

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Anđelko Vidović

**Međudjelovanje endokrinog sustava i
imunostava u osoba s
posttraumatskim stresnim poremećajem:
longitudinalno istraživanje**

DISERTACIJA



Zagreb, 2009.

Disertacija je izrađena u Imunološkom zavodu d.d., Zagreb

Voditelji rada: prof.dr.sc. Alemka Markotić, dr.sc. Ante Sabioncello

Rad je izrađen uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske
(projekt „Stres i imunoreaktivnost“, 0021003, voditelj: akademik Dragan Dekaris)

SADRŽAJ

POPIS KRATICA.....	4
1 UVOD	6
1.1 STRES.....	6
1.2 STRESORI	8
1.3 PERCEPCIJA, UTJECAJ GENA I OKOLIŠA	9
1.4 OSNOVE BIOLOGIJE STRESNE REAKCIJE.....	10
1.5 MEĐUDJELOVANJE IMUNOSUSTAVA I NEUROENDOKRINOLOGIJSKOG SUSTAVA	12
1.5.1 <i>Kratki povijesni pregled</i>	12
1.5.2 <i>Neke karakteristike imunostanica</i>	13
1.5.2.1 Stečena i urođena imunost, recirkulacija limfocita	13
1.5.2.2 Urođenoučiteljske stanice.....	15
1.5.2.3 Citokini	16
1.5.3 <i>Neke karakteristike endokrinog sustava</i>	17
1.5.3.1 Glukokortikoidi	17
1.5.3.2 Prolaktin	20
1.6 STRESNA REAKCIJA – ODRŽANJE INTEGRITETA	21
1.7 KONCEPT ALOSTAZE I PTSP	21
1.8 PROMJENE IMUNOSUSTAVA I NEUROENDOKRINOLOGIJSKOG SUSTAVA U PTSP-U	23
2 HIPOTEZA I CILJ	26
3 MATERIJAL I METODE	27
3.1 ISPITANICI	27
3.1.1 <i>Prvo ispitivanje</i>	28
3.1.2 <i>Drugo ispitivanje</i>	28
3.2 LABORATORIJSKE METODE	29
3.2.1 <i>Postupak prikupljanja uzoraka krvi</i>	29
3.2.2 <i>Određivanje koncentracije hormona u serumu</i>	29
3.2.3 <i>Određivanje koncentracije citokina u serumu</i>	30
3.2.4 <i>Citotoksičnost NK-stanica</i>	30
3.2.5 <i>Broj limfocita, imunofenotipizacija i određivanje ekspresije GR</i>	31
3.3 STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA	35
4 REZULTATI	39
4.1 KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	39
4.2 PODACI KOJI NEDOSTAJU	42
4.3 USPOREDBA GRUPE I PROMJENE TIJEKOM VREMENA.....	47
4.3.1 <i>Hormoni</i>	53
4.3.2 <i>Citokini</i>	53
4.3.3 <i>Citotoksičnost NK-stanica</i>	54
4.3.4 <i>Ekspresija glukokortikoidnog receptora</i>	55
4.3.5 <i>Ukupni broj limfocita i imunofenotip</i>	56
4.3.6 <i>Veličina učinka</i>	60
4.4 MEĐUODNOSI BIOLOŠKIH VARIJABLI	63
4.5 ODNOS PSIHIČKIH SIMPTOMA I BIOLOŠKIH VARIJABLI	65
5 RASPRAVA.....	68
5.1 KORTIZOL I EKSPRESIJA GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA	68

5.2	PROLAKTIN	71
5.3	CITOKINI	72
5.4	CITOTOKSIČNOST NK-STANICA	73
5.5	UKUPNI BROJ LIMFOCITA I IMUNOFENOTIP	74
6	ZAKLJUČCI	79
7	SAŽETAK.....	80
8	ABSTRACT.....	81
9	POPIS LITERATURE	82
10	BIOGRAFIJA	101

POPIS KRATICA

5-HTT	5-hidroksitriptamin (serotonin) transporter
ACTH	od engl. <i>adrenocorticotropic hormone</i> , adrenokortikotropni hormon
ANOVA	od engl. <i>analysis of variance</i> , analiza varijance
AP-1	od engl. <i>activator protein 1</i>
CAPS	od engl. <i>Clinician Administered PTSD Scale</i> , Klinička skala za procjenu posttraumatskog stresnog poremećaja
CD	od engl. <i>cluster of differentiation</i>
CD3+	T-limfociti
CD4+	pomoćnički T-limfociti
CD8+	citotoksični T-limfociti
CD20+	B-limfociti
CD20+CD23+	aktivirani B-limfociti
CD16,56+	urođenoubilačke stanice
CD45RO+	ukupni memorijski limfociti
CD4+CD45RO+	pomoćnički memorijski T-limfociti
CGI-S	od engl. <i>Clinical Global Impression Severity</i> , Skala za globalni klinički utisak
cpm	od engl. <i>counts per minute</i> , otkucaja u minuti
CRH	od engl. <i>corticotropin-releasing hormone</i> , faktor oslobađanja kortikotropina
CRHR1	od engl. <i>corticotropin-releasing hormone receptor 1</i> , receptor za faktor oslobađanja kortikotropina
CRP	C-reaktivni protein
CV	od engl. <i>coefficient of variation</i> , koeficijent varijacije
DSM-IV	od engl. <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV</i> , Dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje, 4. izdanje
DTS	od engl. <i>Davidson Trauma Scale</i>
ELISA	od engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , enzimski imunotest na čvrstoj fazi
FBS	od engl. <i>fetal bovine serum</i> , serum goveđeg fetusa
FCS	od engl. <i>fetal calf serum</i> , serum telećeg fetusa
FDR	od engl. <i>false discovery rate</i>
FITC	od engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FKBP5	od engl. <i>FK506 (Fermentek catalogue number 506, tacrolimus) binding protein 5</i> , protein koji veže takrolimus
FSH	folikulostimulirajući hormon
GAS	od engl. <i>general adaptation syndrome</i> , opći adaptacijski sindrom
GM-CSF	od engl. <i>granulocyte monocyte colony-stimulating factor</i> , faktor stimulacije kolonija granulocita i monocita
GnRH	od engl. <i>gonadotropin-releasing hormone</i> , hormon koji potiče lučenje gonadotropina
GR	glukokortikoidni receptor
HHN	hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda
IFN	interferon
IL	interleukin
JAK	Janus kinaza
JNK	<i>c-jun</i> N-terminalna kinaza
KIR	od engl. <i>killer cell inhibitory receptor</i>

LH	luteotropni hormon
LPS	lipopolisaharid
m.f.i.	od engl. <i>mean fluorescence intensity</i> , srednji intenzitet fluorescencije
MCAR	od engl. <i>missing completely at random</i> , posve slučajan uzrok nedostatnosti podataka
MHC	od engl. <i>major histocompatibility complex</i> , glavni kompleks tkivne podudarnosti
MKB	Međunarodna klasifikacija bolesti
NFκB	od engl. <i>nuclear factor κB</i> , transkripcijski faktor κB
NK	od engl. <i>natural killer</i> , urođenoubilački
PAMPs	od engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i> , molekularni obrasci vezani za patogene
PBS	od engl. <i>phosphate buffered saline</i> , fosfatni pufer
PE	od engl. <i>phycoerythrin</i>
PerCP	od engl. <i>peridinin chlorophyll protein</i>
PHA	od engl. <i>phytohemagglutinin</i> , fitohemaglutinin
PTSP	posttraumatski stresni poremećaj
PVN	od engl. <i>paraventricular nucleus</i> , paraventrikularna jezgra
RPMI	od engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> , naziv za hranjivu podlogu za stanice
STAT	od engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i> , prijenosnik signala i aktivator transkripcije
SŽS	središnji živčani sustav
TGF	od engl. <i>transforming growth factor</i> , transformirajući faktor rasta
TLR	od engl. <i>toll-like receptors</i> , tollu slični receptori
TNF	od engl. <i>tumor necrosis factor</i> , faktor nekroze tumora
TOP-8	engl. <i>8-item Treatment-outcome Posttraumatic Stress Disorder Scale</i> , Klinička skala za procjenu učinka liječenja PTSP-a s 8 čestica

1 UVOD

Ratna zbivanja narušavaju temelj ljudske egzistencije s dalekosežnim posljedicama po fizičko i mentalno zdravlje populacije. Ratni stres posljedica je složenog djelovanja različitih fizikalnih, psiholoških, kemijskih i bioloških stresora s direktnim učinkom na zdravlje, a duboke negativne socioekonomske posljedice rata predstavljaju dodatno opterećenje za društvo. U Hrvatskoj je tijekom rata značajno porasla incidencija nekih bolesti koje se vežu uz stres, kao što su dijabetes, tumori, kardiovaskularne bolesti i čir želuca.¹ Izrazito je porastao i broj suicida, osobito mlađih ljudi,² a psihološke posljedice rata očituju se i u velikom broju ratnih veterana s posttraumatskim stresnim poremećajem (PTSP). PTSP karakterizira ponovno proživljavanje ekstremnog traumatskog iskustva (u koje svakako spada ratno iskustvo, odnosno iskustvo borbe) u formi intruzivnih prisjećanja, noćnih mora i vrlo živih slika, zvukova i mirisa koji su odraz traumatskog iskustva (engl. *flashbacks*). Ponašanje je usmjereno izbjegavanju podsjetnika na traumu uz pojavu emocionalne obamrlosti, pojačanog opreza i budnosti, odnosno pojačane podražljivosti (nesanica, razdražljivost, gubitak koncentracije).³ Studije s veteranima iz Drugog svjetskog rata pokazuju da PTSP može trajati desetljećima i štoviše, simptomi se mogu pogoršavati bez obzira na liječenje.⁴ Pretpostavlja se da se oko 40% osoba s dijagnozom kroničnog PTSP-a ne uspije nikada oporaviti.⁵ Ako PTSP razmatramo u svjetlu stresne reakcije, a znamo da je kronični stres važan faktor u razvoju mnogih bolesti,⁶ postavlja se pitanje imaju li osobe s PTSP-em povećan rizik za razvoj somatskih bolesti i koji patofiziološki mehanizmi u tome sudjeluju. Iako epidemiološka slika u Hrvatskoj još uvijek nije jasna, istraživanja u drugim zemljama ukazuju na povećanu učestalost somatskih, osobito autoimunskih i kardiovaskularnih bolesti u osoba koje boluju od PTSP-a.⁷⁻⁹ Mehanizme odgovorne za ovu povezanost treba tražiti u mogućim poremećajima osnovnih komponenti fiziološke stresne reakcije.

1.1 STRES

Iako često korišten izraz u svakodnevnom žargonu, još uvijek nema jedinstvene definicije stresa. Psihičko emocionalno opterećenje najčešće intuitivno doživljavamo kao stres, međutim to je samo jedan od mogućih elemenata unutar kompleksnog kontinuuma podražaja, obrade podražaja i fizioloških reakcija organizma koje u cijelosti možemo nazvati stres. Isto tako, stres se intuitivno doživljava u negativnom kontekstu jer narušava osjećaj duševnog i fizičkog blagostanja koje moderno društvo postavlja kao imperativ zdravlja, međutim treba imati na umu da su fenomeni uključeni u koncept stresa rezultat evolucijske „igre“ kojom je modeliran odnos jedinke prema okolišu i tako predstavlja adaptivni mehanizam očuvanja integriteta organizma kao cjeline u složenoj interakciji s vanjskim i unutarnjim promjenama koje ugrožavaju jedinku.

Upotreba riječi stres datira iz 16. stoljeća i može se uočiti u Hook-ovom (1635-1703) zakonu elastičnosti iz područja mehanike koji kaže da je deformacija tijela (engl. *strain*) proporcionalna primijenjenoj sili (engl. *stress*) pod uvjetom da se ne prijeđe granica elastičnosti tijela. Riječ se kasnije počela koristiti u engleskom govornom području za označavanje „nervoze“ (psihološke napetosti) što se može uočiti i u djelima Waltera B. Cannona (1871-1945), američkog fiziologa, utemeljitelja koncepta homeostaze, jednog od temeljnih bioloških principa koji je okosnica većine današnjih razmišljanja o fenomenu stresa. Princip homeostaze temelji se na opažanjima Clauda Bernarda (1813-1878) o potrebi očuvanja konstantnosti i stabilnosti unutrašnje sredine organizma (franc. *milieu intérieur*). Cannon je dalje razradio princip i uveo pojam homeostaze. Prema Cannonu organizam je otvoreni sustav, a očuvanje ravnoteže unutar takvog sustava zahtijeva aktivaciju dobro usklađenih i koordiniranih mehanizama koji će djelovati suprotno od prvobitne promjene.¹⁰ Cannon je također uočio da životinje na prijetnju reagiraju aktivacijom simpatoadrenalnog sustava (otpuštanje adrenalina, konstrikcija krvnih žila, dilatacija bronhiola, oslobađanje glukoze iz jetre) što ih priprema za borbu ili bijeg (engl. *fight or flight response*)¹¹ i tako prvi puta opisao neurofiziološki odgovor u sprezi s promjenama u ponašanju koji imaju adaptivnu funkciju. Iako se danas mnogo više zna o fiziološkim mehanizmima uključenim u ovaj odgovor, koncept akutne stresne reakcije kao složenog adaptivnog odgovora „borbom ili bijegom“ je u osnovi isti.

Za međunarodno prihvaćanje riječi stres najzaslužniji je Hans Selye (1907-1982), kanadski endokrinolog koji je eksperimentiranjem na životinjama uočio da organizam na različite nespecifične podražaje reagira karakterističnim trijasom promjena (1. povećanje korteksa nadbubrežne žlijezde, 2. atrofija timusa, slezene i limfnih čvorova, 3. krvarenje unutar gastrointestinalnog sustava).¹² Na temelju ovih opažanja Selye je formirao koncept općeg adaptacijskog sindroma (engl. *General Adaptation Syndrome*, GAS) pri čemu organizam nakon štetnog podražaja (primjena različitih toksičnih tvari, hladnoća, fizički napor, kirurške ozljede itd.) prolazi kroz tri adaptivne faze: a) kratka inicijalna alarmna reakcija, b) stadij otpora i c) stadij iscrpljenja. Uz brojne kritike tadašnje akademske zajednice, Selye je uspio stres konceptualizirati kao zajednički naziv za nespecifične adaptivne reakcije u organizmu uzrokovane agensom kojeg je on nazvao stresor. Pri tome su karakteristične morfološke promjene unutar GAS-a i/ili adaptivne faze kroz koje organizam prolazi zapravo stresne reakcije.¹³ Iako Selye govori o stresu kao nespecifičnom odgovoru na bilo koji zahtjev koji se postavlja na organizam, potencijalne interindividualne razlike u odgovoru na stresni podražaj naslućuju se u njegovom razlikovanju pojmova distress koji označava negativni, neugodni, štetni oblik stresa, i eustres koji označava pozitivni oblik tj. uspješnu adaptaciju na promjenu. Selye je uočio da centralnu ulogu u fiziološkom odgovoru na stresor ima pojačana sekrecija glukokortikoidnih hormona, a većina njegovih zapažanja temelji se na djelovanju fizikalnih agensa i na pokusima na

životinjama. Međutim, iako fiziološki hormonski odgovor na različite štetne fizikalne agense može biti uzrokovan njihovim zajedničkim djelovanjem na pobuđenost središnjeg živčanog sustava (SŽS), vrlo je važna i individualna procjena štetnosti nekog podražaja.¹⁴ Tako dolazimo do Lazarusovog koncepta kognitivne procjene (engl. appraisal) kao ključnog faktora koji posreduje u odnosu između stresora i stresne reakcije.¹⁵ U primarnoj procjeni podražaj se procjenjuje kao nevažan, pozitivan ili stresan. Stresan podražaj je onaj koji je već nanio neku štetu, zatim prijetnja (podražaj potencijalno može biti štetan ili dovesti do nekog gubitka) i izazov (potencijalni dobitak uz moguće teškoće). U sekundarnoj procjeni procjenjuju se mogućnosti nošenja (engl. coping) sa stresnim podražajem pri čemu se aktiviraju kognitivni mehanizmi i modulira se ponašanje s osnovnim ciljevima regulacije uznemirujućih emocija i/ili poduzimanja akcija koje će riješiti problem.¹⁶ Stres nastaje ukoliko u dinamičnom odnosu s okolinom jedinka doživi nerazmjer između vlastitih resursa za nošenje sa stresnim podražajem i zahtjeva koje nameće okolina odnosno podražaj.

Objedinjujući različite teorije Levine¹⁷ definira stres kao stanje uzrokovano potencijalnom prijetnjom od vitalnog interesa za organizam uz aktivaciju fizioloških mehanizama i promjenu ponašanja sa svrhom eliminacije uzroka stresa i očuvanja homeostaze. Pri tome vrlo važnu ulogu ima nedostatak informacije o potencijalnom pozitivnom ishodu ili mogućnosti izbjegavanja negativnog ishoda (nepredvidivost i nesigurnost). Možemo zaključiti da je stresna reakcija, u evolucijskom smislu, bitan i neophodan homeostatski odgovor organizma na unutarnje i/ili vanjske promjene koje ugrožavaju preživljenje jedinke.¹⁸

1.2 STRESORI

Pozivajući se na gore spomenute različite fiziološke, psihološke i bihevioralne aspekte stresa možemo reći da stres predstavlja konstelaciju različitih događaja i uključuje podražaj (stresor) koji dovodi do reakcija u mozgu („percepcija“ stresa) što uzrokuje aktivaciju fizioloških sustava u organizmu (stresna reakcija).¹⁹

Ono što većina ljudi podrazumijeva pod pojmom stres zapravo je podražaj koji se doživljava stresnim. Obzirom na individualne razlike u doživljaju stresora, vrlo je teško kategorizirati stresore. Podjela stresora obzirom na prirodu podražaja (fizikalni i psihosocijalni), trajanje (akutni i kronični) i tijek (diskretni i kontinuirani) predstavlja dobar koncept u koji se mogu uklopiti većina istraživanja na ovom polju.

Fizikalni stresori uključuju ozljedu, infekciju, bol, kardiovaskularne stresore (krvarenje, ortostatska hipotenzija, fizički napor).²⁰ Psihosocijalni stresori mogu biti kratki akutni laboratorijski stresori (javni nastup, rješavanje matematičkih problema), kratki naturalistički stresori (ograničeni stresori iz stvarnog života kao npr. polaganje ispita, stres na poslu, svakodnevni stresori iz okoline),

stresni životni događaji (ključni događaj kao npr. gubitak supružnika dovodi do produljene stresne reakcije koja s vremenom najčešće jenjava), kronični stresori koji u potpunosti prožimaju život pojedinca bez naznake da bi se stresna reakcija mogla stišati (primjeri uključuju invaliditet, brigu za bolesnog supružnika, izbjeglištvo), stresori iz prošlosti (intenzivna trauma s dugoročnim posljedicama kao npr. zlostavljanje u djetinjstvu, borbeno iskustvo, zarobljeništvo).²¹ Ovome još možemo dodati sociodemografske faktore kao što je socioekonomski status koji bi po trajanju pripadao kroničnim stresorima, kao i psihološke osobine pojedinca (depresivnost, anksioznost, agresivnost). Razlikovanje akutnih i kroničnih stresora je posebno važno budući da je adaptivna reakcija na stresore koji traju kratko vrijeme ograničena, dok produljena ili opetovana reakcija na kronični stresor iscrpljuje rezerve organizma i može djelovati štetno.²²

1.3 PERCEPCIJA, UTJECAJ GENA I OKOLIŠA

Ključnu ulogu u reakciji na stresor i odvijanju stresne reakcije ima mozak. Mozak je uključen u procjenu prijetećeg podražaja i ovisno o individualnim mehanizmima nošenja sa stresnim situacijama modulira ponašanje i usmjerava fiziološku reakciju na stresor.²³ Pri tome valja naglasiti da percepcija prijetećeg podražaja i svijest o podražaju nisu uvijek potrebni za inicijaciju stresne reakcije, pogotovo ako je stresor fizikalne prirode (npr. ozljeda uz gubitak krvi).²⁴ U svakom slučaju, stresor dovodi do aktivacije dijelova mozga što rezultira aktivacijom simpatičkog sustava i osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HHN).

Postoje velike individualne razlike u odgovoru na stresore. Reaktivnost mozga određena je genetskim faktorima, faktorima koji djeluju na fetus *in utero*, ranim životnim iskustvima kao i kasnijim prethodnim iskustvima koji određuju pripremljenost i osjećaj kontrole.

Osim dosada spomenutih okolišnih čimbenika, genetski faktori u velikoj mjeri određuju kako će pojedinac reagirati na stresor.²⁵ Tako su pojedinci s određenim alelom gena za transporter serotonina (5-hidroksitriptamin transporter, 5-HTT) skloniji razvoju depresije nakon stresnih životnih iskustava.²⁶ Polimorfizam gena za receptor faktora oslobađanja kortikotropina (CRHR1, od engl. *corticotropi-releasing hormone receptor 1*) moderira utjecaj zlostavljanja u djetinjstvu na razvoj depresije,²⁷ a dokazan je i utjecaj polimorfizma FKBP5 (engl. *FK506 (Fermentek catalogue number 506, tacrolimus) binding protein 5*) gena (gen za protein koji djelomično određuje senzitivnost glukokortikoidnog receptora) u modulaciji utjecaja zlostavljanja u djetinjstvu na razvoj PTSP-a.²⁸

Postoje brojni dokazi da je stres u majki za vrijeme trudnoće vezan uz kasnije tjelesne²⁹ i psihičke smetnje³⁰ kao i promjene u središnjem živčanom i endokrinom sustavu³¹ njihove djece. Pokusi na životinjama upućuju i na strukturalne promjene unutar SŽS-a.³²

Stresna iskustva u djetinjstvu također imaju velik utjecaj na kasniju reaktivnost na stresore i, posljedično tome, zdravlje pojedinca. Emocionalno, fizičko i seksualno zlostavljanje u djetinjstvu i poremećaji u funkcioniranju u obitelji povećavaju rizik za razvoj brojnih psihičkih i tjelesnih bolesti u odrasloj dobi.³³ Pokazano je da djeca depresivnih majki imaju povećanu razinu salivarnog kortizola,³⁴ a na zdravlje može utjecati i kvaliteta odnosa među učenicima³⁵ kao i zlostavljanje od strane kolega.³⁶ Negativna rana životna iskustva povećavaju rizik za razvoj depresije³⁷⁻³⁸ i posttraumatskog stresnog poremećaja.³⁹

U konačnici, prijašnja iskustva i/ili pripremljenost mogu pozitivno ili negativno utjecati na percepciju i/ili tijek stresne reakcij⁴⁰ u novim situacijama.

1.4 OSNOVE BIOLOGIJE STRESNE REAKCIJE

Stresna reakcija kompleksan je odgovor organizma na stresor koji dovodi do aktivacije velikog broja neuronskih krugova u limbičkom sustavu. To dovodi do promjena u ponašanju, promjena funkcije vegetativnog živčanog sustava i sekrecije različitih hormona uključenih u stresnu reakciju. Posljedično dolazi do adaptivne regulacije različitih fizioloških funkcija:²⁰ a) pojačanja mobilizacije energije prema mišićima i mozgu što uključuje redistribuciju krvotoka i iskorištenje glukoze u mišićima i mozgu te pospješeno respiracije; b) inhibicije reproduktivnih funkcija; c) smanjenja apetita i hranjenja; d) modulacije imunostava; e) usmjeravanja pažnje prema izvoru prijetnje.

U tijeku stresne reakcije simpatički sustav aktivira se unutar nekoliko sekundi što rezultira otpuštanjem kateholamina (adrenalina i u manjoj mjeri noradrenalina) iz srži nadbubrežne žlijezde. U aktivaciju simpatičkog sustava uključena je jezgra *locus coeruleus* (sadrži noradrenergičke neurone) u moždanom deblu koja dobiva projekcije iz limbičkog sustava kao i CRH (faktor oslobađanja kortikotropina, od engl. *corticotropin-releasing hormone*) projekcije iz hipotalamusa.⁴¹ Istovremeno se iz parvocelularne regije paraventricularne jezgre (engl. *paraventricular nucleus*, PVN) hipotalamusa u portalnu cirkulaciju hipofize oslobađa CRH, a iz stražnjeg režnja hipofize u sistemsku cirkulaciju se luče oksitocin i vazopresin koji potiču iz magnocelularne i parvocelularne regije PVN-a. Signali za lučenje ovih faktora dolaze prema hipotalamusu polisinaptičkim vezama iz limbičkog sustava ili iz periferije visceralnim aferentnim putevima koji se integriraju u *nucleus tractus solitarius* i šalju projekcije prema PVN-u. Djelovanjem CRH na svoj receptor (CRHR1) na stanicama hipofize potiče se ekspresija gena i sinteza pro-opiomelanokortina (POMC) koji je prekursor adrenokortikotropnog hormona (ACTH, od engl. *adrenocorticotropic hormone*). Treba naglasiti da CRH potiče i noradrenergičnu transmisiju inervacijom *locus coeruleus*. Kroz 5-10 sekundi oslobađa se ACTH iz prednjeg režnja hipofize, a smanjuje se lučenje GnRH (engl. *gonadotropin-releasing hormone*) nakon čega se smanjuje i lučenje gonadotropina (luteotropni hormon (LH) i FSH (folikulostimulirajući

hormon)). Ubrzo se poveća i sekrecija prolaktina i hormona rasta. U sljedećih nekoliko minuta i dalje pada sekrecija gonadotropina, a povećava se sekrecija glukokortikoidnih hormona koji svoj vrhunac u plazmi dosežu unutar 30 minuta i 1 sat od djelovanja stresora. Glukokortikoidi (kortizol) se sintetiziraju u zoni fascikulati nadbubrežne žlijezde, a sintezu potiče ACTH. Učinci povećanog lučenja glukokortikoida vidljivi su ne prije od 1 sat nakon stresora, a smanjenog lučenja gonadotropina tek nakon nekoliko sati.⁴² Većina gore navedenih adaptivnih reakcija organizma (uključujući i aktivaciju imunostava) zbiva se prema tome već unutar nekoliko sekundi od stresnog podražaja pri čemu veliku ulogu ima aktivacija simpatičkog sustava, dok su učinci glukokortikoida vidljivi kasnije zbog toga što glukokortikoidi u velikom dijelu spektra svojih učinaka djeluju na ekspresiju gena, za što je potrebno određeno vrijeme.⁴³

Glukokortikoidi povećavaju koncentraciju glukoze u krvi tako da djeluju na metabolizam glikogena, proteina i lipida i povećavaju perifernu rezistenciju na inzulin. Promjene u metabolizmu lipida očituju se redistribucijom masnog tkiva što može rezultirati pojavom visceralne pretilosti. Također induciraju kataboličke promjene u mišićima (smanjena sinteza proteina), koži (smanjena proliferacija epidermalnih stanica i sinteza vezivnog tkiva) i kostima (inhibicija osteoblasta i promjene u metabolizmu kalcija). Djelovanjem na bubrege i krvne žile povećavaju krvni tlak, a mogu pridonijeti i nastanku glaukoma. Gastrointestinalni efekti mogu se očitovati ulceracijama u želucu.⁴⁴ U konačnici, glukokortikoidi djeluju antiinflamatorno i imunosupresivno.⁴⁵

Treba naglasiti da su učinci glukokortikoida u velikom dijelu adaptivni, a negativni učinci dolaze do izražaja u slučaju poremećene regulacije lučenja glukokortikoida kao što je to u stanjima kroničnog stresa, ili su potaknuti jatrogeno. Glukokortikoidi u sklopu stresne reakcije imaju permisivnu ulogu (bazalna razina koja omogućuje odvijanje stresne reakcije), supresivnu ulogu (sprečavanje negativnih učinaka stresne reakcije), stimulacijsku ulogu (potenciraju učinke inicijalne stresne reakcije) i preparativnu ulogu (moduliraju tijek stresne reakcije u sljedećem kontaktu sa stresorom). Na primjeru aktivacije kardiovaskularnog sustava tijekom akutne stresne reakcije (povećanje arterijskog tlaka i udarnog volumena srca, ubrzanje pulsa, preusmjerenje krvotoka u mišiće i mozak uz konstrikciju renalnih i mezenterijalnih arterija) koji su uglavnom posredovani aktivacijom simpatičkog sustava najbolje možemo ilustrirati permisivne učinke. Ako uklonimo glukokortikoide adrenalektomijom ili poništimo učinke tretmanom s antagonistom glukokortikoidnih receptora, gore opisana reakcija je slabija, a u Addisonovoj bolesti može dovesti do hipotenzivne krize. Također se zna da glukokortikoidi povećavaju senzitivnost adrenergičkih receptora na kateherine⁴⁶ (permisivna i stimulacijska uloga). S druge strane, tijekom krvarenja, glukokortikoidi indirektno inhibiraju djelovanje vazopresina, povećavaju glomerularnu filtraciju i povećavaju lučenje atrijskog natriuretskog polipeptida što odražava njihovu supresivnu ulogu čime se ograničavaju

potencijalni štetni učinci mehanizama uključenih u retenciju tekućine. I u konačnici, iako glukokortikoidi povećavaju razinu glukoze djelujući na metabolizam lipida i proteina, s druge strane potiču odlaganje glikogena u jetri što je zapravo priprema za brzu mobilizaciju glukoze u sljedećoj stresnoj reakciji (preparativna uloga).⁴²

Osim navedenih, i ostali neuroendokrini sustavi su uključeni u stresnu reakciju. Posebno treba spomenuti hormone proteinske strukture kao što su hormon rasta, faktor rasta sličan inzulinu, faktor rasta neurona i osobito prolaktin koji, za razliku od glukokortikoida, ima stimulacijski učinak na imunoreakcije.⁴⁷ Osim kateholamina, važna je uloga i ostalih monoamina kao što je serotonin,⁴⁸ a ne smijemo zaboraviti i brojne neuropeptide (vazopresin, vazoaktivni intestinalni polipeptid, kolekistokinin, neuropeptid Y, tvar P) koji indirektno (najčešće preko HHN-osovine) ili direktno preko svojih centralnih i perifernih učinaka moduliraju tijek stresne reakcij.⁴³

1.5 MEĐUDJELOVANJE IMUNOSUSTAVA I NEUROENDOKRINOLOG SUSTAVA

1.5.1 KRATKI POVIJESNI PREGLED

Prepoznavanje utjecaja glukokortikoida na imunostav datira još iz 19. stoljeća kada Thomas Addison primjećuje da pacijent s insuficijencijom nadbubrežne žlijezde ima povećan broj cirkulirajućih limfocita⁴⁹ što je u skladu s kasnim opažanjem da odstranjenje nadbubrežne žlijezde uzrokuje hipertrofiju timusa.⁵⁰ Već smo govorili o istraživanjima Hansa Selyea koji opisuje hipertrofiju nadbubrežne žlijezde i involuciju timusa kao reakciji na nespecifični stresor.¹² Philip S. Hench i Edward Calvin Kendall, koji su uz Tadeus Reichsteina dobitnici Nobelove nagrade medicinu 1950. godine za definiciju strukture i funkcije glukokortikoida, jasno su 1940. godine pokazali protuupalne efekte kortizona na primjeru reumatoidnog artritisa.⁵¹ Sredinom 70-tih je prepoznato da protuupalni i imunosupresivni efekti glukokortikoida ne dolaze do izražaja samo u farmakološkim koncentracijama, već da endogeni glukokortikoidi sprečavaju prekomjernu aktivaciju imunostava te da ograničavaju i usmjeravaju imunoreakciju tamo gdje je ona potrebna.⁵² U daljnjim istraživanjima Besedovsky i sur. pokazali su da i komponente imunostava mogu potaknuti lučenje glukokortikoida i tako mehanizmom povratne sprege spriječiti vlastitu prekomjernu aktivaciju.⁵³ Tako se počela stvarati slika o dvosmjernoj komunikaciji između neuroendokrinog i imunostava koja je dalje upotpunjena radom Edwina Blalocka i suradnika koji su pokazali da citokini i hormoni u određenim uvjetima imaju slične učinke⁵⁴ te da stanice imunostava (npr. limfociti) mogu lučiti hormone (npr. ACTH i endorfine).⁵⁵ Do kraja 80-tih, na temeljima koji su postavili Besedovsky i Blalock, postalo je jasno da citokini mogu utjecati na komponente HHN-osovine i to ne samo na nivou nadbubrežne žlijezde i hipofize,⁵⁶ već i djelovanjem na hipotalamus⁵⁷ što je značilo da citokini mogu direktno utjecati na aktivnost SŽS-a. Danas se zna da proupalni citokini, u međusobnoj interakciji s komponentama SŽS-a i

endokrinog sustava, imaju centralnu ulogu u sistemskoj reakciji na upalu koje uključuju sintezu proteina akutne faze,⁵⁸ temperaturu,⁵⁹ gubitak apetita, umor i malaksalost, što na primjeru vrlo uobičajene kliničke slike općih simptoma upalnih bolesti najbolje odražava kompleksnu komunikaciju SŽS-a, endokrinog sustava i imunostava. Anatomska i funkcionalna veza između neuroendokrinog i imunostava ostvaruje se signalizacijom neurotransmiterima, hormonima, citokinima i kemokinima. Ovi medijatori dopijevaju do stanica imunostava oslobađajući se u perifernu cirkulaciju ili direktnom simpatičkom⁶⁰⁻⁶¹ i/ili parasimpatičkom⁶² inervacijom primarnih (koštana srž i timus) i sekundarnih (slezena, limfni čvorovi, sluznicama pridruženo limfoidno tkivo) limfoidnih organa. S druge strane, citokini koji se otpuštaju u toku imunoreakcija, stimuliraju aferentna živčana vlakna i/ili perifernom cirkulacijom dolaze do mozga prolazeći krvno-moždanu barijeru, dovode do aktivacije moždanih struktura i mogu izazvati promjene u ponašanju, a moduliraju i HHN-osovinu ili aktiviraju eferentna kolinergična vlakna što u konačnici dovodi do modulacije same imunoreakcije.⁶³ Osim toga, stanice imunostava mogu sintetizirati hormone (npr. CRH, ACTH, FSH, prolaktin, oksitocin) i neuropeptide (npr. endorfini, somatostatin, tvar P, vazoaktivni intestinalni polipeptid).⁶¹ Uz to se brojni citokini (npr. IL (interleukin)-1 α , TNF (engl. *tumor necrosis factor*)- α , IL-1 β) i njihovi receptori (npr. IL-1R1),⁶⁴ a pogotovo kemokini i njihovi receptori⁶⁵ nalaze unutar SŽS-a, prvenstveno stanicama mikroglije, astrocita i oligodendrocita, a zatim i samim neuronima.

Za bolje razumijevanje slijedi pregled osnovnih karakteristika imunostava i neuroendokrinog sustava važnih za ovo istraživanje.

1.5.2 NEKE KARAKTERISTIKE IMUNOSTAVA

1.5.2.1 STEČENA I UROĐENA IMUNOST, RECIRKULACIJA LIMFOCITA

Neprestana recirkulacija stanica imunostava između limfnih organa i periferne krvi temeljno je svojstvo imunostava. Stanice limfoidne (T-limfociti, B-limfociti, NK-stanice) i mijeloidne loze (neutrofili, eozinofili, bazofili, monociti) nastaju od zajedničke pluripotentne matične stanice u koštanoj srži nakon čega T-limfociti sazrijevaju u timusu dok B-limfociti sazrijevaju već u koštanoj srži.⁶⁶ Treba imati na umu da je proces nastajanja i nestajanja populacija stanica u dinamičkoj ravnoteži pri čemu se neke stanice vrlo brzo izmjenjuju (1-2 dana za neutrofile i nekoliko dana za ostale granulocite), a druge sporije (mjeseci za naivne limfocite i godine za memorijske stanice) što ovisi o vrlo velikom broju kompleksnih faktora vezanih za njihovu funkciju. Naivni limfociti, ogromnog potencijala za reakciju s velikom količinom antigena koji nas okružuju, recirkuliraju u ravnoteži između krvi i limfnih organa gdje se nakon susreta s patogenom (antigenom) za koji su specifični, klonski umnažaju, postaju efektorske stanice i ciljano mijenjaju svoj recirkulacijski put prema izvoru antigena (mjestu upale). Zadivljujuće svojstvo limfocita jest njihova mogućnost da pronađu antigen

za koji su specifični bez obzira na mjesto ulaska. Od 1×10^{12} limfocita, koji neprestano cirkuliraju kroz oko 100 000 km krvnih žila u odraslom organizmu, njih nekoliko desetaka specifičnih za neki antigen pronađu ga bez obzira na mjesto ulaska (500 m² epitelnih površina kože i sluznice probavnog i respiracijskog sustava).⁶⁷ To je moguće jer se reakcije prepoznavanja odvijaju u lokalnim limfnim čvorovima i organiziranom limfnom tkivu pridruženom sluznicama tako da limfociti ne moraju pretraživati ogromna „tkivna prostranstva“. Antigen s periferije donose antigen-prezentirajuće stanice (dendritičke stanice), a koordinirana „potraga“ za specifičnim limfocitom vrši se u ograničenom području lokalnog limfnog čvora. Prepoznavanje antigena u kontekstu MHC II (od engl. *major histocompatibility complex*, glavni kompleks tkivne podudarnosti) molekule dendritičke stanice (signal 1) i prisustvo nužnog kostimulacijskog signala (signal 2, vezanje CD28-CD80/86) dovodi do proliferacije specifičnih limfocita i ekspresije kemokinskih receptora i adhezijskih molekula (selektini i integrini). Kontinuirano lučenje kemokina i citokina iz područja inicijalnog susreta s antigenom usmjerava limfocite, a promjene se događaju i na endotelnim stanicama u tom području što omogućuje izlazak limfocita u tkivo gdje obavljaju svoju efektorsku funkciju.⁶⁸ Većina efektorskih limfocita umire nakon toga, dok manji dio limfocita postaju dugoživuće memorijske stanice (centralne i efektorske) koje mnogo brže reagiraju u sljedećem susretu s antigenom zbog tkivno-specifičnog recirkulacijskog obrasca uslijed ekspresije karakterističnih receptora (engl. *homing receptors*).⁶⁹ Memorija i antigenska specifičnost osnovne su karakteristike stečene imunosti. Odgođen odgovor (nekoliko dana) također je karakterističan za ovaj tip reakcija, iako memorijske stanice mogu vrlo brzo reagirati nakon ponovnog susreta s antigenom.

