatry 33: 585-593
- Holm S (1979) A simple sequential rejective multiple test procedure. Scand J Statistics 6 : 65-70
- Horowitz M, Wilner N, Alvarez W (1979) Impact of Event Scale: a measure of subjective stress. Psychosom Med 41: 209-218
- Ikić M, Mažuran R, Šooš E, Silobrčić V (1983) Effect of human leukocyte interferons on in vitro cytotoxicity of natural killer cells. Perod Biol 85: 171-172
- Imura H, Fukata J, Mori T (1991) Cytokines and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine systems. Clin Endocrinol 35: 107-115

- Ironson G, Wynings C, Schneiderman N, Baum A, Rodriguez M, Greenwood D, Benight C, Antoni M, LaPerriere A, Huang HS, Klimas N, Fletcher MA (1997) posttraumatic stress symptoms, intrusive thoughts, loss, and immune function after hurricane Andrew. *Psychosom Med* 59: 128-141
- Irwin M (1994) Stress-induced immune suppression: role of brain corticotropin releasing hormone and autonomic nervous system mechanisms. *Adv Neuroimmunol* 4: 29-47
- Irwin M, Daniels M, Bloom ET, Weiner H (1986) Life events, depression, and natural killer cell activity. *Psychopharm Bull* 22: 1093-1096
- Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C (1993) Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 159: 197-207
- Kavelaars A, van de Poll M, Zijlstra J, Heijnen CJ (1997) Beta 2-adrenergic activation enhances interleukin-8 production by human monocytes. *J Neuroimmunol* 77: 211-216
- Kawamura N, Kim Y, Asukai N (2001) Suppression of cellular immunity in men with a past history of posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 158: 484-486
- Keane TM, Caddel JM, Taylor KL (1988) Mississippi scale for combat-related posttraumatic stress disorder: three studies in reliability and validity. *J Consult Clin Psychol* 56: 85-90
- Kiecolt-Glaser JK, Garner W, Speicher CE, Penn GM, Holliday J, Glaser R (1984) Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosom Med* 46: 7-14
- Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Shuttleworth EC, Dyer CS, Ogrocki P, Speicher CE (1987) Chronic stress and immunity in family caregivers of Alzheimer's disease victims. *Psychosom Med* 49: 523-535
- Kiecolt-Glaser JK, McGuire L, Robles TF, Glaser R (2002) Psychoneuroimmunology: psychological influences on immune function and health. *J Consult Clin Psychol* 70: 537-547

- King LA, King DW, Fairbank JA, Keane TM, Adams GA (1998) Resilience-recovery factors in post-traumatic stress disorder among female and male Vietnam veterans: hardiness, postwar social support, and additional stressful life events. *J Pers Soc Psychol* 74: 420-434
- Komaki G, Gottschall PE, Somogyvari-Vigh A, Tatsuno I, Yatohgo T, Arimura A (1994) Rapid increase in plasma IL-6 after hemorrhage, and posthemorrhage reduction of the IL-6 response to LPS, in conscious rats: interrelation with plasma corticosterone levels. *Neuroimmunomodulation* 1: 127-134
- Kosten TR, Mason JW, Ostroff RB, Harkness L (1987) Sustained urinary norepinephrine and epinephrine elevation in posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 12: 13-20
- Kulka RA, Schlenger WE, Fairbank JA, Hough RL, Jordan BK, Marmar CJ, Weiss DS (1990) Trauma and Vietnam war generation. New York: Brunner/Mazel
- Kusnecov AW, Rabin SB (1994) Stressor-induced alterations of immune function: mechanisms and issues. *Int Arch Allergy Immunol* 105: 107-121
- Labrie F, Belanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B (1997) Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2396-402
- Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV (2000) Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. U: Mayer EA, Saper CB, eds. *The biological basis for mind body interactions*, vol.122, Amsterdam: Elsevier, 79-101
- Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136: 4480-4486
- Lasa M, Mahtani KR, Finch A, Brewer G, Saklatvala J, Clark AR (2000) Regulation of cyclooxygenase-2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol Cell Biol* 20: 4265-4274

- Laudenslager ML, Aasal R, Adler L, Berger CL, Montgomery PT, Sandberg E, Wahlberg LJ, Wilkins RT, Zweig L, Reite ML (1998) Elevated cytotoxicity in combat veterans with long-term post-traumatic stress disorder: preliminary observations. *Brain Behav Immun* 12: 74-79
- Leibson PJ (1997) Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* 6: 655-661
- Leowattana W (2004) DHEA-S as a new diagnostic tool. *Clin Chim Acta* 341: 1-15
- Linden A (1996) Increased interleukin-8 release by beta-adrenoceptor activation in human transformed bronchial epithelial cells. *Br J Pharmacol* 119:402-406
- Liu CC, Walsh CM, Young JD (1995) Perforin: structure and function. *Immunol Today* 16: 194-201
- Loucks AB, Mortola JF, Girton L, Yen SSC (1989) Alterations in the hypothalamic-pituitary-ovarian and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the athletic woman. *J Clin Endocrinol Metab* 68: 402-411
- Madden KS, Felten DL (1995) Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol Rev* 75: 77-105
- Maes M, Stivens WJ, DeClerck LS, Bridts CH, Peeters D, Schotte C, Cosyns P (1991) A significantly increased number and percentage of B cells in depressed subjects: results of flow cytometric measurements. *J Affect Disorders* 24: 127-134
- Maes M, Meltzer HY, Bosmans E, Bergmans R, Vandoolaeghe E, Ranjan R, Desnyder R (1995 a) Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *J Affect Disorders* 18: 301-309
- Maes M, Mylle J, Delmeire L, Janca A (2001) Pre- and post-disaster negative life events in relation to the incidence and severity of post-traumatic stress disorder. *Psychiatry Res* 105: 1-12

-
- Maes M, Smith R, Scharpé S (1995 b) The monocyte-lymphocyte hypothesis of major depression. *Psychoneuroendocrinology* 20: 111-116
- Maes M (1995 c) Evidence for immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19: 11-38
- Maes M, Cooreman W, Delanghe J, Scharpé S, Wauters A, Neels H, D'Hondt P, Peeters D, Cosyns P, Ranjan R, Bosmans E, DeMeyer F, Elkis H, Desnyder R (1995 d) Components of biological variation in plasma haptoglobin: relationships to plasma fibrinogen and immune variables, including interleukin-6 and its receptor. *Clin Chim Acta* 239: 23-35
- Maes M, Lin A, Bonaccorso S, van Hunsel F, Van Gastel A, Delmeire L, Biondi M, Bosmans E, Kenis G, Scharpé S (1998 a) Increased 24-hour urinary cortisol excretion in patients with post-traumatic stress disorder and patients with major depression, but not in patients with fibromyalgia. *Acta Psychiatr Scand* 98: 328-335
- Maes M, Song C, Lin A, De Jongh R, Van Gastel A, Kenis G, Bosman E, De Meester I, Benoy I, Neels H, Demedts P, Janca A, Scharpé S, Smith RS (1998 b) The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* 10: 313-318
- Maes M, Lin A, Delmeire L, Van Gastel A, Kenis G, De Jongh R, Bosmans E (1999 a) Elevated serum interleukin-6 and IL-6 receptor concentrations in posttraumatic stress disorder following accidental man-made traumatic events. *Biol Psychiatry* 45: 833-839
- Maes M, Van Bockstael DR, Van Gastel A, Song C, Schotte C, Neels H, Demeester I, Scharpé S, Janca A (1999 b) The effects of psychological stress on leukocyte subset distribution in humans: evidence of immune activation. *Neuropsychobiology* 39: 1-9

- Malloy PF, Fairbank JA, Keane TM (1983) Validation of multimethod assessment of posttraumatic stress disorders in Vietnam veterans. *J Consult Clin Psychol* 51: 488-494
- Mandy FF, Bergeron M, Recktenwald D, Izaguirre CA (1992) A simultaneous three-color T cell subsets analysis with single laser flow cytometers using T cell gating protocol. comparison with conventional two-color immunophenotyping method. *J Immunol Method* 156: 151-162
- Marshall Jr GD, Agarwal SK, Lloyd C, Cohen L, Henninger M, Morris GJ (1998) Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain Behav Immun* 12: 297-307
- Mason JW, Giller EL, Kosten TR, Ostroff RB, Podd L (1986) Urinary free-cortisol levels in post-traumatic stress disorder patients. *J Nerv Ment Dis* 174: 145-159
- Mason JW, Giller EL, Kosten TR, Harkness L (1988) Elevation of urinary norepinephrine/cortisol ratio in posttraumatic stress disorder. *J Nerv Ment Dis* 176: 498-502
- Mason JW, Giller EL, Kosten TR, Wahby VS (1990) Serum testosterone levels in posttraumatic stress disorder inpatients. *J Traum Stress* 3: 449-457
- Mason J, Southwick S, Yehuda R, Wang S, Riney S, Bremner D, Johnson D, Lubin H, Blake D, Zhou G (1994) Elevation of serum free triiodothyronine, total triiodothyronine, thyroxine-binding globulin, and total thyroxine levels in combat-related posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 51: 629-641
- May M, Holmes E, Rogers W, Poth M (1990) Protection from glucocorticoid induced thymic involution by dehydroepiandrosterone. *Life Sci* 46: 1627-1631
- Mayer EA (2000) The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 47: 861-869
- Meikle AW, Dorchuck RW, Araneo BA, Stringham JD, Evans TG, Spruance SL, Daynes RA (1992) The presence of a dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42: 293-304

- McCarren M, Janes GR, Goldberg J, Eisen SA, True WR, Henderson WG (1995) A twin study of the association of post-traumatic stress disorder and combat exposure with long-term socioeconomic status in Vietnam veterans. *J Trauma Stress* 8: 111-124
- McEwen BS (1998) Protective and Damaging Effects of Stress Mediators. *N Engl J Med* 338: 171-179
- McEwen BS, Seeman T (1999) Protective and damaging effects of mediators of stress. Elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 896: 30-47
- McEwen BS, Stellar E (1993) Stress and the individual: mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 153: 2093-2101
- McEwen BS, Wingfield JC (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 43: 2-15
- McEwan IJ, Wright APH, Gustafsson JA (1997) Mechanisms of gene expression by the glucocorticoid receptor: Role of protein-protein interactions. *Bioessays* 19: 153-160
- McFall ME, Murburg MM, Ko GN, Veith RC (1990) Autonomic responses to stress in Vietnam combat veterans with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 27: 1165-1175
- McFarlane AC, Papay P (1992) Multiple diagnoses in posttraumatic stress disorder in the victims of a natural disaster. *J Nerv Ment Dis* 180: 498-504
- McKinnon W, Weisse CS, Reynolds CP, Bowles CA, Baum A (1989) Chronic stress, leukocyte subpopulations, and humoral response to latent viruses. *Health Psychol* 8: 389-402
- Morales AJ, Nolan JJ, Nelson JC, Yen SS (1994) Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1360-1367

- Mosmann TR, Sad S (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 138-146
- Mosnaim AD, Wolf ME, Maturana P, Mosnaim G, Puente J, Kucuk O, Gilman-Sach A (1993) In vitro studies of natural killer cell activity in post traumatic stress disorder patients. Response to methionine-enkephalin challenge. *Immunopharmacology* 25: 107-116
- Moynihan JA (2003) Mechanisms of stress-induced modulation of immunity. *Brain Behav Immun* 1: S11-16
- Mulchahey JJ, Ekhaton NN, Zhang H, Kasckow JW, Baker DG, Geraciotti TD Jr (2001) Cerebrospinal fluid and plasma testosterone levels in post-traumatic stress disorder and tobacco dependence. *Psychoneuroendocrinology* 26: 273-285
- Munck A, Guyre P (1991) Glucocorticoids and immune function. U: Ader R, Felten D, Cohen N, eds. *Psychoneuroimmunology*, drugo izdanje, New York: Academic, 447-464
- Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH (1989) Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 143: 3183-3191
- Neeck G, Federlin K, Graef V, Rusch D, Schmidt KL (1990) Adrenal secretion of cortisol in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 17: 24-29
- Nemerof CB (1989) Clinical significance of psychoneuroendocrinology in psychiatry: focus on the thyroid and adrenal. *J Clin Psychiatry* 50: 13-22
- Newton R (2000) Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 55: 603-613
- Ohashi M, Kato K, Nawata H, Ibayashi H (1986) Adrenocortical responsiveness to graded ACTH infusions in normal young and elderly human subjects. *Gerontology* 32: 43-51
- O'Leary A (1990) Stress, emotion, and human immune function. *Psychol Bull* 108: 363-382