Brza reakcija (do nekoliko sati) osnovna je karakteristika urođene imunosti koju također karakterizira manja specifičnost i odsustvo memorije. Efektorske stanice urođene imunosti su granulociti, makrofagi, dendritičke stanice i NK-stanice. Ove stanice dio su neprekinutog kontinuuma imunoreakcija koje osim brze eliminacije patogena usmjeravaju komponente stečene imunosti, što pospješuje efikasnost eliminacije patogena i sprečava pretjeranu reakciju na vlastito. Podjela na stečenu i urođenu imunost je prema tome arbitrarna, pogotovo s obzirom na funkciju njihovih staničnih komponenti. Bitna je razlika između receptora uključenih u prepoznavanje antigena, pri čemu su receptori urođene imunosti filogenetski stariji, javljaju se u beskralješnjaka, i tijekom evolucije su odabrani na taj način da reagiraju na specifične, evolucijski konzervirane, molekulske obrasce vezane za patogene (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) što omogućuje reakciju na čitave skupine patogena kojima su ovi obrasci zajednički.⁷⁰ Primjer takvih receptora su tollu slični receptori (engl. *toll-like receptors*, TLR) koji dominiraju na stanicama urođene imunosti, ali se nalaze i na limfocitima.⁷¹ Za razliku od toga, receptori stečene imunosti javljaju se tek u kralješnjaka, odabiru se rekombinacijom varijabilnih dijelova gena, ekspanzijom reaktivnih klonova te

delecijom ili anergijom autoreaktivnih klonova u toku života pojedinca.⁷⁰ To omogućuje reakcije na patogene (mikroorganizme) koji imaju vrlo velik evolucijski adaptivni potencijal. Efikasna imunoreakcija podrazumijeva visoku usklađenost staničnih komponenti, nosioca oba tipa receptora.⁷²

Utjecaj stresa na komponente urođene⁷³ i stečene imunosti¹⁹ vrlo je složen. Promjene imunosustava se najbolje mogu razumjeti ako se o njima razmišlja u adaptivnom smislu. Prvotne pretpostavke da u toku stresne reakcije dolazi do imunosupresije kako bi se energija mogla efikasnije iskoristiti za mnogo važnije, vitalne funkcije, gube na važnosti. Imunoregulacijski procesi koji dovode do supresije komponenti imunosustava zahtijevaju energiju (npr. aktivost regulacijskih T-limfocita, apoptoza), a brojna istraživanja potvrđuju da akutni stres zapravo potiče funkciju imunosustava. Aktivacija fizioloških procesa u kojima sudjeluje imunosustav (npr. cijeljenje, sprečavanje širenja infekcije) nakon djelovanja stresora (npr. ozljeda ili potencijalna ozljeda uslijed napada predatora) u evolucijskom smislu predstavlja veliku prednost. Stoga Dhabhar i sur.¹⁹ na temelju brojnih eksperimentalnih dokaza predlažu model bifazičnog odgovora imunosustava u toku stresne reakcije. U prvoj fazi, neposredno nakon djelovanja stresora (minute) dolazi do mobilizacije leukocita iz prirodnih odjeljaka (limfni čvorovi, slezena, marginalni cirkulacijski odjeljak). U toj fazi u cirkulaciji možemo zamijetiti reaktivnu leukocitozu (poglavito na račun granulocita i NK-stanica, ali je zamijećen i porast T- i B-limfocita). Efekt je vjerojatno potaknut kateholaminima koji djeluju na α_2 -receptore. U sljedećoj fazi koja je karakterizirana aktivacijom HHN-osovine i pojačanim lučenjem kortizola (nakon više od pola sata), leukociti napuštaju cirkulaciju i odlaze na mjesta gdje mogu izvršiti svoju efektorsku funkciju (limfni čvorovi, koža, sluznice gastrointestinalnog i genitourinarnog sustava). U ovoj fazi u cirkulaciji se detektira snižen broj leukocita. Ovaj efekt posredovan je djelovanjem kateholamina na β -receptore i kortizola na glukokortikoidne receptore (GR). U ciljnim tkivima stanice su u stanju „pripravnosti“, a to se može dokazati npr. pojačanom odgođenom kožnom reakcijom preosjetljivosti na antigen nakon akutnog stresnog podražaja.⁷⁴

U kroničnom stresu uslijed dugotrajnog djelovanja glukokortikoida i kateholamina dolazi do preusmjerenja imunoreakcija iz Th1 u Th2 tip,⁷⁵ a eksperimentalno se može zamijetiti supresija nekih funkcija imunosustava.⁷⁶

1.5.2.2 UROĐENOUBILAČKE STANICE

U sklopu neprekinutog kontinuuma između urođene i stečene imunosti, posebno je važno istaknuti ulogu urođenoubilačkih (NK-, engl. *natural killer*) stanica koje su dio limfoidne loze, veličinom i brojnim granulama u citoplazmi podsjećaju na aktivirane citotoksične limfocite, ali nemaju specifični receptor za prepoznavanje antigena u sklopu MHC molekule.⁷⁷ Ove stanice karakterizira

sposobnost brze eliminacije inficiranih i tumorskih stanica. Reakciju na vlastito sprečava aktivna inhibicija koja se ostvaruje vezanjem KIR- (od engl. *killer cell inhibitory receptor*) receptora za MHC I molekulu na stanicama domaćina. Virusi i tumorske stanice smanjuju ekspresiju MHC I molekula i na taj način izbjegavaju specifičnu imunoreakciju. Smanjena ekspresija MHC I molekula (time i smanjena inhibicija NK-stanica) i pojačana ekspresija molekula koje se vežu za aktivirajuće receptore NK-stanica (npr. NKG2D) dovodi do aktivacije NK-stanica koje iz svojih granula otpuštaju perforin i granzim B, luče TNF- α i na svojoj površini ekspimiraju Fas-ligand (FasL). Perforinski kompleks stvara pore unutar imunosinapse koje vjerojatno predstavljaju mjesto ulaska za granzime i ostale molekule važne za efektorsku funkciju. Vezanje TNF- α i FasL za receptore na membrani pokreće programiranu staničnu smrt (apoptozu) ciljnih stanica, a granzim B aktivira kaspaze, ključne enzime u procesu apoptoze.⁷⁸ Aktivirane NK-stanice luče i brojne citokine (pogotovo interferon- γ) čime se pospješuje celularna specifična imunost (Th1 odgovor).

Funkcija NK-stanica vrlo je često određivana u raznim modelima stresa. Prema posljednjoj metaanalizi čini se da akutni, najčešće laboratorijski stresori (npr. matematički zadatak) povišuju citotoksičnost NK-stanica. Međutim, čak i kratki stresori iz stvarnog života (npr. ispit), a pogotovo kronični stres (npr. briga za kronično bolesnog supružnika) dovode do smanjenja citotoksičnosti NK-stanica.⁷⁹

1.5.2.3 CITOKINI

Citokini predstavljaju grupe različitih molekula polipeptidne, proteinske ili glikoproteinske strukture koje luče stanice imunosustava (ali i brojne druge stanice) u svrhu regulacije imunoreakcija.⁸⁰ Citokini su vrlo važni i u komunikaciji s drugim fiziološkim sustavima pa osim što sudjeluju u razvoju i proliferaciji stanica imunosustava i usmjeravanju upalnog odgovora, također su važni posrednici u višesmjernoj komunikaciji imunosustava, SŽS-a i endokrinog sustava. Učinci citokina ostvaruju se na istim stanicama koje ih luče (autokrino), na susjednim stanicama (parakrino) ili na udaljenim ciljnim stanicama (endokrino) vezanjem za specifične receptore. Na temelju ovih svojstava slični su neurotransmiterima i hormonima s kojima sudjeluju u složenoj mreži međusobnih interakcija različitih fizioloških sustava.⁸¹ Pet osnovnih grupa citokina (interleukini, interferoni, faktori stimulacije kolonija, faktori nekroze tumora, kemokini) imaju različite učinke na organizam pri čemu su učinci pojedinih citokina vrlo raznoliki (pleotropizam), a više različitih citokina može imati i slične funkcije (redundancija).⁸² Različiti čimbenici kao što su infekcija, ozljeda ili stresna reakcija potiču seriju događaja koji uključuju i lučenje citokina u sklopu imunoreakcije, a u cilju eliminacije patogena, cijeljenja rana, odnosno ponovne uspostave homeostaze. Zajednički naziv za seriju ovih događaja jest upala. Pojedine citokine možemo okarakterizirati kao imunoregulacijske jer sudjeluju u usmjeravanju

imunoreakcija u Th1 (stanični odgovor, IL-1, IL-2, IL-12, TNF- α , IFN (interferon)- γ) ili Th2 smjeru (humoralni odgovor, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13). Za neke citokine kao što su TNF- α , IL-6 i IL-1 β uvriježio se i naziv proupalni citokini. Ovi citokini potiču upalu tako što pozitivno utječu na diferencijaciju i funkciju citotoksičnih T stanica, permeabilnost kapilara te adheziju i migraciju upalnih stanica u tkiva. Osim toga, potiču sintezu i otpuštanje proteina akutne faze u jetri (npr. C-reaktivni protein (CRP)), a učinci na SŽS manifestiraju se pojavom temperature i smanjenjem apetita.⁸³ Suprotno tome, citokini koji suprimiraju ove reakcije (neki Th2 citokini, npr. IL-10, IL-4) se često nazivaju protuupalnim, što je zapravo neopravdano jer ovi u konačnici, potičući stvaranje protutijela u sklopu Th2 reakcije, također mogu djelovati proupalno.

Učinci citokina izlučenih na periferiji na strukture unutar SŽS-a ostvaruju se reguliranim mehanizmima na nivou krvno-moždane barijere kroz koju prolaze transportom posredovanim nosačima, a djelovanjem na strukture krvno-moždane barijere (endotelne stanice, periciti, nastavci astrocita, mikroglia) mogu potaknuti lučenje istih ili drugih citokina u mozgu, odnosno potaknuti aktivnost enzima kao što su inducibilna NO sintetaza (iNOS) ili ciklooksigenaza-2 (COX-2) što rezultira otpuštanjem NO i prostaglandina E2 s pridruženim učincima u mozgu.⁸⁴⁻⁸⁶ Na ovaj se način ostvaruje pirogeni učinak IL-1 β koji inducira otpuštanje prostaglandina E2, a ovi vezanji em za prostanoide receptore u termoregulacijskim centrima hipotalamusa i moždanog debla dovode do povećanja tjelesne temperature.⁸⁷ I drugi proupalni citokini, kao što su IL-6 i TNF- α , imaju pirogeni učinak, a djelovanjem na mozak stimuliraju i HHN-osovinu što dovodi do povećanja sistemske razine kortizola. IL-1 i TNF- α stimuliraju lučenje IL-6 koji zajedno s kortizolom potiče sintezu proteina akutne faze u jetri (npr. CRP), a IL-6 i kortizol zauzvrat inhibiraju proizvodnju IL-1 i TNF- α ⁸⁸ čime se ostvaruje regulacijska petlja međusobne interakcije proupalnih citokina i HHN-osovine.

Dakle, za vrijeme upale, aktivacija stresnog sustava (lučenje glukokortikoida i kateholamina) suprimira lučenje Th1 citokina (npr. proupalni citokini, IL-2) i potiče se lučenje Th2 citokina (npr. TGF (engl. *transforming growth factor*)- β , IL-10) čime se organizam štiti od prekomjernih učinaka generaliziranog upalnog odgovora. Međutim, u određenim uvjetima, hormoni stresne reakcije, kao što su CRH, tvar P, histamin mogu potaknuti upalu indukcijom lučenja IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α i CRP-a.⁷⁵ Zbog toga su i stanja koja su karakterizirana dugotrajnom aktivacijom stresnog sustava i smetnjama negativne protuupalne povratne sprege zbog promjena u senzitivnosti HHN-osovine (npr. depresija i PTSP) karakterizirane prisutstvom tzv. kronične upale niskog stupnja na što upućuje sve više dokaza o povišenim bazalnim vrijednostima brojnih citokina u ovim stanjima.⁸⁹⁻⁹⁰

1.5.3 NEKE KARAKTERISTIKE ENDOKRINOLOGIJSKOG SUSTAVA

1.5.3.1 GLUKOKORTIKOIDI

Već smo naglasili da je aktivacija HHN-osovine koja rezultira pojačanim otpuštanjem glukokortikoida (kortikosterona u miševa i kortizola u ljudi) iz kore nadbubrežne žlijezde vrlo važan moment u fiziologiji stresne reakcije. Osim već spomenutih metaboličkih učinaka, glukokortikoidi imaju vrlo izraženo protuupalno odnosno imunosupresivno djelovanje, svojstvo koje se već desecima godina koristi u terapijske svrhe.

Glukokortikoidi ostvaruju svoje učinke vezanjem za glukokortikoidni receptor (GR). GR se svrstava u obitelj receptora za steroidne hormone i nalazi se u citoplazmi svih stanica organizma. Gen za GR sastoji se od 9 eksona i lociran je na kromosomu 5 (5q31-32). Alternativnim izrezivanjem nastaju mRNA koje se prevode u dvije osnovne izoforme GR - α i β . Ove izoforme razlikuju se u karboksiterminalnom dijelu bjelančevine tako da GR α ima 50 aminokiselina koje su dio domene za koju se veže ligand, dok se za 15 aminokiselina u istoj regiji GR β ligand ne veže. Različita mjesta na kojima započinje translacija uvjetuju postojanje dodatnih izoformi koje se razlikuju u N-terminalnom djelu bjelančevine (duža A i kraća B izoforma) tako da postoje: GR α -A, GR α -B, GR β -A, GR β -B. Uzvodno od samog gena nalaze se promotori koji sadrže GRE (engl. *glucocorticoid response element*), dio sekvence za koju se veže kompleks liganda i receptora sprečavajući transkripciju GR-a. Tako glukokortikoidi inhibiraju sintezu vlastitih receptora (homologna regulacija) smanjujući njegovu ekspresiju. To se događa u većini stanica, osim u T limfocitima gdje dolazi do povećanja ekspresije GR nakon djelovanja glukokortikoida što se dovodi u vezu s proapoptotskim učincima glukokortikoida.⁹¹ Citokini također utječu na ekspresiju glukokortikoidnog receptora preko NF κ B (od engl. *nuclear factor κ B*, transkripcijski faktor κ B) veznog mjesta na DNA koji se nalazi uzvodno od promotora. Rezultati studija koje su istraživale utjecaj citokina na ekspresiju GR-a su oprečni i ovise o metodi kojom je mjerena ekspresija GR-a nakon tretmana stanica različitim citokinima (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α).⁹² Spomenimo da je na humanim mononuklearima iz periferne krvi i kulturi stanica sličnih osteoblastima pokazana povećana ekspresija mRNA za GR i samog receptora nakon tretmana s IL-2 i IL-6.⁹³ Isto tako, ekspresija GR-mRNA se povećava nakon tretmana s IL-1 i TNF- α i to osobito GR β izoforme receptora.⁹⁴ Obzirom da GR β ne veže ligand i također može ograničiti djelovanje funkcionalnog GR α , citokini na ovaj način mogu uzrokovati rezistenciju na glukokortikoide.⁹⁵

U odsustvu liganda, GR je vezan s pratećim proteiniom (šaperon) HSP90 (HSP, engl. *heat-shock protein*) i imunofilinom p59 stvarajući kompleks koji nije biološki aktivan. Vezanjem liganda dolazi do konformacijskih promjena, disocijacije od pratećih proteina i dimerizacije. Također se oslobađa mjesto za koje se vežu proteini odgovorni za aktivni prijenos novostvorenog homodimera u jezgu.

Genomski učinci glukokortikoida ostvaruju se na više načina.⁴⁵ (1) Vezanjem GR-a za GRE u području promotora ciljnih gena dolazi do aktivacije transkripcije gena za proteine koji imaju protuupalni učinak. Primjer uključuje indukciju sinteze aneksina I, citoplazmatskog proteina koji

inhibira fosfolipazu A2 α važnu za oslobađanje arahidonske kiseline i produkciju eikosanoida (prostaglandina, leukotriena, tromboksana, prostaciklina). (2) Vezanjem za negativni GRE dolazi do inhibicije transkripcije ciljnih gena, npr. ciklooksigenaze 2 koja katalizira nastajanje eikosanoida. (3) Vezanjem za druge transkripcijske faktore koji se aktiviraju djelovanjem brojnih citokina (AP-1 (od engl. *activator protein 1*), NF κ B, STAT (od engl. *signal transducer and activator of transcription*)), uključujući i IL-6 i TNF- α , dolazi do inhibicije njihovih proupalnih učinka (inhibicija sinteze drugih citokina, njihovih receptora, kemokina, adhezijskih molekula, kolagenaza, matriks metaloproteinaza). Interferencija sa signalizacijskim putovima citokina također može narušiti funkciju GR pa tako citokini direktno mogu uzrokovati rezistenciju na glukokortikoide.⁹² (4) Glukokortikoidi također induciraju apoptozu u stanicama imunostava interferirajući s citokinskim putevima signalizacije koji su važni za preživljenje stanica (osobito **MB**) i aktivacijom sinteze proapoptotskih članova *Bcl-2* obitelji proteina.⁹⁶ (5) Učinci glukokortikoida mogu se ostvariti i negenomskim mehanizmima. Ovim se mehanizmima ostvaruju brzi učinci i često uključuju interferenciju s članovima signalizacijske kaskade citokina u citoplazmi, npr. vezanje za JNK (*c-jun* N-terminalna kinaza) sprečava fosforilaciju *c-jun* koji čini AP-1 transkripcijski faktor i tako inhibira signalizaciju npr. IL-1.⁹⁷

Koristeći se gore navedenim molekularnim mehanizmima glukokortikoidi mijenjaju sve aspekte imunoreakcija. Na nivou celularnih elemenata urođene imunosti, glukokortikoidi uzrokuju neutrofiliju⁹⁸ te smanjenje broja cirkulirajućih eozinofila, bazofila i monocita. Ove promjene nastaju zbog kompleksnog utjecaja na ekspresiju leukocitnih i endotelnih adhezijskih molekula (npr. L-selektin) i sekreciju citokina (npr. faktor stimulacije kolonija granulocita i monocita, engl. *granulocyte colony-stimulating factor*, GM-CSF) i kemokina (npr. IL-8) koji reguliraju otpuštanje stanica iz koštane srži, infiltraciju ciljnih tkiva i organa i apoptozu. Stimulacija i supresija lučenja brojnih proupalnih i protuupalnih medijatora u konačnici dovodi do jenjavanja upalnog odgovora na način da glukokortikoidi potiču odstranjivanje stranih antigena, toksina, mikroorganizama i staničnog detritusa.

Na nivou sponse urođene i stečene imunosti, glukokortikoidi inhibiraju ekspresiju molekula MHC-II na površini dendritičkih stanica i sprečavaju njihovo sazrijevanje, ometajući tako prezentaciju antigena i pokretanje reakcija stečene imunosti.⁹⁹ Također inhibiraju aktivnost NK-stanica mehanizmima koji uključuju smanjenje ekspresije aktivirajućih molekula na njihovoj površini.¹⁰⁰

Stečene imunoreakcije modelirane su na način da se suprimiraju Th1 reakcije, a istovremeno potiču Th2 reakcije.¹⁰¹ Nakon administracije glukokortikoida dolazi do smanjenja broja cirkulirajućih limfocita i to osobito na račun T limfocita pri čemu je efekt najizraženiji na CD4 limfocitima.¹⁰² Smanjenje broja cirkulirajućih limfocita u prvom redu nastaje zbog poticanja migracije u tkiva, a zatim i apoptoze.⁹⁹

1.5.3.2 PROLAKTIN

Tijekom stresne reakcije, uz aktivaciju HHN-osovine, potiče se lučenje i drugih hormona s potencijalnim utjecajem na imunost. Osobito su zanimljivi hormoni proteinske strukture koji se luče iz prednjeg režnja hipofize među kojima je i prolaktin. Na relativno čvrstim temeljima ranijih istraživanja još je u ranim devedesetima uspostavljen koncept prema kojem ovi hormoni (uz prolaktin tu su i hormon rasta i inzulinu sličan faktor rasta-I) predstavljaju svojevrsnu protutežu učincima glukokortikoida na imunost u toku stresne reakcije.¹⁰³ Pojačano lučenje prolaktina u akutnom stresu dokazano je na humanom modelu.¹⁰⁴⁻¹⁰⁵

Prolaktin je proteinski hormon veličine 23 kDa kojeg proizvode i luče laktotropne stanice prednjeg režnja hipofize. Sinteza i lučenje prolaktina pod toničkom je inhibicijom dopamina koji se u portalnu cirkulaciju hipofize luči iz neurona hipotalamusa. Osim specifičnih stanica prednjeg režnja hipofize, prolaktin luče i druge stanice u tijelu (decidualne stanice, miociti maternice, epitelne stanice žlijezda znojnice, fibroblasti u koži), pogotovo limfociti (cirkulirajući, unutar slezene, timusa i koštane srži), a može se detektirati u većini tjelesnih tekućina (serum, cerebrospinalni likvor, suze, majčino mlijeko, urin, folikularna tekućina u jajnicima). Lučenje prolaktina je pulsatilno (4-14 sekrecijskih pulseva tijekom 24 sata) s najvećim koncentracijama tijekom sna i najnižom koncentracijom u serumu u priepodnevnim satima. U toku trudnoće i dojenja razine prolaktina dosežu najviše vrijednosti. Žene u reproduktivnoj dobi imaju višu prosječnu razinu prolaktina u usporedbi s ženama nakon menopauze i muškarcima, a starenjem srednja razina prolaktina progresivno pada. Gore spomenuti obrazac ritma lučenja prolaktina održan je bez obzira na spol i dob. Iako su razvoj žljezdanog tkiva dojke, poticanje i održavanje laktacije osnovne funkcije prolaktina, receptori za prolaktin široko su rasprostranjeni u tijelu što odražava raznolikost njegovih funkcija.¹⁰⁶

Receptor za prolaktin pripada obitelji citokinskih receptora klase I u koju spada i receptor za IL-6 te receptori za ostale citokine kojima je zajedničko svojstvo poticanje hematopoeze. Nakon vezanja prolaktina dolazi do dimerizacije receptora i aktivacije pridruženih kinaza (JAK (Janus kinaza)-2) koje fosforiliraju receptor što u konačnici dovodi do aktivacije STAT-5, i u manjoj mjeri STAT-1,3 transkripcijskih faktora. Prolaktinski receptori detektirani su na različitim stanicama imunostava koje također mogu lučiti prolaktin što implicira njegovu lokalnu autokrinu i parakrinu regulaciju.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸ Prema navedenim karakteristikama prolaktin bi se stoga mogao svrstati i u citokine. Prolaktin stimulira proliferaciju limfocita,⁴⁷ aktivnost NK-stanica¹⁰⁰ i produkciju citokina¹⁰⁷.

1.6 STRESNA REAKCIJA – ODRŽANJE INTEGRITETA

SŽS, kao što smo do sada vidjeli, ima centralnu ulogu u integraciji signala dospjelih iz okoline ili iz samog organizma (u formi stresora) pri čemu uz vlastite efektorske funkcije mobilizira i ostale sustave, kao što je to endokrini sustav, i na taj način modificira ponašanje i fiziološke reakcije organizma u svrhu očuvanja integriteta jedinice. Međutim, organizmi su se tijekom evolucije razvijali u dinamičkoj ravnoteži prema svojoj okolini (stanište i ostali organizmi) okruženi prijetnjama koje nisu mogle u prvi mah modificirati ponašanje ili uzrokovati brzu aktivaciju SŽS-a (nevidljivi mikroorganizmi, ozljede). Osnovnu ulogu u prepoznavanju takvih podražaja i homeostatskim reakcijama na njih ima imunosustav.¹⁰⁹ Efektorska funkcija imunosustava je u osnovi destruktivna prema onome što prepoznaje kao strano pri čemu eliminira prijetnju prema vlastitom. Autoregulacijskim mehanizmima imunosustav sprečava destruktivnu reakciju na vlastito, sprečava pretjeranu aktivaciju i/ili ograničava reakciju te potiče reparaciju (cijeljenje). Diskriminacija vlastitog i stranog (engl. self-nonsell), kao i brojni dobro istraženi autoregulacijski mehanizmi, dugo su vremena izdvajali imunosustav kao zasebnu cjelinu. Međutim, sa sve jasnijim dokazima o višesmjernoj komunikaciji sa SŽS-om i endokrinim sustavom, imunosustav se prepoznaje kao dio kontinuuma određenog međusobnim interakcijama ovih sustava koje se aktivno odvijaju održavajući stanje ravnoteže. Ukoliko se ravnoteža naruši na bilo kojem nivou (sustavu), potiče se kompleksna reakcija svih dijelova neprekinute cjeline, koji u osnovi nastoje povratiti ravnotežu, ali u određenim okolnostima (ako postoji naslijeđena predispozicija, ako je podražaj prejak, neprestano se ponavlja ili je dugotrajan) mogu promijeniti reaktivnost organizma na svaki sljedeći podražaj i dovesti do narušene regulacije u svakom od navedenih sustava.¹¹⁰ To sa stajališta imunosustava može značiti da će stresor pod određenim okolnostima uz aktivaciju stresne reakcije promijeniti imunoreakcije na način da organizam ili smanjeno reagira (sklonost infekcijama i nekontrolirani rast zloćudno promijenjenih stanica) ili pojačano reagira na vlastito i/ili strano (sklonost autoimunskim bolestima, alergije).

1.7 KONCEPT ALOSTAZE I PTSP

Već smo u prethodnom poglavlju dali naslutiti da homeostaza u organizmu vrlo lako u određenim okolnostima može biti narušena. Ako su homeostatski mehanizmi tako precizni u održanju unutarnjeg okoliša, kako objasniti sve veću pojavnost npr. pretilosti, hipertenzije, povećanu koncentracije glukoze u krvi, hiperlipidemiju? Možemo pretpostaviti da do ovoga dolazi zbog sve izraženijih promjena u okolišu na što se organizam mora prilagoditi (stres!) pa možemo zaključiti da organizam na neki način mijenja zadane postavke unutarnje okoline. Ovaj koncept „održanja stabilnosti kroz stalnu promjenu“ nazvan je alostazom. Koncept su predložili Sterling i Eyer,¹¹¹ a razradio i proširio McEwan²². Prema ovim autorima alostaza je adaptacijski proces tijekom kojeg

organizam svrsishodno usmjerava svoje energetske resurse kako bi očuvao stabilnost i izvan uskih homeostatskih granica. Na modelu stresa (stresor-percepcija-aktivacija SŽS-a-fiziološka reakcija), alostaza se održava istim medijatorima koji sudjeluju u stresnoj reakciji, a ako su ovi medijatori produljeno ili trajno aktivni nastaje tzv. „stanje alostaze“ (engl. *allostatic state*) (npr. povećana produkcija glukokortikoida i abdominalna pretilost, povišen krvni tlak, pojačana produkcija proupalnih citokina). Stanje alostaze je reverzibilno, a ako se ponavlja ili traje dugo za organizam predstavlja opterećenje (engl. *allostatic load*) koje u konačnici može dovesti do bolesti.

PTSP se može okarakterizirati kao stanje koje nastaje kao posljedica djelovanja stresora u prošlosti, a zbog svoje intenzivnosti ostavlja dalekosežne posljedice. Zbog ponovnog proživljavanja stresora, stresna reakcija je opetovana ili kontinuirana i traje dulje vrijeme pa se može okarakterizirati kao kronični stres. Osim toga, vezan je za specifične promjene ponašanja (izbjegavanje podsjetnika na traumu, sklonost nezdravim životnim stilovima), a osobe s PTSP-om nisu, naravno, pošteđene ni uobičajenih stresnih životnih događaja. Sve to zahtjeva opetovanu aktivaciju adaptacijskih sustava, tj. alostazu. Budući da je stanje dugotrajno, neprestana aktivacija mehanizama stresne reakcije dovodi do karakterističnog alostatskog stanja što se manifestira karakterističnim psihičkim i biološkim promjenama. Ove promjene predstavljaju alostatsko opterećenje što povećava rizik za razvoj bolesti u osoba s PTSP-om.

Četiri predložena tipa alostatskog opterećenja²² možemo razmotriti na primjeru PTSP-a¹¹². Prvi tip alostatskog opterećenja predstavljaju učestale opetovane stresne reakcije (npr. česte promjene krvnog tlaka koje mogu dovesti do infarkta miokarda). Osim što učestalo ponovo proživljavaju stresno iskustvo iz prošlosti, osobe s PTSP-om pojačano reagiraju i na druge stresne događaje, a stresna reakcija često proizlazi i iz pojačanog opreza tj. nerealistične anticipacije prijetećih događaja. Ove reakcije praćene su pojačanom reaktivnošću adrenergičnog¹¹³ i kardiovaskularnog sustava¹¹⁴.

Alostatsko opterećenje tipa 2 predstavlja nesposobnost organizma da se prilagodi opetovanim podražajima (stresorima). Otpornost na ekstinkciju refleksne reakcije na zvučne podražaje (engl. *startle response*) primjer je ovog tipa alostatskog opterećenja u PTSP-u.¹¹⁵

Tip 3 alostatskog opterećenja uključuje produljenu stresnu reakciju. Za razliku od tipa 1 kod kojeg su odgovori fazični, ovdje je odgovor organizma tonički, tj. dugotrajan. Trajno povećanje tlaka i ritma srca u osoba s PTSP-om upućuje na ovaj tip opterećenja.¹¹⁶ Ovome možemo pridodati i povišenje bazalnih razina kateholamina¹¹³ i trajne promjene HHN-osovine¹¹⁷ s mogućim dugotrajnim posljedicama na imunoreaktivnost¹¹⁸.

Tip 4 alostatskog opterećenja odnosi se na stanja u kojima je aktivacija određenih komponenti stresne reakcije neadekvatna. To dovodi do prekomjerne aktivaciju drugih komponenti stresne

reakcije. U slučaju PTSP-a poremećaji u regulaciji HHN-osovine mogli bi dovesti do neadekvatnog odgovora kortizola i posljedično prekomjerne aktivacije imunostava.²²

1.8 PROMJENE IMUNOSUSTAVA I NEUROENDOKRINOLOGIJSKOG SUSTAVA U PTSP-U

Kao što smo vidjeli u prethodnom poglavlju, PTSP je vezan uz niz promjena koje predstavljaju alostatsko opterećenje što povećava rizik za nastanak bolesti⁸. Osobe s PTSP-om češće lošije procjenjuju vlastito zdravlje,¹¹⁹⁻¹²⁰ a to potvrđuju i objektivni pokazatelji povećane učestalosti raznih tjelesnih bolesti u osoba s PTSP-om, osobito autoimunskih i kardiovaskularnih¹²¹⁻¹²³. Uzrok tome vjerojatno se nalazi u promjenama neuroendokrinog sustava i imunostava.¹²⁴

Neuroendokrini sustav i imunostav tijesno su povezani i uzajamno djeluju u koordinaciji odgovora jedinke na unutarnje i/ili vanjske promjene. Složena komunikacija ovih sustava omogućava svrsishodne reakcije kao što je npr. brza i efikasna eliminacija patogena koja podrazumijeva lokalizaciju odgovora imunostava, sprečavanje sistemskih štetnih učinaka i pravovremeno utišavanje imunoreakcija.⁷³ Jedan od centralnih događaja u sklopu stresne reakcije jest aktivacija SŽS-a i HHN-osovine što rezultira pojačanim lučenjem kortizola. Upalna zbivanja dovode do povećane razine proupalnih citokina koji također stimuliraju HHN-osovinu i lučenje kortizola. Kortizol, između ostalog, djeluje na imunoreakcije tako da suprimira lučenje proupalnih citokina i Th1 reakcije (inhibira lučenje IL-12 iz antigen-prezentirajućih stanica) (vidi poglavlja Glukokortikoidi, str. 17; Citokini, str. 16) čime se ostvaruje fina regulacijska petlja. Stanja s učestalom i/ili dugotrajnom aktivacijom stresne reakcije (npr. PTSP) mogu dovesti do promjena u signalizaciji glukokortikoidima (ili ona već inherentno postoji) s posljedičnim smetnjama u regulaciji imunoreakcija i razvojem bolesti.¹²⁵

Rezultati studija o promjenama HHN-osovine i utjecaju PTSP-a na imunoreaktivnost nisu ujednačeni. Moguće je da ovome pridonose različiti faktori među kojima su tip traume (npr. prirodna katastrofa, ratno iskustvo), intenzitet i trajanje traume te vrijeme proteklo od traumatskog iskustva. Studije se u grubo mogu podijeliti u tri osnovne grupe.¹¹⁸ One kod kojih je trauma trajala ograničeno kratko vrijeme, a mjerenja su uslijedila u kratkom vremenu (mjeseci) nakon proživljenja traume bez postavljene dijagnoze PTSP-a. Drugi tip predstavljaju studije provedene u kraćem vremenu nakon traume (do nekoliko godina) i uz jasnu dijagnozu PTSP-a. U trećem tipu studija dijagnoza PTSP-a je jasno postavljena kod ispitanika koji su proživjeli traumatsko iskustvo u daljoj prošlosti (seksualno zlostavljanje, ratno iskustvo). Smatramo da je ova podjela neobično važna jer govori o duljini alostatskog opterećenja o čemu će ovisiti i konačne biološke promjene u traumatiziranih osoba.

Obzirom na važnost HHN-osovine u stresnoj reakciji, postoji mnoštvo studija koje se odnose na promjene HHN-osovine u osoba s PTSP-om. U ovim studijama određivana je koncentracija kortizola u serumu, plazmi, urinu i slini (u određeno doba dana ili dnevni ritam lučenja kortizola), korišteni su

stimulacijski i supresijski testovi, a procjenjivan je i broj, odnosno senzitivnost glukokortikoidnih receptora. Većina recentnih preglednih radova izdvojiti će specifični obrazac HHN-osovine u PTSP-u, koji uključuje smanjeno lučenje kortizola, pojačanu negativnu povratnu spregu (pojačana supresija lučenja kortizola nakon administracije deksametazona) i povećanu ekspresiju i senzitivnost GR.¹¹⁸ Ovo je u potpunosti suprotno od nalaza u depresiji i izdvaja PTSP i s biološke strane kao specifičan nozološki entitet. Međutim, sustavna metaanaliza dosadašnjih istraživanja razine kortizola u PTSP-u,¹²⁶ i vrlo detaljan pregled dosadašnjih ispitivanja funkcije HHN-osovine¹¹⁷ jasno pokazuju da rezultati nisu ujednačeni i često upravo suprotni¹²⁷. Pažljivom analizom literature može se zamijetiti da se velik broj studija u kojima je pronađeno sniženo lučenje kortizola, pojačana supresija lučenja deksametazonom i povećana ekspresija GR, odnose na žrtve zlostavljanja u djetinjstvu, vijetnamske veterane i žrtve Holokausta, dakle osobe kod kojih je od traumatskog iskustva prošlo više desetaka godina. U jednoj od ovih studija¹²⁸ pokazano je da je kod osoba kod kojih se trauma dogodila kasnije u životu potrebno više deksametazona da bi se suprimirala lizozimska aktivnost u perifernim mononuklearima što upućuje da ispitanici kod kojih je manje vremena prošlo od traume do ispitivanja imaju sniženu funkciju GR. U našem istraživanju na uzorku hrvatskih ratnih veterana kod kojih je od traume prošlo više od deset godina pokazali smo da ekspresija GR u limfocitima pozitivno korelira s vremenom od traumatskog iskustva.¹²⁹ Čini se da upravo duljina aktivacije stresnog sustava koja odražava alostatsko opterećenje utječe na profil HHN-osovine. Sve ovo ukazuje na nužnost prospektivnih istraživanja kako bi se utvrdila dinamika promjena HHN-osovine u osoba s PTSP-om.

I hormoni koji nisu izravno vezani za aktivaciju HHN-osovine imaju važnu ulogu u stresnoj reakciji pa tako i u PTSP-u.⁴⁷ Smatra se da prolaktin djeluje kao protuteža pojačanom lučenju i učincima kortizola u stresnoj reakciji. Do sada je objavljeno svega nekoliko studija u kojima je određivana koncentracija prolaktina u serumu osoba s PTSP-om i to bez konkretnih zaključaka o mogućoj vezi prolaktina i PTSP-a.¹³⁰⁻¹³³ Obzirom na potencijalno važnu ulogu prolaktina u modulaciji imunosti, ovaj je hormon potrebno ispitati upravo u kontekstu pokazatelja karakteristika imunosustava.

Većina studija koje se odnose na promjene imunosustava u PTSP-u pratila je određene brojčane pokazatelje recirkulacije leukocita, tj. broj leukocita, posebice limfocita i udjele pojedinih limfocitnih subpopulacija (imunofenotip). Iako su rezultati vrlo neujednačeni, može se izdvojiti nalaz povećanja broja leukocita, limfocita, osobito T-limfocita u perifernoj cirkulaciji.^{118, 134} Ovi nalazi, kao i nalazi aktiviranih limfocita u perifernoj krvi¹³⁵⁻¹³⁶ upućuju na pojačanu aktivaciju imunosustava. Tome u prilog govore i nalazi povećane koncentracije proupalnih citokina.¹³⁷ Nalazi pojačane odgođene kožne reakcije preosjetljivosti^{7, 138} upućuju na važnu ulogu stečene imunosti iako neka istraživanja pokazuju smanjenu proliferaciju T-limfocita nakon stimulacije mitogenom^{136, 139}. Uz to, nalazi studija u

kojima je određivana citotoksičnost NK-stanica u PTSP-u vrlo su neujednačeni.⁷⁹ Prema tome, dosadašnja istraživanja imunosustava u PTSP-u ne prate obrazac koji je uočen u kroničnom stresu (imunosupresija) već više odgovaraju pojačanoj aktivaciji imunosustava koja je karakteristična za akutni stres.

Iako postoji veliki broj istraživanja koje izvještavaju o promjenama komponenti HHN-osovine ili imunosustava u PTSP-u, u svega nekoliko istraživanja ovi su sustavi istraženi zajedno. U jednoj od ovih studija sniženo lučenje kortizola u osoba s PTSP-om bilo je povezano s pojačanom deksametazonom uvjetovanom supresijom lučenja citokina iz lipopolisaharidom (LPS) stimuliranih mononuklearnih stanica periferne krvi.¹⁴⁰ U drugoj studiji sniženo lučenje kortizola bilo je praćeno pojačanom produkcijom IL-6 i TNF- α nakon stimulacije s LPS-om i PHA (od engl. *phytohemagglutinin*, fitohemaglutinin) mononuklearnih stanica periferne krvi traumatiziranih žena s PTSP-om.¹⁴¹

Ovakav pristup omogućava nam iznalaženje izravnih veza između mogućih promjena u HHN-osovini i imunosustava. Tome treba dodati već spomenutu potrebu za prospektivnim studijama, a pogotovo longitudinalnim epidemiološkim istraživanjima kojima će se gore navedene promjene možda dovesti u izravnu vezu s većom pojavnosti tjelesnih bolesti u osoba s PTSP-om.

2 HIPOTEZA I CILJ

Osnovna hipoteza koju smo željeli ispitati ovim istraživanjem jest da u osoba s PTSP-om postoje promjene endokrinog sustava i imunostava koje su međusobno povezane i nisu jednoznačne i statične već ovise o duljini trajanja PTSP-a, odnosno vremenu proteklom od traumatskog iskustva.

Kako bismo to dokazali, osnovni cilj istraživanja bio je usporediti razinu hormona (kortizola i prolaktina), citokina (IL-6 i TNF- α), citotoksičnost NK-stanica, ekspresiju GR na pojedinim subpopulacijama limfocita, ukupni broj limfocita i udjele pojedinih subpopulacija između hrvatskih ratnih veterana s PTSP-om i zdravih dobrovoljaca bez ratnog iskustva i PTSP-a, i to u dva ispitivanja s prosječnim razmakom od 6 godina. Drugi cilj bio je ispitati međuovisnost gore spomenutih varijabli kako bi se dobio uvid u međusobnu interakciju komponenti endokrinog sustava i imunostava u obje vremenske točke.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 ISPITANICI

U ovu studiju bile su uključene osobe koje su se ambulantno liječile zbog kroničnog PTSP-a u Psihijatrijskoj bolnici Vrapče. Svi ispitanici bili su muškarci, veterani Domovinskog rata. Dijagnoza PTSP-a postavljena je na temelju kriterija MKB-10 (Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema, deseta revizija)¹⁴²⁻¹⁴³, a za potrebe ove studije dijagnoza je na dan prikupljanja uzoraka potvrđena na temelju Dijagnostičkog i statističkog priručnika za duševne poremećaje (engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM*)-IV³ korištenjem Kliničke skale za procjenu posttraumatskog stresnog poremećaja (engl. *Clinician Administered PTSD Scale, CAPS*)¹⁴⁴. Ova ispitivanja, kao i prikupljanje sociodemografskih podataka obavljali su iskusni kliničari - psihijatri. Svi su bolesnici zadovoljili DSM-IV kriterije za dijagnozu kroničnog PTSP-a. To znači da je svaki od njih doživio, prisustvovao ili bio suočen s događajem koji je podrazumijevao stvarnu ili moguću smrt ili prijetnju tjelesnom integritetu te osobe ili drugih osoba uz reakciju izuzetnog straha, bespomoćnosti ili užasa (kriterij A). Svaki bolesnik morao je navesti mjesec i godinu proživljavanja traumatskog iskustva utvrđenog na temelju kriterija A. Neka obilježja traumatskog iskustva navedena su u tablici (Tablica 2, str. 40). Nadalje, da bi zadovoljio kriterije za dijagnozu PTSP-a, ispitanik je morao imati barem jedan simptom iz skupine simptoma ponovnog proživljavanja traumatskog iskustva (kriterij B), barem tri simptoma iz skupine simptoma izbjegavanja i obamrlosti (kriterij C) i barem jedan simptom iz skupine simptoma trajne podraženosti vegetativnog živčanog sustava (kriterij D). Kod svih ispitanika simptomi su trajali više od mjesec dana (kriterij E), a barem jedan aspekt funkcioniranja (socijalno, profesionalno, subjektivno) bio je narušen (kriterij F). Kod svih bolesnika stanje je trajalo duže od 3 mjeseca (kronični PTSP), a kod određenog broja njih PTSP se javio više od 6 mjeseci nakon traumatskog iskustva (PTSP s odgođenim početkom). U studiju nisu bili uključeni bolesnici koji su zadovoljavali kriterije za drugu psihijatrijsku dijagnozu (komorbiditet) što je uključivalo depresiju, psihozu i ovisnost, odnosno zlouporabu alkohola i drugih psihoaktivnih tvari.

Druga skupina ispitanika (zdrave kontrole) uključivala je osobe bez ratnog traumatskog iskustva, odnosno dijagnoze PTSP-a. Svi su bili muškarci, zaposlenici Psihijatrijske bolnice Vrapče i Imunološkog zavoda i nisu bili sudionici Domovinskog rata. Zdravi, kontrolni ispitanici također su imali negativnu anamnezu prijašnjih psihijatrijskih bolesti i nisu se do trenutka ispitivanja psihijatrijski liječili.

U razdoblju od mjesec dana prije ispitivanja nitko od ispitanika nije uzimao psihotropne lijekove. Svi ispitanici su za ovo razdoblje negirali zlouporabu alkohola i drugih psihoaktivnih

supstanci. Liječničkim pregledom potvrđeno je odsustvo simptoma i znakova akutnih i kroničnih (infektivnih, alergijskih, kroničnih upalnih i endokrinoloških) tjelesnih bolesti.

Studiju je odobrilo Etičko povjerenstvo Psihijatrijske bolnice Vrapče. Svaki ispitanik potpisao je suglasnost za sudjelovanje u studiji nakon usmenog objašnjenja dizajna studije i predočenja iscrpne obavijesti o studiji prilagođene općoj populaciji radi boljeg razumijevanja.

Budući da je ispitivanje provedeno u dva navrata, sve do sada navedeno odnosi se na oba ispitivanja. Slijede specifičnosti svakog od ispitivanja.

3.1.1 PRVO ISPITIVANJE

Prvo ispitivanje osoba s PTSP-om (n=39) provedeno je u razdoblju između 1997. i 1999. godine u razmaku od 20 mjeseci, a zdravih kontrola (n=37) između 1996. i 1999. godine u razmaku od 38 mjeseci. Nakon vađenja krvi za biološke testove, ispitanike je pregledao liječnik (psihijatar). Zabilježeni su osnovni sociodemografski podaci, a procjena simptoma PTSP-a u prvoj točki je osim korištenjem CAPS-a učinjena i kratkom Kliničkom skalom za procjenu učinka liječenja PTSP-a (engl. 8-item Treatment-outcome Posttraumatic Stress Disorder Scale, TOP-8)¹⁴⁵, odnosno samoocjenom ljestvicom DTS (od engl. *Davidson Trauma Scale*)¹⁴⁶. Prosječna težina kliničke slike PTSP-a procijenjena je Skalom za globalni klinički utisak (engl. Clinical Global Impression Severity, CGI-S)¹⁴⁷ i ocijenjena je kao umjerena (medijan=4, interkvartilni raspon=4-5). Budući da zdravi ispitanici nisu bili sudionici Domovinskog rata i nisu proživjeli bilo koji drugi traumatski događaj koji bi zadovoljavao kriterij A prema DSM-IV za dijagnozu PTSP-a, daljnju procjenu simptoma nije bilo potrebno provesti.

3.1.2 DRUGO ISPITIVANJE

Drugo ispitivanje osoba s PTSP-om (n=39) provedeno je u razdoblju između 2003. i 2004. godine u razmaku od 15 mjeseci, a zdravih kontrola (n=25) između 2003. i 2004. godine u razmaku od 18 mjeseci. Za potrebe ove studije uspjeli smo kontaktirati i ispitati svih 39 ispitanika s PTSP-om koji su sudjelovali u prvom ispitivanju i 25 od 37 zdravih ispitanika koje smo ispitali tijekom prvog ispitivanja. Ukupno 12 zdravih ispitanika su u intervalu između ispitivanja promijenili radno mjesto i/ili mjesto stanovanja i nakon što smo ih kontaktirali putem telefona odbili su sudjelovati u ponovnom ispitivanju. Postupak vađenja krvi, laboratorijska obrada i klinički pregled nisu se razlikovali od prvog ispitivanja. Potvrđena je osnovna dijagnoza kod ispitanika s kroničnim PTSP-om, a procjena simptoma PTSP-a učinjena je pomoću CAPS-a. TOP-8 i DTS nisu primijenjeni prilikom drugog ispitivanja. Zdravi ispitanici u razdoblju između ispitivanja nisu doživjeli traumatski događaj koji bi zadovoljavao kriterij A prema DSM-IV za dijagnozu PTSP-a.

3.2 LABORATORIJSKE METODE

Kako bismo mogli uspoređivati rezultate između dva ispitivanja, nastojali smo da se laboratorijske metode ne razlikuju između ispitivanja. Ovaj uvjet nismo uspjeli zadovoljiti u slučaju određivanja koncentracije citokina u serumu budući da su imunotestovi za njihovo određivanje u razdoblju između ispitivanja znatno usavršeni (bolje senzitivnosti i preciznosti s manjim stupnjem nespecifičnog vezanja, a time i lažno pozitivnih rezultata). Način provođenja (engl. *Standard Operating Procedure*, SOP) ostalih testova, koji su standardizirani u laboratorijima Imunološkog zavoda, nije se razlikovao između ispitivanja.

3.2.1 POSTUPAK PRIKUPLJANJA UZORAKA KRV

Svatom ispitaniku je između 8 i 9 sati prijepodne iz kubitalne vene izvađeno 30 mL krvi: 2 epruvete od 10 mL s dodatkom heparina kao antikoagulansa (Becton Dickinson Vacutainer System Europe, Grenoble, France), prva za određivanje citotoksične aktivnosti NK-stanica, a druga za određivanje udjela subpopulacija limfocita i razine GR na pojedinim subpopulacijama limfocita, i 1 epruveta od 10 mL bez dodatka antikoagulansa (BD Vacutainer) za određivanje razine hormona i citokina. Krv je nakon toga transportirana u laboratorij Imunološkog zavoda gdje je isti dan određena citotoksična aktivnost NK-stanica te udjeli subpopulacija limfocita i razine GR metodom protočne citometrije. Serum je iz epruvete bez antikoagulansa odvojen nakon zgrušavanja krvi centrifugiranjem i uskladišten u triplikatu (3x500 μ L) na -80°C za kasnije određivanje razine hormona i citokina.

3.2.2 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE HORMONA U SERUMU

Koncentracija kortizola u serumu izmjerena je metodom radioimunoetesta korištenjem komercijalno dostupnog kita CORT-CT2 (Schering S.A. Cis bio international, Gif-sur-Yvette, France). Test se temelji na kompeticijskom vezanju između radioaktivno (^{125}I) obilježenog kortizola i kortizola sadržanog u uzorcima i standardima za točno određen broj veznih mjesta antitijela kojima su obložene epruvete za provođenje testa. Veća koncentracija kortizola u uzorku sprječava vezanje radioaktivno obilježenog ^{125}I -kortizola za vezna mjesta na stijenci epruvete te se nevezani radioaktivni kortizol uklanja ispiranjem. Konačna koncentracija kortizola u uzorku je stoga obrnuto proporcionalna izmjerenoj preostaloj radioaktivnosti u epruveti. Test je proveden prema napucima proizvođača u duplikatu i ukoliko je razlika unutar jednog uzorka bila veća od 10%, testiranje ovog uzorka je ponovljeno. Ako je razlika nakon drugog testiranja i dalje bila prisutna, kao konačni rezultat korištena je srednja vrijednost rezultata oba duplikata. Senzitivnost testa bila je 0,17 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, koeficijent varijacije (engl. *coefficient of variation*, CV) istih uzoraka unutar jednog kita (engl. *intra-assay*) iznosio je 6%, a među istim kitovima (engl. *inter-assay*) 8%.

Koncentracija prolaktina u serumu izmjerena je također metodom radioimunotesta pomoću komercijalno dostupnog kita RIA-gnost PROL (Schering S.A. Cis bio international, Gif-sur-Yvette, France). Princip testa se razlikuje od onog za određivanje kortizola. U prvom koraku se prolaktin iz uzorka veže na vezna mjesta antitijela kojima je obložena epruveta za provođenje testa. U drugom koraku se dodaju s ^{125}I obilježena anti-prolaktinska antitijela koja se vežu na prolaktin vezan na stijenci epruvete, a ostatak se uklanja ispiranjem. Konačna koncentracija prolaktina u uzorku stoga je direktno proporcionalna izmjerenoj preostaloj radioaktivnosti. Test je također proveden u duplikatu prema napucima proizvođača. Senzitivnost testa bila je 0,1 µg/l, „intra-assay“ CV iznosio je 5,5-8,3%, a „inter-assay“ CV 7,5-10,8%.

3.2.3 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE CITOKINA U SERUMU

Koncentracije IL-6 i TNF-α u serumu u prvom ispitivanju određene su enzimskim imunotestom na čvrstoj fazi (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) pomoću komercijalno dostupnih Milenia kitova (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Testovi su provedeni prema napucima proizvođača u duplikatu. Senzitivnost testa za IL-6 bila je 4 pg/mL, „intra-assay“ CV iznosio je 3,1-7,1%, a „inter-assay“ CV 3,5-7,9%. Za TNF-α senzitivnost testa bila je 6 pg/mL, „intra-assay“ CV iznosio je 7,3-8,7%, a „inter-assay“ CV 7,7-8,1%.

U drugom ispitivanju, koncentracije IL-6 i TNF-α također su izmjerene ELISA metodom, ali pomoću Quantikine kitova (R&D Systems, Minneapolis, USA) budući da kitovi korišteni u prvom ispitivanju više nisu bili dostupni. Iako se postupak obrade uzoraka nije razlikovao, performanse kita su se razlikovale te se rezultati nisu mogli uspoređivati. Testovi su provedeni prema napucima proizvođača u duplikatu. Senzitivnost testa za IL-6 bila je 0,7 pg/mL, „intra-assay“ CV iznosio je 2,0-4,2%, a „inter-assay“ CV 3,8-6,4%. Za TNF-α senzitivnost testa bila je 1,6 pg/mL, „intra-assay“ CV iznosio je 4,6-5,2%, a „inter-assay“ CV 5,4-7,4%.

3.2.4 CITOTOKSIČNOST NK-STANICA

Funkcija NK-stanica, tj. njihova sposobnost ubijanja ciljnih stanica koje ne eksprimiraju podudarne MHC molekule, može se odrediti mjerenjem otpuštanja radioaktivnog kroma (^{51}Cr) iz tumorskih ciljnih stanica (u našem slučaju stanična linija mijeloične leukemije K-562) koje su prethodno bile izložene različitim koncentracijama efektorskih NK-stanica¹⁴⁸.

Test citotoksičnosti NK-stanica izvodio se istog dana kada je ispitanicima izvađena krv. Iz 10 mL heparinizirane krvi ispitanika izdvojene su mononuklearne stanice na gradijentu gustoće (Ficcol-Paque, Uppsala, Sweden) te je koncentracija mononuklearnih stanica (koje sadržavaju efektorske NK-stanice) podešena na 5×10^6 stanica/mL u tekućoj hranjivoj podlozi RPMI (engl. *Roswell Park*

Memorial Institute)-1640 s gentamicinom (50 mg/L) uz dodatak 10% seruma goveđeg fetusa (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (RPMI-FBS). U istoj tekućoj hranjivoj podlozi, u suspenziji rastu i K-562 ciljne stanice. Ova stanična kultura održavana je u laboratoriju Imunološkog zavoda (održavanje u ekspanzijskoj fazi rasta, promjena hranjive podloge svaka 3 dana). Dan prije izvođenja testa koncentracija ciljnih stanica podešena je na 2×10^5 /mL. Na dan izvođenja testa stanice su obilježene s ^{51}Cr (inkubacijom s Na_2CrO_4 u onoj količini koja na taj dan, obzirom na vrijeme poluraspada ^{51}Cr , ima aktivnost od 3,7 MBq). Nakon obilježavanja, koncentracija stanica podešena je na 5×10^4 /mL. Test citotoksičnosti proveden je na mikrotitarskim pločicama prema sljedećoj shemi:

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	...
A		Ciljne stanice + medij	Ciljne stanice + medij	Ciljne stanice + medij	Ciljne stanice + Triton	Ciljne stanice + Triton	Ciljne stanice + Triton				
B	Uzorak 1	100E:1C	100E:1C	100E:1C	50E:1C	50E:1C	50E:1C	25E:1C	25E:1C	25E:1C	
C	Uzorak 2	100E:1C	100E:1C	100E:1C	50E:1C	50E:1C	50E:1C	25E:1C	25E:1C	25E:1C	
D	Uzorak 3	100E:1C	100E:1C	100E:1C	50E:1C	50E:1C	50E:1C	25E:1C	25E:1C	25E:1C	
E	Uzorak 4	100E:1C	100E:1C	100E:1C	50E:1C	50E:1C	50E:1C	25E:1C	25E:1C	25E:1C	
F	Uzorak 5	100E:1C	100E:1C	100E:1C	50E:1C	50E:1C	50E:1C	25E:1C	25E:1C	25E:1C	
G	Uzorak 6	100E:1C	100E:1C	100E:1C	50E:1C	50E:1C	50E:1C	25E:1C	25E:1C	25E:1C	
H	Uzorak ...	100E:1C	100E:1C	100E:1C	50E:1C	50E:1C	50E:1C	25E:1C	25E:1C	25E:1C	
100 µl suspenzije ciljnih stanica obilježenih s ^{51}Cr (5×10^4 stanica/ml)											
po 200 µl suspenzije efektorskih stanica (5×10^6 stanica/ml)					100 µl RPMI						
					100 µl suspenzije stanica iz 1,2,3			100 µl suspenzije stanica iz 4,5,6			

Test je proveden u triplikatu uz serijsko razrjeđenje efektorskih stanica da bi se postigla tri omjera efektorskih prema ciljnim stanicama (E:C; 100:1, 50:1, 25:1). Jažice u redu A nisu sadržavale efektorske stanice već su uz ciljne stanice sadržavale samo medij (RPMI-FBS) za određivanje spontanog otpuštanja ^{51}Cr , ili Triton X-100 (lizira sve ciljne stanice) za određivanje maksimalnog otpuštanja ^{51}Cr . Nakon inkubacije (3 sata) gama-brojačem je određena radioaktivnost svakog supernatanta pojedinačno. Za svaki omjer uzorka (O), spontano otpuštanje (S) i maksimalno otpuštanje (M) izračunata je srednja vrijednost otkućaja u minuti (engl. *counts per minute*, cpm) te je izračunat postotak lize ciljnih stanica prema formuli: $(O-S)/(M-S) \times 100$.

3.2.5 BROJ LIMFOCITA, IMUNOFENOTIPIZACIJA I ODREĐIVANJE EKSPRESIJE GR

Trostruko obilježavanje mononuklearnih stanica periferne krvi metodom protočne citometrije omogućilo nam je istovremeno određivanje ukupnog broja limfocita, udjela pojedinih subpopulacija limfocita i ekspresije GR na istim subpopulacijama limfocita. U postupku su korišteni sljedeći puferi i otopine:

- a) PBS-S (engl. *phosphate buffered saline – staining*) - pufer za obilježavanje i ispiranje; Dulbecco PBS (komercijalno dostupni), 1% FCS (engl. *fetal calf serum*), 0,1% natrijev azid (NaN₃)
- b) PBS-P (engl. *phosphate buffered saline – permeabilization*) – permeabilizacijski pufer; Dulbecco PBS, 1% FCS, 0,1% NaN₃, 0,1% saponin
- c) otopina za lizu eritrocita – komercijalno dostupna (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), prije upotrebe razrijeđeno 1:10 u reH₂O
- d) fiksativ 1 – Dulbecco PBS, 4% paraformaldehid
- e) fiksativ 2 – FACS solution (komercijalno dostupni, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), 1% formaldehid

Za obilježavanje stanica korištena su komercijalno dostupna (Becton Dickinson) mišja monoklonska antitijela za površinske biljege na ljudskim stanicama (CD, engl. *cluster of differentiation*) prema shemi u tablici (Tablica 1, str. 32). Za obilježavanje unutarstaničnog, citoplazmatskog GR korišteno je monoklonsko antitijelo konjugirano s FITC (engl. *fluorescein isothiocyanate*) (IgG₁, clone no. 5E4-B1, vidi referencu 149) razrijeđeno u PBS-P puferu (konačna koncentracija 2,66 µg/mL).

Tablica 1. Raspored monoklonskih antitijela po epruvetama

Epruveta	Boja			Obilježeno	Populacija
	FITC	PE	PerCP		
1	CD45 ¹	CD14 ¹		CD45+CD14-	Ukupni limfociti
2	IgG ₁	IgG _{2α}	IgG ₁	(Izotipska kontrola)	
3	GR	CD3	CD4	CD3+	T-limfociti
				CD3+CD4+	Pomoćnički T-limfociti
4	GR	CD3	CD8	CD3+CD8+	Citotoksični T-limfociti
5	GR	CD23	CD20	CD20+	B-limfociti
				CD20+CD23+	Aktivirani B-limfociti
6	GR	CD16,56		CD16,56+	NK-stanice
7	GR	CD45RO	CD4	CD45RO+	Ukupni memorijski limfociti
				CD4+CD45RO+	Pomoćnički memorijski T-limfociti
8	CD45 ¹	CD14 ¹	Kuglice ²	Limfociti, kuglice	Apsolutni broj limfocita

Kratice: CD - engl. *cluster of differentiation*, FITC – engl. *fluorescein isothiocyanate*, GR – glukokortikoidni receptor, PE – engl. *phycoerythrin*, PerCP – engl. *peridinin chlorophyll protein*

U tablici su označene epruvete i monoklonska antitijela koja su korištena za obilježavanje stanica (npr. epruveta 1 sadržavala je anti-CD45 antitijelo konjugirano s FITC i anti-CD14 antitijelo konjugirano s PE čime su diferencirani ukupni limfociti).

¹ Anti-CD45 FITC i anti-CD14 PE antitijela komercijalno su dostupna u kombinaciji (Leucogate™, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany)

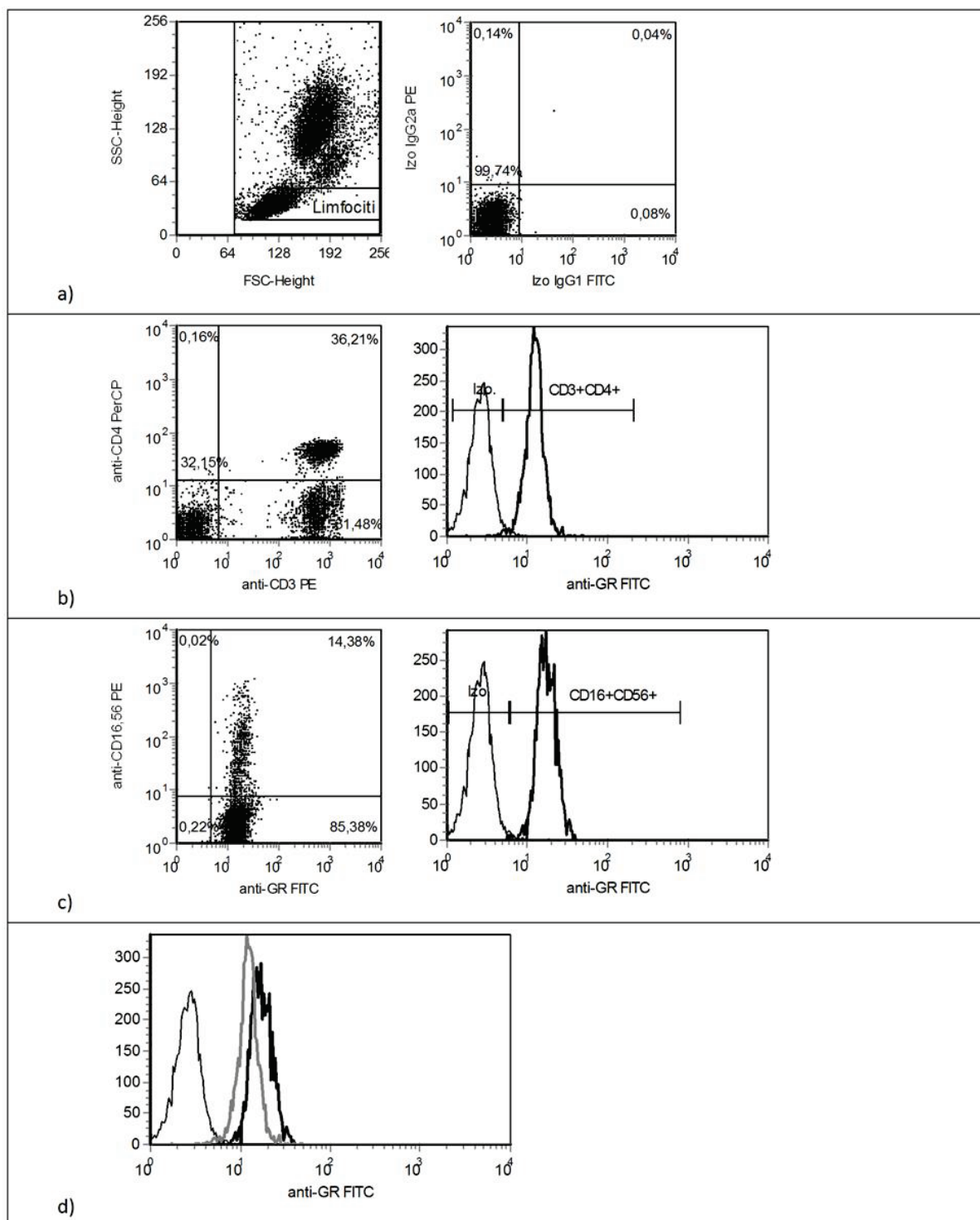
² Apsolutni broj limfocita određen je pomoću komercijalno dostupnih kuglica čija fluorescencija se očitava u istom kanalu kao i PerCP (Flow-Count™ Fluorospheres, Coulter Corporation, Miami, USA)

U svaku od epruveta dodano je 5 µL pojedinačnog antitijela i izotipske kontrole (osim anti-GR FITC i IgG₁ FITC izotipske kontrole) ili kombinacije anti-CD45/CD14 (Leucogate™, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) prema tablici (Tablica 1, str. 32). Nakon toga dodano je 50 µL pune krvi po epruveti. Uslijedili su inkubacija (15 minuta u tami), ispiranje u 4 mL PBS-S pufera i centrifugiranje (600 x g, 5 min.). Talog stanica je zatim fiksiran u fiksativu 1 uz inkubaciju od 20 minuta na 4°C u tami.

Nakon ponovnog ispiranja uslijedila je liza eritrocita – inkubacija od 15 minuta u otopini za lizu eritrocita na sobnoj temperaturi u tami. Stanice su zatim ponovo isprane i centrifugirane te je uslijedilo unutarstanično obilježavanje citoplazmatskog GR-a. U epruvetu br. 2 dodadno je 5 μL izotipske kontrole IgG₁ FITC i 50 μL PBS-P pufera za permeabilizaciju stanica. U druge epruvete dodano je 50 μL anti-GR FITC antitijela razrijeđenog u PBS-P puferu. Nakon inkubacije od 20 minuta na 4°C u tami stanice su isprane u 4 mL PBS-P pufera, a preostali talog stanica nakon posljednjeg centrifugiranja (600G, 5 min.) resuspendiran je u 500 mL fiksativa 2. U posljednju epruvetu (epruveta 8) dodano je 50 μL (isti volumen kao što je bio početni volumen pune krvi) kuglica za određivanje apsolutnih brojeva limfocita (Flow-Count™ Fluorospheres, Coulter Corporation, Miami, USA). Tako pripremljeni uzorci propušteni su na FACSCalibur (Becton Dickinson) protočnom citometru, a analiza je izvršena pomoću pripadajućeg programa CELLQuest (Becton Dickinson). Osnovni princip analize prikazan je slici (Slika 1, str. 34). Propuštanje je provedeno na način da je prikupljeno 5000 događaja koji prema slici odgovaraju limfocitima (Slika 1a, str. 34). Korekcija limfocitne ograde izvršena je analizom anti-CD45 FITC vs. anti-CD14 PE (Leucogate™, Becton Dickinson) dijagrama i iznosila je više od 90%. Na točkastim dijagramima, kreiranim iz limfocitne ograde, prikazane su subpopulacije limfocita prema kombinacijama biljega prikazanim u tablici (Tablica 1, str. 32) te su zabilježeni udjeli pojedinih subpopulacija (Slika 1b i 1c, str.34). Oko svake od ovih subpopulacija limfocita postavljena je ograda na temelju koje je formiran histogram koji je prikazivao događaje pozitivne za anti-GR FITC (Slika 1b, 1c i 1d, str. 34) u dotičnoj subpopulaciji limfocita. Srednji intenzitet FITC fluorescencije (engl. *mean fluorescence intensity*, m.f.i.) nespecifičnog vezanja izotipske kontrole IgG₁ FITC oduzet je od m.f.i. specifičnog vezanja anti-GR FITC. Ova razlika intenziteta fluorescencije označavala je relativnu količinu GR u subpopulaciji limfocita izraženu u m.f.i.

Analiza apsolutnih brojeva limfocita izvršena je prema naputcima proizvođača kuglica (Flow-Count™ Fluorospheres, Coulter Corporation, Miami, USA). Ukratko, propušteno je 3000 limfocita (epruveta 8, Tablica 1, str. 32) ograđenih na anti-CD45 FITC vs. anti-CD14 PE dijagramu. Budući da se u smjesi limfocita i kuglica uspostavlja stabilan protok čestica tijekom propuštanja uzorka, protočni citometar broji kuglice i limfocite u stalnom omjeru. Kako nam je poznata koncentracija kuglica (1022 kuglice/ μL), apsolutni broj limfocita jednostavno se računa prema formuli: (broj propuštenih kuglica/broj propuštenih limfocita)x(1022/ μL).

Slika 1. Analiza ekspresije glukokortikoidnog receptora u subpopulacijama limfocita metodom protočne citometrije



a) postavljanje ograde oko limfocita i pripadajuća izotipska kontrola; **b)** udio pomoćničkih T-limfocita (CD3+CD4+) (točkasti dijagram lijevo) i ekspresija glukokortikoidnog receptora (GR) u ovim stanicama (histogram desno); relativna ekspresija izražava se kao m.f.i. (engl. *mean fluorescence intensity*) specifičnog vezanja (marker označen s CD3+CD4+) umanjena za m.f.i. nespecifičnog vezanja, odnosno izotipske kontrole (marker označen s Izo.); **c)** udio urođenoubilačkih (engl. *natural killer*, NK) stanica (CD16+CD56+) i pripadajuća ekspresija GR; **d)** zajednički prikaz histograma izotipske kontrole (tanka crna linija), ekspresije GR u CD3+CD4+ (siva linija) i ekspresije GR u CD16+CD56+ (deblja crna linija); ekspresija GR u CD16+CD56+ veća je nego u CD3+CD4+ stanicama

3.3 STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Kako je ovim istraživanjem generiran veliki broj varijabli koje su rezultat različitih psiholoških (12 varijabli) i bioloških (25 varijabli) testiranja, razumljivo je da pojedini ispitanici nisu imali vrijednosti za sve testove koji su planirani. Razlozi za to bili su razni, a navodimo neke od njih: razbijena epruveta tijekom transporta, hemoliza pri razdvajanju seruma, greška istraživača pri provođenju nekih od pokusa, nepredvidive tehničke poteškoće, prisutnost vrijednosti koje odskakuju (engl. *outliers*). Rezultat toga je nedostatak pojedinih podataka (engl. *missing values*) kod nekih ispitanika što može narušiti valjanost statističke analize, pogotovo u metodama multivarijatne analize.¹⁵⁰ Korištenjem postupaka za nadomještanje (engl. *imputation*) nedostajućih podataka možemo doskočiti ovom problemu te smo u analizi podataka ove studije koristili metodu multiple imputacije. Ovom metodom vrijednosti koje nedostaju mogu se nadomjestiti na temelju regresijske analize korištenjem ostalih vrijednosti, koje su prisutne, kao prediktora. Na ovaj način dobivamo procijenjenu distribuciju varijabli kojima su nadomještene vrijednosti koje nedostaju. Kako se radi o procjeni, u izračunu konačnih statističkih parametara i p-vrijednosti treba uzeti u obzir i dodatnu nesigurnost nastalu ovom procjenom. U tu svrhu imputacije se vrše n puta i željene analize provodimo na n novonastalih baza podataka. Kao rezultat uzimamo kombinirane statistike (regresijski koeficijenti, standardne pogreške, t- i p-vrijednosti) kod kojih u obzir uzimamo i nepreciznost nastalu imputacijom i novim uzorkovanjem (n imputacija)¹⁵¹. Korištenje multiple imputacije potrebno je ako uzrok nedostatnosti podataka nije posve slučajan (engl. *missing completely at random*, MCAR).

U ovoj studiji odlučili smo analizu provesti na dvije različite baze podataka. Prva baza sadržavala je podatke iz prvog ispitivanja svih 39 ispitanika s PTSP-om i 37 zdravih kontrola, a druga baza podataka sadržavala je podatke oba ispitivanja svih 39 ispitanika s PTSP-om i 25 zdravih kontrola (12 kontrola koje nismo uspjeli ispitati u drugom ispitivanju izbacili smo iz cjelokupne analize). Za ovaj pristup odlučili smo se kako bi očuvali maksimalnu količinu dostupnih podataka u prvom ispitivanju, a u drugom ispitivanju 12 kontrola nije uopće ispitano pa nadomještanje podataka ne bi bilo opravdano. Dakle, analizom prve baze podataka procijenili smo razlike između ispitanika s PTSP-om i zdravih kontrola u prvom ispitivanju, a analizom druge baze podataka procijenili smo razlike između ispitanika s PTSP-om i zdravih kontrola u drugom ispitivanju, odnosno promjene varijabli unutar obje grupe tijekom vremena.