- Olf M (1999) Stress, depression and immunity: the role of defense and coping styles. *Psychiat Res* 85: 7-15
- Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Lucia PD, D'Ambrosio D, Lang R, Fabbri L, Self C, Sinigaglia F (1997) Beta 2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin-12. *J Clin Invest* 100: 1513-1529
- Pariante CM, Nemeroff CB, Miller AH (1995) Glucocorticoid receptors in depression. *Isr J Med Sci* 31: 705-712
- Perlstein RS, Whitnall MH, Abrams JS, Mougey EH, Neta R (1993) Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumour necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. *Endocrinology* 132: 946-952
- Perry BD, Southwick SM, Yehuda R, Giller EL (1990) Adrenergic receptor regulation in post-traumatic stress disorder. *U: Giller R (ed.) Biological Assessment and Treatment of Post-Traumatic Stress Disorder. American Psychiatric Press, Washington, 87-114*
- Petito JM, Folds JD, Ozer H, Quade D, Evans DL (1992) Abnormal diurnal variation in circulating natural killer cell phenotypes and cytotoxic activity in major depression. *Am J Psychiatry* 149: 694-696
- Pitman RK, Orr SP (1990) Twenty-four hour urinary cortisol and catecholamine excretion in combat-related post-traumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 27: 245-247
- Prussin, C, Metcalfe DD (1995) Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 188:117-128
- Raikkonen K, Lassila R, Keltikangas-Jarvinen L, Hautanen A (1996) Association of chronic stress with plasminogen activator inhibitor-1 in healthy middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 363-367

- Ramierz F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D (1996) Glucocorticoids promote a Th2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J Immunol* 156: 2406-2412
- Rasmusson AM, Vythilingam M, Morgan CA 3rd (2003) The neuroendocrinology of posttraumatic stress disorder: new directions. *CNS Spectr* 8: 651-656, 665-657
- Ravetch JV, Bolland S (2001) IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19: 275-290
- Reber PM (1993) Prolactin and immunomodulation. *Am J Med* 95: 637-644
- Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK (2004) Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 5: 617-625
- Robertson MJ, Ritz J (1990) Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76: 2421-2438
- Rivier C, Rivier J, Vale W (1986) Stress-induced inhibition of reproductive function: role of endogenous corticotropin releasing factor. *Science* 231: 607-609
- Rohleder N, Joksimovic L, Wolf JM, Kirschbaum C (2004) Hypocortisolism and increased glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production in Bosnian war refugees with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 55: 745-51
- Rook GA, Hernandez-Pando R, Lightman SL (1994) Hormones, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. *Immunol Today* 15: 301-303
- Rosenfeld RS, Hellman L, Roffwarg H, Weitzman ED, Fukushima DK, Gallagher TF (1971) Dehydroisoandrosterone is secreted episodically and synchronously with cortisol by normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 33: 87-92
- Rothwell NJ (1991) Functions and mechanisms of interleukin-1 in the brain. *TIPS* 121: 430-436
- Rothwell NJ, Hopkins SJ (1995) Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 18: 130-136

- Rothwell NJ, Luheshi G, Toulmond S (1996) Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology, and pathology. *Pharmacol Ther* 69: 85-95
- Sabioncello A, Rabatić S, Kadrnka-Lovrenčić M, Oberiter V, Dekaris D (1981) Decreased phagocytosis and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in type-1 diabetes. *Biomedicine* 35: 227-229
- Saksela E, Timonen T, Ranki A, Hayry P (1979) Fractionation, morfological and functional characterization of effector cells responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and cell line targets. *Immunol Rev* 44: 71-123
- Saklatvala J (2002) Glucocorticoids: do we know how they work? *Arthritis Res* 4: 146-50
- Sander B, Andersson J, Andersson U (1991) Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol Rev* 119: 65-93
- Sanders VM, Baker RA, Ramer-Quinn DS, Kasprovicz DJ, Fuchs BA, Street NE (1997) Differential expression of the beta 2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. *J Immunol* 158: 4200-4210
- Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, Vale W (1987) Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* 238: 522-524
- Schedlowski M, Hosch W, Oberbeck R, Benschop RJ, Jacobs R, Raab H-R, Schmidt RE (1996) Chatecholamines modulate human natural killer (NK) cell circulation and function via spleen-independent β 2-adrenergic mechanisms. *J Immunol* 156: 93-99
- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidowski JA, Baldwin AS Jr.(1995)Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15: 943-953

- Schleifer SJ, Keller SE, Meyerson AT, Raskim MJ, Davis KL, Stein M (1984) Lymphocyte function in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiat* 41: 484-486
- Schleifer SJ, Keller SE, Bond RN, Cohen J, Stein M (1989) Major depressive disorder and immunity. *Arch Gen Psychiat* 46: 81-87
- Schleifer SJ, Keller SE, Bartlett JA (1999) Depression and immunity: clinical factors and therapeutic course. *Psychiat Res* 85: 63-69
- Schnurr PP, Spiro A 3rd, Paris AH (2000) Physician-diagnosed medical disorders in relation to PTSD symptoms in older male military veterans. *Health Psychol* 19: 91-7
- Schuerwegh AJ, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS (2001) Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Cytometry* 46: 172-176
- Selye H (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32
- Selye H (1974) *Stress without distress*. New York: New American Library
- Selye H (1976) *The Stres of Life*. McGraw-Hill, New York
- Shalev AY, Orr SP, Peri T, Schreiber S, Pitman RK (1992) Physiologic responses to loud tones in Israeli patients with posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 49: 870-874
- Shalev AY, Bonne O, Eth S (1996) Treatment of posttraumatic stress disorder: a review. *Psychosom Med* 58: 165-182
- Sheridan JF, Dobbs C, Brown D, Zwillling B (1994) Psychoneuroimmunology: stress effects on pathogenesis and immunity during infection. *Clin Microbiol Rev* 7: 200-212

- de Simoni MG, Sironi M, De Luigi A, Manfredi A, Mantovani A, Ghezzi P (1990) Intracerebroventricular injection of interleukin-1 induces high circulating levels of interleukin-6. *J Exp Med* 171: 1773-1778
- Sluzewska A, Rybakowski J, Bosmans E, Sobieska M, Berghmans R, Maes M, Wiktorowicz K (1996) Indicators of immune activation in major depression. *Psychiat Res* 64: 161-167
- Smith MA, Davidson J, Ritchie JC, Kudler H, Lipper S, Chappell P, Nemeroff CB (1989) The corticotropin releasing hormone test in patients with post-traumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 26: 349-355
- Smith RA (1991) The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses* 35: 298-306
- Solomon Z, Mikulincer M (1987) Combat stress reactions, posttraumatic stress disorder, and social adjustment. A study of Israeli veterans. *J Nerv Ment Dis* 175: 277-285
- Soontjens CD, Rafter JJ, Gustafsson JA (1996) Ligands for orphan receptors? *J Endocrin* 150: S241-S257
- Spivak B, Maayan R, Kotler M, Mester R, Gil-Ad I, Shtauf B, Weizman A (2000) Elevated circulatory level of GABA(A)--antagonistic neurosteroids in patients with combat-related post-traumatic stress disorder. *Psychol Med* 30: 1227-1231
- Spivak B, Maayan R, Mester R, Weizman A (2003) Plasma testosterone levels in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Neuropsychobiology* 47: 57-60
- Spivak B, Shohat B, Mester R, Avraham S, Gil-Ad I, Bleich A, Valevski A, Weizman A (1997) Elevated levels of serum interleukin-1 β in combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiat* 42: 345-348
- Starkie RL, Angus DJ, Rolland J, Hargreaves M, Febbraio MA (2000) Effect of prolonged, submaximal exercise and carbohydrate ingestion on monocyte intracellular cytokine production in humans. *J Physiol* 528: 647-655

- Starkie RL, Rolland J, Angus DJ, Anderson MJ, Febbraio MA (2001) Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: 769-774
- Sterling P, Eyer J (1988) Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. *U: Fisher S, Reason J (eds.) Handbook of Life Stress, Cognition and Health*. New York, John Wiley, 629-649
- Sternberg EM (1989) Monokines, lymphokines, and the brain. *U: Cruse JM, Lewis RE Jr (eds.) The Year in Immunology 1988. Immunoregulatory Cytokines and Cell Growth. Year Immunol Basel, Karger* 5: 205-217
- Sternberg EM (1993) Hyperimmune fatigue syndromes: diseases of the stress response? *J Rheumatol* 20: 418-421
- Sternberg EM (1997) Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest* 100: 2641-2647
- Sternberg EM, Chrousos GP, Wilder L, Gold PW (1992) The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Ann Intern Med* 117: 854-866
- Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, Kamilaris T, Listwak SJ, Gold PW, Wilder RL (1989 a) Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2374-2378
- Sternberg EM, Young WS 3rd, Bernardini R, Calogero AE, Chrousos GP, Gold PW, Wilder RL (1989 b) A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4771-4775
- Stone AA, Bovbjerg DH, Neale JM, Napoli A, Valdimarsdottir H (1992) Development of common cold symptoms following experimental rhinovirus infection is related to prior stressful life events. *Behav Med* 8: 115-120

- Suzuki N, Suzuki T, Engleman EG (1991) Evidence for the involvement of CD56 molecules in alloantigen-specific recognition by human natural killer cells. *J Exp Med* 173: 1451-1461
- Suzuki T, Suzuki N, Daynes RA, Engleman EG (1991) Dehydroepiandrosterone enhances IL-2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clin Immunol Immunopathol* 61: 202-211
- Swanson LW, Simmons DM (1989) Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 285: 413-435
- Tabardel Y, Duchateau J, Schmartz D, Marecaux G, Shahla M, Barvais L, Leclerc JL, Vincent JL (1996) Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men. *Surgery* 119: 76-80
- Tilders FJ, DeRijk RH, Van Dam AM, Vincent VA, Schotanus K, Persoons JH (1994) Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology* 19: 209-232
- Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, Kinoshita A, Ikemoto A, Nakamura S, Kimura J (1996) Glial expression of cytokines in the brains of cerebrovascular disease patients. *Acta Neuropathol* 92: 281-287
- Trinchieri G (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 251-276
- Turnbull AV, Rivier CL (1999) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79: 1-71
- Tucker P, Ruwe WD, Masters B, Parker DE, Hossain A, Trautman RP, Wyatt DB (2004) Neuroimmune and cortisol changes in selective serotonin reuptake inhibitor and placebo treatment of chronic posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 56: 121-128

- Van Cauter E, Leproult R, Kupfer DJ (1996) Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2468-2473
- Van Dam A-M, De Vries HE, Kuiper J, Zijlstra FJ, De Boer AG, Tilders FJH, Berkenbosch F (1996) Interleukin-1 receptors on rat brain endothelial cells: a role in neuroimmune interaction? *FASEB J* 10: 351-356
- van der Poll T, Barber AE, Coyle SM, Lowry SF (1996) Hypercortisolemia increases plasma interleukin-10 concentrations during human endotoxemia--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3604-3606
- Vanderpompe G, Antoni MH, Visser A, Heijnen CJ (1998) Effect of mild acute stress on immune cell distribution and natural killer cell activity in breast cancer patients. *Biol Psychol* 48: 21-35
- Vojdani A, Thrasher JD (2004) Cellular and humoral immune abnormalities in Gulf War veterans. *Environ Health Perspect* 112: 840-846
- de Waal RM (1994) The anti-inflammatory activity of glucocorticoids. *Mol Biol Rep* 19: 81-88
- Wang S, Mason J (1999) Elevations of serum T3 levels and their association with symptoms in World War II veterans with combat-related posttraumatic stress disorder: replication of findings in Vietnam combat veterans. *Psychosom Med* 61: 131-138
- Watkins AD (1994) Hierarchical cortical control of neuroimmunomodulatory pathways. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20: 423-431
- Watkins RL, Maier SF, Goehler LE (1995 a) Cytokine-to-brain communication: a review and analysis of alternative mechanisms. *Life Sci* 57: 1011-1026
- Watkins RL, Maier SF, Goehler LE (1995 b) Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* 63: 289-302

- Watson CG, Juba MP, Manifold V, Kucala T, Anderson PE (1991) The PTSD interview: rationale, description, reliability, and concurrent validity of a DSM-III-based technique. *J Clin Psychol* 47: 179-188
- Watson IP, Muller HK, Jones IH, Bradley AJ (1993) Cell-mediated immunity in combat veterans with post-traumatic stress disorder. *Med J Australia* 159: 513-516
- Webster EL, Elenkov IJ, Chrousos GP (1997) The role of corticotropin-releasing hormone in neuroendocrine-immune interactions. *Mol Psychiatry* 2: 368-372
- Weigent DA, Blalock E (1995) Associations between the neuroendocrine and immune systems. *J Leukoc Biol* 57: 137-150
- Wilder RL (1995) Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 13: 307-338
- Wilson SN, van der Kolk B, Burbridne J, Fisler R, Kradin R (1999) Phenotype of blood lymphocytes in PTSD suggests chronic immune activation. *Psychosomatics* 40: 222-225
- Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schoning B, Glockner F, Lanksch WR, Volk HD, Docke WD (1998) Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med* 4: 808-813
- Wolf OT, Kirschbaum C (1999) Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animals and humans. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 264-288
- Wong CM (2002) Post-traumatic stress disorder: advances in psychoneuroimmunology. *Psychiatr Clin North Am* 25: 369-383
- Wright BE, Porter JR, Browne ES, Svec F (1992) Antigluocorticoid action of dehydroepiandrosterone in young obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16: 579-583

- Wu CY, Wang K, McDyer JF, Seder RA (1998) Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J Immunol* 161: 2723-2730
- Xia L, Matera C, Ferin M, Wardlaw SL (1996 a) Interleukin-1 stimulates the central release of corticotropin-releasing hormone in the primate. *Neuroendocrinology* 63: 79-84
- Xiao E, Xia-Zhang L, Thornell D, Ferin M (1996) Interleukin-1 stimulates luteinizing hormone release during the midfollicular phase in the Rhesus monkey: a novel way in which stress may influence the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2136-2141
- Yehuda R, Southwick SM, Nussbaum G, Giller EL, Mason JW (1991 a) Low urinary cortisol excretion in PTSD. *J Nerv Ment Dis* 178: 366-369
- Yehuda R, Lowy MT, Southwick SM, Shaffer S, Giller EL (1991 b) Increased number of glucocorticoid receptor number in post-traumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 149: 499-504
- Yehuda R, Boisoneau D, Mason JW, Giller EL (1993 a) Glucocorticoid receptor number and cortisol excretion in mood, anxiety, and psychotic disorders. *Biol Psychiatry* 34: 18-25
- Yehuda R, Southwick SM, Krystal JH, Charney DS, Mason JW (1993 b) Enhanced suppression of cortisol following a low dose of dexamethasone in combat veterans with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 150: 83-96
- Yehuda R, Teicher M, Trestman RL, Levengood RA, Siever LJ (1994) Cortisol regulation in posttraumatic stress disorder: a chronobiological analysis. *Ann N Y Acad Sci* 746: 378-380
- Yehuda R, Boisoneau D, Lowy MT, Giller EL Jr (1995 a) Dose-response changes in plasma cortisol and lymphocyte glucocorticoid receptors following dexamethasone administration in combat veterans with and without posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 52: 583-593

- Yehuda R, Kahan B, Binder-Brynes K, Southwick M, Mason JW, Giller EL (1995 b) Low urinary cortisol excretion in Holocaust survivors with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 152: 982-986
- Yehuda R, Teicher MH, Trestman RL, Levengood RA, Siever LJ (1996) Cortisol regulation in posttraumatic stress disorder and major depression: a chronobiological analysis. *Biol Psychiatry* 37: 1-10
- Yehuda R, McFarlane AC, Shalev AY (1998) Predicting the development of posttraumatic stress disorder from the acute response to a traumatic event. *Biol Psychiatry* 44: 1305-1313
- Yirmiya R (1997) Behavioral and psychological effects of immune activation: implications for depression due to a general medical condition. *Curr Opin Psychiatry* 10: 470-476
- Zompi S, Colucci F (2005) Anatomy of a murder--signal transduction pathways leading to activation of natural killer cells. *Immunol Lett* 97: 31-39

8. SAŽETAK

8. SAŽETAK

Pri održavanju homeostaze u slučaju stresa pokreće se adaptivna reakcija s obostranom komunikacijom među organskim sustavima koji sudjeluju u stresnoj reakciji (središnji živčani sustav, imunostav te hormonski sustav). Interakcija među njima je neprekidna, zasnovana na sustavu topivih molekula (neurotransmitora, hormona, citokina) i njihovih receptora, s osnovnim ciljem održanja stabilnosti cijeloga organizma unutar širokih fizioloških granica alostaze. Adaptivna reakcija na stres je sastavni dio alostatskih mehanizama kojima se aktivira adrenergički sustav te hormonska osovina hipotalamus-hipofiza-adrenalna žlijezda (HPA). Postavljena je hipoteza kako učestalo ili produljeno izlaganje stresnoj reakciji te neadekvatan odgovor stresnog sustava, može rezultirati alostatskim opterećenjem i dovesti do patoloških promjena. Biološke posljedice stresne reakcije istraživane su na različitim modelima akutnog i kroničnog stresa, psihijatrijskim poremećajima te u posttraumatskom stresnom poremećaju (PTSP). Za PTSP karakteristično je «oslabljeno» funkcioniranje HPA-osovine, što se očituje niskom bazalnom razinom kortizola te povišenim brojem glukokortikoidnih receptora (GCR). Ovi nalazi uglavnom proizlaze iz istraživanja na veteranima vijetnamskog rata, dakle nekoliko desetaka godina nakon proživljene traume. Naša dosadašnja istraživanja sprovedena na ratnim veteranima Domovinskog rata s PTSP-om u ranijim fazama bolesti (unutar 8 godina od proživljene traume) pokazala su, osim brojnih promjena u imunostavu, povišenu razinu kortizola u serumu i sniženu ekspresiju GCR-a u svim ispitivanim populacijama limfocita. Razlog takvom odstupanju zacijelo leži u bitno kraćem trajanju alostatskog opterećenja zbog adaptivne reakcije na stres u odnosu na vijetnamske veterane. Pretpostavili smo kako je za izmjenu razine kortizola i njegova receptora potrebno duže razdoblje pojačane aktivnosti HPA-osovine. Istraživanja imunološkog statusa u PTSP-u su rijetka a rezultati oprečni. Usporedbom dviju grupa ispitanika s PTSP-om, ratnih veterana i profesionalnih vojnika, uz neke istovrsne promjene imunoloških i hormonskih parametara, uočili smo i razlike u drugim varijablama. Pretpostavili smo da bi se nedosljednost mogla objasniti psihosocijalnim faktorima prvenstveno socioekonomskim statusom. Prema literarnim podacima, socioekonomski status je značajno povezan s rizikom oboljenja i smrtnošću. Nezaposlenost ili gubitak posla je teža životna trauma koja dovodi do promjena u funkcioniranju imunostava i kod zdravih ljudi, a najčešće dodatne traume koje se povezuju s ratnim PTSP-om su

nemogućnost nalaženja ili gubitak posla, nizak socioekonomski status, rastava braka te teža oboljenja. Kroničan stres smanjuje sposobnost odupiranja bolestima, a nedavno je postavljena hipoteza kako stresni sustav (kateholamini i glukokortikoidi) pomiču Th1/Th2 ravnotežu prema Th2-tipu reakcije, pa se tako narušava ravnoteža između stanične i humoralne imunosti. Želeći uzeti u obzir sve navedeno, cilj nam je bio ispitati novu skupinu veterana Domovinskog rata s kroničnim PTSP-om (n=41), otprilike deset godina nakon proživljene traume, te skupinu zdravih, po dobi sličnih muškaraca (n=13) bez PTSP-a kao kontrolu. Ispitanike s PTSP-om podijelili smo u dvije podskupine: PTSD I (n=23), su bili ispitanici koji nisu proživjeli novi traumatski događaj unutar zadnje godine dana, te PTSD II (n=18) ispitanici koji su, osim dijagnoze PTSP-a, ostali bez mirovinske naknade ili drugih primanja što je bio uzrok dodatne traumatizacije. Koristili smo se multiparametarskom imunofenotipizacijom pri određivanju: a) apsolutnog broja limfocita i monocita te postotka subpopulacija limfocita (CD4-, CD8- i memorijskih stanica), NK-stanica i površinskih Fc-receptora (CD16, CD32, CD64) na limfocitima, b) relativne količine glukokortikoidnih receptora (GCR) u citoplazmi limfocita te unutarstaničnog perforina u NK- i CD8-stanicama, c) unutarstanične ekspresije Th1/Th2 citokina (IFN- γ ili IL-4) nakon kratkotrajne (4 sata) stimulacije pune krvi s PMA i ionomicinom *in vitro* te proizvodnju proupalnih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α) u monocitima stimuliranim LPS-om (5 sati) *in vitro*. NK-staničnu aktivnost određivali smo metodom oslobađanja ^{51}Cr , a razine kortizola, dehidroepiandrosterona (DHEA) te testosterona u serumu enzimimunotestom (ELISA). Iznenadujuće je da u najvećem broju praćenih varijabli (38) nismo našli promjena između ispitivanih grupa. Nismo pronašli niti razliku u apsolutnom broju limfocita, postotcima njihovih osnovnih populacija, razini perforina, u Th1/Th2 odgovoru kao ni u proizvodnji proupalnih citokina u stimuliranim monocitima. Razlika nije nađena niti u razinama hormona u serumu. Nasuprot tome, relativna količina GCR-a u limfocitima bila je povišena, a citotoksička aktivnost NK-stanica snižena u obje grupe ispitanika s PTSP-om u odnosu na zdrave kontrole. Dodatna trauma nije značajan faktor koji, u našem modelu, utječe na ispitivane varijable. Ovi rezultat potkrjepljuju pretpostavku o iscrpljujućem utjecaju pojačane aktivnosti HPA-osovine i alostatskom opterećenju koje se odražava na imunološkom statusu. Možemo zaključiti kako promjene hormonskog i imunostava, kod osoba koje su izložene dugotrajnom stresu, nisu statične već ovisne o trajanju alostatskog pritiska kao i o interakcijama koje su uključene u stresni odgovor.