Na obje baze učinjena je temeljita analiza podataka koji nedostaju (Tablica 4, str. 43; Tablica 5, str. 45). Analizom uzoraka nedostajućih podataka utvrđeno je da u 21 od 76 ispitanika u prvom ispitivanju imamo prisutne sve podatke. Ako uzmemo u obzir oba ispitivanja (druga baza) tada su svi podaci bili dostupni za svega 15 od 64 ispitanika. Broji ispitanika kod kojih su nedostajali podaci po

pojedinoj varijabli prikazan je u tablicama (Tablica 4, str. 43; Tablica 5, str. 45). U sljedećem smo koraku analizirali matricu t-testova kako bismo utvrdili postoje li razlike u ostalim varijablama ako uspoređujemo ispitanike kod kojih je određena varijabla prisutna i one kod kojih ista nedostaje. Ovom analizom uvidjeli smo da ispitanici kojima nedostaju podaci o ekspresiji GR-a imaju značajno niže vrijednosti za prolaktin i citotoksičnost NK-stanica u sva tri omjera. Na temelju toga zaključili smo da podaci ne nedostaju posve slučajno tj. ne zadovoljavaju kriterij MCAR. To potvrđuje i Littleov test za MCAR ($\chi^2=665,387$, $df=549$, $p<0,001$) za prvu bazu. Za drugu bazu, Littleov test ($\chi^2=1289,084$, $df=1324$, $p=0,749$) upućivao je na potpuno slučajnu nedostatnost (MCAR). Iako bismo u tom slučaju mogli koristiti neku drugu metodu za imputaciju nedostajućih podataka (npr. jednostruka imputacija), radi dosljednosti, kao i mnogo manje mogućnosti pogreške, odlučili smo se za korištenje metode multiple imputacije za nadomještanje podataka koji nedostaju u analizi obje baze.

Kako bi se mogao provesti postupak multiple imputacije, varijable su morale slijediti normalnu distribuciju. Vizualnim pregledom podataka i prilikom testiranja normalnosti uočili smo da pojedine vrijednosti unutar nekih varijabli znatno odskoču. Pretpostavili smo da bi ove vrijednosti mogle biti rezultat pogrešaka u mjerenju i odlučili smo ih izbaciti iz analize. Definirali smo ih kao one vrijednosti koje su se nalazile više od 4 interkvartilna raspona iznad gornjeg ili ispod donjeg kvartila. Broj izbačenih vrijednosti po pojedinim varijablama prikazan je u tablicama (Tablica 4, str. 43; Tablica 5, str. 45). Normalnost distribucije po grupama testirana je Shapiro-Wilkovim testom nakon čega smo varijable koje se nisu normalno distribuirale transformirali na način naveden u tablicama (Tablica 4, str. 43; Tablica 5, str. 45). U konačnici, nekoliko varijabli u nekoj od grupa nije bilo normalno distribuirano (Tablica 4, str. 43), ali smo ih odlučili uključiti u analizu jer je distribucija ovih varijabli vizualno nalikovala normalnoj, a varijance među grupama bile su homogene. Homogenost varijanci između grupa testirana je Levenovim testom. Treba napomenuti da varijablu TNF- α nismo uspjeli normalizirati i bili smo primorani izbaciti je iz modela i analizirati neparametarskom metodom (Mann-Whitney U-test). Varijablu IL-6 uspjeli smo normalizirati korištenjem Box-Cox transformacije (vidi podnožje tablice (Tablica 4, str. 43)) i bila je uključena u model, ali budući da je distribucija inicijalno bila vrlo nepravilna i nalikovala onoj TNF- α , ovu smo varijablu dodatno analizirali i neparametarskom metodom (Mann-Whitney U-test).

Uslijedio je postupak multiple imputacije te smo od svake baze generirali 5 imputiranih baza na kojima smo vršili sve daljnje analize. Utjecaj grupe na biološke varijable u pojedinim ispitivanjima testiran je multivarijatnim generalnim linearnim modelom uz dob i pušenje kao kovarijate. Utvrdili smo jednakost matrica kovarijanci (Box M-test) i testirali utjecaj grupe (Pillai's Trace, Wilks' Lambda, Hotelling's Trace, Roy's Largest Root testovi). Ako je utjecaj grupe bio značajan ($p<0,05$), univarijatnim generalnim linearnim modelom uz dob i pušenje kao kovarijatama, testirali smo

razliku u pojedinim varijablama između grupa. Konačna statistika (β , standardna pogreška aritmetičke sredine, t i p) prikazana je u obliku kombinacije rezultata 5 testiranja (Tablica 6, str. 48, Tablica 7, str. 50). Kako bismo smanjili mogućnost pogreške tipa II zbog višestrukih usporedbi (po 24 u svakom ispitivanju), tj. kako ne bi pogrešno proglasili razliku značajnom, p -vrijednosti su korigirane metodom FDR (engl. *false discovery rate*)¹⁵². Uz svaku p -vrijednost prikazana je i d -vrijednost prema FDR-metodi i ukoliko je $p < d$ tada je razlika značajna na nivou $\alpha=0,05$ bez obzira na vrijednost p .

Kako bismo usporedili veličinu učinka PTSP-a na pojedine varijable, za svaku varijablu izračunat je Cohenov d prema formuli:

$$d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s}, \quad s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2}},$$

$\bar{x}_1$ – kombinirana aritmetička sredina svih 5 imputacija grupe 1 (PTSP)

$\bar{x}_2$ – kombinirana aritmetička sredina svih 5 imputacija grupe 2 (kontrole)

n_1 – broj ispitanika s PTSP-om (39 u prvom i drugom ispitivanju)

n_2 – broj zdravih kontrola (37 u prvom ispitivanju i 25 u drugom ispitivanju)

s_1 – standardna devijacije aritmetičke sredine grupe 1 (dobivena iz kombinirane standardne pogreške (SE_1) aritmetičke sredine svih 5 imputacija prema formuli $SE_1\sqrt{n_1}$)

s_2 – standardna devijacije aritmetičke sredine grupe 2 (dobivena iz kombinirane standardne pogreške (SE_2) aritmetičke sredine svih 5 imputacija prema formuli $SE_2\sqrt{n_1}$)

Veličina učinka prema vrijednosti Cohenovog d klasificirana je kao: mala (0,1-0,3), umjerena (0,3-0,5), visoka (više od 0,5).¹⁵³

Konačno, usporedba varijabli između prvog i drugog ispitivanja za svaku od grupa učinjena je pomoću t -testova za zavisne uzorke. Kao i kod prije opisanih analiza, kombinirane vrijednosti t i p dobivene su analizom 5 imputiranih baza (Tablica 8, str. 52). Vrijednosti p korigirane su metodom FDR.

Iako je gore opisana analiza valjanija, dodatno smo u svrhu grafičke prezentacije rezultata, varijable kortizol, prolaktin, citotoksičnost NK-stanica (100:1), ekspresija GR-a na limfocitima, broj limfocita i imunofenotip ispitali pojedinačno analizom varijance (ANOVA, od engl. *Analysis of Variance*) za ponavljana mjerenja (2x2 dizajn, grupa x vrijeme) koristeći originalne vrijednosti (bez nadomještanja podataka metodom multiple imputacije). Ukoliko je interakcija faktora bila značajna, grupe su uspoređene pomoću četiri kontrasta tj. svaka grupa u vremenu, odnosno razlika između

grupa u pojedinoj vremenskoj točki. Statističke značajnosti razlika (na nivou $\alpha=0,05$) dobivene temeljem ove analize nisu se razlikovale od analize temeljene na multiploj imputaciji.

Odnos rezultata psihometrijskog testiranja i bioloških testova, kao i međusobni odnos bioloških varijabli, analizirani su metodom parcijalne korelacije uz kontrolu za dob i pušenje. Analiza je provedena na 5 baza generiranih metodom multiple imputacije, a vrijednosti koeficijenata korelacije (r) i p -vrijednosti kombinirani su rezultati 5 analiza (Tablica 9, str. 63; Tablica 10, str. 64; Tablica 11, str. 66).

Na temelju rezultata parcijalnih korelacija formirani su regresijski modeli. Ukupno je testirano šest modela (multipla linearna regresija), tj. po jedan model za svaku zavisnu varijablu pri čemu su zavisne varijable predstavljali rezultati psihometrijskih testova. Prediktori su uz biološke varijable uključivali i demografske varijable (Tablica 12, str. 67). R^2 izračunat je kao prosjek 5 vrijednosti dobivenih nakon multiple imputacije, a vrijednosti β , t i p izvedene su kombinacijom pojedinih vrijednosti nakon 5 analiza.

4 REZULTATI

4.1 KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

Osnovne demografske karakteristike ispitanika prikazane su u tablicama (Tablica 2, str. 40; Tablica 3, str. 41). Razmak između dva ispitivanja kretao se između 53 i 81 mjesec ($68,2 \pm 6,7$ mjeseci) kod ispitanika s PTSP-om i od 59 do 95 mjeseci ($73,6 \pm 13,19$ mjeseci) kod zdravih kontrola. Ispitanici s dijagnozom PTSP-a bili su nešto stariji, međutim ova razlika nije bila statistički značajna ($t=1,865$, $p=0,066$) u prvom ispitivanju. U drugom ispitivanju ova razlika bila je statistički značajna ($t=2,387$, $p=0,020$) budući da 12 kontrola nismo uspjeli ponovo ispitati. Iz ovog razloga većina daljnjih analiza provedena je uz kontrolu za dob. Tijekom prvog ispitivanja ispitanici s PTSP-om nisu se razlikovali od zdravih kontrola s obzirom na pušenje ($\chi^2=0,794$, $df=1$ $p=0,373$), i bračni status ($\chi^2=2,292$, $df=2$, $p=0,318$). Međutim, razlika je postojala u stupnju edukacije ($\chi^2=12,562$, $df=2$, $p=0,002$) budući da je veći broj zdravih ispitanika imao završen fakultet. Isto tako, grupe su se razlikovale i po radnom statusu ($\chi^2=18,097$, $df=2$, $p<0,001$) što je razumljivo obzirom da je relativno velik udio ispitanika s PTSP-om već u ovoj dobi ostvario pravo na mirovinu. U drugom ispitivanju gore spomenute karakteristike nisu se značajno promijenile u osoba s PTSP-om (1 ispitanik postao je pušač, 1 se rastao, 1 je ostvario pravo na mirovinu i 1 se zaposlio). Od 25 zdravih ispitanika koji su ispitani i u drugom ispitivanju 1 je postao pušač, bračni status je svima ostao nepromijenjen, a 4 ispitanika od njih 25 su se u međuvremenu zaposlili. Stupanj edukacije ostao je nepromijenjen u obje grupe. Odnosi iz prvog ispitivanja ostali su nepromijenjeni u drugom ispitivanju, tj. grupe se nisu razlikovale u pušenju ($\chi^2=1,377$, $df=1$, $p=0,241$) i bračnom statusu ($\chi^2=1,322$, $df=2$, $p=0,517$), a razlika je postojala u stupnju edukacije i radnom statusu ($\chi^2=13,675$, $df=2$, $p<0,001$).

Prema karakteristikama traume možemo zaključiti da je većina ispitanika bila visoko traumatizirana s velikim udjelom ratnih veterana koji su doživjeli smrt svojih suboraca (Tablica 2, str. 40). Rezultati kliničkih intervjua (CAPS, TOP-8) i samoocjenjske ljestvice (DTS) upućuju na srednje izraženu kliničku sliku PTSP-a što se podudara i s rezultatima CGI-S skale (vidi poglavlje Ispitanici, str. 27). Temeljem korelacija između ukupnih rezultata različitih skala (CAPS vs. DTS, $r=0,650$, $p<0,001$; CAPS vs. TOP-8, $r=0,735$, $p<0,001$; DTS vs. TOP-8, $r=0,564$, $p<0,001$) možemo zaključiti da je provedeno testiranje bilo pouzdano. U drugom ispitivanju rezultati CAPS testiranja upućuju na lakšu kliničku sliku (Tablica 2). Na slici (Slika 2, str. 41) je vidljivo kako u drugom ispitivanju dolazi do značajnog pada razine svih skupina simptoma PTSP-a mjerenih pomoću CAPS.

Tablica 2. Osnovne demografske karakteristike, karakteristike traume i rezultati psihometrijskog testiranja osoba s posttraumatskim stresnim poremećajem

Karakteristika ¹	1. ispitivanje		2. ispitivanje	
Dob	38,46±9,1		44,10±9,3	
Pušenje	25/39	64,1%	26/39	66,7%
Bračni status				
Oženjen	21/39	53,8%	20/39	51,3%
Rastavljen	7/39	17,9%	8/39	20,5%
Neoženjen	11/39	28,2%	11/39	28,2%
Edukacija				
Osnovna škola	5/39	12,8%		
Srednja škola	29/39	74,4%		
Fakultet	5/39	12,8%		
Radni status				
Zaposlen	22/39	56,4%	23/39	59,0%
U mirovini	15/39	38,5%	16/39	41,0%
Nezaposlen	2/39	5,1%	0/39	0,0%
Godine od traume	5,8 (5,5-6,5)		11,4 (11,1-12,4)	
Karakteristike traume				
Sudionik ili svjedok ratnih stradanja	39/39	100,0%		
Direktno sudjelovao u borbi	33/39	84,6%		
Prisustvovao smrti drugih ljudi	23/39	41,0%		
Iskustvo logora	2/39	5,1%		
CAPS				
Ukupno	68,0±10,2		58,7±7,5	
Ponovno proživljavanje	20,0 (20,0-22,0)		17,0 (15,0-18,0)	
Izbjegavanje/ obamrlost	28,0 (27,0-29,0)		26,0 (24,0-28,0)	
Pojačana podražljivost	18,6±4,2		15,9±3,5	
PTSP s odgođenim početkom	21/39	53,8%		
DTS				
Ukupno	65,4±10,7			
Ponovno proživljavanje	20 (19,0-21,0)			
Izbjegavanje/ obamrlost	27 (24,0-28,0)			
Pojačana podražljivost	18 (16,0-21,0)			
TOP-8				
Ukupno	16,6±2,7			
Ponovno proživljavanje	5,0 (4,0-5,0)			
Izbjegavanje/ obamrlost	9,0 (8,0-10,0)			
Pojačana podražljivost	2,0 (1,0-4,0)			

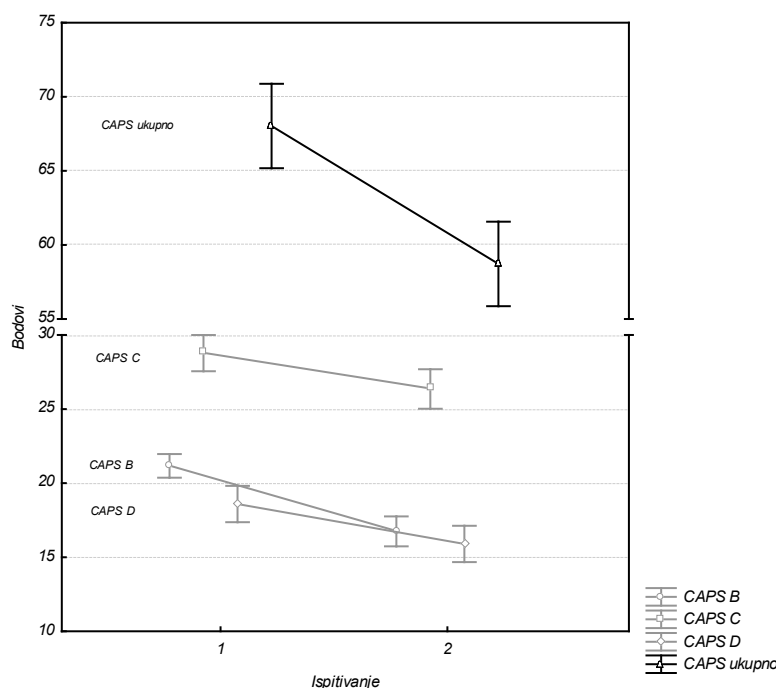
Kratice: **CAPS** - klinička skala za procjenu posttraumatskog stresnog poremećaja (od engl. *Clinician Administered PTSD Scale*); **DTS** - engl. *Davidson Trauma Scale*; **TOP-8** - klinička skala za procjenu učinka liječenja PTSP-a (od engl. *8-item Treatment-outcome Posttraumatic Stress Disorder Scale*)

¹ Rezultati su prikazani kao broj/ukupni broj ispitanika s pripadajućim postotkom, aritmetička sredina ± standardna devijacija za varijable koje su pratile normalnu distribuciju i medijan (interkvartilni raspon) za ostale kvantitativne varijable.

Tablica 3. Osnovne demografske karakteristike zdravih kontrola

Karakteristika ¹	1. ispitivanje		2. ispitivanje	
Dob	34,2±10,6		38,7±8,3	
Pušenje	20/37	54,1%	13/25	52,0%
Bračni status				
Oženjen	15/37	40,5%	12/25	48,0%
Rastavljen	3/37	8,1%	3/25	12,0%
Neoženjen	14/37	37,8%	10/25	40,0%
Edukacija				
Osnovna škola	0/37	0,0%		
Srednja škola	17/37	45,9%		
Fakultet	15/37	40,5%		
Radni status				
Zaposlen	32/37	86,5%	25/25	100,0%
U mirovini	0	0,0%	0/25	0,0%
Nezaposlen	5/37	13,5%	0/25	0,0%

¹ Rezultati su prikazani kao broj/ukupni broj ispitanika s pripadajućim postotkom, a varijabla dob kao aritmetička sredina±standardna devijacija.

Slika 2. Promjena razine simptoma na temelju Kliničke skale za procjenu posttraumatskog stresnog poremećaja^{1,2}

Kratice: CAPS - Klinička skala za procjenu posttraumatskog stresnog poremećaja (engl. *Clinician Administered PTSD Scale*); B – simptomi ponovnog proživljavanja; C – simptomi izbjegavanja/obamrlosti; D – simptomi pojačane podražljivosti

Točke predstavljaju aritmetičke sredine, a vertikalne linije 95%-tne intervale pouzdanosti. CAPS B i CAPS C analizirani su nakon transformacije (kvadrat), a pripadajuće točke na grafu odgovaraju povratno transformiranim vrijednostima (drugi korijen).

¹ Podaci su analizirani testom ANOVA (engl. *Analysis of Variance*) za ponavljana mjerenja.

² CAPS B (simptomi ponovnog proživljavanja), $F(1, 38)=164,83$, $p<0,001$; CAPS C (simptomi izbjegavanja/emocionalne obamrlosti), $F(1, 38)=33,529$, $p<0,001$; CAPS D (simptomi pojačane pobudljivosti), $F(1, 38)=93,977$, $p<0,001$; CAPS ukupno, $F(1, 38)=185,99$, $p<0,001$

4.2 PODACI KOJI NEDOSTAJU

U tablicama (Tablica 4, str. 43; Tablica 5, str.45) je prikazana struktura podataka po ispitivanim varijablama i deskriptivna statistika izračunata korištenjem originalnih podataka (prije imputacije) dostupnih nakon izbacivanja onih koji su odskakali (*outlier*-i), uz napomenu da su sve analize i usporedbe vršene na temelju kombiniranih vrijednosti za 5 imputiranih baza. Vidljivo je da je u prvom ispitivanju najviše podataka nedostajalo unutar varijable broj limfocita kod ispitanika s PTSP-om, odnosno varijable ekspresija GR kod zdravih kontrola (Tablica 4, str. 43). U drugom ispitivanju nedostajalo je mnogo manje podataka, ali 12 zdravih kontrola nismo uspjeli testirati (Tablica 5, str. 45). Podaci koji nedostaju uglavnom se nisu podudarali između prvog i drugog ispitivanja tj. čest slučaj je bio da u osobe koja u jednom ispitivanju ima određeni podatak, u drugom ispitivanju kod iste osobe ovaj podatak nedostaje. Prema tome, kada ne bismo koristili neku od metoda imputacije došlo bi do gubitka velike količine informacija, pogotovo u analizi zavisnih varijabli. Detalje o analizi podataka koji nedostaju i korištenoj metodi multiple imputacije vidi u poglavlju Statistička analiza podataka (str. 35).

Tablica 4. Deskriptivna statistika i osnovna analiza podataka koji nedostaju u prvom ispitivanju

Osobe s posttraumatskim stresnim poremećajem (n=39)								Osobe bez posttraumatskog stresnog poremećaja (zdrave kontrole, n=37)							
Varijabla	n ¹	$\bar{X}$ / Medijan ²	SD/Q1-Q3	O (n)	p ³	Nedostaje		n	$\bar{X}$ / Medijan	SD/Q1-Q3	O (n)	p	Nedostaje		Transf.
						n	%						n	%	
Hormoni															
Kortizol (µg/100mL)	31	16,45	14,55-21,15	0	0,169	8	20,5	32	14,97	12,01-16,84	0	0,892	5	13,5	sqrt
Prolaktin (µg/L)	32	11,12	7,29-29,55	1	0,322	8	20,5	30	5,62	3,53-7,18	0	0,784	7	18,9	ln
Citokini															
IL-6 (pg/mL)	39	10,98	7,73-21,80	6	0,488	6	15,4	29	7,47	5,91-14,43	1	0,082	9	24,3	box ⁴
TNF-a (pg/mL)	38	17,87	15,60-19,68	2	<0,001*	3	7,7	28	9,41	1,37-15,35	0	0,002	9	24,3	
Citotoksičnost NK-stanica (% lize)															
25:1	39	33,00	20,00-45,00	0	0,482	0	0,0	34	19,50	11,00-36,00	0	0,037*	3	8,1	sqrt
50:1	39	49,90	17,34	0	0,109	0	0,0	34	38,38	15,88	0	0,551	3	8,1	
100:1	39	60,51	17,07	0	0,040*	0	0,0	34	45,06	16,20	0	0,354	3	8,1	
Ekspresija GR (m.f.i.)															
Limfociti	35	30,64	6,57	0	0,375	4	10,3	24	45,79	9,73	0	0,646	13	35,1	
CD3+	35	25,40	21,99-31,32	0	0,336	4	10,3	24	44,15	38,44-52,39	0	0,478	13	35,1	sqrt
CD4+	35	24,53	21,31-29,97	0	0,221	4	10,3	24	44,09	37,50-52,03	0	0,465	13	35,1	sqrt
CD8+	35	25,31	22,66-30,66	0	0,660	4	10,3	23	43,28	39,54-52,34	0	0,117	14	37,8	ln
CD20+	35	32,01	7,95	0	0,041*	4	10,3	24	44,66	9,69	0	0,107	13	35,1	
CD20+CD23+	35	31,91	7,77	0	0,033*	4	10,3	24	44,46	9,31	0	0,140	13	35,1	
CD16+CD56+	35	36,72	8,54	0	0,074	4	10,3	24	51,95	9,91	0	0,448	13	35,1	
CD45RO+	35	30,06	7,50	0	0,377	4	10,3	23	42,96	10,13	0	0,418	14	37,8	
CD4+CD45RO+	35	29,91	7,71	0	0,429	4	10,3	23	42,90	10,07	0	0,454	14	37,8	
Broj limfocita/µL	28	3760,75	1343,67	0	0,265	11	28,2	26	2405,06	1060,46	0	0,012*	11	29,7	
Imunofenotip (% od limfocita)															
CD3+	38	73,12	67,56-78,00	0	0,411	1	2,6	37	67,40	60,00-72,34	0	0,472	0	0,0	square
CD4+	38	47,19	5,80	1	0,463	1	2,6	35	36,65	9,48	0	0,264	2	5,4	
CD8+	38	25,87	5,31	1	0,487	1	2,6	37	24,56	6,87	0	0,589	0	0,0	
CD20+	38	12,46	5,00	0	0,037*	1	2,6	37	11,67	3,02	0	0,045*	0	0,0	
CD20+CD23+	38	5,81	4,00-9,02	0	0,109	1	2,6	37	6,00	5,00-8,00	0	0,533	0	0,0	ln
CD16+CD56+	39	19,69	12,29-24,85	0	0,464	0	0,0	37	24,20	17,65-28,00	0	0,196	0	0,0	sqrt
CD45RO+	39	53,36	11,17	0	0,169	0	0,0	35	47,05	9,79	0	0,137	2	5,4	
CD4+CD45RO+	38	35,38	7,97	0	0,639	1	2,6	35	26,24	8,52	0	0,038*	2	5,4	

Kratice: **box** – Box-Cox; **GR** – glukokortikoidni receptor; **IL-6** – interleukin-6; **ln** – prirodni logaritam; **m.f.i.** – srednji intenzitet fluorescencije (od engl. *mean fluorescence intensity*); **NK** – urođenoubilački (od engl. *Natural Killer*); **norm.** – normalnost distribucije; **O** – vrijednost koja odskake (od engl. *outlier*); **Q1** – donji kvartil; **Q2** – gornji kvartil; **SD** – standardna devijacija; **sqrt** – drugi korijen; **square** – kvadrat; **TNF-α** – faktor nekroze tumora alfa (od engl. *Tumor Necrosis Factor*); **Transf.** – transformacija

* Statistički značajno ($p < 0,05$)

¹ Broj ispitanika koji su imali dostupne podatke za varijablu.

² Ukoliko je varijabla inicijalno bila normalno distribuirana prikazana je aritmetičkom sredinom ($\bar{X}$) i standardnom devijacijom (SD), a ukoliko nije slijedila normalnu distribuciju prikazana je medijanom i interkvartilnim rasponom (Q1-Q3). Parametri su izračunati koristeći podatke koji su bili dostupni (bez nadomještanja) nakon izbacivanja vrijednosti koje odskakuju.

³ p-vrijednost Shapiro-Wilkovog testa za normalnost distribucije nakon primijenjene transformacije (ako je $p < 0,05$ varijabla ne slijedi normalnu distribuciju).

⁴ Box-Cox transformacija ima oblik $T(x) = (x^\lambda - 1)/\lambda$ pri čemu se vrijednost λ za zavisnu varijablu procjenjuje na temelju multiple regresije.

Tablica 5. Deskriptivna statistika i osnovna analiza podataka koji nedostaju u drugom ispitivanju

Varijabla	Osobe s posttraumatskim stresnim poremećajem (n=39)							Osobe bez posttraumatskog stresnog poremećaja (zdrave kontrole, n=25)								Transf.
	n ¹	$\bar{X}$ / Medijan ²	SD/Q1-Q3	O (n)	p ³	Nedostaje		n	$\bar{X}$ / Medijan	SD/Q1-Q3	O (n)	p	Nedostaje			
						n	%						n	%		
Hormoni																
Kortizol (µg/100mL)	39	13,34	9,09-20,00	0	0,520	0	0,0	25	11,30	7,81-14,08	0	0,892	0	0,0	sqrt	
Prolaktin (µg/L)	39	9,79	5,73-23,81	1	0,065	1	2,6	25	5,51	4,16-7,86	0	0,784	0	0,0	ln	
Citokini																
IL-6 (pg/mL)	36	1,72	1,30-3,07	1	0,123	4	10,3	25	1,65	1,23-2,78	3	0,082	3	12,0	Box ⁴	
TNF-a (pg/mL)	36	9,21	7,48-11,15	1	0,694	4	10,3	25	9,31	7,85-10,78	0	0,002	0	0,0		
Citotoksičnost NK-stanica (% lize)																
25:1	39	28,00	18,00-41,00	0	0,916	0	0,0	23	30,00	18,00-51,00	0	0,037	2	8,0	sqrt	
50:1	39	46,59	17,65	0	0,292	0	0,0	23	49,52	18,11	0	0,551	2	8,0		
100:1	39	56,51	17,13	0	0,275	0	0,0	23	59,65	17,26	0	0,354	2	8,0		
Ekspresija GR (m.f.i.)																
Limfociti	39	42,84	11,40	0	0,048	0	0,0	25	39,93	8,14	0	0,646	0	0,0		
CD3+	39	43,47	31,49-52,91	0	0,029	0	0,0	25	38,95	26,49-44,15	0	0,478	0	0,0	sqrt	
CD4+	39	42,36	30,14-51,87	0	0,038	0	0,0	25	43,00	37,91-49,45	0	0,465	0	0,0	sqrt	
CD8+	39	45,16	31,68-54,40	0	0,005	0	0,0	25	45,37	39,36-49,94	0	0,117	0	0,0	ln	
CD20+	39	44,52	10,88	0	0,180	0	0,0	25	46,42	9,40	0	0,107	0	0,0		
CD20+CD23+	39	43,10	11,50	0	0,134	0	0,0	25	45,76	9,74	0	0,140	0	0,0		
CD16+CD56+	39	50,93	11,62	0	0,039	0	0,0	25	52,35	6,84	0	0,448	0	0,0		
CD45RO+	39	44,22	11,48	0	0,122	0	0,0	25	49,08	10,76	0	0,418	0	0,0		
CD4+CD45RO+	39	43,20	11,42	0	0,084	0	0,0	25	47,10	8,87	0	0,454	0	0,0		
Broj limfocita/µL	39	2294,65	669,06	0	0,701	0	0,0	24	1817,24	637,04	0	0,012	1	4,0		
Imunofenotip (% od limfocita)																
CD3+	39	72,00	64,00-77,00	0	0,083	0	0,0	25	68,00	65,00-74,00	0	0,472	0	0,0	square	
CD4+	39	44,59	7,13	1	0,084	0	0,0	23	42,39	7,67	0	0,264	2	8,0		
CD8+	39	23,31	6,31	1	0,188	0	0,0	23	21,57	4,72	0	0,589	2	8,0		
CD20+	38	11,48	3,05	0	0,046	0	0,0	25	12,15	4,85	0	0,045	0	0,0		
CD20+CD23+	38	4,80	2,90-6,00	0	0,294	0	0,0	25	5,60	3,30-7,60	0	0,533	0	0,0	ln	
CD16+CD56+	39	16,00	13,00-23,00	0	0,876	0	0,0	25	17,00	15,00-21,00	0	0,196	0	0,0	sqrt	
CD45RO+	39	45,10	9,19	0	0,336	0	0,0	25	44,28	8,49	0	0,137	0	0,0		
CD4+CD45RO+	39	30,31	5,84	0	0,061	0	0,0	25	28,04	7,23	0	0,038	0	0,0		

Kratice: box – Box-Cox; GR – glukokortikoidni receptor; IL-6 – interleukin-6; ln – prirodni logaritam; m.f.i. – srednji intenzitet fluorescencije (od engl. *mean fluorescence intensity*); NK – urođenoubilački (od engl. *Natural Killer*); O – vrijednost koja odskakače (od engl. *outlier*); Q1 – donji kvartil; Q2 – gornji kvartil; SD – standardna devijacija; sqrt – drugi korijen; square – kvadrat; TNF-α - faktor nekroze tumora alfa (od engl. *Tumor Necrosis Factor*); Transf. – transformacija

* Statistički značajno (p<0,05)

¹ Broj ispitanika koji su imali dostupne podatke za varijablu.

² Ukoliko je varijabla inicijalno bila normalno distribuirana prikazana je aritmetičkom sredinom ($\bar{X}$) i standardnom devijacijom (SD), a ukoliko nije slijedila normalnu distribuciju prikazana je medijanom i interkvartilnim rasponom (Q1-Q3). Parametri su izračunati koristeći podatke koji su bili dostupni (bez nadomještanja) nakon izbacivanja vrijednosti koje odskakuju.

³ p-vrijednost Shapiro-Wilkovog testa za normalnost distribucije nakon primijenjene transformacije (ako je $p < 0,05$) varijabla ne slijedi normalnu distribuciju).

⁴ Box-Cox transformacija ima oblik $T(X) = (X^\lambda - 1)/\lambda$ pri čemu se vrijednost λ za zavisnu varijablu procjenjuje na temelju multiple regresije.

4.3 USPOREDBA GRUPA I PROMJENE TIJEKOM VREMENA

Rezultati usporedbe grupa u prvom ispitivanju prikazani su u tablici (Tablica 6, str. 48). Vidljivo je da je niz varijabli bio promijenjeno u osoba s PTSP-om u odnosu na zdrave kontrole, za razliku od drugog ispitivanja (Tablica 7, str. 50) gdje postoji razlika između samo dvije varijable. U tablicama nije prisutna varijabla TNF- α budući da, zbog svoje distribucije, nije mogla biti uključena u multivarijatan model. U sljedećoj tablici (Tablica 8, str. 52) vidljivo je kod kojih je varijabli došlo do značajnih promjena između dva ispitivanja u osoba s PTSP-om, odnosno zdravih kontrola. Značajne promjene tijekom vremena dogodile su se uglavnom unutar onih varijabli kod kojih je inicijalno postojala razlika između grupa. U ovoj tablici nisu prisutni niti TNF- α , niti IL-6 zbog toga jer se metoda određivanja koncentracije ovih faktora tijekom vremena značajno promijenila pa se rezultati nisu mogli uspoređivati (vidi poglavlje Određivanje koncentracije citokina u serumu, str. 30). Slijedi detaljna analiza pojedinih varijabli.

Tablica 6. Usporedba varijabli između grupa u prvom ispitivanju¹

		$\bar{X}^2$	95%-tni interval pouzdanosti		β^3	SE	t	FDR (d) ⁴	p
			Donja granica	Gornja granica					
Hormoni									
Kortizol (µg/100mL)	PTSP	17,99	16,20	19,88	0,483	0,151	3,205	0,029	0,002*
	Kontrole	14,13	12,73	15,60					
Prolaktin (µg/L)	PTSP	12,97	8,45	19,90	0,944	0,324	2,912	0,033	0,014*
	Kontrole	5,05	3,35	7,60					
Citokini									
IL-6 (pg/mL)	PTSP	9,82	8,23	11,91	0,055	0,051	1,088	0,046	0,282
	Kontrole	8,38	6,75	10,66					
Citotoksičnost NK stanica (%)									
25:1	PTSP	31,36	26,45	36,68	0,888	0,369	2,407	0,035	0,017*
	Kontrole	22,21	17,30	27,72					
50:1	PTSP	49,91	44,48	55,33	10,871	4,176	2,603	0,031	0,009*
	Kontrole	39,04	33,04	45,03					
100:1	PTSP	60,38	55,00	65,75	14,513	4,066	3,570	0,027	<0,001*
	Kontrole	45,86	40,10	51,63					
Ekspresija GR (m.f.i.)									
Limfociti	PTSP	30,47	27,81	33,14	-13,295	2,164	-6,144	0,006	<0,001*
	Kontrole	43,77	39,72	47,82					
CD3+	PTSP	25,86	23,41	28,43	-1,301	0,185	-7,017	0,002	<0,001*
	Kontrole	40,78	37,39	44,30					
CD4+	PTSP	25,27	22,78	27,89	-1,327	0,191	-6,954	0,004	<0,001*
	Kontrole	40,38	36,87	44,05					
CD8+	PTSP	26,50	24,55	28,61	-0,435	0,071	-6,145	0,013	<0,001*
	Kontrole	40,92	35,29	47,46					
CD20+	PTSP	31,98	29,23	34,72	-11,058	2,432	-4,548	0,015	<0,001*
	Kontrole	43,04	38,26	47,82					
CD20+CD23+	PTSP	31,91	29,24	34,59	-10,945	2,142	-5,110	0,010	<0,001*
	Kontrole	42,86	38,93	46,79					
CD16+CD56+	PTSP	36,56	33,13	39,99	-10,464	2,721	-3,845	0,023	<0,001*
	Kontrole	47,03	41,92	52,14					
CD45RO+	PTSP	30,36	27,08	33,64	-8,809	2,347	-3,753	0,019	<0,001*
	Kontrole	39,17	35,92	42,42					
CD4+CD45RO+	PTSP	30,16	26,94	33,37	-10,227	2,430	-4,210	0,017	<0,001*
	Kontrole	40,38	36,85	43,91					
Broj limfocita/µL	PTSP	3720,42	3101,89	4338,95	1417,360	548,106	2,586	0,038	0,023*
	Kontrole	2303,06	1271,54	3334,58					
Imunofenotip (% od limfocita)									
CD3+	PTSP	73,55	71,15	75,88	930,070	256,840	3,621	0,025	<0,001*
	Kontrole	66,93	64,21	69,54					
CD4+	PTSP	46,93	44,42	49,43	10,077	1,856	5,429	0,008	<0,001*
	Kontrole	36,85	34,26	39,44					
CD8+	PTSP	25,94	23,94	27,94	1,159	1,473	0,787	0,050	0,431
	Kontrole	24,78	22,75	26,81					
CD20+	PTSP	12,54	11,18	13,89	0,902	0,995	0,907	0,048	0,365
	Kontrole	11,63	10,27	13,00					
CD20+CD23+	PTSP	6,23	5,42	7,17	0,122	0,103	1,184	0,044	0,236
	Kontrole	5,52	4,79	6,36					
CD16+CD56+	PTSP	19,65	16,95	22,54	-0,326	0,230	-1,421	0,042	0,160
	Kontrole	22,64	19,67	25,83					
CD45RO+	PTSP	53,03	49,67	56,40	5,368	2,530	2,122	0,040	0,034*
	Kontrole	47,67	44,07	51,27					
CD4+CD45RO+	PTSP	34,55	31,68	37,42	8,014	2,160	3,710	0,021	<0,001*
	Kontrole	26,53	23,48	29,59					

Kratice: FDR – engl. *False Discovery Rate*; GR – glukokortikoidni receptor; IL-6 – interleukin-6; m.f.i. – srednji intenziteta fluorescencije (od engl. *mean fluorescence intensity*); NK – urođenoubilački (od engl. *Natural Killer*); SE – standardna pogreška (od engl. *Standard Error*)

* Statistički značajno ($p < 0,05$)

¹ Analiza je provedena upotrebom multivarijatnog generalnog linearnog modela uz dob i pušenje kao kovarijate nakon multiple imputacije na 5 imputiranih baza. Boxov M-test ($df_1=300$, $df_2=16544,530$, $p > 0,05$) za svih 5 imputacija upućivao je na jednakost matrica kovarijanci između grupa. Svaki od multivarijatnih testova (Pillai's Trace, Wilks' Lambda, Hotelling's Trace i Roy's Largest Root) upućivao je na značajan efekt grupe u svih 5 imputacija ($p < 0,001$).