9. *SUMMARY*

9. SUMMARY

Maintenance of homeostasis, adaptation to stress, and ultimately survival require bidirectional feedback communication among the components of stress response (central nervous, immune and endocrine systems). An interaction among these systems is sustained in order to achieve stability across an allostatic operating range, and is based upon soluble mediators (neurotransmitters, hormones and cytokines) and their receptors. Adaptive stress response involves activation of adrenergic and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and is an integrative part of allostasis. It is hypothesized that long-term effect of prolonged response to stress or malfunction in the stress system can result in substantial allostatic load with pathologic outcome over time. The biological consequences of stress have been extensively studied in different models of acute or chronic stress, psychiatric or mood disorders, and in posttraumatic stress disorder (PTSD). A distinct profile of HPA axis, manifested by low basal cortisol level and increased number of glucocorticoid receptors (GCR), is associated with PTSD. These findings mainly rely on studies performed in Vietnam veterans, decades following exposure to trauma. Our previous study performed in the more acute stage of PTSD (within 8 years from traumatic event) in war veterans with PTSP, besides numerous immune alterations, revealed elevated plasma cortisol level and lower GCR expression in each of the lymphocyte populations examined. The reason for such a discrepancy could lie in a considerably shorter duration of allostatic load caused by adaptive response to stress. We assumed that more time was needed for reversal of hormone and its receptor expression to take place due to hyperactivity of HPA axis. Studies of immune status in PTSD survivors are scarce and inconsistent results have been reported. Comparison of the two groups of war veterans and professional soldiers with PTSD revealed them to share alterations in some but not all immune and hormone variables tested. We assumed that the discrepancy between the groups resulted from different socioeconomic background. Socioeconomic status is strongly associated with the risk of disease and mortality. Correlational studies indicated that additional life stressors, particularly unemployment, low income or socioeconomic status, and disruption of relationships were significantly associated with PTSD symptoms. Chronic stress can lead to a reduced capacity to resist disease. Recently, it has been suggested that stress-induced changes in hormones and cytokines may disrupt the fine balance between the cell-mediated and humoral immunity. The physiologic levels of glucocorticoids and catecholamines are

immunomodulatory rather than immunosuppressive, causing a shift in the cytokine production from Th1-type to Th2-type pattern. In line with this assumption, our aim was to examine another group of Croatian war veterans with chronic, combat-related PTSD (n=41) approximately ten years after trauma, and healthy, age-matched men (n=13) as controls. PTSD patients were divided into two subgroups: PTSD I, with no additional major stress experience during the last year (n=23), and PTSD II, including patients who, besides primary diagnosis, had lost their job or rent recently, considered as an additional trauma (n=18). We used multiparameter flow cytometric approach to determine: (a) absolute number of lymphocytes and monocytes and percentage of lymphocyte subsets (CD4, CD8, memory cells), NK-cells, and their surface Fc-receptors (CD16, CD32, CD64); (b) relative quantity of cytoplasmatic GCR in lymphocytes and intracellular perforin in NK- and CD8-subsets; and (c) intracellular expression of Th1/Th2 cytokines (IFN- γ or IL-4) after short-term whole blood stimulation (4 hours) with PMA and ionomycin *in vitro* as well as proinflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated (5 hours) monocytes. Besides, NK-cell activity was measured by ^{51}Cr -release assay, and serum levels of cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA) and testosterone were determined by ELISA. Surprisingly, most of the immune and endocrine variables (n=38) showed no differences among the three groups of subjects. There were no differences in absolute lymphocyte number, percentage of main lymphocyte populations, level of perforin in lymphocyte subsets, or in either Th1/Th2 profile or level of proinflammatory cytokines in stimulated monocytes. There were no significant between-group differences in the levels of serum hormones (cortisol, DHEA and testosterone) either. On the other hand, the relative quantity of GCR in lymphocytes was increased, whereas the NK-cytotoxic activity was decreased in both PTSD groups as compared with the control group. In our study, additional trauma had no major impact on the tested variables. These results support the hypothesis of the exhaustive effect of allostatic load on the immune response through enduring overactivity of HPA axis. It is concluded that changes in the immune and hormone system are not static in persons under prolonged stress but rather depend on the duration of allostatic load and its impact on the interactions involved in the response to stress.

POPIS KRATICA

ADCC	stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (od engl. antibody-dependent cellular cytotoxicity)
ACTH	adenokortikotropni hormon (od engl. adenocorticotropic hormone)
APC	alofikocianin
AVP	arginin vasopresin
AŽS	autonomni živčani sustav
BFA	brefeldin A
CAPS	Clinician-Administered PTSD Scale
CMV	citomegalovirus
Cmp	mjera radioaktivnosti tj. broj otkucaja u minuti (od engl. counts per minute)
CRH	kortikotropni hormon (od engl. corticotropin-releasing hormone)
CVO	cirkumventrikularni organi
DHEA	dehidroepiandrosteron
DHEA-S	dehidroepiandrosteron-sulfat
DSM	dijagnostički i statistički priručnik mentalnih bolesti (od engl. Diagnostic and Statisticcal Manual of Mental Disorders)
DTS	Davidsonova traumatska skala
EBV	Epstein-Barrov virus
ELISA	enzimski imunotest (od engl. enzyme-linked immunoabsorbent assay)
FITC	fluorescein-izotiocijanat (od engl. fluorescein isothiocyanate)
FSC	rasap svjetlosti pod malim kutem na smjer upadne zrake; mjera veličine stanice (od engl. forward scatter)
FTS	fetalni teleći serum
GH	hormon rasta (od engl. growth hormone)
HPA	osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (od engl. hypotalamic-pituitary-adrenal)
HPG	osovina hipotalamus-hipofiza-gonade
HPT	osovina hipotalamus-hipofiza-tireoideja
Hsp	“heat-shock” proteini
IES	mjerni instrument (od eng. Impact of Event Scale)
GCR	glukokortikoidni receptor (od engl. glucocorticoid receptor)
GRE	elementi za odgovor na glukokortikoide (od engl. glukokorticoid response elements)
IL	interleukin
INF-γ	interferon- γ
KMB	krvno-moždana barijera
LASC	mjerni instrument (od eng. Los Angeles Symptom Checklist)
LC	locus caeruleus
LH	hormon luteinizacije
LHRH	hormon koji oslobađa hormon luteinizacije (od engl. luteinizing hormone releasing hormone)
LPS	lipopolisaharid
MCR	mineralokortikoidni receptor (od engl. mineralocorticoid receptor)
mfi	intenzitet specifične fluorescencije u srednjem kanalu (od eng. mean fluorescence intensity)
M-PTSD	Mississippi mjerni instrument (od eng. Mississipi Scale for Combat-Related PTSD)

NA	noradrenergički sustav
Na	noradrenalin
NCAM	izoforna adhezivne molekule živčanih stanica (od engl. neural cell adhesion molecule)
NK	urođenoubilačke stanice (od engl. natural killer)
OD	optička gustoća (od eng. optical density)
PBMC	mononuklearne stanice periferne krvi (od engl. peripheral blood mononuclear cells)
PE	fikoeritrin (od engl. phycoerythrin)
PerCP	peridinin-klorofil a protein (od engl. peridinin-chlorophyll-a protein)
PHA	fitohemaglutinin (od engl. phytohemagglutinin)
PMA	forbol-12-miristat-13-acetat,
PMN	polimorfonuklearne stanice
PVN	nucleus paraventricularis
POMC	proopiomelanokortin (od engl. proopiomelanocortin)
PPD	purificirani proteinski derivat tuberkulina
PRL	prolaktin
PTSD-I	mjerni instrument (PTSD-Interview)
PTSP	posttraumatski stresni poremećaj
SSC	rasap svjetlosti pod pravim kutem na smjer upadne zrake; mjera zrnatosti stanice (od engl. side scatter)
SŽS	središnji živčani sustav
Th	T-pomoćnički limfociti
Tc	T-citotoksički limfociti
TGF- β	faktor transformirajućeg rasta- β (od engl. transforming growth factor)
TNF- α	faktor nekroze tumora- α (od engl. tumor necrosis factor)
TOP-8	Treatment Outcome PTSD Scale
TSH	tireotropin (od engl. thyroid-stimulating hormone)

INDEKS SLIKA I TABLICA

SLIKE

- SLIKA 1: PSIHOBIOLOGIJA ODUPIRANJA STRESU. (PRERAĐENO PREMA OLFF, 1999). 9
- SLIKA 2 : SHEMATSKI PRIKAZ MEĐUDJELOVANJA ŽIVČANOG, HORMONSKOG I IMUNOSUSTAVA. AŽS, AUTONOMNI ŽIVČANI SUSTAV; 11
- SLIKA 3 : GLAVNE KOMPONENTE CENTRALNOG I PERIFERNOG STRESNOG SUSTAVA. PRIKAZANE SU PARAVENTRIKULARNE JEZGRE I LOKUS CERULEUS (NORADRENERGIČKI SUSTAV) TE DIJELOVI PERIFERNOG STRESNOG SUSTAVA, OSOVINA HIPOFIZA-NADBUBREŽNA ŽLIJEZDA I SIMPATIČKI ŽIVČANI SUSTAV. DETALJAN OPIS SLIKE NALAZI SE U TEKSTU. CRH, HORMON OSLOBAĐANJA KORTIKOTROPINA; ACTH, ADRENOKORTIKOTROPIN; AVP, ARGININ VAZOPRESIN; POMC, PROOPIOMELANOKORTIN. (PREMA CHROUSOSU, 1995). 15
- SLIKA 4 : ZBIVANJA U UPALI I PRIENOS SIGNALA U MOZAK. CIRKULIRAJUĆI LEUKOCITI, STANICE IMUNOSUSTAVA U TKIVU, TERMINALNI ZAVRŠETCI POSTGANGLIJSKIH SIMPATIČKIH I OSJETILNIH AFERENTNIH NEURONA PRIKAZANI SU NA LIJEVOJ SLICI U NORMALNOM TKIVU. NA DESNOJ SLICI SU ZBIVANJA U UPALJENOM TKIVU. AKTIVIRANI LEUKOCITI I ENDOTELNE STANICE EKSPRIMIRAJU ADHEZIJSKE MOLEKULE I NJIHOVE RECEPTORE NA SVOJOJ POVRŠINI. STANICE, PRIVUČENE KEMOTAKSIJSKIM GRADIJENTOM, PRILJUBLJUJU SE ZA SITJENKE KAPILARA I DIJAPEDEZOM PRELAZE U UPALJENO TKIVO. MIGRIRAJUĆI LEUKOCITI, TKIVNI MAKROFAGI, STANICE TKIVA I PERIFERNI ŽIVCI IZLUČUJU CITOKINE, LEUKOTRIJENE, FAKTOR AKTIVACIJE TROMBOCITA, NEUROPEPTIDE, NEUROHORMONE I DRUGE MEDIJATORE UPALE. NEKE OD TIH TVARI KAO ŠTO SU LEUKOTRIJENI, IL-6, IL-8, TGF- β I CRH IMAJU KEMOTAKTIČKA SVOJSTVA. PROUPALNI CITOKINI IL-1, IL-6 I TNF- α PRELAZE U CIRKULACIJU IZAZIVAJUĆI SISTEMSKE EFEKTE KAO ŠTO SU SINTEZA PROTEINA AKUTNE FAZE, "BOLESNO PONAŠANJE", PORAST TEMPERATURE I AKTIVACIJU HPA-OSOVINE. UPALNI MEDIJATORI PODRAŽUJU ŽIVČANE ZAVRŠETKE AFERENTNIH OSJETILNIH NEURONA I AUTONOMNOG ŽIVČANOG SUSTAVA ČIM SE INFORMACIJA O UPALI PRENOSI DO MOZGA. (PREUZETO OD CHROUSOSA, 1995). 18
- SLIKA 5 : MEĐUSOBNO DJELOVANJE PROUPALNIH CITOKINA TE UTJECAJ GLUKOKORTIKOIDA I KATEHOLAMINA. LIJEVA SLIKA PRIKAZUJE DINAMIKU POJAVLJIVANJA CITOKINA NA MJESTU UPALE. TNF- α SE IZLUČUJE PRVI, SLIJEDI IL-1, A IL-6 JE POSLJEDNJI. SVAKI OD TIH CITOKINA STIMULIRA VLASTITO IZLUČIVANJE (DESNA SLIKA). TNF- α I IL-1 STIMULIRAJU SE UZAJAMNO I SINERGISTIČKI POTIČU LUČENJE IL-6. IL-6 KOČI LUČENJE TNF- α I IL-1. GLUKOKORTIKOIDI INHIBIRAJU LUČENJE SVA TRI CITOKINA KAO I NJIHOVO DJELOVANJE NA CILJNA TKIVA, OSIM U SLUČAJU OTPUŠTANJA PROTEINA AKUTNE FAZE U JETRI GDJE DJELUJU SINERGISTIČKI S IL-6. KATEHOLAMINI KONTROLIRAJU UPALNU REAKCIJU POTIČUĆI PROIZVODNJU IL-6 KOJI KOČI OSTALE CITOKINE. PUNE CRTE ZNAČE STIMULACIJU, A ISPREKIDANE INHIBICIJU. (PREUZETO OD CHROUSOSA, 1995). 19
- SLIKA 6: NEUROIMUNOLOŠKI KOMUNIKACIJSKI PUTEVI. PRIKAZANI SU VAGUS I TRI ODJELJKA: CVO, CIRKUMVENTRIKULARNI ORGANI; CST, CEREBROSPINALNA TEKUĆINA I OSTALA MOŽDANA TKIVA. 21
- SLIKA 7 : AKTIVACIJA I DJELOVANJE GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA (GCR). HSP, HEAT SHOCK PROTEIN; GRE, ELEMENTI ZA ODGOVOR NA GLUKOKORTIKOIDE U DNA. (PREUZETO OD WAALA, 1994). 22
- SLIKA 8: PRIKAZ INTERAKCIJA GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA (GCR) I TRANSKRIPCISKOG FAKTORA AP-1 KOJE DOVODE DO INHIBICIJE TRANSKRIPCije GENA. (PREUZETO OD WAALA, 1994). 24
- SLIKA 9 : SHEMATSKI PRIKAZ KONTROLNIH MEHANIZAMA STRESNIH REAKCIJA. HORMON OSLOBAĐANJA KORTIKOTROPINA (CRH) KOJI OTPUŠTAJU NEURONI HIPOTALAMUSA POTIČE (PUNE STRJELICE) AKTIVNOST NORADRENERGIČKIH JEZGARA LOKUSA CERULEUSA UZ LUČENJE NORADRENALINA (NA) KOJI OPET AKTIVIRA RAD CRH-NEURONA. TA MEĐUSOBNA POZITIVNA POVRATNA SPREGA POD AUTOKONTRLOM JE ULTRAKRATKIH NEGATIVNIH POVRATNIH SPREGA (TOČKASTE STRJELICE). ADRENOKORTIKOTROPIN (ACTH), ČIJE LUČENJE IZ HIPOFIZE POTIČE CRH, KRATKOM NEGATIVNOM POVRATNOM SPREGOM (CRTKANA STRELICA) ZAUSTAVLJA AKTIVNOST CRH-NEURONA I IZAZIVA LUČENJE GLUKOKORTIKOIDA IZ KORE NADBUBREŽNE ŽLIJEZDE. GLUKOKORTIKOIDI KRATKOM NEGATIVNOM POVRATNOM SPREGOM KOČE LUČENJE ACTH A DUGOM NEGATIVNOM POVRATNOM SPREGOM (ISPREKIDANA STRJELICA) AKTIVNOST CRH-NEURONA. (PRERAĐENO PREMA ELENKOVU I CHROUSOSU, 1999). 26
- SLIKA 10 : SISTEMSKE UČINCI STRESNIH HORMONA NA PROIZVODNJU CITOKINA TIPA 1 I 2. GLUKOKORTIKOIDI NE UTJEČU NA PRODUKCIJU IL-10 IZ MONOCITA/MAKROFAGA, ALI POSPJEŠUJU PROIZVODNJU IL-10 I IL-4 U TH2-STANICAMA. KATEHOLAMINI POTIČU LUČENJE IL-10 U MONOCITIMA/MAKROFAGIMA, ALI NEMAJU DIREKTAN UTJECAJ NA TH2-STANICE (TH2 STANICE IMAJU MALO ILI UOPĆE NEMAJU β -ADRENERGIČKIH RECEPTORA). INDIRECTNO, MEĐUTIM, KATEHOLAMINI MOGU POSPJEŠITI PROIZVODNJU CITOKINA TH2-TIPA JER ISKLJUČUJU NJIHOV GLAVI INHIBITOR, IL-12. (PREUZETO OD ELENKOVA I CHROUSOSA, 2002). 29

SLIKA 11 : SISTEMSKO DJELOVANJE STRESNIH HORMONA, GLUKOKORTIKOIDA I KATEHOLAMINA, NA IMUNOSUSTAV. *NK*, UROĐENOUČILACKE STANICE; *CD8*, T-CITOTOKSIČKI LIMFOCITI; *Mo/MQ*, MONOCITI/MAKROFAGI; *B*, B-LIMFOCITI; *EO*, EOZINOFILI; *MA*, MASTOCITI; *APC*, ANTIGEN-PREZENTIRAJUĆE STANICE; *BA*, BAZOFILI; *CRHR1*, RECEPTOR ZA *CRH*; β_2 , ADRENERGIČKI RECEPTOR; *H1*, HISTAMINSKI RECEPTORI; *GR*, GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTOR; *CRH*, HORMONE OSLOBAĐANJA ADRENOKORTIKOTROPINA; *DHEA*, DEHIDROEPIANDROSTERON; *NA*, NORADRENALIN. ZELENE STRJELICE OZNAČAVAJU DJELOVANJE CITOKINA, CRVENE I PLAVE HORMONA, A ISPEKIDANE SUPRESIJU. (PRERAĐENO PREMA REICHE I SUR., 2004)... 31

SLIKA 12 : KEMIJSKA STRUKTURA MOLEKULE DHEA. 34

SLIKA 13 : PROMJENA RAZINE CIRKULIRAJUĆEG DHEA TIJEKOM LJUDSKOG ŽIVOTA. 34

SLIKA 14: USPOREDBA RAZINE GLUKOKORTIKOIDNIH RECEPTORA (*GR*) I KORTIZOLA U URINU BOLESNIKA S PTSP-OM I DRUGIM PSIHIJATRIJSKIM POREMEĆAJIMA..... 46

SLIKA 15: POMAK U DESNO NA DIAGRAMU FLUORESCENCIJA ZA IZOTIPSKE KONTROLE KOD ISPITANIKA S PTSP-OM. 48

SLIKA 16: IMUNOFENOTIPIZACIJA S DVOSTRUKIM I TROSTRUKIM OBILJEŽAVANJEM. (A) ELEKTRONSKA OGRADA (*O1*) POSTAVLJENA OKO POPULACIJE LIMFOCITA DEFINIRANIH NA TEMELJU VELIČINE (*FSC*) I ZRNATOSTI (*SSC*) STANICA. (B) POSTOTAK LIMFOCITA KOJI EKSPRIMIRAJU JEDAN, DRUGI ILI OBA BILJEGA U KVADRANTIMA OMEĐENIM GRANIČNICIMA (ENGL. CURSOR), POSTAVLJENIM NA TEMELJU IZOTIPSKE KONTROLE. (C) KOD TROSTRUKOG OBILJEŽAVANJA DRUGA ELEKTRONSKA OGRADA (*O2*) POSTAVLJENA JE OKO POPULACIJE $CD4^+$ - (U SLUČAJU *CD45RA FITC/CD45RO PE/CD4 FITC*) ILI $CD3^+$ -LIMFOCITA (U SLUČAJU *CD16 FITC/CD56 PE/CD3 PERCP*). (D) SUBPOPULACIJE $CD4$ -LIMFOCITA KOJI EKSPRIMIRAJU RAZLIČITE KOMBINACIJE BILJEGA *CD45RA* I *CD45RO* IZRAŽENE KAO POSTOTAK $CD4$ -LIMFOCITA IZ *O2* I SUBPOPULACIJE $CD3^+$ -LIMFOCITA KOJE EKSPRIMIRAJU RAZLIČITE KOMBINACIJE BILJEGA *CD16* I *CD56* IZRAŽENE KAO POSTOTAK $CD3^+$ -LIMFOCITA IZ *O2*. (E) DRUGA ELEKTRONSKA OGRADA POSTAVLJENA OKO RAZLIČITIH SUBPOPULACIJA CITOTOKSIČKIH STANICA ($CD3^+CD16^+$, $CD3^+CD56^+$ ILI $CD3^+CD8^+$). (F) EKSPRESIJA PERFORINA U UNUTRAŠNOSTI CITOTOKSIČKIH STANICA. 64

SLIKA 17: ODREĐIVANJE RELATIVNE KOLIČINE UNUTARSTANIČNOG BILJEGA NA TEMELJU VRIJEDNOSTI SREDNJEG KANALA FLUORESCENCIJE (MFI) ZA PERFORIN (A) I ZA GCR (B). 65

SLIKA 18: RETROGRADNA METODA POSTAVLJANJA OPTIMALNE OGRADE ILI "BACK GATING". (A) NA TEMELJU SPECIFIČNIH FLUORESCENCIJA POSTAVLJA SE PRVA ELEKTRONSKA OGRADA, *O1*, OKO STANICA KOJE KARAKTERIZIRA VISOKA EKSPRESIJA BILJEGA *CD14* I *CD45*. (B) STANICE UNUTAR OGRADE *O1* PRIKAŽU SE NA DIJAGRAMU *FSC/SSC* TE SE POSTAVLJA NOVA OGRADA, *O2*, TAKO DA OBUHVATI MAKSIMALAN POSTOTAK MONOCITA IZ *O1*. (C) NA ISTOM SE DIJAGRAMU PRIKAŽU I SVI LEUKOCITI TE SE VRŠI KOREKCIJA OGRADE *O2*, PRATEĆI SASTAV STANICA UNUTAR *O2* NA DIJAGRAMU FLUORESCENCIJE *CD45/CD14*, TAKO DA KONAČNO UKLJUČUJE MAKSIMALAN POSTOTAK MONOCITA. 66

SLIKA 19 ODREĐIVANJE APSOLUTNOG BROJA LIMFOCITA ILI MONOCITA POMOĆU KUGLICA POZNATE KONCENTRACIJE. BROJ LIMFOCITA IZ *O2* DIJELI SE S BROJEM KUGLICA IZ *O1* I MNOŽI S POZNATOM KONCENTRACIJOM KUGLICA. 67

SLIKA 20: APSOLUTNI BROJ LIMFOCITA TE RELATIVAN ODNOS (POSTOTCI) POMOĆNIČKIH ($CD3^+CD4^+$) I CITOTOKSIČKIH ($CD3^+CD8^+$) T-LIMFOCITA U SKUPINI ISPITANIKA S PTSP-OM BEZ DODATNE TRAUME (PTSP I), S DODATNOM TRAUMOM ZBOG GUBITKA SREDSTAVA ZA ŽIVOT (PTSP II) TE ZDRAVIM KONTROLAMA. PRIKAZANI SU MEDIJANI (■) ILI ARITMETIČKE SREDINE (●) S INTERKVARTILNIM RANGOM, ODNOSNO STANDARDNOM DEVIJACIJOM (□) TE MINIMALNE (⊥) I MAKSIMALNE (⊓) VRIJEDNOST. 75

SLIKA 21: RAZLIKA U RELATIVNOM OMJERU (POSTOTKU) LIMFOCITA KOJI EKSPRIMIRAJU *CD32* (*FcγRII*) KOD ISPITANIKA S PTSP-OM BEZ DODATNE TRAUME (PTSP I) I S DODATNOM TRAUMOM ZBOG GUBITKA SREDSTAVA ZA ŽIVOT (PTSP II) U ODNOSU NA ZDRAVE KONTROLE. PRIKAZANA JE ARITMETIČKA SREDINA (●) SA STANDARDNOM DEVIJACIJOM (□) TE MINIMALNA (⊥) I MAKSIMALNA (⊓) VRIJEDNOST. NAVEDENE P-VRIJEDNOSTI DOBIVENE SU TUKEYJEVIM "POST-HOC" TESTOM ZA NEJEDNAKE UZORKE. 79