² Procijenjene vrijednosti nakon 5 imputacija. Ukoliko je analiza bila provedena na transformiranim varijablama aritmetička sredina, gornja i donja granica intervala pouzdanosti povratno su transformirani.

³ Nakon što smo potvrdili značajnost multivarijatnog modela, proveden je odgovarajući broj usporedbi univarijatnim generalnim linearnim modelom uz dob i pušenje kao kovarijate. Pripadajući β , SE, t i p, koji upućuju na efekt grupe, kombinirane su vrijednosti 5 analiza nakon 5 imputacija.

⁴ Faktor d dobiven je temeljem FDR analize (vidi poglavlje *Statistička analiza podataka*) da bi se spriječilo pogrešno zaključivanje zbog višestrukih usporedbi. Efekt grupe za varijablu je značajan na nivou $p < 0,05$ ukoliko je $p < d$.

Tablica 7. Usporedba varijabli između grupa u drugom ispitivanju¹

		$\bar{X}^2$	95%-tni interval pouzdanosti		β^3	SE	t	FDR (d) ⁴	p
			Donja granica	Gornja granica					
Hormoni									
Kortizol (µg/100mL)	PTSP	13,46	11,27	15,85	0,232	0,257	0,902	0,027	0,371
	Kontrole	11,81	9,26	14,68					
Prolaktin (µg/L)	PTSP	11,82	9,31	15,00	0,740	0,198	3,731	0,002	<0,001*
	Kontrole	5,64	4,26	7,48					
Citokini									
IL-6 (pg/mL)	PTSP	1,74	1,16	2,44	0,099	0,246	0,402	0,044	0,690
	Kontrole	1,52	0,68	2,72					
Citotoksičnost NK stanica (%)									
25:1	PTSP	29,35	23,90	35,37	-0,347	0,456	-0,760	0,035	0,447
	Kontrole	33,23	25,64	41,81					
50:1	PTSP	47,54	41,85	53,23	-1,434	4,957	-0,289	0,046	0,773
	Kontrole	48,98	41,32	56,63					
100:1	PTSP	57,53	52,03	63,04	-0,667	4,805	-0,139	0,050	0,890
	Kontrole	57,92	50,67	65,18					
Ekspresija GR (m.f.i.)									
Limfociti	PTSP	43,13	39,74	46,52	3,608	2,788	1,294	0,017	0,201
	Kontrole	39,52	35,25	43,80					
CD3+	PTSP	41,42	37,61	45,40	0,379	0,249	1,524	0,013	0,133
	Kontrole	36,68	32,20	41,45					
CD4+	PTSP	40,55	36,86	44,42	-0,210	0,244	-0,861	0,029	0,393
	Kontrole	43,27	38,49	48,35					
CD8+	PTSP	42,82	39,48	46,47	-0,035	0,067	-0,515	0,042	0,608
	Kontrole	44,35	40,01	49,14					
CD20+	PTSP	44,25	40,84	47,65	-2,593	2,802	-0,926	0,025	0,358
	Kontrole	46,84	42,55	51,14					
CD20+CD23+	PTSP	42,73	39,17	46,28	-3,611	2,928	-1,233	0,019	0,222
	Kontrole	46,34	41,85	50,83					
CD16+CD56+	PTSP	50,64	47,33	53,94	-2,176	2,720	-0,800	0,031	0,427
	Kontrole	52,81	48,64	56,98					
CD45RO+	PTSP	43,62	39,99	47,24	-6,403	2,983	-2,146	0,006	0,036
	Kontrole	50,02	45,45	54,59					
CD4+CD45RO+	PTSP	42,87	39,41	46,32	-4,754	2,843	-1,672	0,010	0,100
	Kontrole	47,62	43,26	51,98					
Broj limfocita/µL	PTSP	2296,42	2079,12	2513,72	502,517	186,143	2,700	0,004	0,007*
	Kontrole	1793,90	1506,72	2081,09					
Imunofenotip (% od limfocita)									
CD3+	PTSP	70,91	68,27	73,46	411,986	302,782	1,361	0,015	0,179
	Kontrole	67,94	64,43	71,28					
CD4+	PTSP	44,90	42,50	47,30	3,634	2,148	1,692	0,008	0,092
	Kontrole	41,27	37,87	44,66					
CD8+	PTSP	23,50	21,38	25,61	1,483	1,885	0,787	0,033	0,432
	Kontrole	22,01	19,05	24,98					
CD20+	PTSP	11,48	10,20	12,76	-0,682	1,051	-0,649	0,038	0,519
	Kontrole	12,16	10,55	13,77					
CD20+CD23+	PTSP	4,37	3,65	5,23	-0,081	0,148	-0,546	0,040	0,587
	Kontrole	4,74	3,77	5,95					
CD16+CD56+	PTSP	16,26	14,10	18,57	-0,261	0,228	-1,144	0,023	0,257
	Kontrole	18,43	15,55	21,55					
CD45RO+	PTSP	44,61	41,77	47,45	-0,436	2,339	-0,186	0,048	0,853
	Kontrole	45,05	41,46	48,63					
CD4+CD45RO+	PTSP	30,22	28,11	32,33	2,038	1,739	1,172	0,021	0,246
	Kontrole	28,18	25,51	30,85					

Kratice: FDR – engl. *False Discovery Rate*; GR – glukokortikoidni receptor; IL-6 – interleukin-6; m.f.i. – srednji intenzitet fluorescencije (od engl. *mean fluorescence intensity*); NK – urođenoubilački (od engl. *Natural Killer*); SE – standardna pogreška (od engl. *Standard Error*)

* Statistički značajno ($p < 0,05$)

¹ Analiza je provedena upotrebom multivarijatnog generalnog linearnog modela uz dob i pušenje kao kovarijate nakon multiple imputacije na 5 imputiranih baza. Boxov M-test ($df_1=300$, $df_2= 8078,248$, $p > 0,05$) za svih 5 imputacija upućivao je na jednakost matrica kovarijanci između grupa. Značajnosti multivarijatnih testova (*Pillai's Trace*, *Wilks' Lambda*, *Hotelling's Trace*, *Roy's Largest Root*) za 5 analiza bile su redom (za svaku analizu): 1. $p=0,042$; 2. $p= 0,030$; 3. $p=0,034$; 4. $p=0,027$; 5. $p=0,041$. Prema tome, efekt grupe bio je značajan u svih 5 imputacija ($p < 0,05$).

² Procijenjene vrijednosti nakon 5 imputacija. Ukoliko je analiza bila provedena na transformiranim varijablama aritmetička sredina, gornja i donja granica intervala pouzdanosti povratno su transformirani.

³ Nakon što smo potvrdili značajnost multivarijatnog modela, proveden je odgovarajući broj usporedbi univarijatnim generalnim linearnim modelom uz dob i pušenje kao kovarijate. Pripadajući β , SE, t i p, koji upućuju na efekt grupe, kombinirane su vrijednosti 5 analiza nakon 5 imputacija.

⁴ Faktor d dobiven je temeljem FDR analize (vidi poglavlje *Statistička analiza podataka*) kako bi se spriječilo pogrešno zaključivanje zbog višestrukih usporedbi. Efekt grupe za varijablu je značajan na nivou $p < 0,05$ ukoliko je $p < d$.

Tablica 8. Usporedba varijabli između dva ispitivanja po grupi¹

Varijabla	Osobe s posttraumatskim stresnim poremećajem (n=39)				Osobe bez posttraumatskog stresnog poremećaja (zdrave kontrole, n=25)			
	Srednja razlika ²	t ³	FDR (d) ³	p	Srednja razlika	t	FDR(d)	p
Hormoni								
Kortizol (µg/100mL)	-0,44	-2,265	0,024	0,024*	-0,43	-2,239	0,025	0,025*
Prolaktin (µg/L)	-0,10	-0,506	0,047	0,613	0,06	0,375	0,048	0,708
Citotoksičnost NK stanica (%)								
25:1	-0,22	-0,793	0,040	0,433	1,45	3,554	0,016	<0,001*
50:1	-3,31	-0,803	0,039	0,427	16,27	3,714	0,014	<0,001*
100:1	-4,00	-1,067	0,037	0,293	19,44	4,095	0,013	<0,001*
Ekspresija GR (m.f.i.)								
Limfociti	12,17	5,432	0,010	<0,001*	-8,37	-3,631	0,015	<0,001*
CD3+	1,35	6,741	0,004	<0,001*	-0,73	-3,296	0,021	0,001*
CD4+	1,33	6,804	0,003	<0,001*	-0,20	-0,755	0,042	0,452
CD8+	0,47	7,211	0,002	<0,001*	0,06	0,639	0,043	0,528
CD20+	12,44	5,518	0,009	<0,001*	-1,50	-0,544	0,046	0,587
CD20+CD23+	11,15	4,769	0,012	<0,001*	-2,12	-0,765	0,041	0,444
CD16+CD56+	14,27	5,846	0,008	<0,001*	-3,38	-1,418	0,030	0,156
CD45RO+	14,15	6,586	0,005	<0,001*	1,88	0,604	0,045	0,546
CD4+CD45RO+	13,25	6,147	0,007	<0,001*	0,44	0,165	0,050	0,869
Broj limfocita/µL	-1466,56	-8,284	0,001	<0,001*	-753,33	-5,310	0,011	<0,001*
Imunofenotip (% od limfocita)								
CD3+	-477,27	-1,784	0,028	0,074	412,31	1,452	0,032	0,160
CD4+	-2,58	-1,924	0,027	0,054	6,68	3,096	0,022	0,002*
CD8+	-2,57	-1,967	0,026	0,049	-2,63	-1,658	0,029	0,097
CD20+	-0,95	-0,993	0,038	0,321	0,27	0,210	0,049	0,835
CD20+CD23+	-0,34	-2,915	0,023	0,004*	-0,21	-1,354	0,034	0,188
CD16+CD56+	-0,33	-1,300	0,035	0,201	-0,61	-3,943	0,020	0,001*
CD45RO+	-8,25	-3,822	0,017	<0,001*	-2,83	-1,162	0,036	0,245
CD4+CD45RO+	-5,03	-3,479	0,018	0,001*	2,95	1,399	0,033	0,162

Kratice: **FDR** – engl. *False Discovery Rate*; **GR** – glukokortikoidni receptor; **IL-6** – interleukin-6; **mfi** – srednja vrijednost intenziteta fluorescencije (od engl. *mean fluorescence intensity*); **NK** – urođenoubilački (od engl. *Natural Killer*)

¹ Usporedba varijabli između prvog i drugog ispitivanja za svaku od grupa učinjena je pomoću t-testova za zavisne uzorke na 5 imputiranih baza.

² Srednja razlika aritmetičkih sredina (kombinirana vrijednost 5 imputiranih baza). Negativan predznak označava sniženje vrijednosti u drugom ispitivanju. Povratna transformacija nije učinjena za transformirane varijable.

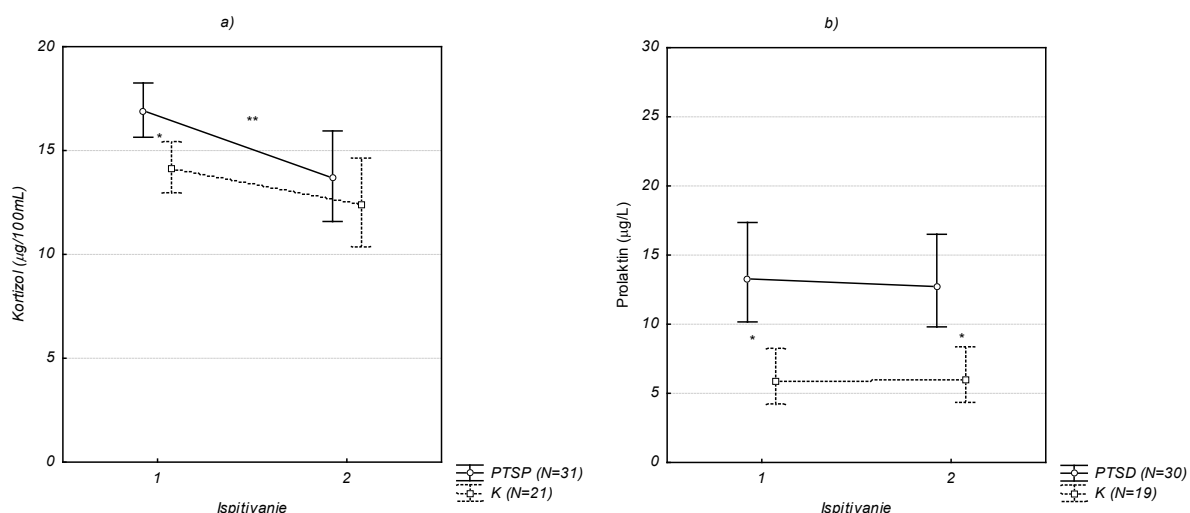
³ Faktor d dobiven je temeljem FDR analize (vidi poglavlje Statistička analiza podataka) kako bi se spriječilo pogrešno zaključivanje zbog višestrukih usporedbi. Razlika je značajna na nivou p<0,05 ukoliko je p<d.

4.3.1 HORMONI

Koncentracija kortizola u prvom je ispitivanju bila povišena u osoba s PTSP-om (Tablica 6, str. 48; Slika 3a). U drugom ispitivanju dolazi do značajnog pada koncentracije kortizola u PTSP grupi (Tablica 8, str. 52; Slika 3a) tako da se ova grupa više nije razlikovala od zdravih kontrola (Tablica 7, str. 50, Slika 3a). Rezultati analize na temelju multiplih imputacija upućuju na značajan pad razine kortizola i u zdravih kontrola (Tablica 8, str. 52), ali kako u drugom ispitivanju nema razlike između grupa možemo zaključiti da je u osoba s PTSP-om taj pad bio izraženiji.

Prolaktin je u osoba s PTSP-om bio viši kako u prvom (Tablica 6, str. 48; Slika 3b), tako i u drugom ispitivanju (Tablica 7, str. 50; Slika 3b).

Slika 3. Koncentracije kortizola i prolaktina u serumu



Kratice: PTSP – osobe s posttraumatskim stresnim poremećajem; K – zdrave kontrole

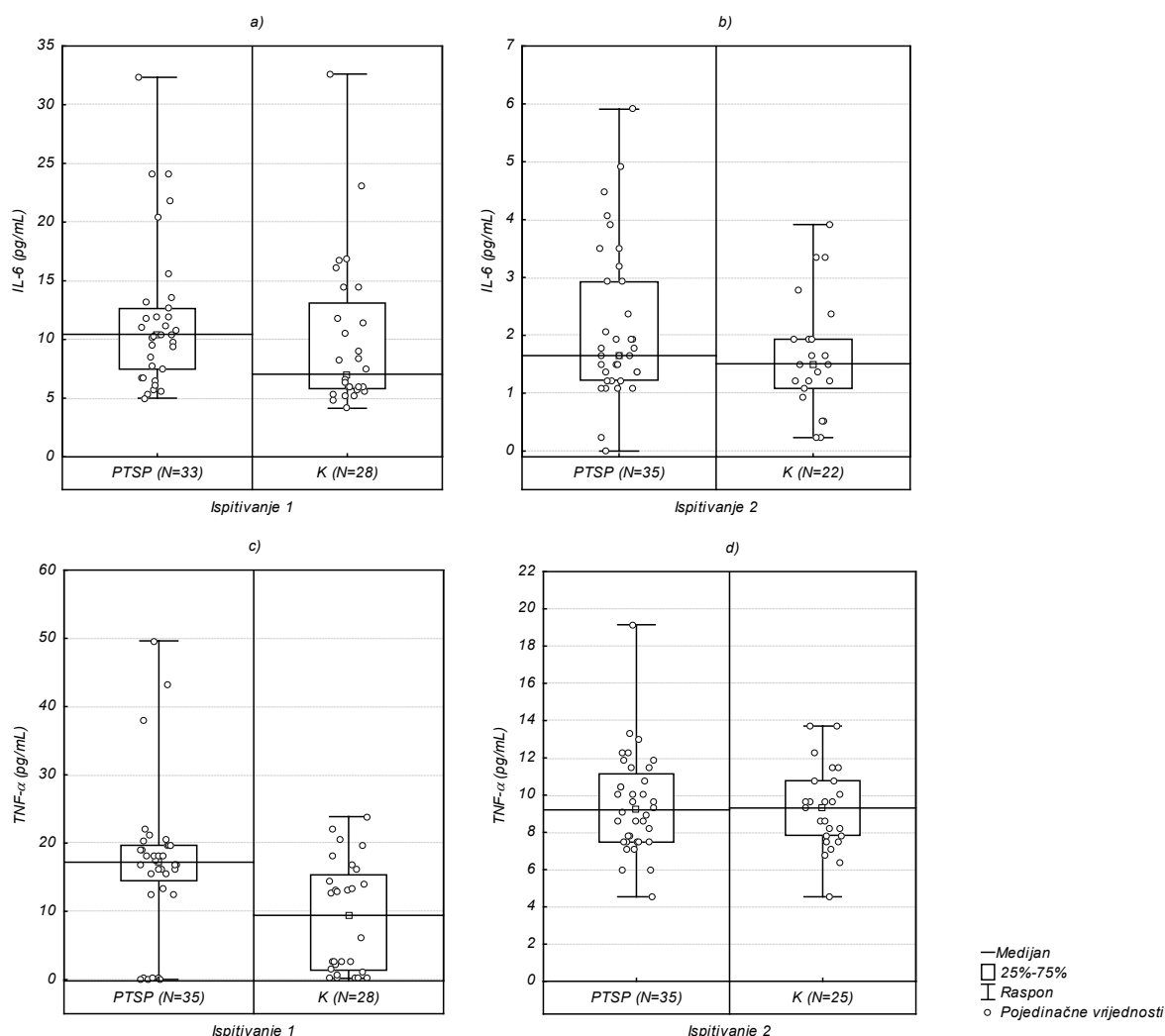
Središnja točka označava aritmetičku sredinu, a vertikalne crte 95%-tni interval pouzdanosti aritmetičke sredine.

Varijable su analizirane pomoću ANOVA-e za ponavljana mjerenja (2x2 dizajn, grupa x vrijeme, dob i pušenje kao kovarijate) na originalnim vrijednostima (bez imputacije). Ukoliko je interakcija faktora bila značajna, grupe su uspoređene pomoću četiri kontrasta tj. svaka grupa u vremenu, odnosno razlika između grupa u pojedinoj vremenskoj točki. Izdvojene su usporedbe koje su bile statistički značajne (kratica označava grupu, a broj ispitivanje). **a)** PTSP1 vs. K1, $F(1,50)=4,574$, $p=0,037$ (*); PTSP1 vs. PTSP2, $F(1,50)=7,728$, $p=0,008$ (**), **b)** PTSP1 vs. K1, $F(1,47)=14,638$, $p<0,001$ (*); PTSP2 vs. K2, $F(1,47)=12,911$, $p<0,001$ (*)

4.3.2 CITOKINI

Koncentracija IL-6 nije se niti u jednom ispitivanju razlikovala između grupa (Tablica 6, str. 48; Tablica 7, str. 50; Slika 4 a i b) dok je koncentracija TNF- α bila povišena u osoba s PTSP-om u odnosu na zdrave kontrole prilikom prvog ispitivanja (Slika 4c).

Slika 4. Koncentracije citokina u serumu



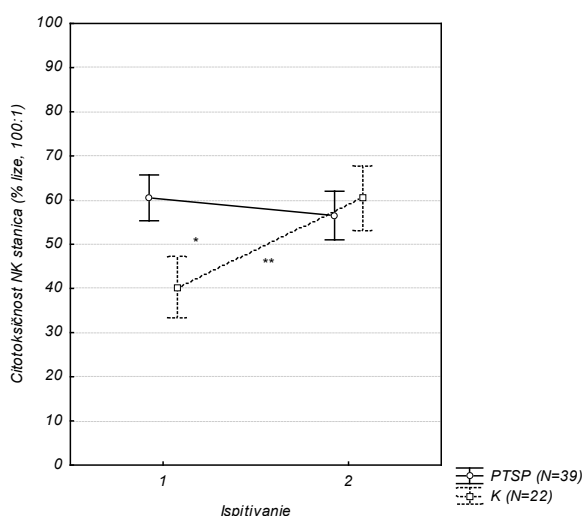
Kratice: PTSP – osobe s posttraumatskim stresnim poremećajem; K – zdrave kontrole

Razlika između grupa analizirana je pomoću Mann-Whitney U testa. **a)** U=341,5, p=0,081, **b)** U=306,5, p=0,198, **c)** U=309,0, p=0,008, **d)** U=433,5, p=0,952

4.3.3 CITOTOKSIČNOST NK-STANICA

Citotoksičnost NK-stanica je u sva tri omjera efektorskih prema ciljnim stanicama (100:1, 50:1, 25:1) bila povišena u osoba s PTSP-om u odnosu na zdrave kontrole prilikom prvog ispitivanja (Tablica 6, str. 48; Slika 5). U drugom ispitivanju nije bilo razlike. Međutim, očekivano sniženje NK-citotoksičnosti unutar PTSP grupe nije nastupilo, već je došlo do povišenja NK-citotoksičnosti kod zdravih kontrola (Tablica 8, str. 52; Slika 5).

Slika 5. Citotoksičnost NK-stanica (omjer efektorskih prema ciljnim stanicama, 100:1)



Kratice: PTSP – osobe s posttraumatskim stresnim poremećajem; K – zdrave kontrole

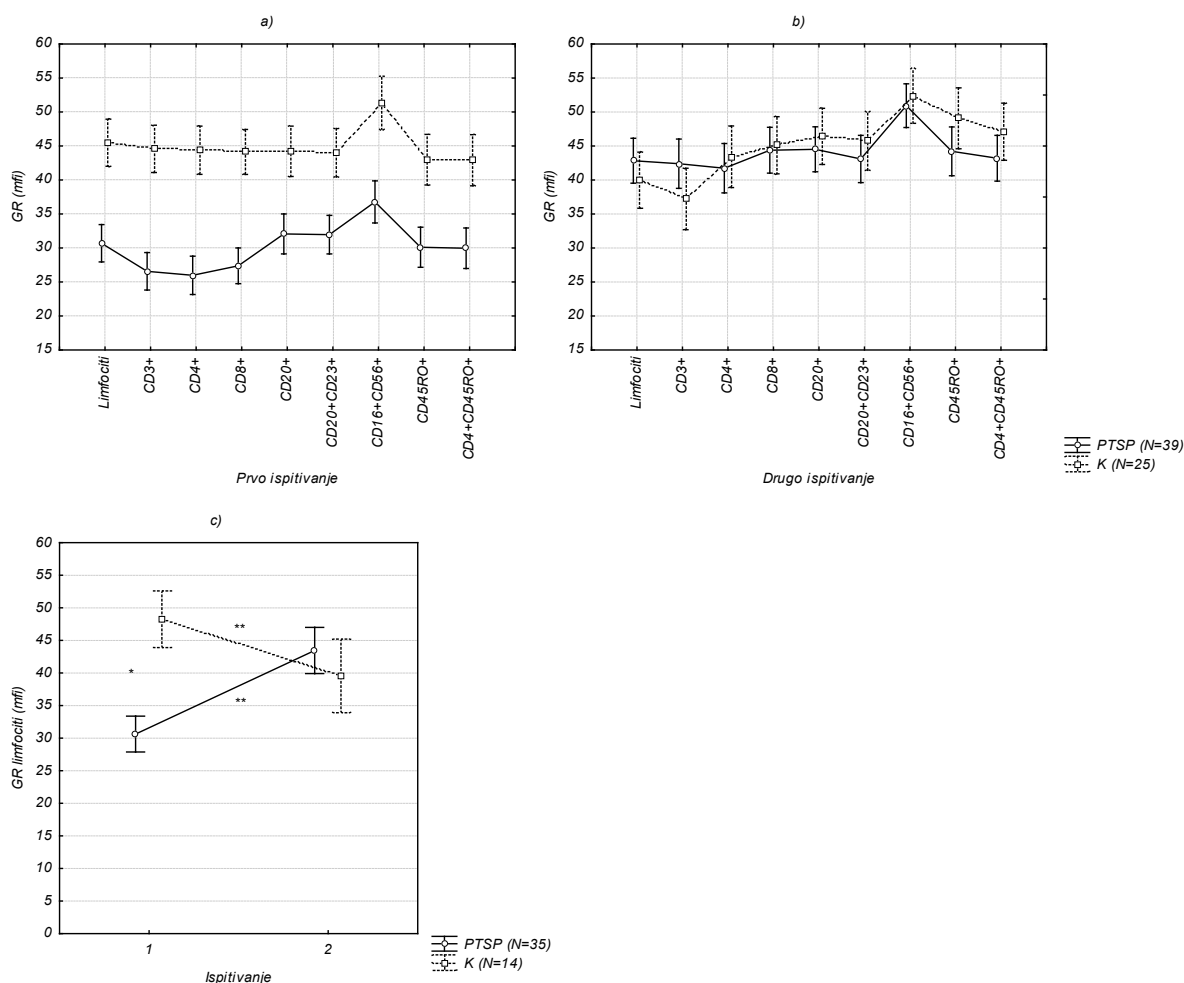
Središnja točka označava aritmetičku sredinu, a vertikalne crte 95%-tni interval pouzdanosti aritmetičke sredine.

Varijable su analizirane pomoću ANOVA-e za ponavljana mjerenja (2x2 dizajn, grupa x vrijeme, dob i pušenje kao kovarijate) na originalnim vrijednostima (bez imputacije). Ukoliko je interakcija faktora bila značajna, grupe su uspoređene pomoću četiri kontrasta tj. svaka grupa u vremenu, odnosno razlika između grupa u pojedinoj vremenskoj točki. Izdvojene su usporedbe koje su bile statistički značajne (kratica označava grupu, a broj ispitivanje). PTSP1 vs. K1, $F(1,59)=22,007$, $p<0,001$ (*); K1 vs. K2, $F(1,59)=15,843$, $p<0,001$ (**)

4.3.4 EKSPRESIJA GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA

Neovisno o grupi, razina ekspresije GR na pojedinim subpopulacijama limfocita slijedila je specifičan obrazac. Najviša ekspresija GR bila je izmjerena na NK-stanicama (CD16+CD56+) u obje grupe, kako prilikom prvog, tako i prilikom drugog ispitivanja (Slika 6). U prvom ispitivanju osobe s PTSP-om imale su značajno nižu ekspresiju GR u svim subpopulacijama limfocita (Tablica 6, str. 48; Slika 6 a i c) da bi se u drugom ispitivanju ova razlika izgubila (Tablica 7, str. 50; Slika 6 b i c). Kod ispitanika s PTSP-om tijekom vremena je došlo do značajnog povećanja razine GR u svim subpopulacijama limfocita (Tablica 8, str. 52; Slika 6c). U zdravih kontrola primijećen je značajni pad razine GR u ukupnim limfocitima (Tablica 8, str. 52; Slika 6c) što je rezultat sniženja ekspresije poglavito u T-limfocitima (CD3+). Razina ekspresije GR u ostalim subpopulacijama limfocita nije se mijenjala kod zdravih ispitanika, ali budući da T-limfociti predstavljaju najbrojniju subpopulaciju limfocita, to se odrazilo na razinu ekspresije u ukupnim limfocitima.

Slika 6. Ekspresija glukokortikoidnog receptora



Kratice: PTSP – osobe s posttraumatskim stresnim poremećajem; K – zdrave kontrole; GR – glukokortikoidni receptor

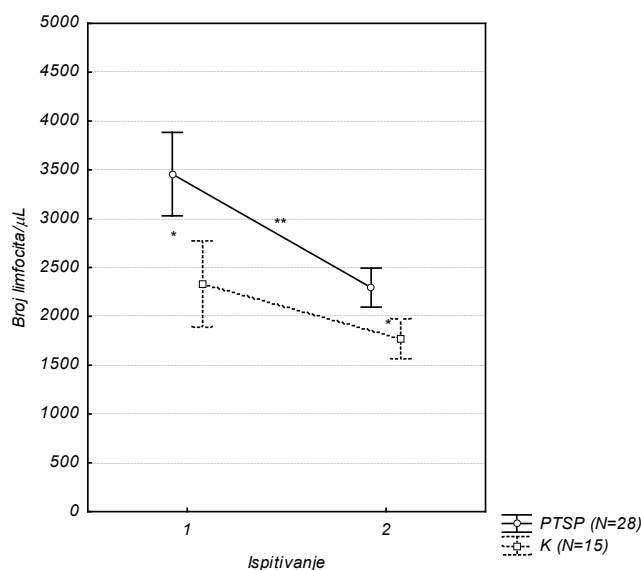
Središnja točka označava aritmetičku sredinu, a vertikalne crte 95%-tni interval pouzdanosti aritmetičke sredine.

a) i b) Profil ekspresije GR po pojedinim subpopulacijama limfocita. Varijable su analizirane pomoću ANOVA-e za ponavljana mjerenja (9x2x2 dizajn, subpopulacija x grupa x vrijeme) pri čemu su subpopulacija i vrijeme bile zavisne varijable. Testirani su kontrasti koji odražavaju razliku ekspresije GR u CD16+CD56+ stanicama prema svim ostalim subpopulacijama po pojedinoj grupi i vremenskoj točki (ukupno 4 analize). Svaki od analiziranih kontrasta bio je statistički značajan u svih 5 imputacija ($p < 0,001$). **c) Ekspresija GR u ukupnim limfocitima.** Varijable su analizirane pomoću ANOVA-e za ponavljana mjerenja (2x2 dizajn, grupa x vrijeme, dob i pušenje kao kovarijate) na originalnim vrijednostima (bez imputacije). Izdvojene su usporedbe koje su bile statistički značajne (kratica označava grupu, a broj ispitivanje). PTSP1 vs. K1, $F(1,47)=47,572$, $p < 0,001$ (*); PTSP1 vs. PTSP2, $F(1,47)=31,159$, $p < 0,001$ (**); K1 vs. K2, $F(1,47)=5,715$, $p=0,021$ (**)

4.3.5 UKUPNI BROJ LIMFOCITA I IMUNOFENOTIP

Ukupni broj limfocita bio je povišen u osoba s posttraumatskim stresnim poremećajem (Slika 7, str. 57), kako u prvom (Tablica 6, str. 48) tako i u drugom ispitivanju (Tablica 7, str. 50). U vremenu između dva ispitivanja došlo je do značajnog pada broja cirkulirajućih limfocita u obje grupe (Slika 7, str. 57; Tablica 8, str. 52).

Slika 7. Ukupni broj limfocita



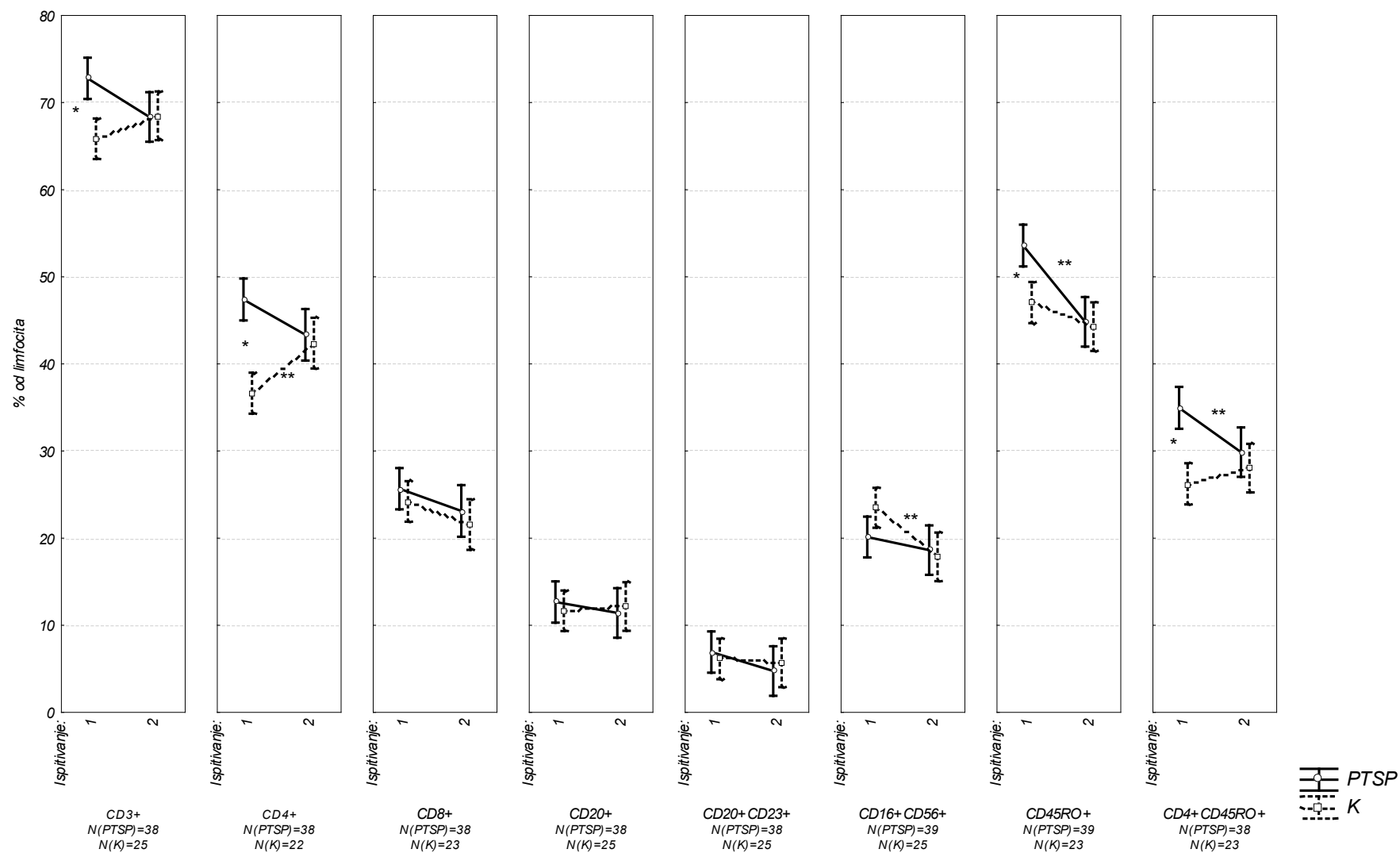
Kratice: PTSP – osobe s posttraumatskim stresnim poremećajem; K – zdrave kontrole

Središnja točka označava aritmetičku sredinu, a vertikalne crte 95%-tni interval pouzdanosti aritmetičke sredine.

Varijable su analizirane pomoću ANOVA-e za ponavljana mjerenja (2x2 dizajn, grupa x vrijeme, dob i pušenje kao kovarijate) na originalnim vrijednostima (bez imputacije). Ukoliko je interakcija faktora bila značajna, grupe su uspoređene pomoću četiri kontrasta tj. svaka grupa u vremenu, odnosno razlika između grupa u pojedinoj vremenskoj točki. Izdvojene su usporedbe koje su bile statistički značajne (kratica označava grupu, a broj ispitivanje). PTSP1 vs. K1, $F(1,41)=8,714$, $p=0,005$ (*); PTSP2 vs. K2, $F(1,41)=13,215$, $p<0,001$ (*); PTSP1 vs. PTSP2, $F(1,41)=43,999$, $p<0,001$ (**); K1 vs. K2, $F(1,41)=5,141$, $p=0,029$ (**).