SLIKA 22: RAZLIKA U SREDNJEM INTENZITETU FLUORESCENCIJE (MFI) ZA EKSPRESIJU *CD32* BILJEGA NA LIMFOCITIMA ISPITANIKA S PTSP-OM BEZ DODATNE TRAUME (PTSP I) TE ONIH S DODATNOM TRAUMOM ZBOG GUBITKA SREDSTAVA ZA ŽIVOT (PTSP II) U ODNOSU NA ZDRAVE KONTROLE. PRIKAZANA JE ARITMETIČKA SREDINA (●) SA STANDARDNOM DEVIJACIJOM (□), MINIMALNA (⊥) I MAKSIMALNA (⊓) VRIJEDNOST. NAVEDENE P-VRIJEDNOSTI DOBIVENE SU TUKEYJEVIM "POST-HOC" TESTOM ZA NEJEDNAKE UZORKE. 80

SLIKA 23: RAZLIKA U RELATIVNOM OMJERU (POSTOTKU) *NK*-STANICA KOJE EKSPRIMIRAJU PERFORIN IZMEĐU SKUPINE ISPITANIKA S PTSP-OM BEZ DODATNE TRAUME (PTSP I) I ONIH S DODATNOM TRAUMOM ZBOG GUBITKA SREDSTAVA ZA ŽIVOT (PTSP II) TE ZDRAVIH KONTROLA. PRIKAZAN JE MEDIJAN (■) S INTERKVARTILNIM RANGOM (□) TE MINIMALNA (⊥) I MAKSIMALNA (⊓) VRIJEDNOST. SKUPINE SU USPOREĐIVANE MANN-WHITNEYJEVIM TESTOM A NAVEDENE SU P-VRIJEDNOSTI DOBIVENE NAKON HOLMOVE KOREKCIJE. 83

- SLIKA 24: RAZLIKA U CITOTOKSIČNOSTI NK-STANICA IZMEĐU SKUPINE ISPITANIKA S PTSP-OM BEZ DODATNE TRAUME (PTSP I), S DODATNOM TRAUMOM ZBOG GUBITKA SREDSTAVA ZA ŽIVOT (PTSP II) TE ZDRAVIH KONTROLA. *PRIKAZANA JE CITOTOKSIČKA AKTIVNOST U TRI OMJERA EFEKTORSKIH I CILJINI STANICA (1:25; 1:50; 1:100) KAO MEDIJAN (■) S PRVIM (⊥) I TREĆIM (⊓) KVARTILOM. SKUPINE SU USPOREĐIVANE MANN-WHITNEYJEVIM TESTOM A NAVEDENE SU P-VRIJEDNOSTI DOBIVENE NAKON HOLMOVE KOREKCIJE.*..... 85
- SLIKA 25: RAZLIKE U RELATIVNOJ KOLIČINI GLUKOKORTIKOIDNIH RECEPTORA IZRAŽENOJ SREDNJIM INTENZITETOM FLUORESCENCIJE (MFI) U POPULACIJI LIMFOCITA IZMEĐU SKUPINE ISPITANIKA S PTSP-OM BEZ DODATNE TRAUME (PTSP I), ONIH S DODATNOM TRAUMOM ZBOG GUBITKA SREDSTAVA ZA ŽIVOT (PTSP II) I ZDRAVIH KONTROLA. *PRIKAZANA JE ARITMETIČKA SREDINA (●) SA STANDARDNOM DEVIJACIJOM (□) TE MINIMALNA (⊥) I MAKSIMALNA (⊓) VRIJEDNOST. NAVEDENE P-VRIJEDNOSTI DOBIVENE SU TUKEYJEVIM "POST-HOC" TESTOM ZA NEJEDNAKE UZORKE.* 88
- SLIKA 26: KORELACIJA IZMEĐU RAZINE SERUMSKOG KORTIZOLA I APSOLUTNOG BROJA LIMFOCITA. *PRIKAZAN JE SPEARMANOV KOEFICIJENT KORELACIJE (Rs) TE ODGOVARAJUĆA RAZINA ZNAČAJNOSTI (P).* 92
- SLIKA 27: KORELACIJA IZMEĐU RAZINE SERUMSKOG KORTIZOLA I APSOLUTNOG BROJA MONOCITA. *PRIKAZAN JE SPEARMANOV KOEFICIJENT KORELACIJE (Rs) TE ODGOVARAJUĆA RAZINA ZNAČAJNOSTI (P).*..... 93

TABLICE

TABLICA 1 : ODGOVOR POJEDINIH DIJELOVA STRESNOG SUSTAVA NA RAZLIČITE STRESORE.....	4
TABLICA 2: PRIMJERI NEKIH VRSTA STRESORA.	7
TABLICA 3 : MOGUĆE REAKCIJE NA STRES.	10
TABLICA 4 : RECEPTORI ZA NEUROPEPTIDNE HORMONE NA STANICAMA IMUNOSUSTAVA.	13
TABLICA 5 : NEKI CITOKINI I NJIHOVI RECEPTORI IDENTIFICIRANI NA RAZLIČITIM TIPOVIMA.....	13
TABLICA 6 : DJELOVANJE CITOKINA NA RAZLIČITE NEUROENDOKRINE SUSTAVE.....	14
TABLICA 7 : STRESNI ADAPTACIJSKI MEHANIZMI.	17
TABLICA 8: CITOKINI I OSTALI MEDIJATORI UPALE KOJI IZRAVNO DJELUJU NA HPA-OSOVINU.....	17
TABLICA 9: NEUROTRANSMITORI, NEUROPEPTIDI, NEUROHORMONI ILI NEUROHORMONSKE EFEKTORSKE MOLEKULE S IMUNOMODULACIJSKIM DJELOVANJEM.	37
TABLICA 10 : BOLESTI POVEZANE S DEFEKTNOM HPA-OSOVINOM ILI NJEZINIM CILJNIM TKIVIMA.....	39
TABLICA 11 : VRSTE STRESA, VIRUSNA PATOGENEZA I ANTIVIRUSNA IMUNOST KOD LJUDI.	41
TABLICA 12: KOMBINACIJE POVRŠINSKIH I UNUTARSTANIČNIH BILJEGA KOJE SMO ODREĐIVALI MONOKLONSKIM ANTITIJELIMA KONJUGIRANIM FITC-OM (PRVONAVEDENA), PE-OM (DRUGONAVEDENA) I PERCP-OM ILI APC-OM* (TREĆENAVEDENA), TE SUBPOPULACIJE LIMFOCITA KOJE POJEDINE OD TIH KOMBINACIJA ODREĐUJU.	58
TABLICA 13: ANALIZA BAZE PODATAKA S OBZIROM NA VRIJEDNOSTI KOJE NEDOSTAJU. ZA SVAKU JE VARIJABLU PRIKAZAN BROJ POSTOJEĆIH REZULTATA (<i>N</i>) TE BROJ I POSTOTAK VRIJEDNOSTI KOJE NEDOSTAJU.....	73
TABLICA 14: APSLOTNI BROJ ($\times 10^9/L$) LIMFOCITA (L) I MONOCITA (M).PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (<i>N</i>), MEDIJAN (<i>MED</i>), PRVI I TREĆI KVARTIL (<i>Q1-Q3</i>), RAZINA ZNAČAJNOSTI TEMELJEM KRUSKAL-WALLISOVA TESTA (<i>K-W P</i>) I GRANIČNA VRIJEDNOST NA TEMELJU STUPNJA POGREŠNOG ZAKLJUČKA (<i>FDR D_i*</i>).	74
TABLICA 15: RELATIVNI OMJERI ZA SUBPOPULACIJE POMOĆNIČKIH, CITOTOKSIČNIH TE NAIVNIH LIMFOCITA. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (<i>N</i>), ARITMETIČKA SREDINA (\bar{x}) TE STANDARDNA DEVIJACIJA (<i>SD</i>).	76
TABLICA 16: RELATIVNI OMJERI ZA SUBPOPULACIJE PRIJELAZNIH I MEMORIJSKIH LIMFOCITA. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (<i>N</i>), MEDIJAN (<i>MED</i>) TE PRVI I TREĆI KVARTIL (<i>Q1-Q3</i>), RAZINA ZNAČAJNOSTI TEMELJEM KRUSKAL-WALLISOVA TESTA (<i>K-W P</i>) I GRANIČNA VRIJEDNOST NA TEMELJU STUPNJA POGREŠNOG ZAKLJUČKA (<i>FDR D_i*</i>).	76
TABLICA 17: RELATIVNI OMJERI SUBPOPULACIJA NK-STANICA. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (<i>N</i>), ARITMETIČKA SREDINA (\bar{x}) TE STANDARDNA DEVIJACIJA (<i>SD</i>).	77
TABLICA 18: RELATIVAN OMJER (POSTOTAK) MONOCITA KOJI EKSPRIMIRAJU CD64. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (<i>N</i>), MEDIJAN (<i>MED</i>) TE PRVI I TREĆI KVARTIL (<i>Q1-Q3</i>), RAZINA ZNAČAJNOSTI TEMELJEM KRUSKAL- WALLISOVA TESTA (<i>K-W P</i>) I GRANIČNA VRIJEDNOST NA TEMELJU STUPNJA POGREŠNOG ZAKLJUČKA (<i>FDR D_i*</i>).	78
TABLICA 19: RELATIVAN OMJER (POSTOTAK) LIMFOCITA KOJI EKSPRIMIRAJU CD32 I RELATIVNA KOLIČINA (MFI) CD32 NA LIMFOCITIMA, ODNOSNO CD64 NA MONOCITIMA. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (<i>N</i>), ARITMETIČKA SREDINA (\bar{x}), STANDARDNA DEVIJACIJA (<i>SD</i>) I KORIGIRANE (HOLMOVOM METODOM) P-VRIJEDNOSTI (<i>P'</i>) ZA UNIVARIJATNE TESTOVE. ZNAČAJNE P-VRIJEDNOSTI OTISNUTE SU MASNO.	78
TABLICA 20: RELATIVNA KOLIČINA (MFI) PERFORINA U CITOTOKSIČKIM LIMFOCITIMA. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (<i>N</i>), ARITMETIČKA SREDINA (\bar{x}), STANDARDNA DEVIJACIJA (<i>SD</i>), RAZINA ZNAČAJNOSTI TEMELJEM UNIVARIJATNE ANALIZE VARIJANCE (ANOVA <i>P</i>) I GRANIČNA VRIJEDNOST NA TEMELJU STUPNJA POGREŠNOG ZAKLJUČKA (<i>FDR D_i*</i>).	81
TABLICA 21: RELATIVNI OMJER (POSTOTAK) CITOTOKSIČKIH LIMFOCITA I SUBPOPULACIJA NK-STANICA KOJI EKSPRIMIRA PERFORIN I RELATIVNA KOLIČINA (MFI) PERFORINA U SUBPOPULACIJAMA NK-STANICA. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (<i>N</i>), MEDIJAN (<i>MED</i>), PRVI I TREĆI KVARTIL (<i>Q1-Q3</i>), RAZINA ZNAČAJNOSTI TEMELJEM KRUSKAL-WALLISOVA TESTA (<i>K-W P</i>) I GRANIČNA VRIJEDNOST NA TEMELJU STUPNJA POGREŠNOG ZAKLJUČKA (<i>FDR D_i*</i>). ZNAČAJNA P-VRIJEDNOST OTISNUTA JE MASNO.	82
TABLICA 22: RAZLIKA CITOTOKSIČKE AKTIVNOSTI NK-STANICA IZMEĐU ISPITANIKA S PTSP-OM KOJI NISU DOŽIVJELI DODATNU TRAUMU (PTSP I), I ONIH S ISKUSTVOM DODATNE TRAUME ZBOG GUBITKA SREDSTAVA ZA ŽIVOT (PTSP II) TE ZDRAVIH KONTROLA. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (<i>N</i>), MEDIJAN (<i>MED</i>), PRVI I TREĆI KVARTIL (<i>Q1-Q3</i>), RAZINA ZNAČAJNOSTI TEMELJEM KRUSKAL-WALLISOVA TESTA (<i>K-W P</i>) I GRANIČNA VRIJEDNOST NA TEMELJU STUPNJA POGREŠNOG ZAKLJUČKA (<i>FDR D_i*</i>). ZNAČAJNE P- VRIJEDNOSTI OTISNUTE SU MASNO.	84

TABLICA 23: EKSPRESIJA UNUTARSTANIČNIH CITOKINA U LIMFOCITIMA, ODNOSNO MONOCITIMA, NAKON KRATKOTRAJNE NESPECIFIČNE STIMULACIJE <i>IN VITRO</i> PRIKAZANA KAO POSTOTAK STANICA KOJE EKSPRIMIRAJU POJEDINI CITOKIN I RELATIVNA KOLIČINA CITOKINA (MFI) U POJEDINOJ STANICI. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (N), MEDIJAN (MED), PRVI I TREĆI KVARTIL ($Q1-Q3$), RAZINA ZNAČAJNOSTI TEMELJEM KRUSKAL-WALLISOVA TESTA ($K-W P$) I GRANIČNA VRIJEDNOST NA TEMELJU STUPNJA POGREŠNOG ZAKLJUČKA ($FDR D_i^*$).....	86
TABLICA 24: RELATIVNI OMJER (POSTOTAK) MONOCITA KOJI EKSPRIMIRAJU IL-1 β I RELATIVNA KOLIČINA CITOKINA (MFI) U LIMFOCITIMA, ODNOSNO MONOCITIMA, NAKON KRATKOTRAJNE NESPECIFIČNE STIMULACIJE <i>IN VITRO</i> . PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (N), ARITMETIČKA SREDINA (\bar{x}) I STANDARDNA DEVIJACIJA (SD). REZULTATI SU ANALIZIRANI HOTELLINGOVIM T^2 -TESTOM, OBLIKOM MULTIVARIJATNE ANALIZE VARIJANCE ZA DVA UZORKA ($T^2=12,97$; $F_{(4,16)}=2,73$; $P=0,066$).	87
TABLICA 25: RELATIVNA KOLIČINA (MFI) UNUTARSTANIČNOG GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA (GCR) U LIMFOCITIMA. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (N), ARITMETIČKA SREDINA (\bar{x}), STANDARDNA DEVIJACIJA (SD), RAZINA ZNAČAJNOSTI TEMELJEM UNIVARIJATNE ANALIZE VARIJANCE (ANOVA P) I GRANIČNA VRIJEDNOST NA TEMELJU STUPNJA POGREŠNOG ZAKLJUČKA ($FDR D_i^*$). ZNAČAJNA P-VRIJEDNOST OTISNUTA JE MASNO.	87
TABLICA 26: RAZINA KORTIZOLA (NG/ML) I TESTOSTERONA (NG/ML) U SERUMU. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (N), ARITMETIČKA SREDINA (\bar{x}) TE STANDARDNA DEVIJACIJA (SD).....	89
TABLICA 27: RAZINA DHEA (μ G/ML)U SERUMU. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (N), MEDIJAN (MED) TE PRVI I TREĆI KVARTIL ($Q1-Q3$).....	89
TABLICA 28: KORELACIJA IZMEĐU IMUNOLOŠKIH I HORMONSKIH VARIJABLI. PRIKAZAN JE BROJ ISPITANIKA (N), SPEARMANOV KOEFICIJENT KORELACIJE (R_s), RAZINA ZNAČAJNOSTI (P) I GRANIČNA VRIJEDNOST NA TEMELJU STUPNJA POGREŠNOG ZAKLJUČKA ($FDR D_i^*$). ZNAČAJNE P-VRIJEDNOSTI OTISNUTE SU MASNO. ...	90

ŽIVOTOPIS

Curriculum Vitae

- Ime i prezime: Katja Gotovac
 Datum rođenja: 26. travnja, 1968., Zagreb, Hrvatska
 Bračno stanje: udata, majka Jakovu (7) i Brini (2)
- Školovanje: dipl.ing. biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Biološki odjel, Molekularna biologija, 1994.
- diplomski rad:** "Stanična imunost miševa zaraženih oblicem *Trichinella spiralis*" Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za animalnu fiziologiju, **mentori:** mg. Miroslav Rožić i prof. dr. Ivo Bašić.
- poslijediplomski studij, područje: Biologija, smjer: Biomedicina, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 1994-2000.
- magistarska teza:** "Imunoreaktivnost ljudi s posttraumatskim stresnim poremećajem", Imunološki zavod d.d., Zagreb, Odjel za istraživanje i razvoj, Odsjek za celularnu imunologiju, 19. svibanj, 2000.
mentor: dr.sc. Ante Sabioncello
- Strani jezici: engleski, slovenski (pasivno)
- Radno mjesto: od 1994- sada, Imunološki zavod d.d., Zagreb, Odjel za istraživanje i razvoj, Odsjek za celularnu imunologiju, Rockefellerova 10, 10 000 Zagreb
- Istraživanja: od 1994- do sada, Imunološki zavod d.d., Zagreb,
znanstveni novak na znanstvenim projektima Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske:
 021003: "Stres i imunost" (glavni istraživač: akademik D. Dekaris) i
 021001: "Mehanizmi imunoreakcije i imunomodulacija" (glavni istraživač: prof., dr.sc. S. Rabatić)
izrada doktorske disertacije;
mentor: dr.sc. Ante Sabioncello
- Tečajevi i stipendije: stipendija Austrijskog društva za alergologiju i imunologiju za sudjelovanje na: Joint Annual meeting 1995, Austrian Society for Allergology and Immunology and Society for Immunology, 27 - 30 September, 1995, Vienna, Austria
- stipendija Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH za sudjelovanje na: Joint Third Central European FACS/CAS Users' Meeting and Fifth CEQUAL Sendarous Meeting, 12 -14 June, 1995, Balatonfured, Hungary

stipendija Internacionalne unije za borbu protiv raka za sudjelovanje na: 18th UICC Training Course in Cancer Research, Advanced Course on Tumor Biology, 20 - 26 June, 1996, Trieste, Italy and Rijeka, Croatia

stipendija European Science Foundation, EURESCO Conference mladim istraživačima za sudjelovanje na: European Research Conference on Cytokines, Hormones and Immunity, 25 - 30 September, 1999, Castelvecchio Pascoli, Italy

stipendija Scuola superiore d'immunologia Ruggero Ceppellini za sudjelovanje na: Postgraduate School of Immunology "Remembering Environmental Experiences: The Physiological Basis of Memory in the Immune and Nervous Systems", 28 June-2 July, 2001, Campo Miseno (Napulj), Italy

stipendija Internaconalnog društva za neuroimunologiju za sudjelovanje na: IVth International Congress of Neuroimmunology, 3 - 7 September, 2001, Edinburgh, UK

- Članstva: Hrvatsko imunološko društvo, od 2000.
Hrvatsko biološko društvo **1885**, od 2005.
- Radovi: jedan znanstveni rad kao prvi autor i pet kao koautor, jedan stručni članak i tri rada u zbornicima. Četiri znanstvena radova objavljena su u časopisima indeksiranim u CC-u.
- Sudjelovanja na skupovima: 9 domaćih skupova s 14 priopćenja te 10 međunarodnih skupova s 12 priopćenja. Među najznačajnije mogu ubrojiti:
- EURESCO Conferences. "Neuroendocrine-immune Interactions, Euroconference on Molecular Mechanisms and Clinical Relevance of Brain-Immune Communication", 5 -10 October, 2002, San Feliu de Guixols, Spain
- International Society of Neuroimmunology Sixth International Congress, 3 -7 September, 2001, Edinburgh, UK
- European Research Conference on Cytokines, Hormones and Immunity, 25 -30 September, 1999, Castelvecchio Pascoli, Italy
- Ostalo: 3 pozvana predavanja na domaćim skupovima te sudjelovanje kao predavač u:
- poslijediplomskoj nastavi 2000- kolegij "Neuroimunologija", Poslijediplomski studij, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu (voditelj: prof. dr. Milivoj Boranić)
- poslijediplomskoj nastavi 2002- kolegij „Profesionalne bolesti i toksikologija”, predavanje "Stečena imunost", Znanstveni poslijediplomski studij Medicina rada, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (voditeljica: docent dr. Vlatka Brumen)

POPIS RADOVA

ZNANSTVENI RADOVI:

1. Cebalo Lj, Markotić A, Mišić Majerus Lj, Bendelja K, Jelačić J, Baletić J, Zgorelec R, Gotovac K, Sabioncello A, Gagro A, Kuzman I, Avšič Županc T, Dekaris D, Rabatić S. **Immune response in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis.** *CMJ* (submitted)
2. Sabioncello A, Gotovac K, Vidović A, Gagro A, Markotić A, Rabatić S, Dekaris D: **The immune system under stress.** *Period biol* 106: 317-323, 2004.
3. Gagro A, Tominac M, Kršulović-Hrešić V, Baće A, Matic M, Draženović V, Mlinarić-Galinović G, Kosor E, Gotovac K, Bolanča I, Batinica S, Rabatić S: **Increased Toll-like receptor 4 expression in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis.** *Clin Exp Immunol* 135:267-272, 2004.
4. Gotovac K, Sabioncello A, Rabatić S, Berki T, Dekaris D: **Flow cytometric determination of glucocorticoid receptor (GCR) expression in lymphocyte subpopulations: lower quantity of GCR in patients with post-traumatic stress disorder (PTSD).** *Clin Exp Immunol* 131:335-339, 2003.
5. Kosor E, Gagro A, Draženović V, Kuzman I, Jeren T, Rakušić S, Rabatić S, Markotić A, Gotovac K, Sabioncello A, Čečuk E, Kerhin-Brkljačić V, Gjenero-Margan I, Kaić B, Mlinarić-Galinović G: **MHC-tetrameri na tragu specifičnoj imunosti.** *Acta Med Croatica* 57:255-259, 2003.
6. Gagro A, Rabatić S, Bendelja K, Jelačić J, Gotovac K, Sabioncello A, Dekaris D: **Detection of intracellular cytokines by flow cytometry.** *Central-European J Immunol* 24:125-131, 1999.

STRUČNI ČLANCI:

1. Gotovac-Borčić K, Sabioncello A, Dekaris D: **Utjecaj stresa na imunoreaktivnost.** *Medix* 7:43-45, 2001.

KONGRESNA PRIOPĆENJA:

1. Vidović A, Gotovac K, Vilibić M, Sabioncello A, Rabatić S, Folnegović-Šmalc V, Dekaris D: **Changes of immune and endocrine parameters in PTSD over time.** International Society of Neuroimmunology, 7th International Congress of Neuroimmunology, Venice, Italija, 28.09.-02.10. 2004.
2. Sabioncello A, Folnegović-Šmalc V, Kocijan-Hercigonja D, Komar Z, Dekaris D: **Traumatic stress and immune reactivity during the war and early post-war period.** *Program and Abstract book* p. 7-7; Stress and Immune Reactivity, Zagreb, 20.10. 2003.