Tijekom prvog ispitivanja kod ispitanika s posttraumatskim stresnim poremećajem ustanovljen je povećani udio ukupnih T-limfocita (CD3+), pomoćničkih T-limfocita (CD4+), ukupnih memorijskih T-limfocita (CD45RO+) i pomoćničkih memorijskih T-limfocita (CD4+CD45RO+) (Slika 8, str. 58; Tablica 6, str. 48). U drugom ispitivanju nismo uočili značajne razlike između ispitanika i zdravih kontrola (Slika 8, str. 58; Tablica 7, str. 50). Tijekom vremena značajno je porastao udio pomoćničkih T-limfocita u zdravih kontrola kod kojih je uočen i značajan pad udjela NK-stanica (Slika 8, str. 58; Tablica 8, str. 52). Udio ukupnih memorijskih i pomoćničkih memorijskih T-limfocita značajno se smanjio tijekom vremena u osoba s posttraumatskim stresnim poremećajem (Slika 8, str. 58; Tablica 8, str. 52).

Slika 8. Imunofenotip



Kratice: PTSP – osebe s posttraumatskim stresnim poremećajem; K – zdrave kontrole

Središnja točka označava aritmetičku sredinu, a vertikalne crte 95%-tni interval pouzdanosti aritmetičke sredine.

Svaka varijabla analizirana je pomoću ANOVA-e za ponavljana mjerenja (2x2 dizajn, grupa x vrijeme, dob i pušenje kao kovarijate) na originalnim vrijednostima (bez imputacije). Ukoliko je interakcija faktora bila značajna, grupe su uspoređene pomoću četiri kontrasta tj. svaka grupa u vremenu, odnosno razlika između grupa u pojedinoj vremenskoj točki. Izdvojene su usporedbe koje su bile statistički značajne (kratica označava grupu, a broj vremensku točku):

CD3+: PTSP1 vs K1, $F(1,61)=15,372$, $p<0,001$

CD4+: PTSP1 vs K1, $F(1,58)=31,64$, $p<0,001$; K1 vs K2, $F(1,58)=9,348$, $p=0,003$

CD16+CD56+: K1 vs K2, $F(1,62)=7,712$, $p=0,007$

CD45RO+: PTSP1 vs K1, $F(1,60)=4,938$, $p=0,030$; PTSP1 vs PTSP2, $F(1,60)=15,384$, $p<0,001$

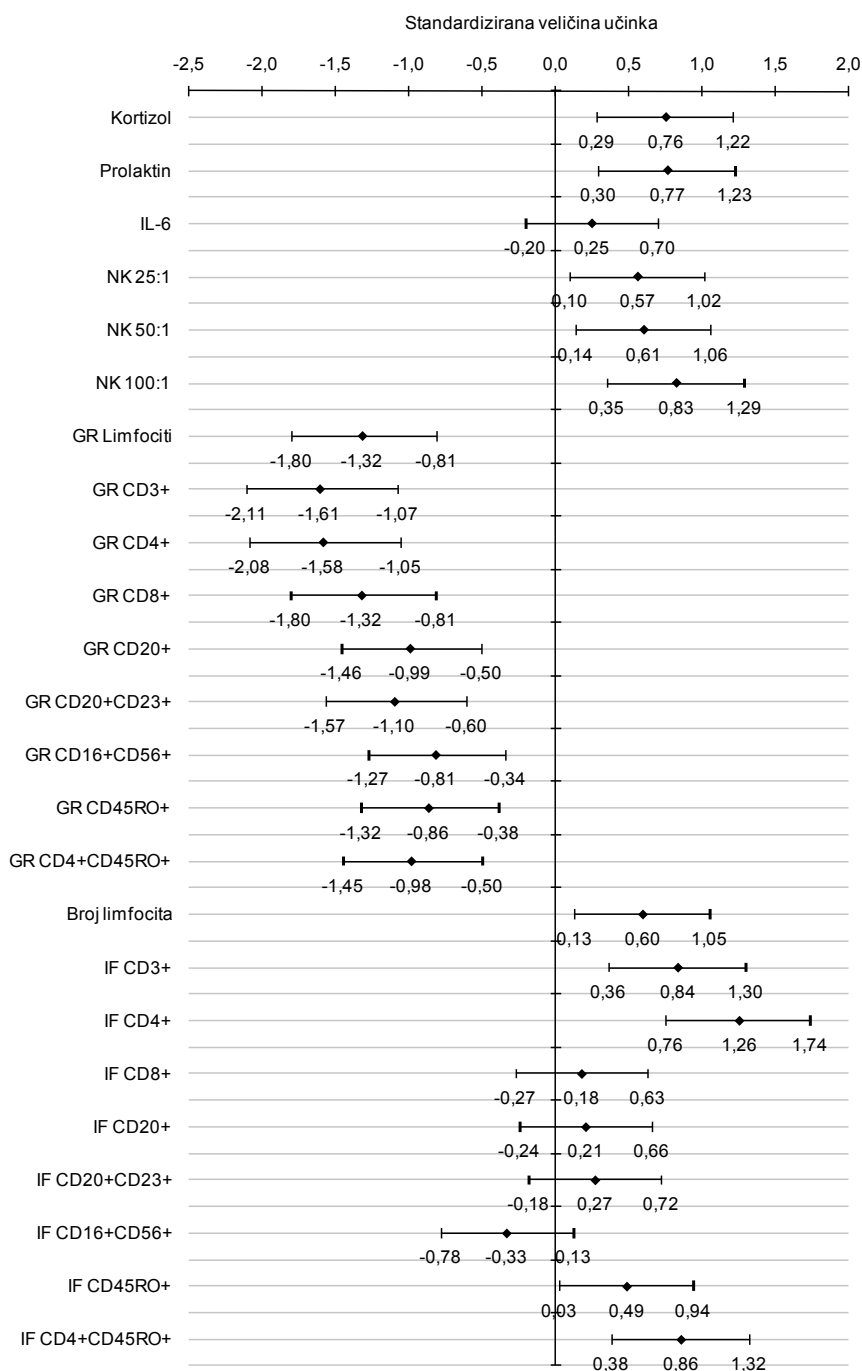
CD4+CD45+: PTSP1 vs K1, $F(1,59)=23,677$, $p<0,001$; PTSP1 vs PTSP2, $F(1,59)=10,293$, $p=0,002$

4.3.6 VELIČINA UČINKA

Veličina učinka PTSP-a na izmjerene varijable u prvom ispitivanju prikazana je na slici (Slika 9, str. 61). Vidljivo je da prisutnost PTSP-a ima najizraženiji učinak na ekspresiju GR-receptora, i to posebno unutar svih T (GR CD3+) i pomoćničkih (GR CD4+) limfocita. Statistički značajan učinak PTSP-a vidljiv je i kod hormona, NK-citotoksičnosti i nekih subpopulacija limfocita (ukupnih T-limfocita (CD3+), pomoćničkih T-limfocita (CD4+), ukupnih memorijskih T-limfocita (CD45RO+) i pomoćničkih memorijskih T-limfocita (CD4+CD45RO+)).

U drugom ispitivanju veličina učinka PTSP-a bila je manje izražena kod većine varijabli (Slika 10, str. 62). Učinak PTSP-a u drugom ispitivanju bio je statistički značajan samo za koncentraciju prolaktina u serumu i ukupni broj limfocita. PTSP nije imao statistički značajan učinak na ostale varijable u drugom ispitivanju.

Slika 9 . Standardizirana veličina učinka posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP-a) na varijable određivane u prvom ispitivanju

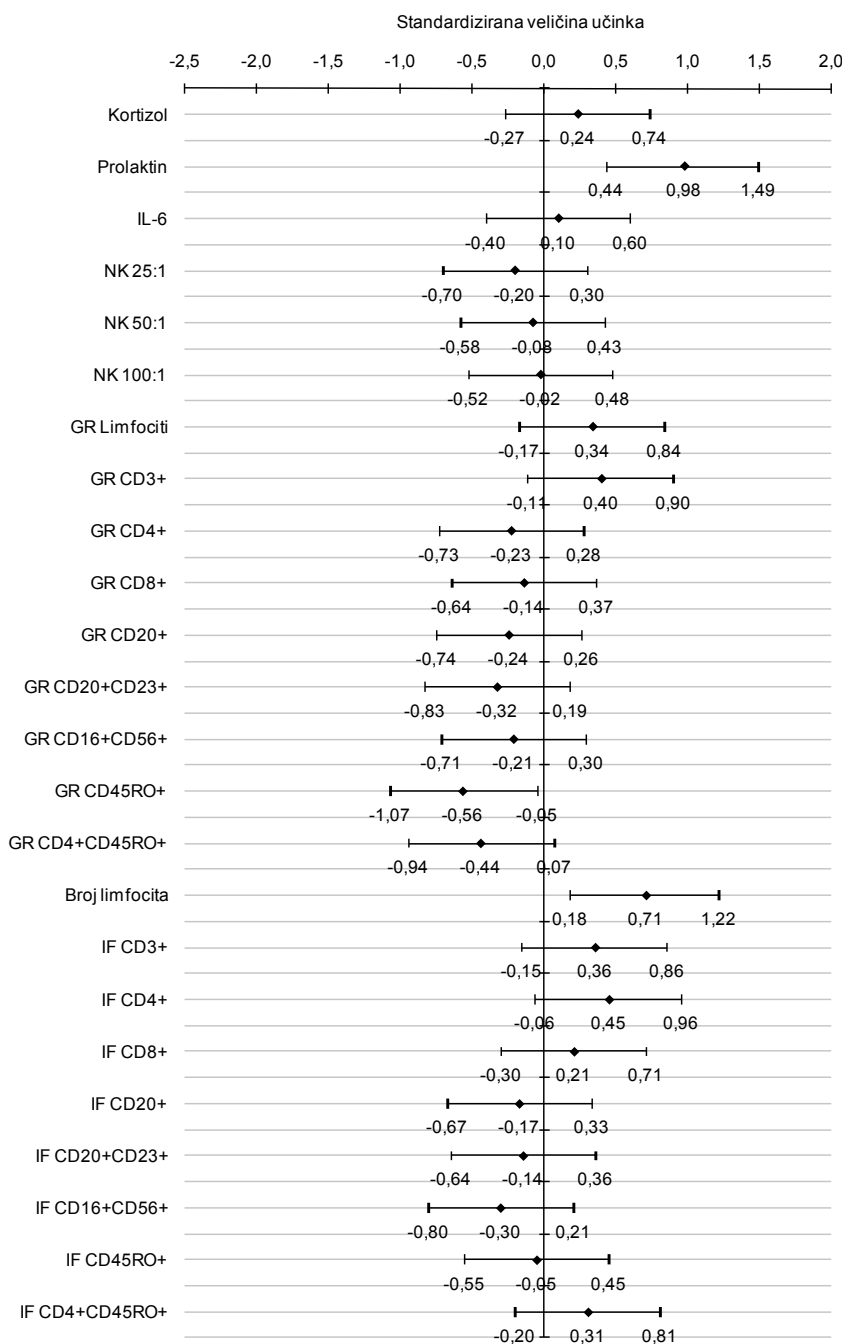


Kratice: GR – glukokortikoidni receptor (ekspresija izražena kao mfi (od engl. *mean fluorescence intensity*)); IF – imunofenotip (% od ukupnih limfocita); IL-6 – interleukin-6; NK – urođenoučilačke (od engl. *Natural Killer*) stanice (% lize u naznačen omjer efektorskih prema ciljnim stanicama)

Jedinice: IL-6 – pg/mL; kortizol - µg/100mL; prolaktin - µg/L

Središnja točka označava veličinu učinka (Cohenov d), a horizontalne crte 95%-tni interval pouzdanosti veličine učinka. Negativna veličina učinka označava snižene vrijednosti u osoba s PTSP-om. Ukoliko interval pouzdanosti prelazi 0 (vertikalna crta), učinak nije statistički značajan.

Slika 10. Standardizirana veličina učinka posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP-a) na varijable određivane u drugom ispitivanju



Kratice: GR – glukokortikoidni receptor (ekspresija izražena kao mfi (od engl. *mean fluorescence intensity*)); IF – imunofenotip (% od ukupnih limfocita); IL-6 – interleukin-6; NK – urođenoučilačke (od engl. *Natural Killer*) stanice (% lize u naznačenom omjeru efektorskih prema ciljnim stanicama)

Jedinice: IL-6 – pg/mL; kortizol - µg/100mL; prolaktin - µg/L

Središnja točka označava veličinu učinka (Cohenov d), a horizontalne crte 95%-tni interval pouzdanosti veličine učinka. Negativna veličina učinka označava snižene vrijednosti u osoba s PTSP-om. Ukoliko interval pouzdanosti prelazi 0 (vertikalna crta), učinak nije statistički značajan.

4.4 MEĐUODNOSI BIOLOŠKIH VARIJABLI

Tablice (Tablica 9, str. 63; Tablica 10, str. 64) prikazuju odnos hormona i citokina prema ostalim biološkim varijablama određenim u ovom istraživanju. Između ostalih, potrebno je izdvojiti pozitivnu korelaciju prolaktina prema citotoksičnosti NK-stanica (NK 25:1, $p=0,008$; NK 50:1, $p=0,040$) u osoba s PTSP-om u prvom ispitivanju, što nije slučaj u zdravih kontrola (Tablica 9, str. 63). U drugom ispitivanju istaknuli bismo pozitivnu korelaciju koncentracije kortizola u serumu s ekspresijom GR u osoba s PTSP-om (GR limfociti, $p=0,015$; GR CD20+CD23+, $p=0,041$; GR CD45RO+, $p=0,041$; GR CD4+CD45RO+, $p=0,034$) i u zdravih kontrola (GR limfociti, $p=0,019$; GR CD3+, $p=0,029$) (Tablica 10, str. 64). U osoba s PTSP-om uočena je i pozitivna korelacija koncentracije kortizola u serumu s nekim imunofenotipskim varijablama (IF CD3+, $p=0,035$; IF CD8+, $p=0,014$) (Tablica 10, str. 64).

Tablica 9. Međuodnosi bioloških varijabli – prvo ispitivanje¹

	PTSP (N=39)				Zdrave kontrole (N=37)			
	Kortizol	Prolaktin	IL-6	TNF- α^2	Kortizol	Prolaktin	IL-6	TNF- α^2
Kortizol	1,000	0,029	-0,029	0,196	1,000	0,185	-0,112	-0,134
Prolaktin	0,029	1,000	-0,084	-0,270	0,185	1,000	-0,317	0,201
IL-6	-0,029	-0,084	1,000	-0,119	-0,112	-0,317	1,000	-0,321
TNF- α^2	0,196	-0,270	-0,119	1,000	-0,134	0,201	-0,321	1,000
NK 25:1	0,275	0,469*	-0,186	-0,163	-0,373*	0,062	0,271	-0,332
NK 50:1	0,283	0,370*	0,002	-0,032	-0,348	0,074	0,249	-0,452*
NK 100:1	0,109	0,259	0,069	0,063	-0,278	0,077	0,245	-0,348
GR Limfociti	-0,074	-0,156	-0,055	0,302	0,367	-0,090	0,067	0,513*
GR CD3+	0,082	-0,174	-0,088	0,212	0,024	-0,198	0,053	0,378
GR CD4+	0,113	-0,155	-0,073	0,229	0,006	-0,206	0,064	0,325
GR CD8+	0,001	-0,243	-0,039	0,243	0,109	-0,260	0,253	0,190
GR CD20+	0,078	0,133	-0,004	0,275	0,276	-0,281	-0,104	0,368
GR CD20+CD23+	0,153	0,059	-0,030	0,218	0,272	-0,310	-0,082	0,297
GR CD16+CD56+	0,239	-0,050	-0,212	0,246	0,192	-0,148	-0,034	0,557*
GR CD45RO+	0,012	0,036	-0,096	0,327	-0,045	-0,036	-0,191	0,377
GR CD4+CD45RO+	-0,091	-0,064	-0,030	0,177	-0,044	-0,027	-0,202	0,351
Broj limfocita	-0,123	-0,117	-0,083	0,290	0,263	0,338	-0,748*	-0,178
IF CD3+	0,151	-0,067	0,167	-0,029	0,113	-0,061	-0,216	-0,452*
IF CD4+	0,044	-0,022	0,252	-0,170	-0,230	0,031	-0,054	-0,245
IF CD8+	-0,043	-0,047	-0,012	0,148	0,096	-0,058	-0,311	-0,231
IF CD20+	0,152	-0,080	-0,320	-0,069	0,120	-0,236	0,096	-0,001
IF CD20+CD23+	0,028	-0,075	-0,387	-0,015	0,096	0,029	0,036	0,104
IF CD16+CD56+	0,015	0,088	0,281	-0,113	-0,036	0,009	-0,193	0,121
IF CD45RO+	0,287	0,027	0,170	-0,006	0,168	-0,328	0,103	0,152
IF CD4+CD45RO+	0,138	0,226	0,068	-0,212	-0,360	-0,303	0,307	0,039

Kratice: GR – glukokortikoidni receptor (ekspresija izražena kao mfi (od engl. *mean fluorescence intensity*)); IF – imunofenotip (% od ukupnih limfocita); IL-6 – interleukin-6; NK – urođenoubilačke (od engl. *Natural Killer*) stanice (% lize u naznačen omjer efektorskih prema ciljnim stanicama); PTSP – posttraumatski stresni poremećaj; TNF- α – faktor nekroze tumora α (od engl. *Tumor Necrosis Factor*)

Jedinice: IL-6 – pg/mL; kortizol – μ g/100mL; prolaktin – μ g/L; TNF- α – pg/mL

¹ Prikazane su kombinirane vrijednosti (5 analiza na 5 imputiranih baza) koeficijena korelacije (r) nakon metode multiple imputacije. U analizi su korištene transformirane varijable ukoliko inicijalno nisu slijedile normalnu distribuciju.

² Budući da TNF- α u prvom ispitivanju nismo mogli normalizirati, korelacija TNF- α s ostalim varijablama izračunata je pomoću Spearmanove korelacije ranga, a pripadajuće vrijednosti u tablici predstavljaju Spearmanov koeficijent korelacije (ρ).

* Statistički značajno ($p < 0,05$)

Tablica 10. Međudodnosi bioloških varijabli – drugo ispitivanje¹

2.ispitivanje	PTSP (N=39)				Zdrave kontrole (N=25)			
	Kortizol	Prolaktin	IL-6	TNF- α	Kortizol	Prolaktin	IL-6	TNF- α
Kortizol	1,000	-0,063	-0,196	-0,118	1,000	0,261	0,075	0,006
Prolaktin	-0,063	1,000	-0,191	-0,134	0,261	1,000	-0,254	0,283
IL-6	-0,196	-0,191	1,000	0,315	0,075	-0,254	1,000	0,445*
TNF- α	-0,118	-0,134	0,315	1,000	0,006	0,283	0,445*	1,000
NK 25:1	0,216	-0,116	0,090	-0,171	-0,004	0,022	-0,266	0,373
NK 50:1	-0,046	0,007	0,177	-0,075	0,031	0,098	0,011	0,521*
NK 100:1	-0,035	0,023	0,197	-0,062	-0,021	0,062	-0,124	0,444*
GR Limfociti	0,386*	0,086	-0,136	0,051	0,464*	0,122	-0,258	0,094
GR CD3+	0,287	0,059	-0,131	0,110	0,437*	0,157	-0,355	-0,275
GR CD4+	0,284	0,048	-0,132	0,117	0,236	0,114	-0,217	-0,001
GR CD8+	0,280	0,126	-0,161	0,107	0,264	0,148	-0,247	-0,097
GR CD20+	0,313	0,024	-0,135	0,077	0,195	0,003	-0,010	0,111
GR CD20+CD23+	0,330*	0,055	-0,149	0,073	0,187	0,017	-0,013	0,113
GR CD16+CD56+	0,311	0,047	-0,211	0,053	0,314	0,136	-0,250	-0,056
GR CD45RO+	0,329*	0,086	-0,177	0,077	-0,037	-0,129	0,206	0,326
GR CD4+CD45RO+	0,341*	0,094	-0,144	0,017	-0,010	-0,071	0,059	0,250
Broj limfocita	-0,027	0,110	-0,040	0,072	0,094	-0,150	0,406	-0,230
IF CD3+	0,338*	0,051	-0,258	-0,338	-0,390	-0,064	-0,354	-0,258
IF CD4+	0,102	0,016	-0,198	-0,196	0,054	-0,245	0,009	-0,047
IF CD8+	0,389*	0,060	-0,159	-0,218	-0,105	0,004	-0,400	-0,224
IF CD20+	-0,193	0,020	0,137	0,269	-0,081	-0,136	0,119	-0,267
IF CD20+CD23+	-0,137	-0,237	0,294	0,324	-0,083	0,002	0,058	0,050
IF CD16+CD56+	-0,188	0,023	0,039	0,069	-0,041	-0,221	0,142	-0,173
IF CD45RO+	0,201	-0,075	-0,039	-0,040	-0,154	-0,096	0,311	0,173
IF CD4+CD45RO+	-0,096	-0,009	-0,050	-0,133	0,194	-0,012	0,063	-0,084

Kratice: GR – glukokortikoidni receptor (ekspresija izražena kao mfi (od engl. *mean fluorescence intensity*)); IF – imunofenotip (% od ukupnih limfocita); IL-6 – interleukin-6; NK – urođenoučilačke (od engl. *Natural Killer*) stanice (% lize u naznačenom omjeru efektorskih prema ciljnim stanicama); PTSP – posttraumatski stresni poremećaj; TNF- α – faktor nekroze tumora α (od engl. *Tumor Necrosis Factor*)

Jedinice: IL-6 – pg/mL; kortizol – μ g/100mL; prolaktin – μ g/L; TNF- α – pg/mL.

¹ Prikazane su kombinirane vrijednosti (5 analiza na 5 imputiranih baza) koeficijena korelacije (r) nakon metode multiple imputacije. U analizi su korištene transformirane varijable ukoliko inicijalno nisu slijedile normalnu distribuciju.

* Statistički značajno ($p < 0,05$)

4.5 ODNOS PSIHIČKIH SIMPTOMA I BIOLOŠKIH VARIJABLI

U tablici (Tablica 11, str. 66) su prikazane korelacije psihičkih simptoma izmjerenih samoocjenom ljestvicom DTS i strukturiranim kliničkim intervjuima TOP-8 i CAPS s biološkim varijablama kod osoba s PTSP-om u prvom ispitivanju. U istoj tablici prikazani su i rezultati korelacija u drugom ispitivanju pri čemu su izostavljene korelacije s razinom simptoma izmjerenih pomoću DTS i TOP-8 instrumenata budući da ova testiranja nisu u drugom ispitivanju provedena.

Obzirom da postotci lize u sva tri omjera efektorskih prema ciljnim stanicama u testu citotoksičnosti NK-stanica snažno međusobno koreliraju, prikazan je samo jedan od tri omjera (100:1). Iz istog razloga je u korelacijskoj analizi korištena razina ekspresije GR u ukupnim limfocitima, tj. izostavljena je ekspresija GR u pojedinim subpopulacijama limfocita. Koncentracija TNF- α nije uvrštena u analizu jer nije slijedila normalnu distribuciju. Neparametarskom metodom (Spearmanova korelacija ranga) nisu pronađene značajne korelacije s razinom psihičkih simptoma. U regresijskim modelima su kao prediktori korištene sve biološke varijable kao u korelacijskim analizama osim onih imunofenotipskih varijabli kod kojih nije pronađena značajna korelacija s psihičkim simptomima. Osim toga, u analizu su kao prediktori uvrštene demografske varijable (Tablica 12, str. 67).

U prvom ispitivanju pronađeno je više značajnih korelacija psihičkih simptoma s biološkim varijablama (Tablica 11, str. 66). Jutarnja koncentracija kortizola u serumu pozitivno je korelirala s razinom psihičkih simptoma (CAPS D, $p=0,006$; CAPS (ukupno), $p=0,033$). Pozitivna korelacija razine psihičkih simptoma uočena je i s ekspresijom GR u limfocitima (TOP-8, $p=0,004$; CAPS C, $p=0,010$; CAPS D, $p=0,038$; CAPS (ukupno), $p=0,016$). Koncentracija IL-6 u serumu negativno je korelirala s psihičkim simptomima (TOP-8, $p=0,026$; CAPS D, $p=0,022$). Udio cirkulirajućih B-limfocita (CD20+) pozitivno je korelirao s psihičkim simptomima (DTS, $p=0,004$; TOP-8, $p=0,008$; CAPS C, $p=0,024$; CAPS D, $p=0,040$; CAPS (ukupno), $p=0,016$) kao i udio aktiviranih B-limfocita (DTS, $p=0,023$; TOP-8, $p=0,007$; CAPS C, $p=0,029$; CAPS D, $p=0,040$; CAPS (ukupno), $p=0,020$). Za razliku od toga, udio NK-stanica bio je u negativnom odnosu s razinom psihičkih simptoma (TOP-8, $p=0,006$; CAPS D, $p=0,031$). U drugom ispitivanju nije bilo značajnih korelacija.

Na temelju dobivenih koeficijenata determinacije (R^2) modela multiple linearne regresije, iz tablice (Tablica 12, str. 67) je vidljivo da se između 47% i 49% varijabilnosti psihičkih simptoma (TOP-8 (ukupno), CAPS D i CAPS (ukupno)) može opisati varijacijom korištenih prediktora. Pri tome je također vidljivo da, neovisno od ostalih prediktora, statistički značajan utjecaj imaju ekspresija GR u limfocitima i udio cirkulirajućih B-limfocita (CD20+).

Tablica 11. Odnos psihičkih simptoma i bioloških varijabli - korelacije

	DTS (ukupno)	TOP-8 (ukupno)	CAPS B	CAPS C	CAPS D	CAPS (ukupno)
Prvo ispitivanje						
Kortizol (µg/100mL)	0,142	0,309	0,202	0,310	0,479*	0,384*
Prolaktin (µg/L)	-0,157	-0,247	-0,194	-0,299	-0,129	-0,244
IL-6 (pg/mL)	-0,164	-0,388*	-0,272	-0,199	-0,398*	-0,313
NK 100:1 (%lize)	0,152	-0,179	0,031	0,090	0,218	0,131
GR limfociti (mfi)	0,168	0,473*	0,238	0,430*	0,353*	0,403*
Broj limfocita/µL	0,042	-0,119	-0,210	-0,032	0,233	0,024
IF CD3+ (%)	-0,067	-0,008	0,144	0,166	0,021	0,122
IF CD4+ (%)	0,098	0,010	0,311	0,301	-0,170	0,158
IF CD8+ (%)	-0,155	-0,072	-0,081	-0,169	0,202	-0,026
IF CD20+ (%)	0,453*	0,423*	0,303	0,365*	0,335*	0,390*
IF CD20+CD23+ (%)	0,369*	0,428*	0,265	0,355*	0,334*	0,377*
IF CD16+CD56+ (%)	-0,233	-0,434*	-0,246	-0,181	-0,346*	-0,298
IF CD45RO+ (%)	0,031	0,096	0,014	0,092	-0,093	0,007
IF CD4+CD45RO+ (%)	0,146	0,083	0,058	0,033	-0,184	-0,039
Drugo ispitivanje						
Kortizol (µg/100mL)			0,018	-0,232	-0,065	-0,114
Prolaktin (µg/L)			-0,265	-0,197	-0,244	-0,278
IL-6 (pg/mL)			-0,254	-0,065	0,029	-0,091
NK 100:1 (% lize)			-0,068	-0,108	0,008	-0,045
GR Limfociti (mfi)			0,199	-0,087	-0,048	0,001
Broj limfocita/µL			0,010	0,107	0,058	0,055
IF CD3+ (%)			0,057	-0,144	0,015	-0,044
IF CD4+ (%)			0,159	-0,056	-0,015	0,001
IF CD8+ (%)			-0,160	-0,218	0,009	-0,125
IF CD20+ (%)			0,150	0,073	0,158	0,166
IF CD20+CD23+ (%)			0,007	-0,018	-0,051	-0,053
IF CD16+CD56+ (%)			-0,042	0,109	0,174	0,140
IF CD45RO+ (%)			0,035	-0,174	0,023	-0,051
IF CD4+CD45RO+ (%)			0,197	0,039	0,152	0,148

Kratice: **CAPS** - klinička skala za procjenu posttraumatskog stresnog poremećaja (od engl. *Clinician Administered PTSD Scale*); **CAPS B** – kriterij B, simptomi ponovnog proživljavanja traumatskog iskustva; **CAPS C** – kriterij C, simptomi izbjegavanja i obamrlosti; **CAPS D** – kriterij D, simptomi trajne podraženosti vegetativnog živčanog sustava; **DTS** - engl. *Davidson Trauma Scale*; **GR** – glukokortikoidni receptor; **IL-6** – interleukin-6; **mfi** – srednja vrijednost intenziteta fluorescencije (od engl. *mean fluorescence intensity*); **NK** – urođenoubilački (od engl. *Natural Killer*); **TOP-8** - klinička skala za procjenu učinka liječenja PTSP-a (od engl. *8-item Treatment-outcome Posttraumatic Stress Disorder Scale*)

¹ Prikazane su kombinirane vrijednosti (5 analiza na 5 imputiranih baza) koeficijenata korelacije (r) kao rezultat parcijalnih korelacija kontroliranih za dob i pušenje. U analizi su korištene transformirane varijable ukoliko inicijalno nisu slijedile normalnu distribuciju.

* Statistički značajno (p<0,05)

Tablica 12. Odnos psihičkih simptoma i bioloških varijabli – multipla linearna regresija

Korišteni prediktori	Zavisna varijabla	R^2 ¹	Značajni prediktori			
				β ²	t	p
Kortizol ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	CAPS (ukupno)	0,486	GR limfociti	0,690	2,581	0,013
Prolaktin ($\mu\text{g}/\text{L}$)			IF CD20+	0,713	2,406	0,016
IL-6 (pg/mL)			GR limfociti	0,234	2,203	0,030
NK 100:1 (% lize)	CAPS D	0,478	IF CD20+	0,217	1,783	0,045
GR Limfociti (mfi)			GR limfociti	0,138	2,167	0,031
IF CD20+ (%)			IF CD20+	0,200	2,553	0,011
IF CD20+CD23+ (%)	TOP-8 (ukupno)	0,471	GR limfociti	0,138	2,167	0,031
IF CD16+CD56+ (%)			IF CD20+	0,200	2,553	0,011
Dob (godine)						
Pušenje						
Edukacija						
Radni status						

Kratice: **CAPS** - klinička skala za procjenu posttraumatskog stresnog poremećaja (od engl. *Clinician Administered PTSD Scale*); **CAPS D** – kriterij D, simptomi trajne podraženosti vegetativnog živčanog sustava; **GR** – glukokortikoidni receptor; **IL-6** – interleukin-6; **NK** – urođenoubilački (od engl. *Natural Killer*); **TOP-8** - klinička skala za procjenu učinka liječenja PTSP-a (od engl. *8-item Treatment-outcome Posttraumatic Stress Disorder Scale*)

¹ Koeficijent determinacije R^2 izračunat je kao prosjek 5 vrijednosti dobivenih nakon multiple imputacije i bio je statistički značajan ($p < 0,05$) u svih 5 slučajeva.

² Vrijednosti β , t i p izvedene su kombinacijom pojedinačnih vrijednosti nakon 5 analiza.

5 RASPRAVA

Ovim prospektivnim istraživanjem prvi puta smo, prema našem saznanju, pokazali da promjene izmjerenih varijabli (i njihov međuodnos) u osoba s PTSP-om nisu jednoznačne i statične, već se mijenjaju s vremenom. U prvom ispitivanju, u prosjeku 6 godina od traumatskog iskustva, osobe s PTSP-om imale su povišenu jutarnju koncentraciju kortizola, sniženu ekspresiju GR u svim izmjerenim subpopulacijama limfocita, povišenu koncentraciju prolaktina i $\text{TNF-}\alpha$, povišenu citotoksičnost NK-stanica, povišen ukupni broj limfocita i udio pojedinih subpopulacija limfocita u odnosu na zdrave kontrole (Tablica 6, str. 48). Prvo ispitivanje karakterizira i nalaz niza korelacija između pojedinih bioloških varijabli što upućuje na međuodnos izmjerenih komponenti endokrinog sustava i imunostava (Tablica 9, str. 63). Pojedine biološke varijable bile su u odnosu i s razinom psihičkih simptoma PTSP-a (Tablica 11, str. 66; Tablica 12, str. 67).

U drugom ispitivanju, u prosjeku 12 godina od traumatskog iskustva, većina razlika se gubi i to uglavnom na način da varijable koje su inicijalno bile povišene kod ispitanika s PTSP-om padaju, a one koje su bile snižene rastu (Tablica 7, str. 50; Tablica 8, str. 52). Jedino su koncentracija prolaktina i ukupni broj limfocita ostali povišeni u osoba s PTSP-om. Također se gubi i većina korelacija koje su postojale u prvom ispitivanju (Tablica 10, str. 64; Tablica 11, str. 66). Iako svi ispitanici i u drugom ispitivanju zadovoljavaju sve kriterije za dijagnozu PTSP-a, razina simptoma u drugom ispitivanju je značajno pala (Slika 2, str. 41). Mogući razlog gubitka promjena u drugom ispitivanju upravo je pad razine simptoma. Međutim, mali broj promjena je ostao, a smjer promjena daje naslutiti da, ukoliko simptomi PTSP-a potraju (a time i alostatsko opterećenje), promjene u budućnosti dosegnu onaj obrazac koji je pronađen u osoba s PTSP-om kod kojih je prošlo više desetaka godina od traumatskog iskustva.

5.1 KORTIZOL I EKSPRESIJA GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA

Iako na temelju jednokratnog određivanja jutarnjeg kortizola ne možemo zaključivati o aktivnosti HPA-osovine, istovremeno snižena ekspresija GR u svim subpopulacijama limfocita u prvom ispitivanju (Tablica 6, str. 48; Slika 6, str. 56) upućuje na kompenzatorno sniženje (engl. *downregulation*) zbog mogućeg prekomjernog utjecaja povišene koncentracije kortizola (Tablica 6, str. 48; Slika 3, str. 53).

Dosadašnja istraživanja također su pokazala povišene bazalne vrijednosti kortizola u osoba s PTSP-om u urinu¹⁵⁴⁻¹⁵⁹, plazmi¹⁶⁰ i slini¹⁶¹⁻¹⁶⁷. Povišene razine kortizola u PTSP-u pronađene su i nakon stimulacije s CRH¹⁵⁹ te nakon akutnog stresnog podražaja^{160-161, 168}. Međutim, u velikom broju istraživanja izvještava se o sniženim bazalnim vrijednostima kortizola u urinu¹⁶⁹⁻¹⁷², plazmi¹⁷³⁻¹⁷⁵ i slini^{140, 176-180}, a podosta studija izvještava i o nedostatku razlike¹⁸¹⁻¹⁸⁶. I posljednja metaanaliza nije

uspjela dokazati sistematsku povezanost između razine bazalnog kortizola i PTSP-a.¹²⁶ Analiza podgrupa studija u ovoj metaanalizi također nije pokazala značajan utjecaj ratne traume na razinu kortizola, ali je utvrđeno da studije koje se odnose na fizičko i/ili seksualno zlostavljanje u djetinjstvu pokazuju značajno nižu razinu kortizola u osoba koje su kasnije razvile PTSP. U istoj metaanalizi ispitan je i utjecaj godina od traumatskog iskustva koji nije bio statistički značajan, ali je vidljiva tendencija nižim razinama kortizola u studijama kod kojih se trauma dogodila unazad više od 20 godina (studije koje se odnose na zlostavljanje u djetinjstvu i koje uključuju vijetnamske veterane i žrtve Holokausta) i višim razinama kortizola ako se trauma dogodila unutar 10 godina od ispitivanja. U ovaj obrazac uklapaju se i naši rezultati povišenih vrijednosti kortizola u prvom ispitivanju i nedostatak razlike u drugom ispitivanju.