3. Cebalo L, Markotić A, Mišić Majerus L, Jelačić J, Baletić J, Zgorelec R, Bendelja K, Gotovac K, Sabioncello A, Gagro A, Kuzman I, Avšič Županc T, Dekaris D, Rabatić S: **Imunoreakcije na hantaviruse i leptospire.** *Knjiga sažetaka* p. 32-32; Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom u Hrvatskoj, Zagreb, 28-29.03. 2003.
4. Gotovac K, Vidović A, Vilibić M, Vukušić H, Sabioncello A, Folnegović-Šmalc V, Dekaris D: **PTSD and immune reactivity ten years after the war-related trauma.** *Program and Abstract book* p. 8-8; Stress and Immune Reactivity, Zagreb, 20.10. 2003.
5. Matijević I, Globočnik T, Cebalo L, Cvetko L, Cebalo K, Jelačić J, Baletić J, Gotovac K, Kosor E, Sabioncello A, Vugrinec Kunštek K, Rabatić S, Kuzman I, Puljiz I, Rode O: **Evaluation of diagnostic rapid tests for the acute infections with hantaviruses during the outbreak of hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia in 2002.** *Final Program and Abstracts* p. 104-104; The third European-American school in forensic genetics and Mayo clinic course in advanced molecular and cellular medicine, Zagreb, 01.-05.09. 2003.
6. Matijević I, Globočnik T, Cebalo L, Cvetko L, Cebalo K, Jelačić J, Baletić J, Gotovac K, Kosor E, Sabioncello A, Vugrinec-Kunštek K, Rabatić S, Kuzman I, Puljiz I, Rode O: **Evaluation of diagnostic rapid tests for the acute infections with hantaviruses.** *Program and Abstracts* p. 45-45; Croatian Immunological Society Annual Meeting 2003, Brijuni, 17.-19. 10. 2003.
7. Vidović A, Gotovac K, Vilibić M, Sabioncello A, Rabatić S, Folnegović-Šmalc V, Dekaris D: **The effect of time on immune and endocrine parameters in PTSD: preliminary observations.** *Program and Abstracts* p. 62-62; Croatian Immunological Society Annual Meeting 2003, Brijuni, 17.-19. 10. 2003.
8. Cvetko L, Globočnik T, Cebalo K, Matijević I, Cebalo L, Kosor E, Gotovac K, Baletić J, Jelačić J, Zgorelec R, Gagro A, Sabioncello A, Rabatić S, Avšič Županc T, Markotić A: **Diagnostic of hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia during 2002 outbreak.** *Program and Abstracts* p. 53-53; Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2002, Trakošćan, 22.-24.11. 2002.
9. Gagro A, Kosor E, Draženović V, Kuzman I, Jeren T, Rabatić S, Markotić A, Gotovac K, Sabioncello A, Čečuk E, Kerhin-Brkljačić V, Gjenero-Margan I, Kaić B, Mlinarić-Galinović G: **Monitoring of human antiviral CD8+ T cells using Class I peptide tetramers in influenza.** *Abstract book* p. 53-53; 3rd Croatian congress on infectious diseases with international participation, Dubrovnik, 12.-15.10. 2002.
10. Gagro A, Kosor E, Draženović V, Kuzman I, Rabatić S, Markotić A, Gotovac K, Sabioncello A, Kerhin-Brkljačić V, Gjenero-Margan I, Kaić B, Jeren T, Mlinarić-Galinović G, Kaštelan A: **Possible monitoring of vaccine effectiveness with MHC tetramers: influenza model.** Third World Congress on Vaccines and Immunisation, Opatija, 04.-09. 06. 2002.
11. Gagro A, Tominac M, Kosor E, Draženović V, Mlinarić-Galinović G, Katja G, Kršulović-Hrešić V, Matić M, Baće A, Bolanča I, Batinica S, Rabatić S: **Linking innate to acquired immunity in respiratory syncytial virus infection in children: the**

role of Toll-like receptor 4 (TLR4). *Abstract book* 3rd Croatian congress on infectious diseases with international participation, Dubrovnik, 12.-15.10. 2002.

12. Gagro A, Tominac M, Kosor E, Draženović V, Mlinarić-Galinović G, Gotovac K, Kršulović-Hrešić V, Matić M, Baće A, Bolanča I, Batinica S, Rabatić S: **Uloga Toll-u sličnog receptora (TLR4) u infekciji respiratornim sincicijskim virusom: veza urođene sa specifičnom imunošću.** V. kongres hrvatskog pedijatrijskog društva, Šibenik, 02.-05.10. 2002.

13. Gotovac K, Vukušić H, Komar Z, Sabioncello A, Dekaris D: **Immunologic parameters in war veterans with combat related post-traumatic stress disorder (PTSD).** *Program and Abstracts* p. 9-9; Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2002, Trakošćan, 22.-24.11. 2002.

14. Gotovac K, Vukušić H, Komar Z, Sabioncello A, Dekaris D: **Immunologic parameters in war veterans with combat related post-traumatic stress disorder (PTSD).** EURESCO Conferences. "Neuroendocrine-immune Interactions, Euroconference on Molecular Mechanisms and Clinical Relevance of Brain-Immune Communication", San Feliu de Guixols, Španjolska, 05.-10.10. 2002.

15. Gotovac K, Vukušić H, Komar Z, Sabioncello A, Dekaris D: **Immunologic parameters in war veterans with combat related post-traumatic stress disorder (PTSD).** *Stress 5:* p. 116-116; 4th World Congress on Stress, Edinburgh, Škotska, Edinburgh, 12.-15.09. 2002.

16. Kosor E, Gagro A, Draženović V, Kuzman I, Jeren T, Rabatić S, Markotić A, Gotovac K, Sabioncello A, Čečuk E, Kerhin-Brkljačić V, Gjenero-Margan I, Kaić B, Mlinarić-Galinović G, Kaštelan: **Monitoring of human antiviral immunity using MHC class I tetramers in influenza.** *Program and Abstracts* p. 39-39; Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2002, Trakošćan, 22.-24.11. 2002.

17. Markotić A, Hensley L, Anderson K, Jelačić J, Gotovac K, Lukas D, Puljiz I, Gagro A, Kuzman I, Schmaljohn C: **The role of monocytes/macrophages in immunopathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome.** *Abstract book* 3rd Croatian congress on infectious diseases with international participation, Dubrovnik, 12.-15.10. 2002.

18. Markotić A, Mišić Majerus L, Ljiljana C, Bendelja K, Gotovac K, Jelačić J, Baletić J, Zgorelec R, Sabioncello A, Gagro A, Kuzman I, Avšič Županc T, Rabatić S, Dekaris D: **Immune response in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome, leptospirosis or dual infections: a comparative study.** 51st Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Denver, Colorado, 10.-14.11. 2002.

19. Gotovac Borčić K, Sabioncello A, Rabatić S, Dekaris D: **Interactions of immune and hormonal systems in combat- related posttraumatic stress disorder.** Scuola superiore d'immunologia Ruggero Ceppellini: "Remembering Environmental Experiences: The Physiological Basis of Memory in the Immune and Nervous Systems", Campo Miseno (Napulj), 28.06-2.07 2001.

20. Gotovac Borčić K, Sabioncello A, Rabatić S, Berki T, Dekaris D: **Intracellular flow cytometric determination of glucocorticoid receptor in lymphocyte subpopulations of posttraumatic stress disorder patients.** International Society of Neuroimmunology Sixth International Congress, Edinburgh, 03.-07.09. 2001.
21. Gotovac K, Sabioncello A, Rabatić S, Dekaris D: **PTSP i imunoreaktivnost: Hormonske promjene i imunostatus u vojnika s posttraumatskim stresnim poremećajem.** In: Prgomet D (Ed) *Zbornik radova* pp. 353-354; MORH, Sektor za odnose s javnošću i informiranje, Uprava za nakladništvo, Prvi hrvatski kongres vojne medicine, Zagreb, 26.-28.10. 2000.
22. Sabioncello A, Gotovac K, Rabatić S, Dekaris D: **PTSP i imunoreaktivnost: Alostatski mehanizmi u stresu.** In: Prgomet D (Ed) *Zbornik radova* pp. 351-352; MORH, Sektor za odnose s javnošću i informiranje, Uprava za nakladništvo, Prvi hrvatski kongres vojne medicine, Zagreb, 26.-28.10. 2000.
23. Sabioncello A, Gotovac K, Rabatić S, Dekaris D: **War stress and immunological reactivity.** Psychoneurobiological Frameworks of Post-Traumatic Stress Disorders, Zagreb, 11.09. 2001.
25. Sabioncello A, Gotovac K, Rabatić S, Dekaris D: **Imunostatus i hormonske promjene u vojnika Domovinskog rata s posttraumatskim stresnim poremećajem.** Godišnji sastanak hrvatskog imunološkog društva, Zagreb, 15.12. 2000.
27. Dekaris D, Sabioncello A, Gotovac K, Rabatić S: **Immune reactivity and PTSD.** New Insights in Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD), Zagreb, 26.03. 1999.
28. Gotovac Borčić K, Sabioncello A, Rabatić S, Komar Z, Dekaris D: **Endocrine and immune interactions in war related trauma.** European Research Conference on Cytokines, Hormones and Immunity, Castelvecchio Pascoli, Italija, 25.-30.09. 1999.
29. Gotovac Borčić K, Sabioncello A, Rabatić S, Komar Z, Dekaris D: **Endocrine and immune interactions in war related trauma.** Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Zagreb, 25.11. 1999.
30. Sabioncello A, Gotovac Borčić K, Rabatić S, Berki T, Dekaris D: **PTSD as a model of neuroendocrine-immune interactions.** Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Zagreb, 25.11. 1999.
31. Sabioncello A, Gotovac Borčić K, Rabatić S, Berki T, Dekaris D: **PTSD as a model of neuroendocrine-immune interactions.** European Research Conference on Cytokines, Hormones and Immunity, Castelvecchio Pascoli, Italija, 25.-30.09. 1999.
32. Matijević L, Sabioncello A, Folnegović-Šmalc V, Kocijan-Hercigonja D, Mažuran R, Rabatić S, Gotovac K, Jeren V, Dekaris D: **Stress induced immunological changes in newly resettled Bosnian refugees.** *Period biol* 97 (Supp 1):48-48, 1995.

ZBORNICI RADOVA:

1. Gotovac K, Sabioncello A, Rabatić S, Dekaris D: **PTSP i imunoreaktivnost: Hormonske promjene i imunostatus u vojnika s posttraumatskim stresnim poremećajem.** *In: Prgomet D (Ed) Zbornik radova prvog hrvatskog kongresa vojne medicine.* MORH, Sektor za odnose s javnošću i informiranje, Uprava za nakladništvo, Zagreb, 2001. pp 353-354.
2. Sabioncello A, Gotovac K, Rabatić S, Dekaris D: **PTSP i imunoreaktivnost: Alostatski mehanizmi u stresu.** *In: Prgomet D (Ed) Zbornik radova prvog hrvatskog kongresa vojne medicine.* MORH, Sektor za odnose s javnošću i informiranje, Uprava za nakladništvo, Zagreb, 2001. pp 351-352.
3. Dekaris D, Sabioncello A, Gotovac K, Rabatić S: **Immune reactivity and PTSD.** New insights in post-traumatic stress disorder (PTSD), Proceedings (Abstracts, Referances and Illustrations) of Simposium held Friday March 26 1999 in Croarian Academy of Sciences and Atrs Zagreb, Croatia

POZVANA PREDAVANJA:

1. Gotovac K, Vidović A, Vilibić M, Vukušić H, Sabioncello A, Folnegović-Šmalc V, Dekaris D: **PTSD and immune reactivity ten years after the war-related trauma.** *Program and Abstract book* p. 8-8; Stress and Immune Reactivity, HAZU, Zagreb, 20.10. 2003.
2. Gotovac Borčić K, Sabioncello A, Dekaris D: **Promjene imunoloških funkcija uzrokovanih stresom.** 64. znanstveno-stručni sastanak hrvatskog društva infektologa, Varaždin, 23.-26.05. 2001.
3. Gotovac K, Sabioncello A, Rabatić S, Dekaris D: **PTSP i imunoreaktivnost: Hormonske promjene i imunostatus u vojnika s posttraumatskim stresnim poremećajem.** *In: Prgomet D (Ed) Zbornik radova* pp. 353-354; MORH, Sektor za odnose s javnošću i informiranje, Uprava za nakladništvo, Prvi hrvatski kongres vojne medicine, Zagreb, 26.-28.10. 2000.