Iako već varijacije u razini kortizola govore o određenim promjenama u funkcioniranju HHN-osovine kod osoba s PTSP-om, mnogo se jasnija slika dobiva ukoliko se u procjeni koriste supresijski testovi deksametazonom, a mnogo nam govori i razina, odnosno funkcija GR-a. U prvoj studiji koja je odredila razinu GR-a na leukocitima vijetnamskih veterana koristeći radioaktivni test vezanja liganda (³H-deksametazon) uočena je povišena gustoća GR-a.¹⁸⁷ Studije koje su uslijedile ponovile su ovaj rezultat koristeći istu metodu za određivanje receptora.^{128, 188-191} U posljednjoj studiji također je pokazano da u osoba s PTSP-om postoji pojačana inhibicija lizozimske aktivnosti nakon tretmana kultura perifernih mononukleara deksametazonom što govori o pojačanoj funkciji GR-a.¹²⁸ U dijelu ovih studija istovremeno je dokazana pojačana supresija lučenja kortizola deksametazonom¹⁸⁸⁻¹⁹¹ što je u skladu s povećanim brojem, odnosno funkcijom GR-a. Pojačana supresija lučenja kortizola deksametazonom utvrđena je u još nekoliko studija¹⁹²⁻¹⁹⁴, ali u nemalom broju istraživanja ovaj se efekt nije uspio dokazati.^{164-165, 186, 195-196} Pažljivom analizom ovih studija vidljivo je da su rezultati dobiveni na uzorku vijetnamskih veterana,^{128, 187-189, 193} žrtava Holokausta¹⁹¹ i osoba zlostavljanih u djetinjstvu,^{190, 192} tj. više od 20 godina nakon traumatskog iskustva. Istraživanja na uzorcima veterana Zaljevskog rata¹⁸³ i različitih ratova iz 90-tih^{186, 196} ne pokazuju specifičan učinak PTSP-a na inhibiciju lučenja kortizola deksametazonom. Međutim, dva vrlo zanimljiva istraživanja, jedno na uzorku izbjeglica iz Bosne,¹⁴⁰ a drugo na uzorku veterana različitih ratova iz 90-tih,¹⁹⁷ pokazuju promijenjenu funkciju GR-a u PTSP-u. U prvom je istraživanju pokazano da deksametazon pojačano inhibira lipopolisaharidom (LPS) potaknuto lučenje IL-6 i TNF- α na uzorcima pune krvi osoba s PTSP-om što govori o pojačanoj funkciji GR-a. Ovaj je učinak izostao u drugom spomenutom istraživanju, ali je ustanovljeno da osobe s PTSP-om imaju nižu razinu GR-a u odnosu na kontrole. Isto tako, deksametazonom potaknuta inhibicija proliferacije T-limfocita bila je manje izražena u osoba s PTSP-om što upućuje i na sniženu funkciju GR-a. Naša istraživanja na uzorku hrvatskih ratnih veterana unutar 8 godina od traumatskog iskustva pokazuju sniženu ekspresiju GR-a u različitim

subpopulacijama limfocita u osoba s PTSP-om,¹²⁷ a kod ratnih veterana koji su proživjeli traumatsko iskustvo unazad više od 10 godina ekspresija GR-a bila je povišena¹⁹⁸ ili nismo uočili razliku¹²⁹. U posljednjem istraživanju pokazali smo i da razina glukokortikoidnog receptora pozitivno korelira s godinama proteklom od traumatskog iskustva. Temeljem svega navedenog možemo pretpostaviti da se ekspresija GR-a mijenja ovisno o vremenu od traumatskog iskustva tj. o duljini trajanja stresne reakcije karakteristične za PTSP.

U ovom je istraživanju izravno vidljivo da je ekspresija GR-a u osoba s PTSP-om porasla oko 6 godina nakon prvog ispitivanja (Tablica 8, str. 52). Ovaj porast izražen je na svim limfocitnim subpopulacijama (Slika 6, str. 56). Istovremeno je došlo i do pada ekspresije GR-a u zdravih kontrola, ali je taj pad mnogo manje izražen i vidljiv je na ukupnim limfocitima i T-limfocitima dok na ostalim subpopulacijama nije bio značajan (Tablica 8, str. 52). U oba ispitivanja obje grupe imale su najvišu ekspresiju GR u NK-stanicama (Slika 6, str. 56). U prvom ispitivanju zamijetili smo negativnu korelaciju ekspresije GR-a na NK-stanicama s citotoksičnošću NK-stanica u svim omjerima efektorskih prema ciljnim stanicama u zdravih kontrola (NK25:1, $r=-0,691$, $p<,001$; NK50:1, $r=-,567$, $p=0,007$; NK100:1, $r=-,710$, $p<,001$). Negativna korelacija u zdravih kontrola tijekom prvog ispitivanja uočena je i između kortizola i NK-citotoksičnosti (Tablica 9, str. 63). Kod ispitanika s PTSP-om nije bilo korelacije što, osim snižene ekspresije, upućuje i na smetnje funkcije GR-a. U drugom ispitivanju koncentracija kortizola pozitivno je korelirala s razinom GR-a (Tablica 10, str. 64). Mogli bismo pretpostaviti da ovaj nalaz također upućuje na poremećaj funkcije GR-a budući da izostaje kompenzatorno sniženje receptora na povećane razine kortizola. Međutim, ova je korelacija izražena i u zdravih kontrola što, doduše, ne isključuje moguće smetnje u funkciji i njihovih receptora. Druga je mogućnost da neki treći faktor podjednako djeluje na razine GR-a i kortizola. Mogući kandidat je IL-6 budući da on stimulira produkciju glukokortikoida, a istovremeno potiče sintezu GR-a u perifernim mononuklearima⁹³. Nepostojanje razlike u razini IL-6 između ispitanika s PTSP-om i zdravih kontrola (Tablica 7, str. 50) i nedostatak korelacije GR-a s IL-6 u oba ispitivanja (Tablica 9, str. 63; Tablica 10, str. 64) ne isključuje ovu mogućnost obzirom na ograničenu senzitivnost korištenog testa za IL-6 te smatramo da je ovaj odnos potrebno dalje istražiti.

Korelacijskom i regresijskom analizom u prvom ispitivanju pokazano je da osobe s jače izraženim simptomima PTSP-a, i to osobito iz skupine pojačane podražljivosti (prema regresijskoj analizi), imaju i višu ekspresiju GR-a (Tablica 11, str. 66; Tablica 12, str. 67). Ovo je neočekivan nalaz budući da je ekspresija GR-a generalno snižena u ispitanika s PTSP-om. To bi značilo da je PTSP specifično doista vezan uz povećanje ekspresije GR-a, ali da je neki drugi faktor koji snižava ekspresiju imao veći utjecaj tijekom prvog ispitivanja. Osobe s PTSP-om pokazuju pojačanu reaktivnost na različite stresore i reagiraju povećanim lučenjem kortizola^{160-161, 168} što bi moglo rezultirati i sniženjem

ekspresije GR-a. Moguće je da se s vremenom reaktivnost smanjuje, tj. smanjuje se učestalost aktivacije HHN-osovine i kompenzatorno sniženje GR-a, te dolazi do izražaja upravo povećana ekspresija GR-a. U drugom ispitivanju nije uočena ovakva korelacija niti su pronađene razlike u GR-u i kortizolu u odnosu na zdrave kontrole (Tablica 10, str. 64; Tablica 11, str. 66). Međutim, budući da prema našim rezultatima GR tijekom vremena raste, a kortizol pada, mogli bismo očekivati da će, ukoliko simptomi PTSP-a perzistiraju, u konačnici doći do još veće ekspresije GR-a i sniženja razine kortizola. Dakle, promjene u HHN-osovini zasigurno postoje u osoba s PTSP-om, ali one nisu jednoznačne i statične, već se mijenjaju tijekom vremena.

5.2 PROLAKTIN

Iako se promjene u HHN-osovini najčešće vežu uz promjene imunoreaktivnosti, osim kortizola za koji se smatra da djeluje primarno imunosupresivno, ispitali smo i vezu između PTSP-a i razina prolaktina koji se također oslobađa tijekom stresne reakcije, ali su njegovi učinci primarno imunostimulacijski i djeluju kao protuteža glukokortikoidima. Koncentracija prolaktina u serumu bila je konzistentno povišena u osoba s PTSP-om u oba ispitivanja (Tablica 6, str. 48; Tablica 7, str. 50; Slika 3, str. 53). Do sada nisu pronađene povišene bazalne vrijednosti prolaktina u osoba s PTSP-om. Na uzorcima vijetnamskih ratnih veterana¹³⁰⁻¹³² i osoba preživjelih nakon potresa¹³³ bazalne razine prolaktina se nisu razlikovale od zdravih kontrola. Štoviše, na miješanom uzorku ispitanika koji su proživjeli različite vrste traume¹⁹⁹ uočena je niža razina prolaktina u osoba s PTSP-om. Nalaz povišene razine prolaktina karakterističan je za akutni stres¹⁰⁴⁻¹⁰⁵ iako je povišena koncentracija prolaktina pronađena i u policajaca izloženim pojačanoj razini različitih kemijskih, fizikalnih i psihosocijalnih stresora²⁰⁰ što bi odgovaralo kroničnom stresu. U kontekstu pojačanog lučenja kortizola i snižene ekspresije GR na svim subpopulacijama limfocita možemo pretpostaviti da je pojačano lučenje prolaktina u našem uzorku ispitanika s PTSP-om zaista kompenzacijsko te da se na ovaj način nastoje umanjiti imunosupresivni učinci glukokortikoida⁴⁷. Tome govori u prilog i pozitivna korelacija između prolaktina i citotoksičnosti NK-stanica u ispitanika s PTSP-om u prvom ispitivanju (Tablica 9, str. 63). U zdravih kontrola ovo nije bio slučaj, a korelacija nije pronađena niti u drugom ispitivanju kada se koncentracija kortizola i razina GR nisu razlikovali od zdravih kontrola (Tablica 10, str. 64). Međutim, veličina učinka PTSP-a na koncentraciju prolaktina u serumu bila je izraženija u drugom ispitivanju (Slika 10, str. 62) tako da treba razmisliti i o drugim mogućim faktorima koji su mogli djelovati na razinu prolaktina. U ovoj studiji nije sistematski evaluiran mogući utjecaj terapije. Ispitanici doduše nisu koristili lijekove mjesec dana prije ispitivanja, ali u razdoblju između ispitivanja zasigurno su koristili lijekove. U terapiji PTSP-a najčešće se koriste antidepresivi iz skupine SSRI (od engl. *selective serotonin reuptake inhibitor*), često u kombinaciji s atipičnim antipsihoticima, a lijekovi iz obje navedene skupine mogu povišiti razinu prolaktina.²⁰¹⁻²⁰² Međutim, dokazano je da se razina

prolaktina vraća na normalu unutar mjesec dana od promjene terapije tipičnim u atipični antipsihotik,²⁰³ a učinak antidepresiva iz SSRI skupine i atipičnih antipsihotika na razinu prolaktina nije velik.

5.3 CITOKINI

Bez obzira na stanje HHN-osovine u PTSP-u koje je prema nekim istraživanjima karakterizirano sniženjem lučenja kortizola uz pojačanu senzitivnost glukokortikoidnih receptora, ili su prema našem i drugim istraživanjima promjene sasvim suprotne, može se slobodno reći da u PTSP-u postoje određene smetnje u signalizaciji glukokortikoidima. Bilo na nivou lučenja kortizola (sniženje) ili na nivou receptora (sniženje ekspresije i poremećaj funkcije) imunosupresijski učinci glukokortikoida su vjerojatno poremećeni i možemo pretpostaviti da dolazi do dezinhibicije imunosustava¹²⁵. Povećana koncentracija proinflatarnog citokina TNF- α (Slika 4c, str. 54) i visoka citotoksičnost NK-stanica u prvom ispitivanju (Tablica 6, str. 48), povišen ukupni broj limfocita u oba ispitivanja (Tablica 6, str. 48; Tablica 7, str. 50; Slika 7, str. 57) i povećani udio pojedinih subpopulacija u prvom ispitivanju u ispitanika s PTSP-om govore u prilog ovoj pretpostavci (Tablica 6, str. 48; Slika 8, str. 58).

Od solubilnih upalnih faktora u osoba s PTSP-om do sada su pronađene povišene serumske razine IL-1 β ,^{137, 204-205} IL-6,²⁰⁶⁻²⁰⁸ solubilnog IL-6 receptora,^{206, 209} TNF- α ¹³⁷. U jednoj od studija autori su pronašli i povišenu koncentraciju IL-6 u cerebrospinalnom likvoru.²⁰⁷ Osim toga, dokazana je i pojačana produkcija IL-6 i TNF- α nakon stimulacije pune krvi LPS-om (od engl. *lipopolysaccharide*)¹⁴⁰ ili s PHA i LPS-om,¹⁴¹ te IFN- γ ²¹⁰ nakon stimulacije pune krvi LPS-om. Analizom genskog čipa (engl. *microarray*) na uzorku mononukleara periferne krvi osoba s PTSP-om, Segman i sur.²¹¹ pokazali su pojačanu aktivaciju onih gena koji upućuju na aktivaciju imunosustava.

Nalaz povišene koncentracije TNF- α u osoba s PTSP-om u prvom ispitivanju (Slika 4c, str. 54) u skladu je s navedenim istraživanjima. Koncentracija IL-6 (Slika 4a, str. 54) također je bila nešto viša u prvom ispitivanju, ali ova razlika nije bila statistički značajna. Ni TNF- α , ni IL-6 nisu se razlikovali između ispitanika s PTSP-om i zdravih kontrola u drugom ispitivanju (Slika 4b i d, str. 54). Treba naglasiti da u nekim studijama također nije pronađena razlika prema zdravim kontrolama u IL-6, i to u osoba s PTSP-om koje su preživjele potres²¹² te osoba koje su razvile PTSP nakon različitih vrsta trauma u posljednjih nekoliko godina¹³⁷. U posljednjoj studiji autori su, unatoč nepostojanju razlike između nekih citokina, pokazali da su citokini u pozitivnoj multivarijantnoj korelaciji sa simptomima PTSP-a. Nedostatak razlike između grupa pripisuje ograničenoj senzitivnosti testova i niskoj snazi studija tj. premalom broju ispitanika. Zbog razlika u senzitivnosti korištenih u dvije različite vremenske točke u našem ispitivanju, nismo bili u mogućnosti usporediti grupe u vremenu. Nadalje, moderni imunoenzimski testovi mnogo su senzitivniji od testova koje smo koristili u ovoj studiji i

smatramo da bi se njihovim korištenjem otkrile mnogo suptilnije razlike. To je vrlo važno jer, prema dosadašnjim istraživanjima promjene u PTSP-u očito postoje i to vjerojatno u smislu kronične upale niskog stupnja (engl. *chronic low grade inflammation*) što predstavlja rizik za razvoj niza bolesti. Da bi se ove razlike detektirale, studije je potrebno pažljivo dizajnirati uz korištenje senzitivnih testova kojima se istovremeno može odrediti više proupalnih faktora.

TNF- α i IL-6 nisu korelirali s ostalim biološkim varijablama u osoba s PTSP-om niti u jednom od ispitivanja (Tablica 9, str. 63; Tablica 10, str. 64). Pronađene korelacije u zdravih kontrola vjerojatno reflektiraju imunoregulacijske aktivnosti. Zna se da TNF- α potiče lučenje IL-6⁸⁸ što objašnjava nalaz njihove pozitivne korelacije u zdravih kontrola u drugom ispitivanju. Isto tako, TNF- α potiče ekspresiju GR- α ⁹² čime se može objasniti pozitivna korelacija u zdravih kontrola u prvom ispitivanju.

Neočekivan je nalaz negativne korelacije između razine psihičkih simptoma PTSP-a i koncentracije IL-6 (Tablica 11, str. 66; Tablica 12, str. 67). Već smo prije naglasili potencijalno važnu ulogu IL-6 u modulaciji ekspresije GR- α . Budući da u prvom ispitivanju postoji tendencija višim vrijednostima IL-6 u ispitanika s PTSP-om, moguće je da je on u dijelu bolesnika s najviše izraženim simptomima inducirao pojačanu sintezu GR- α . Zbog veće ekspresije GR- α i posljedično pojačane senzitivnosti na glukokortikoide, sinteza IL-6 u stanicama ovih bolesnika sada postaje smanjena što rezultira i nižim koncentracijama u serumu. Ekspresija GR- α pozitivno je korelirala s psihičkim simptomima u prvom ispitivanju tako da su oni s najizraženijim simptomima imali višu ekspresiju GR- α i nižu razinu IL-6.

5.4 CITOTOKSIČNOST NK-STANICA

Pretpostavka o dezinhibiciji imunostava najbolje se odražava na nalazima citotoksičnosti NK-stanica. Osobe s PTSP-om imale su povišenu citotoksičnost NK-stanica u sva tri omjera efektorskih prema ciljnim stanicama u prvom ispitivanju (Tablica 6, str. 48; Slika 5, str. 55). Već je spomenuta pozitivna korelacija s razinom prolaktina što izvrsno pokazuje mogući mehanizam dezinhibicije imunosustava u slučaju poremećene signalizacije glukokortikoidima.

Citotoksičnost je ostala visoka i u drugom ispitivanju, međutim nije se razlikovala od zdravih kontrola kod kojih je citotoksičnost NK-stanica porasla (Slika 5, str. 55; Tablica 8, str. 52). U posljednjoj metaanalizi literature o utjecaju stresa na imunosustav⁷⁹ vidljivo je da akutni, vremenski ograničeni, najčešće laboratorijski stresori (npr. matematički zadatak) povišuju citotoksičnost NK-stanica. Međutim, čak i kratki stresori iz stvarnog života (npr. ispit), a pogotovo kronični stres (npr. briga za kronično bolesnog supružnika) dovode do smanjenja citotoksičnosti NK-stanica. Stoga, vjerojatnost da su psihički faktori uzrok visokoj citotoksičnosti NK-stanica u zdravih kontrola je mala. Ne možemo isključiti niti metodološke promjene u izvođenju testa u drugom ispitivanju. U tom

slučaju, rezultate između dva ispitivanja ne bismo mogli uspoređivati i sigurnije bi bilo nalaz u drugom ispitivanju interpretirati jednostavno kao nedostatak razlike između osoba s PTSP-om i zdravih kontrola budući da su testovi tijekom drugog ispitivanja sigurno napravljeni na isti način i pod istim uvjetima za ispitanike i kontrole.

Unatoč gore navedenim problemima u interpretaciji rezultata, ostaje nalaz povišene citotoksičnosti NK-stanica u prvom ispitivanju što je u skladu i s nekoliko drugih studija. Povišena citotoksičnost NK-stanica pronađena je u vijetnamskih veterana s PTSP-om²¹³ te u nekih studija koje su uključivale ekstremno traumatsko iskustvo, ali nije postavljena dijagnoza PTSP-a: kod hrvatskih profesionalnih vojnika nakon akcije²¹⁴, izraelskih civila nakon raketiranja²¹⁵ i radnika na aerodromu izloženim leševima nakon avionske nesreće²¹⁶. Međutim, podjednako se izvještava i o sniženoj citotoksičnosti NK-stanica nakon traume bez razvijenog PTSP-a i to u osoba oslobođenih iz koncentracijskog logora¹³⁵ i preživjelih nakon uragana¹⁵⁶. Snižena citotoksičnost NK-stanica pronađena je i u osoba s razvijenom kliničkom slikom PTSP-a²¹⁷⁻²¹⁸ ili koje su u prošlosti imale PTSP²¹⁹. Naši neobjavljeni rezultati na uzorku ratnih veterana kod kojih je prošlo više od 10 godina od traumatskog iskustva također pokazuju sniženu citotoksičnost NK-stanica u osoba s PTSP-om.¹⁹⁸ Ako uzmemo u obzir da u ovom istraživanju nismo pronašli razliku citotoksičnosti NK-stanica u odnosu na zdrave kontrole u drugom ispitivanju, možemo pretpostaviti da bi promjene u citotoksičnosti mogle pratiti isti obrazac kao i promjene u GR-u, tj. ukoliko se stresno opterećenje nastavi citotoksičnost NK-stanica bi mogla biti niža kao što je to slučaj u kroničnom stresu.

5.5 UKUPNI BROJ LIMFOCITA I IMUNOFENOTIP

I nalazi koji se odnose na sastav stanica imunostava u odjeljku periferne krvi najčešće se interpretiraju kao pojačana aktivacija imunostava osoba s PTSP-om čime se objašnjava i povećana učestalost autoimunskih i drugih tjelesnih bolesti.²²⁰ Prije nego što se osvrnemo na rezultate našeg istraživanja, potrebno je naglasiti nekoliko problema u interpretaciji ovih istraživanja. Normalne vrijednosti limfocita i udjela pojedinih subpopulacija limfocita dosta su širokog raspona, odnosno postoji velika varijabilnost među pojedincima. Rezultati studija najčešće se odnose na usporedbu bolesnika i zdravih kontrola u jednoj točki (presječne studije), a razlike o kojima se izvještava najčešće su unutar normalnih vrijednosti. Već smo u uvodu naglasili da se distribucija leukocita između pojedinih odjeljaka (krv, limfa i limfni čvorovi, slezena, tkiva) mijenja nakon akutnog stresnog podražaja i da promjene broja leukocita i udjela pojedinih populacija ne moraju odražavati njihovu funkciju. Efektorska funkcija leukocita obavlja se u ciljnim tkivima (i lokalnim limfnim čvorovima), a u stresnoj reakciji recirkulacija se usmjerava upravo prema ovim odjeljcima tako da leukociti i pojedine populacije leukocita mogu biti u perifernoj krvi sniženi uz istovremenu aktivaciju imunostava.^{19, 221} Ako naše presječno istraživanje uključuje skupine koje se razlikuju isključivo po prisutnosti ili

odsutnosti PTSP-a, pronađene razlike u imunofenotipu između skupina možemo u najboljem slučaju interpretirati kao utjecaj neuroendokrinih faktora vezanih uz PTSP na recirkulaciju limfocita što može (ali ne mora) imati svoj odraz u njihovoj funkciji.

U našem istraživanju broj limfocita bio je u obje vremenske točke povišen u osoba s PTSP-om u odnosu na zdrave kontrole (Tablica 6, str. 48; Tablica 7, str. 50; Slika 7, str. 57). Zabilježen je i značajan pad broja limfocita u drugom ispitivanju u odnosu na prvo, ali on je bio izražen u obje grupe tako da je razlika u drugoj točki očuvana s otprilike podjednakom veličinom učinka PTSP-a na broj limfocita (Tablica 8, str. 52; Slika 7, str. 57; Slika 9, str. 61; Slika 10, str. 62). Na uzorku od preko 2000 vijetnamskih ratnih veterana pokazano je da osobe s dijagnozom PTSP-a imaju veći broj limfocita,²²⁰ a isti autori kasnije pokazuju da istovremeno uz povećan broj limfocita, osobe s dijagnozom PTSP-a imaju i nekoliko puta veću šansu za razvoj raznih autoimunskih bolesti.⁷ Nadalje, na uzorku od preko 4000 vijetnamskih ratnih veterana pokazana je veza između inicijalnog povišenja ukupnog broja leukocita u PTSP-u i mortaliteta zbog raznih bolesti 15 godina kasnije.¹²⁴ U jednoj od studija ukupni broj limfocita pozitivno je korelirao sa simptomima PTSP-a kod osoba preživjelih nakon uragana.¹⁵⁶ Međutim, pronađen je i sniženi broj limfocita, i to u osoba s pozitivnom anamnezom simptoma koji upućuju na PTSP, ali bez sadašnje bolesti.²¹⁹ U ostalim studijama nije bilo razlike u broju limfocita i/ili ukupnih leukocita između traumatiziranih osoba i kontrola.^{135, 222-223} Iako su rezultati dosadašnjih istraživanja načelno neujednačeni, naši rezultati u skladu su s rezultatima Boscarina i sur.²²⁰ gdje je korišten najveći uzorak i dijagnoza PTSP-a je jasno postavljena. Možemo se stoga prikloniti hipotezi Boscarina i sur. da bi povećan broj limfocita u perifernoj cirkulaciji osoba PTSP-om mogao biti značajan rizični faktor za razvoj autoimunskih bolesti. Vrijednost ovog nalaza leži i u činjenici što su osobe s PTSP-om imale povećan broj limfocita u perifernoj krvi u odnosu na zdrave kontrole u obje vremenske točke. To upućuje da bi ovo mogla biti stabilna karakteristika vezana za PTSP koja ne ovisi o vremenu proteklom od traume.

Povećan udio ukupnih T-limfocita (CD3+), posebno pomoćničkih T-limfocita (CD4+), kao i odsustvo razlike u postotcima citotoksičnih T-limfocita (CD8+) i B-limfocita (CD20+) između osoba s PTSP-om i zdravih kontrola u prvoj vremenskoj točki (Tablica 6, str. 32; Slika 8, str. 58) u potpunosti su u skladu s gore spomenutim istraživanjem Boscarina i sur.²²⁰ Povećan broj T-limfocita potvrđen je u sljedećoj Boscarinovoj studiji u kojoj je pronađena i veza između PTSP-a i veće pojavnosti autoimunskih bolesti.⁷ Zanimljivo je i istraživanje u kojem je ispitana reaktivnost imunofenotipskih varijabli (CD4+, CD8+ i NK-stanica (CD16+CD56+)) na akutni stresni podražaj kod majki teško bolesne djece koje su pokazivale simptome PTSP-a.²²⁴ Za vrijeme ispitivanja (unutar jedno sata krv je vađena 5 puta) majke sa simptomima PTSP-a imale su povećani udio pomoćničkih T-limfocita (CD4+) i sniženi udio citotoksičnih T-limfocita (CD8+) u perifernoj krvi u svih 5 mjerenja. Udio cirkulirajućih NK-stanica

(CD16+CD56+) bazalno nije bio promijenjen između grupa, ali je rastao nakon generičkog akutnog stresnog podražaja i nakon čitanja individualiziranih traumatskih scenarija. Međutim taj je porast bio manje izražen u majki koje su pokazivale simptome PTSP-a u odnosu na majke bez simptoma. Ovo istraživanje je vrlo važno jer pokazuje da bi neke promjene imunofenotipa (u ovom slučaju CD4+) mogle biti stabilne i karakteristične za PTSP. U drugom istraživanju praćene su subpopulacije limfocita kod ljudi na području zahvaćenom teškim potresom, i to u tri navrata kroz 4 mjeseca nakon potresa.¹³⁹ Broj ukupnih T-limfocita (CD3+), citotoksičnih T-limfocita (CD8+) i NK-stanica (CD16+CD56+) progresivno je pao paralelno sa simptomima distresa. U našem istraživanju, značajno je pao udio subpopulacija limfocita koje su inicijalno bile povišene (memorijski limfociti (CD45RO+), pomoćnički memorijski T-limfociti (CD4+CD45RO+)), dok su druge inicijalno povišene subpopulacije pokazivale tendenciju pada (ukupni T-limfociti (CD3+), pomoćnički T-limfociti (CD4+)) (Tablica 8, str. 52; Slika 8, str. 58), tako da u drugom ispitivanju nije bilo razlike u odnosu na zdrave kontrole (Tablica 7, str. 50). Istovremeno je pala i razina simptoma PTSP-a što upućuje na manji utjecaj psihičkih faktora na recirkulaciju limfocita u drugom ispitivanju (Slika 2, str. 41). Međutim, kako je ukupni broj limfocita bio povišen u odnosu na zdrave kontrole i u drugom ispitivanju, ispitali smo razlike u apsolutnim brojevima subpopulacija limfocita. Gruba neparametarska analiza (Mann-Whitney U test), bez korekcije za višestruke usporedbe, pokazuje da su apsolutni brojevi upravo onih subpopulacija limfocita čiji su udjeli bili povišeni u prvom ispitivanju, bili povišeni i u drugom ispitivanju (CD3+, U=281, p=0,008; CD4+, U=263, p=0,012; CD45RO+, U=327, p=0,046; CD4+CD45RO+, U=308, 0,023). Možemo pretpostaviti da, unatoč padu razine simptoma, i dalje postoji učinak faktora uključenih u patogenezu PTSP-a na recirkulaciju gore spomenutih subpopulacija limfocita.

Neka istraživanja ukazuju na mogućnost pojačane aktivacije pojedinih subpopulacija limfocita u perifernoj krvi traumatiziranih osoba. Dekaris i sur.¹³⁵ pokazali su da osobe koje su netom otpuštene iz koncentracijskog logora imaju povišen udio aktiviranih T- i B-limfocita u perifernoj krvi. Isto to pokazali su Sabioncello i sur.¹³⁶ na uzorku od 20 žena prognanih iz područja pogođenih ratom. Na pojačanu aktivaciju limfocita u perifernoj krvi upućuje i nalaz Wilsona i sur.²²² koji su pronašli da žene s dijagnozom PTSP-a koje su zlostavljane u djetinjstvu imaju povećan omjer memorijskih prema naivnim limfocitima (CD45RO+/CD45RA+). To je u skladu i s istraživanjem Dekarisa i sur.¹³⁵ koji su pokazali sniženi udio naivnih pomoćničkih T-limfocita (CD4+CD45RA+) u perifernoj krvi traumatiziranih osoba. U jednom od novijih istraživanja, također na uzorku žena traumatiziranih u djetinjstvu, ovi rezultati nisu potvrđeni, već je pronađeno upravo suprotno tj. povišen udio CD45RA+ pomoćničkih i citotoksičnih T-limfocita i snižen udio CD45RO+ limfocita.²²⁵ Koristeći nešto drugačiji pristup u obilježavanju stanica, Sommershof i sur.²²⁶ su pokazali da osobe koje su nakon ratnog

traumatskog iskustva razvile PTSP (od kojih je velik dio preživio mučenje) imaju povišen udio centralnih (CD45RA⁺ CCR7⁺) i efektorskih (CD45RA⁺ CCR7⁻) memorijskih limfocita u odnosu na kontrole. Prema tome, većina studija upućuje na povišen udio memorijskih limfocita u perifernoj krvi traumatiziranih osoba u što se uklapa i naš nalaz povišenih udjela CD45RO⁺ i CD4⁺CD45RO⁺ limfocita u prvom ispitivanju (Tablica 6, str. 48; Slika 8, str. 58). Apsolutni brojevi ovih subpopulacija u drugom ispitivanju također su bili povišeni. CD45 je transmembranski protein uključen u signalizaciju preko T-staničnog receptora. Naivni limfociti u cirkulaciji posjeduju CD45RA-izoformu ovog biljega. Nakon aktivacije, limfociti eksprimiraju i CD45RO-izoformu te su neko vrijeme dvostruko pozitivni da bi u konačnici eksprimirali samo CD45RO-izoformu pa se smatra da CD45RO⁺ stanice predstavljaju dugoživuće memorijske limfocite.⁶⁶ Obzirom na to, povećan udio ovih limfocita može označavati njihovu nedavnu ili prošlu aktivaciju, a moguće je da do ove aktivacije dolazi i uslijed neuroendokrinih faktora. Međutim, veći broj memorijskih limfocita može značiti i povećanu učestalost kontakta s različitim antigenima u prošlosti što nije isključeno obzirom uvijete u kojima su veterani boravili na ratištu. Isto tako, udio memorijskih limfocita u periferiji ne govori mnogo o njihovoj funkciji u ciljnim tkivima kao što je to pokazano kod žena zlostavljanih u djetinjstvu koje su imale PTSP i pojačanu odgođenu kožnu reakciju preosjetljivosti u odnosu na kontrole, bez razlike u omjeru CD45RO/CD45RA limfocita u perifernoj cirkulaciji.²²³

Udio ukupnih i citotoksičnih T-limfocita pozitivno je korelirao s koncentracijom kortizola u drugoj vremenskoj točki (Tablica 10, str. 64). Ovaj nalaz upućuje na nedavnu aktivaciju stresnog sustava budući da kortizol (uz kateholamine) u prvoj fazi akutne stresne reakcije dovodi do povećanja broja limfocita u cirkulaciji.¹⁹

Zanimljiv je i nalaz pozitivne korelacije B-limfocita i aktiviranih B-limfocita (CD20⁺CD23⁺) s razinom psihičkih simptoma u prvom ispitivanju (Tablica 11, str. 66). CD23 integralni je membranski protein, receptor niskog afiniteta za imunoglobulin E (FcεRII). Ima važnu ulogu u alergijskim i nekim autoimunim bolestima u kojima je dokazana i povećana ekspresija ovog markera na B-limfocitima.²²⁷⁻²²⁹ Prema našim saznanjima, ovaj marker do sada nije istraživao na modelima stresa. Iako nismo pronašli razliku u subpopulaciji CD20⁺CD23⁺ limfocita između osoba s PTSP-om i zdravih kontrola, pronađeni odnos s razinom simptoma upućuje na potencijalni utjecaj stresa na ekspresiju CD23.

Nadalje, osim što je pozitivno korelirao s razinom psihičkih simptoma, udio ukupnih B-limfocita bio je i značajan prediktor psihičkih simptoma u regresijskom modelu koji se odnosi na prvo ispitivanje (Tablica 12, str. 67). Rezultati nekoliko istraživanja u kojima je određivan broj ili udio cirkulirajućih B-limfocita u traumatiziranih osoba vrlo su nekonzistentni.^{135-136, 220, 222, 230} Potrebna su

daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo je li ovaj nalaz od kakvog značaja za promjene u humoralnoj imunosti koje su do sada pronađene u PTSP-u.²³¹

Naši rezultati, kao i rezultati drugih istraživanja imunofenotipa upućuju na činjenicu da PTSP svakako utječe na recirkulaciju pojedinih subpopulacija limfocita, međutim promjene nisu jednoznačne i vjerojatno, između ostalog, ovise i o učestalosti aktivacije stresnog sustava u osoba s PTSP-om koja je u ovoj populaciji svakako češća u odnosu na ostatak populacije. Zbog toga je i veća vjerojatnost da ćemo u jednom trenutku pronaći određene promjene. Te promjene će ovisiti o frekvenciji i intenzitetu simptoma, tj. o vremenu kada je posljednji put nastupila aktivacija stresnog sustava. Vjerojatno zbog toga promjene koje su do sada opažene u imunofenotipu osoba s PTSP-om više odgovaraju rezultatima istraživanja u akutnom stresu.⁷⁹ U sklopu akutne stresne reakcije, već unutar jednog sata u cirkulaciji možemo pronaći najprije povećanje broja leukocita, zatim pad i u konačnici povratak na početne vrijednost¹⁹ (vidi poglavlje Stečena i urođena imunost, recirkulacija limfocita, str. 13). Iako se čini da bi neke promjene mogle biti stabilne i karakteristične za PTSP (npr. broj limfocita, pogotovo pomoćničkih T-limfocita kao što je i naše istraživanje pokazalo), tek longitudinalne studije mogu to potvrditi. Nužno je praćenje imunofenotipa u kombinaciji s funkcijskim testovima u kratkim vremenskim intervalima (u toku dana, kroz nekoliko dana) uz ispitivanje reaktivnosti na akutni stresni podražaj u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Tada ćemo moći i bolje zaključivati o uzrocima i funkcionalnim posljedicama ovih nalaza i mogućim implikacijama za razvoj bolesti.

6 ZAKLJUČCI

Unutar približno 6 godina od traumatskog iskustva promjene endokrinog sustava koje upućuju na aktivnost HHN-osovine (povišena koncentracija kortizola, snižena ekspresija GR) suprotne su od promjena dobivenih u velikom broju drugih istraživanja. Za razliku od našeg, velik dio ovih istraživanja uključivao je ispitanike s PTSP-om više desetaka godina od traume.

Povećanje ekspresije GR u subpopulacijama limfocita u narednih 6 godina upućuje na dva moguća scenarija:

- a) Zbog efikasnog liječenja (psihofarmakoterapija) smanjuje se intenzitet i frekvencija simptoma, a time i učestalost aktivacije stresnog sustava, odnosno lučenja stresnih hormona, što rezultira postupnim povećanjem ekspresije GR.
- b) Unatoč padu razine psihičkih simptoma PTSP-a, taj pad nije bio velik tako da su simptomi u drugom ispitivanju i dalje bili izraženi, a to podrazumijeva aktivaciju stresnog sustava. Učestala aktivacija stresne reakcije predstavlja alostatsko opterećenje, tj. niz fizioloških adaptacijskih promjena koje mijenjaju regulaciju ekspresije GR. Porast ekspresije GR je stoga rezultat alostatskog opterećenja što bi u konačnici moglo rezultirati daljnjim porastom ekspresije GR do razine opažene u drugim istraživanjima.

Rezultati povišene koncentracije proinflamatornog citokina TNF- α , povišene citotoksičnosti NK-stanica, i povećanih udjela pojedinih subpopulacija T-limfocita u cirkulaciji govore u prilog pojačanoj imunoreaktivnosti osoba s PTSP-om u prvih približno 6 godina od traumatskog iskustva. Čini se da imunoreaktivnost nije u direktnoj vezi s razinom kortizola i GR u limfocitima već da ovisi o djelovanju drugih medijatora koji sudjeluju u stresnoj reakciji. Naši rezultati upućuju na moguću važnu ulogu prolaktina.

Nadalje, naše istraživanje pokazuje da bi povećanje broja ukupnih cirkulirajućih limfocita moglo biti stabilna karakteristika PTSP-a. Dodatnu težinu ovom nalazu daje i nedavno istraživanje u kojem je povećan broj cirkulirajućih limfocita u PTSP-u doveden u vezu s većom pojavnosću autoimunih bolesti.

Konačan odgovor na pitanje koliko su istraživane promjene u PTSP-u važne za nastanak tjelesnih bolesti mogu dati samo dobro dizajnirane longitudinalne studije na većem uzorku koje će uključivati praćenje pojavnosti bolesti u sprezi s promjenama neuroendokrinog i imunostava.

7 SAŽETAK

Posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) vezan je uz povećanu pojavnost tjelesnih, osobito autoimunskih i kardiovaskularnih bolesti. Smatra se da su stresom uvjetovane promjene endokrinog i imunostava ključni posrednici u razvoju ovih bolesti. Unatoč opsežnom istraživanju u ovom području, ne postoje jasni dokazi o specifičnim promjenama imunostava i endokrinog sustava u PTSP-u. Postoje naznake da bi ove promjene mogle ovisiti o trajanju PTSP-a. Cilj naše studije bio je ispitati mijenjaju li se razine hormona (kortizol i prolaktin), citokina (interleukin-6 (IL-6) i faktor nekroze tumora α (TNF- α)), ekspresija glukokortikoidnog receptora (GR) u pojedinim limfocitnim subpopulacijama, funkcija imunostava (citotoksičnost urođenoubilačkih (NK, engl. *natural killer*) stanica) i udio raznih subpopulacija limfocita (T-limfociti, pomoćnički i citotoksični T-limfociti, B-limfociti, NK-stanice, ukupni i pomoćnički memorijski T-limfociti) tijekom vremena u osoba s PTSP-om. Također smo željeli ispitati međudjelovanje gore navedenih varijabli kao i njihov odnos prema razini simptoma PTSP-a.

Ispitali smo 39 hrvatskih ratnih veterana s dijagnozom PTSP-a i 37 (25 u drugom ispitivanju) po spolu i dobi ujednačenih zdravih dobrovoljaca u dvije vremenske točke u razmaku od 5,6 godina (medijan; interkvartilni raspon: 5,4-6,3). Koncentracija hormona u serumu određena je radioimunotestom, a koncentracija citokina imunoenzimskim testovima. Funkcija imunostava procijenjena je testom citotoksičnosti NK-stanica prema tumorskim K562 ciljnim stanicama obilježenim s ^{51}Cr . Ukupni broj limfocita, udio pojedinih subpopulacija limfocita i ekspresija GR-a u tim stanicama određena je metodom protočne citometrije.

U prvoj vremenskoj točki osobe s PTSP-om imale su povišenu koncentraciju kortizola, prolaktina i TNF- α u serumu, povišenu citotoksičnost NK-stanica, povećan ukupni broj cirkulirajućih limfocita, povišen udio T-limfocita, pomoćničkih T-limfocita, ukupnih memorijskih i pomoćničkih memorijskih T-limfocita dok je ekspresija glukokortikoidnog receptora bila snižena u svim subpopulacijama limfocita u odnosu na zdrave kontrole. U drugoj vremenskoj točki samo su koncentracija prolaktina i ukupni broj limfocita ostali povišeni dok u drugim varijablama nije bilo razlike u odnosu na zdrave kontrole.

Možemo zaključiti da promjene endokrinog i imunostava nisu statične u osoba s PTSP-o, već vjerojatno ovise o trajanju alostatskog opterećenja koje je uvjetovano samim stresnim poremećajem i njegovim utjecajem na međudjelovanje komponenti endokrinog i imunostava uključenih u stresnu reakciju.

8 ABSTRACT

Title: Endocrine and immune system interactions in posttraumatic stress disorder – longitudinal study

Posttraumatic stress disorder (PTSD) has been associated with increased medical morbidity, particularly with the autoimmune and cardiovascular diseases. It is assumed that stress-related changes in the endocrine and immune systems are key mediators involved in the development of diseases. Despite extensive research in the field, there is no conclusive evidence linking specific changes in the endocrine and immune systems to PTSD. Some evidence suggests that those changes might be related to the duration of the PTSD. The aim of our study was to investigate whether hormones (cortisol and prolactin), proinflammatory cytokines (interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)), lymphocyte expression of glucocorticoid receptor (GR), immune function (NKCC, natural killer cell cytotoxicity) and peripheral blood percentages of various lymphocyte subpopulations (T cells, helper T cells, cytotoxic T cells, B cells, natural killer (NK) cells, memory T cells and memory helper T cells) change in patients with PTSD over time. We also wanted to investigate mutual interactions of above mentioned variables and their relation to PTSD symptoms.

We assessed 39 Croatian war veterans with PTSD and 37 (25 in the second time point) sex and age matched healthy volunteers in two time points separated by 5.6 years (median; interquartile range: 5.4-6.3). Hormones were measured by radioimmunoassay and cytokines were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immune function was assessed with the *in vitro* natural killer cell cytotoxicity (NKCC) toward ^{51}Cr -labeled K562 target cells. Lymphocyte counts, immunophenotype and intracellular glucocorticoid receptor expression were determined by three-color flow cytometry.

In the first time point serum levels of cortisol, prolactin, and TNF- α , NKCC, lymphocyte count, total T cells, helper T cells, total memory cells, and helper memory T cells were increased, while glucocorticoid receptor expression was decreased in all lymphocyte subpopulations in PTSD patients compared to controls. In the second time point only prolactin levels and lymphocyte counts remained elevated and no significant differences in other variables have been observed.

We can conclude that changes in the endocrine and immune systems are not static in persons with PTSD but rather depend on duration of alostatic load posed by the disorder and its impact on interactions between endocrine and immune systems involved in stress response.

Anđelko Vidović, 2009.

9 POPIS LITERATURE

1. Flögel M, Lauc G. War Stress – Effects of the War in the Area of Former Yugoslavia. U: Fink G, ur. Encyclopedia of Stress. 2. izd. San Diego: Academic Press; 2007, str. 678-84.
2. Kozaric-Kovacic D, Grubisic-Ilic M, Grubisic F, Kovacic Z. Suicide: rates and methods before, during and after the war in Croatia (1985-2000). Natl Med J India 2002;15:356-7.
3. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV-TR. 4th. izd. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, Inc.; 2000.
4. Spiro A, 3rd, Schnurr PP, Aldwin CM. Combat-related posttraumatic stress disorder symptoms in older men. Psychol Aging 1994;9:17-26.
5. Kessler RC, Sonnega A, Bromet E, Hughes M, Nelson CB. Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. Arch Gen Psychiatry 1995;52:1048-60.
6. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. Nat Rev Endocrinol 2009;5:374-81.
7. Boscarino JA. Posttraumatic stress disorder and physical illness: Results from clinical and epidemiologic studies. Ann N Y Acad Sci 2004;1032:141-53.
8. Schnurr PP, Green BL. Understanding relationships among trauma, posttraumatic stress disorder, and health outcomes. U: Schnurr PP, Green BL, ur. Trauma, posttraumatic stress disorder, and health status. Washington, DC, US: American Psychological Association; 2004, str. 247-75.
9. Kubzansky LD, Koenen KC. Is posttraumatic stress disorder related to development of heart disease? An update. Cleve Clin J Med 2009;76 Suppl 2:S60-5-S-5.
10. Cannon WB. The Wisdom of the Body. 1. izd. New York: W.W. Norton & Company, Inc.; 1932.
11. Cannon WB. Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage: An Account of Recent Researches Into the Function of Emotional Excitement. 1. izd. New York: Appleton; 1929.
12. Selye H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. Nature 1936;138:32.
13. Selye H. The Stress of Life. 1. izd. McGraw-Hill; 1956.
14. Mason JW. A historical view of the stress field. J Human Stress 1975;1:6-12.
15. Lazarus RS. From psychological stress to the emotions: A history of changing outlooks. Annu Rev Psychol 1993;44:1.
16. Lazarus RS, Folkman S. Stress, Appraisal, and Coping. 1. izd. New York: Springer Publishing Company; 1984.

17. Levine S, Ursin H. What is stress? U: Brown MR, Koob GF, Rivier C, ur. Stress: Neurobiology and Neuroendocrinologyizd. New York: Marcel Dekker; 1991, str. 3-21.
18. Ursin H, Eriksen HR. The cognitive activation theory of stress. Psychoneuroendocrinology 2004;29:567-92.
19. Dhabhar FS, McEwen B. Bi-directional effects of stress on immune function: possible explanations for salubrious as well as harmful effects. U: Ader R, ur. Psychoneuroimmunologyizd. Oxford, UK: Elsevier Academic Press; 2007, str. 723-60.
20. Van de Kar LD, Blair ML. Forebrain Pathways Mediating Stress-Induced Hormone Secretion. Front Neuroendocrinol 1999;20:1-48.
21. Elliott GR, Eisdorfer C. Stress and Human Health: Analysis and Implications of Researchizd. Springer Pub Co; 1982.
22. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. N Engl J Med 1998;338:171-9.
23. McEwen BS. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. Physiol Rev 2007;87:873-904.
24. Day TA. Defining stress as a prelude to mapping its neurocircuitry: no help from allostasis. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2005;29:1195-200.
25. Ising M, Holsboer F. Genetics of stress response and stress-related disorders. Dialogues Clin Neurosci 2006;8:433-44.
26. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, i sur. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science 2003;301:386-9.
27. Bradley RGP, Binder EBMDP, Epstein MPP, Tang YP, Nair HPP, Liu WP, i sur. Influence of Child Abuse on Adult Depression: Moderation by the Corticotropin-Releasing Hormone Receptor Gene. Arch Gen Psychiatry 2008;65:190-200.
28. Binder EBMDP, Bradley RGP, Liu WP, Epstein MPP, Deveau TCBS, Mercer KBMPH, i sur. Association of FKBP5 Polymorphisms and Childhood Abuse With Risk of Posttraumatic Stress Disorder Symptoms in Adults. JAMA 2008;299:1291-305.
29. Kanaka-Gantenbein C, Mastorakos G, Chrousos GP. Endocrine-related causes and consequences of intrauterine growth retardation. Ann N Y Acad Sci 2003;997:150-7.

30. Hack M, Youngstrom EA, Cartar L, Schluchter M, Taylor HG, Flannery D, i sur. Behavioral outcomes and evidence of psychopathology among very low birth weight infants at age 20 years. *Pediatrics* 2004;114:932-40.
31. Phillips DI, Barker DJ. Association between low birthweight and high resting pulse in adult life: is the sympathetic nervous system involved in programming the insulin resistance syndrome? *Diabet Med* 1997;14:673-7.
32. Coe CL, Kramer M, Czeh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, i sur. Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biol Psychiatry* 2003;54:1025-34.
33. Felitti VJ, Anda RF, Nordenberg D, Williamson DF, Spitz AM, Edwards V, i sur. Relationship of childhood abuse and household dysfunction to many of the leading causes of death in adults. The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study. *Am J Prev Med* 1998;14:245-58.
34. Essex MJ, Klein MH, Cho E, Kalin NH. Maternal stress beginning in infancy may sensitize children to later stress exposure: effects on cortisol and behavior. *Biol Psychiatry* 2002;52:776-84.
35. Gadin KG, Hammarstrom A. School-related health--a cross-sectional study among young boys and girls. *Int J Health Serv* 2000;30:797-820.
36. Wolke D, Woods S, Bloomfield L, Karstadt L. Bullying involvement in primary school and common health problems. *Arch Dis Child* 2001;85:197-201.
37. Kaufman J, Plotsky PM, Nemeroff CB, Charney DS. Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. *Biol Psychiatry* 2000;48:778-90.
38. Heim C, Newport DJ, Mletzko T, Miller AH, Nemeroff CB. The link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology* 2008;33:693-710.
39. Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 2001;49:1023-39.
40. Sabban EL, Serova LI. Influence of prior experience with homotypic or heterotypic stressor on stress reactivity in catecholaminergic systems. *Stress* 2007;10:137-43.
41. Valentino RJ, Van Bockstaele E. Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol* 2008;583:194-203.

42. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 2000;21:55-89.
43. Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 2003;463:235-72.
44. Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. *Williams Textbook of Endocrinology* izd. Saunders; 2007.
45. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005;353:1711-23.
46. Collins S, Caron MG, Lefkowitz RJ. Beta-adrenergic receptors in hamster smooth muscle cells are transcriptionally regulated by glucocorticoids. *J Biol Chem* 1988;263:9067-70.
47. Kelley KW, Weigent DA, Kooijman R. Protein hormones and immunity. *Brain Behav Immun* 2007;21:384-92.
48. Leonard BE. The HPA and immune axes in stress: The involvement of the serotonergic system. *European Psychiatry* 2005;20:S302-S6.
49. Addison T. On the constitutional and local effects of disease of the supra-renal capsules. 1. izd. Highley, 1855; Birmingham: Classics of Medicine Library; 1980.
50. Jaffe HL. The influence of the suprarenal gland on the thymus: III. Stimulation of the growth of the thymus gland following double suprarenalectomy in young rats. *J Exp Med* 1924;40:753-9.
51. Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH, Polley HF. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-corticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Mayo Clin Proc* 1949;24:181-97.
52. Besedovsky HO, Del Rey A, Sorkin E. Antigenic competition between horse and sheep red blood cells as a hormone-dependent phenomenon. *Clin Exp Immunol* 1979;37:106-13.
53. Besedovsky HO, del Rey A, Sorkin E. Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. *J Immunol* 1981;126:385-7.
54. Blalock JE, Stanton JD. Common pathways of interferon and hormonal action. *Nature* 1980;283:406-8.
55. Smith EM, Blalock JE. Human lymphocyte production of corticotropin and endorphin-like substances: association with leukocyte interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7530-4.

56. Bernton EW, Beach JE, Holaday JW, Smallridge RC, Fein HG. Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 1987;238:519-21.
57. Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science (New York, NY)* 1987;238:522-4.
58. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine* 1999;340:448-54.
59. Kluger MJ. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev* 1991;71:93-127.
60. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve - An integrative interface between two supersystems: The brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000;52:595-638.
61. Blalock JE, Smith EM. Conceptual development of the immune system as a sixth sense. *Brain Behav Immun* 2007;21:23-33.
62. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *The Journal of Clinical Investigation* 2007;117:289-96.
63. Ziemssen T, Kern S. Psychoneuroimmunology--cross-talk between the immune and nervous systems. *J Neurol* 2007;254 Suppl 2:II8-11-II8-.
64. Vitkovic L, Konsman JP, Bockaert J, Dantzer R, Homburger V, Jacque C. Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry* 2000;5:604-15.
65. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Schettini G. Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J Neurochem* 2002;82:1311-29.
66. Janeway C. Chapter 1: Basic Concepts in Immunology. *Immunobiology* izd. Garland Science; 2004, str. 800.
67. Jalkanen S, Salmi M. Lymphocytes: recirculation. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1. izd. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd www.els.net; 2007.
68. Marelli-Berg FM, Cannella L, Dazzi F, Mirenda V. The highway code of T cell trafficking. *J Pathol* 2008;214:179-89.
69. Sprent J, Tough DF. T cell death and memory. *Science* 2001;293:245-8.
70. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.

71. Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ. B cell autonomous TLR signaling and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2008;7:313-6.
72. Germain RN. An innately interesting decade of research in immunology. *Nat Med* 2004;10:1307-20.
73. Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2006;6:318-28.
74. Dhabhar FS. Stress, leukocyte trafficking, and the augmentation of skin immune function. *Ann N Y Acad Sci* 2003;992:205-17.
75. Elenkov IJ. Neurohormonal-cytokine interactions: Implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochem Int* 2008;52:40-51.
76. Webster Marketon JJ, Glaser R. Stress hormones and immune function. *Cell Immunol* 2008;In Press, Corrected Proof.
77. Valiante NM. Natural Killer (NK) Cells. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1. izd. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd www.els.net; 2002.
78. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008;112:461-9.
79. Segerstrom SC, Miller GE. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull* 2004;130:601-30.
80. Thomson AW, Lotze MT. *The Cytokine Handbook*. 4. izd. Academic Press; 2003.
81. Jain S, Mills PJ. Cytokines, Chronic Stress, and Fatigue. U: Fink G, ur. *Encyclopedia of Stress*. 2. izd. Academic Press; 2007, str. 698-704.
82. Marshall GD. Cytokines. U: Fink G, ur. *Encyclopedia of Stress*. 2. izd. New York: Academic Press; 2007, str. 692-8.
83. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1999;79:1-71.
84. Banks WA. Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Curr Pharm Des* 2005;11:973-84.
85. Banks WA, Lynch JL, Price TO. Cytokines and the Blood–Brain Barrier. U: Siegel A, Zalcman SS, ur. *The Neuroimmunological Basis of Behavior and Mental Disorders* 2. izd. Springer; 2008, str. 3-19.

86. Quan N, Banks WA. Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun* 2007;21:727-35.
87. Lazarus M. The differential role of prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in regulation of fever. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:451-5.
88. O'Connor TM, O'Halloran DJ, Shanahan F. The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *QJM* 2000;93:323-33.
89. Simon NM, McNamara K, Chow CW, Maser RS, Papakostas GI, Pollack MH, i sur. A detailed examination of cytokine abnormalities in Major Depressive Disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008;18:230-3.
90. Hoge EA, Brandstetter K, Moshier S, Pollack MH, Wong KK, Simon NM. Broad spectrum of cytokine abnormalities in panic disorder and posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 2009;26:447-55.
91. Denton RR, Eisen LP, Elsasser MS, Harmon JM. Differential autoregulation of glucocorticoid receptor expression in human T- and B-cell lines. *Endocrinology* 1993;133:248-56.
92. Pace TWW, Hu F, Miller AH. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav Immun* 2007;21:9-19.
93. Angeli A, Masera RG, Sartori ML, Fortunati N, Racca S, Dovio A, i sur. Modulation by cytokines of glucocorticoid action. *Ann N Y Acad Sci* 1999;876:210-20.
94. Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6865-70.
95. Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1069:1-9.
96. Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2002;9:6-19.
97. Bruna A, Nicols M, Munoz A, Kyriakis JM, Caelles C. Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids. *The EMBO Journal* 2003;22:6035-44.
98. Mishler JM. Glucocorticoid effects on neutrophils. *Lancet* 1977;2:95-.

-
99. Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1024:124-37.
 100. Mavoungou E, Bouyou-Akotet MK, Kremsner PG. Effects of prolactin and cortisol on natural killer (NK) cell surface expression and function of human natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp44 and NKp30). *Clin Exp Immunol* 2005;139:287-96.
 101. Blotta MH, DeKruyff RH, Umetsu DT. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 1997;158:5589-95.
 102. Fauci AS, Dale DC. The effect of Hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes. *Blood* 1975;46:235-43.
 103. Kelley KW, Dantzer R. Growth hormone and prolactin as natural antagonists of glucocorticoids in immunoregulation. U: Plotnikoff NP, Murgu A, ur. *Stress and Immunity*. 1st. izd. Boca Roca: CRC Press; 1991, str. 433-52.
 104. Anegg U, Dietmaier G, Maier A, Tomaselli F, Gabor S, Kallus KW, i sur. Stress-induced hormonal and mood responses in scuba divers: a field study. *Life Sci* 2002;70:2721-34.
 105. Schedlowski M, Wiechert D, Wagner TO, Tewes U. Acute psychological stress increases plasma levels of cortisol, prolactin and TSH. *Life Sci* 1992;50:1201-5.
 106. Ben-Jonathan N. Prolactin (PRL). U: Henry H, Norman AW, ur. *Encyclopedia of Hormones* izd. Academic Press; 2003, str. 263-9.
 107. Dimitrov S, Lange T, Fehm HL, Born J. A regulatory role of prolactin, growth hormone, and corticosteroids for human T-cell production of cytokines. *Brain Behav Immun* 2004;18:368-74.
 108. Gerlo S, Verdood P, Hooghe-Peters EL, Kooijman R. Modulation of prolactin expression in human T lymphocytes by cytokines. *J Neuroimmunol* 2005;162:190-3.
 109. Sabioncello A, Gotovac K, Vidović A, Gagro A, Markotić A, Rabatić S, i sur. The immune system under stress. *Periodicum biologorum* 2004;40:236-47.
 110. Rabin B. Stress: a system of the whole. U: Ader R, ur. *Psychoneuroimmunology* izd. Oxford, UK: Elsevier Academic Press; 2007, str. 709-22.

111. Sterling P, Eyer J. Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. U: Fisher S, Reason J, ur. *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*. 1. izd. New York: John Wiley; 1988, str. 629-49.
112. Friedman MJ, McEwen BS. Posttraumatic stress disorder, allostatic load, and medical illness. U: Schnurr PP, Green BL, ur. *Trauma and Health: Physical Health Consequences of Exposure to Extreme Stress*. 1st. izd. Washington, DC, US: American Psychological Association; 2004, str. 157-88.
113. Southwick SM, Paige S, Morgan CA, Bremner JD, Krystal JH, Charney DS. Neurotransmitter alterations in PTSD: catecholamines and serotonin. *Semin Clin Neuropsychiatry* 1999;4:242-8.
114. Bedi US, Arora R. Cardiovascular manifestations of posttraumatic stress disorder. *J Natl Med Assoc* 2007;99:642-9.
115. Shalev AY, Orr SP, Peri T, Schreiber S, Pitman RK. Physiologic responses to loud tones in Israeli patients with posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1992;49:870-5.
116. Buckley TC, Kaloupek DG. A meta-analytic examination of basal cardiovascular activity in posttraumatic stress disorder. *Psychosom Med* 2001;63:585-94.
117. de Kloet CS, Vermetten E, Geuze E, Kavelaars A, Heijnen CJ, Westenberg HGM. Assessment of HPA-axis function in posttraumatic stress disorder: pharmacological and non-pharmacological challenge tests, a review. *J Psychiatr Res* 2006;40:550-67.
118. Ironson G, Cruess D, Kumar M. Immune and neuroendocrine alterations in post-traumatic stress disorder. U: Ader R, ur. *Psychoneuroimmunology*. 2. izd. Oxford, UK: Elsevier Academic Press; 2007, str. 531-47.
119. Boscarino JA. Diseases among men 20 years after exposure to severe stress: implications for clinical research and medical care. *Psychosom Med* 1997;59:605-14.
120. Schnurr PP, Jankowski MK. Physical health and post-traumatic stress disorder: review and synthesis. *Semin Clin Neuropsychiatry* 1999;4:295-304.
121. Boscarino JA, Chang J. Electrocardiogram abnormalities among men with stress-related psychiatric disorders: implications for coronary heart disease and clinical research. *Annals of Behavioral Medicine: A Publication of the Society of Behavioral Medicine* 1999;21:227-34.
122. Kubzansky LD, Koenen KC, Spiro Iii A, Vokonas PS, Sparrow D. Prospective study of posttraumatic stress disorder symptoms and coronary heart disease in the normative aging study. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64:109-16.

123. Schnurr PP, Spiro A, Paris AH. Physician-diagnosed medical disorders in relation to PTSD symptoms in older male military veterans. *Health Psychol* 2000;19:91-7.
124. Boscarino JA. Psychobiologic Predictors of Disease Mortality After Psychological Trauma: Implications for Research and Clinical Surveillance. *J Nerv Ment Dis* 2008;196:100-7.
125. Raison CL, Miller AH. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry* 2003;160:1554-65.
126. Meewisse ML, Reitsma JB, De Vries GJ, Gersons BPR, Olff M. Cortisol and post-traumatic stress disorder in adults: Systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry* 2007;191:387-92.
127. Gotovac K, Sabioncello A, Rabatic 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* 2003;131:335-9.
128. Yehuda R, Golier JA, Yang R-K, Tischler L. Enhanced sensitivity to glucocorticoids in peripheral mononuclear leukocytes in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2004;55:1110-6.
129. Vidović A, Vilibić M, Sabioncello A, Gotovac K, Rabatić S, Folnegović-Šmalc V, i sur. Circulating lymphocyte subsets, natural killer cell cytotoxicity, and components of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in Croatian war veterans with posttraumatic stress disorder: cross-sectional study. *Croat Med J* 2007;48:198-206.
130. Davis LL, Clark DM, Kramer GL, Moeller FG, Petty F. D-fenfluramine challenge in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 1999;45:928-30.
131. Grossman R, Yehuda R, Boisoneau D, Schmeidler J, Giller JEL. Prolactin response to low-dose dexamethasone challenge in combat-exposed veterans with and without posttraumatic stress disorder and normal controls. *Biol Psychiatry* 1996;40:1100-5.
132. Schweitzer I, Morris P, Hopwood M, Maguire K, Norman T. Prolactin response to d-fenfluramine in combat-related post-traumatic stress disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2004;7:291-8.
133. Song Y, Zhou D, Wang X. Increased serum cortisol and growth hormone levels in earthquake survivors with PTSD or subclinical PTSD. *Psychoneuroendocrinology* 2008;33:1155-9.

134. Wong CM. Post-traumatic stress disorder: advances in psychoneuroimmunology. *Psychiatr Clin North Am* 2002;25:369-83.
135. Dekaris D, Sabioncello A, Mazuran R, Rabatic S, Svoboda-Beusan I, Racunica NL, i sur. Multiple changes of immunologic parameters in prisoners of war. Assessments after release from a camp in Manjaca, Bosnia. *JAMA* 1993;270:595-9.
136. Sabioncello A, Kocijan-Hercigonja D, Rabatic S, Tomasic J, Jeren T, Matijevic L, i sur. Immune, Endocrine, and Psychological Responses in Civilians Displaced by War. *Psychosom Med* 2000;62:502-8.
137. von Kanel R, Hepp U, Kraemer B, Traber R, Keel M, Mica L, i sur. Evidence for low-grade systemic proinflammatory activity in patients with posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res* 2007;41:744-52.
138. Altemus M, Cloitre M, Dhabhar FS. Enhanced cellular immune response in women with PTSD related to childhood abuse. *Am J Psychiatry* 2003;160:1705-7.
139. Solomon GF, Segerstrom SC, Grohr P, Kemeny M, Fahey J. Shaking up immunity: psychological and immunologic changes after a natural disaster. *Psychosom Med* 1997;59:114-27.
140. Rohleder N, Joksimovic L, Wolf JM, Kirschbaum C. Hypocortisolism and increased glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production in Bosnian war refugees with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2004;55:745-51.
141. Gill J, Vythilingam M, Page GG. Low cortisol, high DHEA, and high levels of stimulated TNF-alpha, and IL-6 in women with PTSD. *J Trauma Stress* 2008;21:530-9.
142. Svjetska zdravstvena organizacija. Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema - deseta revizija, svezak 1. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 1994.
143. World Health Organisation. ICD-10, International Statistical Classification of Diseases and Health Related Problems, 10th Revision. 1. izd. Geneva: World Health Organisation; 1992.
144. Blake DD, Weathers FW, Nagy LM, Kaloupek DG, Gusman FD, Charney DS, i sur. The development of a clinician-administered PTSD scale. *J Trauma Stress* 1995;8:75-90.
145. Davidson JR, Colket JT. The eight-item treatment-outcome post-traumatic stress disorder scale: a brief measure to assess treatment outcome in post-traumatic stress disorder. *Int Clin Psychopharmacol* 1997;12:41-5.

146. Davidson JR, Book SW, Colket JT, Tupler LA, Roth S, David D, i sur. Assessment of a new self-rating scale for post-traumatic stress disorder. *Psychol Med* 1997;27:153-60.
147. Guy W. ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology. 1. izd. Washington (DC): US Government Printing Office; 1976.
148. Timonen T, Saksela E, Ranki A, Häyry P. Fractionation, morphological and functional characterization of effector cells responsible for human natural killer activity against cell-line targets. *Cell Immunol* 1979;48:133-48.
149. Berki T, Kumánovics G, Kumánovics A, Falus A, Ujhelyi E, Németh P. Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J Immunol Methods* 1998;214:19-27.
150. Donders ART, van der Heijden GJMG, Stijnen T, Moons KGM. Review: a gentle introduction to imputation of missing values. *J Clin Epidemiol* 2006;59:1087-91.
151. Schafer JL. *Analysis of Incomplete Multivariate Data*. 1. izd. London: Chapman & Hall/CRC; 1997.
152. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B Met* 1995;57:289-300.
153. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2. izd. New York City: Lawrence Erlbaum; 1988.
154. Delahanty DL, Nugent NR, Christopher NC, Walsh M. Initial urinary epinephrine and cortisol levels predict acute PTSD symptoms in child trauma victims. *Psychoneuroendocrinology* 2005;30:121-8.
155. Hawk LW, Dougall AL, Ursano RJ, Baum A. Urinary catecholamines and cortisol in recent-onset posttraumatic stress disorder after motor vehicle accidents. *Psychosom Med* 2000;62:423-34.
156. Ironson G, Wynings C, Schneiderman N, Baum A, Rodriguez M, Greenwood D, i sur. Posttraumatic stress symptoms, intrusive thoughts, loss, and immune function after Hurricane Andrew. *Psychosom Med* 1997;59:128-41.
157. Lemieux AM, Coe CL. Abuse-related posttraumatic stress disorder: evidence for chronic neuroendocrine activation in women. *Psychosom Med* 1995;57:105-15.
158. Maes M, Lin A, Bonaccorso S, van Hunsel F, Van Gastel A, Delmeire L, i sur. 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* 1998;98:328-35.
159. Rasmusson AM, Lipschitz DS, Wang S, Hu S, Vojvoda D, Bremner JD, i sur. Increased pituitary and adrenal reactivity in premenopausal women with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2001;50:965-77.
160. Liberzon I, Abelson JL, Flagel SB, Raz J, Young EA. Neuroendocrine and psychophysiologic responses in PTSD: a symptom provocation study. *Neuropsychopharmacology* 1999;21:40-50.
161. Elzinga BM, Schmahl CG, Vermetten E, van Dyck R, Bremner JD. Higher cortisol levels following exposure to traumatic reminders in abuse-related PTSD. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:1656-65.
162. Inslicht SS, Marmar CR, Neylan TC, Metzler TJ, Hart SL, Otte C, i sur. Increased cortisol in women with intimate partner violence-related posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:825-38.
163. Johnson DM, Delahanty DL, Pinna K. The cortisol awakening response as a function of PTSD severity and abuse chronicity in sheltered battered women. *J Anxiety Disord* 2008;22:793-800.
164. Lindley SE, Carlson EB, Benoit M. Basal and dexamethasone suppressed salivary cortisol concentrations in a community sample of patients with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2004;55:940-5.
165. Lipschitz DS, Rasmusson AM, Yehuda R, Wang S, Anyan W, Gueoguieva R, i sur. Salivary cortisol responses to dexamethasone in adolescents with posttraumatic stress disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2003;42:1310-7.
166. Pico-Alfonso MA, Garcia-Linares MI, Celda-Navarro N, Herbert J, Martinez M. Changes in cortisol and dehydroepiandrosterone in women victims of physical and psychological intimate partner violence. *Biol Psychiatry* 2004;56:233-40.
167. Young EA, Breslau N. Saliva cortisol in posttraumatic stress disorder: a community epidemiologic study. *Biol Psychiatry* 2004;56:205-9.
168. Bremner JD, Vythilingam M, Vermetten E, Adil J, Khan S, Nazeer A, i sur. Cortisol response to a cognitive stress challenge in posttraumatic stress disorder (PTSD) related to childhood abuse. *Psychoneuroendocrinology* 2003;28:733-50.

169. Delahanty DL, Raimonde AJ, Spoonster E. Initial posttraumatic urinary cortisol levels predict subsequent PTSD symptoms in motor vehicle accident victims. *Biol Psychiatry* 2000;48:940-7.
170. Mason JW, Wang S, Yehuda R, Riney S, Charney DS, Southwick SM. Psychogenic lowering of urinary cortisol levels linked to increased emotional numbing and a shame-depressive syndrome in combat-related posttraumatic stress disorder. *Psychosom Med* 2001;63:387-401.
171. Yehuda R, Halligan SL, Bierer LM. Cortisol levels in adult offspring of Holocaust survivors: relation to PTSD symptom severity in the parent and child. *Psychoneuroendocrinology* 2002;27:171-80.
172. Yehuda R, Kahana B, Binder-Brynes K, Southwick SM, Mason JW, Giller EL. Low urinary cortisol excretion in Holocaust survivors with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 1995;152:982-6.
173. Luecken LJ, Dausch B, Gulla V, Hong R, Compas BE. Alterations in morning cortisol associated with PTSD in women with breast cancer. *J Psychosom Res* 2004;56:13-5.
174. Santa Ana EJ, Saladin ME, Back SE, Waldrop AE, Spratt EG, McRae AL, i sur. PTSD and the HPA axis: differences in response to the cold pressor task among individuals with child vs. adult trauma. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:501-9.
175. Yehuda R, Teicher MH, Trestman RL, Levengood RA, Siever LJ. Cortisol regulation in posttraumatic stress disorder and major depression: a chronobiological analysis. *Biol Psychiatry* 1996;40:79-88.
176. Aardal-Eriksson E, Eriksson TE, Thorell LH. Salivary cortisol, posttraumatic stress symptoms, and general health in the acute phase and during 9-month follow-up. *Biol Psychiatry* 2001;50:986-93.
177. Lauc G, Zvonar K, Vukšić-Mihaljević Ž, Flögel M. Short Communication: Post-awakening changes in salivary cortisol in veterans with and without PTSD. *Stress and Health* 2004;20:99-102.
178. Roth G, Ekblad S, Agren H. A longitudinal study of PTSD in a sample of adult mass-evacuated Kosovars, some of whom returned to their home country. *Eur Psychiatry* 2006;21:152-9.
179. Wessa M, Rohleder N, Kirschbaum C, Flor H. Altered cortisol awakening response in posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:209-15.

180. Yehuda R, Golier JA, Kaufman S. Circadian rhythm of salivary cortisol in Holocaust survivors with and without PTSD. *Am J Psychiatry* 2005;162:998-1000.
181. Baker DG, West SA, Nicholson WE, Ekhtor NN, Kasckow JW, Hill KK, i sur. Serial CSF corticotropin-releasing hormone levels and adrenocortical activity in combat veterans with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 1999;156:585-8.
182. Eckart C, Engler H, Riether C, Kolassa S, Elbert T, Kolassa IT. No PTSD-related differences in diurnal cortisol profiles of genocide survivors. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:523-31.
183. Golier JA, Schmeidler J, Legge J, Yehuda R. Twenty-four hour plasma cortisol and adrenocorticotrophic hormone in Gulf War veterans: relationships to posttraumatic stress disorder and health symptoms. *Biol Psychiatry* 2007;62:1175-8.
184. Pitman RK, Orr SP. Twenty-four hour urinary cortisol and catecholamine excretion in combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 1990;27:245-7.
185. Young EA, Breslau N. Cortisol and catecholamines in posttraumatic stress disorder: an epidemiologic community study. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61:394-401.
186. de Kloet CS, Vermetten E, Heijnen CJ, Geuze E, Lentjes EGWM, Westenberg HGM. Enhanced cortisol suppression in response to dexamethasone administration in traumatized veterans with and without posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:215-26.
187. Yehuda R, Lowy MT, Southwick SM, Shaffer D, Giller EL. Lymphocyte glucocorticoid receptor number in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 1991;148:499-504.
188. Yehuda R, Southwick SM, Krystal JH, Bremner D, Charney DS, Mason JW. Enhanced suppression of cortisol following dexamethasone administration in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 1993;150:83-6.
189. Yehuda R, Boisoeneau D, Lowy MT, Giller EL. 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* 1995;52:583-93.
190. Stein MB, Yehuda R, Koverola C, Hanna C. Enhanced dexamethasone suppression of plasma cortisol in adult women traumatized by childhood sexual abuse. *Biol Psychiatry* 1997;42:680-6.
191. Yehuda R, Halligan SL, Grossman R, Golier JA, Wong C. The cortisol and glucocorticoid receptor response to low dose dexamethasone administration in aging combat veterans and

- holocaust survivors with and without posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2002;52:393-403.
192. Newport DJ, Heim C, Bonsall R, Miller AH, Nemeroff CB. Pituitary-adrenal responses to standard and low-dose dexamethasone suppression tests in adult survivors of child abuse. *Biol Psychiatry* 2004;55:10-20.
193. Yehuda R, Halligan SL, Golier JA, Grossman R, Bierer LM. Effects of trauma exposure on the cortisol response to dexamethasone administration in PTSD and major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2004;29:389-404.
194. Griffin MG, Resick PA, Yehuda R. Enhanced cortisol suppression following dexamethasone administration in domestic violence survivors. *Am J Psychiatry* 2005;162:1192-9.
195. Golier JA, Schmeidler J, Legge J, Yehuda R. Enhanced cortisol suppression to dexamethasone associated with Gulf War deployment. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:1181-9.
196. de Kloet C, Vermetten E, Lentjes E, Geuze E, van Pelt J, Manuel R, i sur. Differences in the response to the combined DEX-CRH test between PTSD patients with and without co-morbid depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2008;33:313-20.
197. de Kloet CS, Vermetten E, Bikker A, Meulman E, Geuze E, Kavelaars A, i sur. Leukocyte glucocorticoid receptor expression and immunoregulation in veterans with and without post-traumatic stress disorder. *Mol Psychiatry* 2007;12:443-53.
198. Gotovac K, Vidović A, Vukušić H, Krčmar T, Sabioncello A, Rabatić S, i sur. Natural killer cell cytotoxicity and lymphocyte perforin expression in veterans with posttraumatic stress disorder. Submitted 2009.
199. Olff M, Guzelcan Y, de Vries GJ, Assies J, Gersons BP. HPA- and HPT-axis alterations in chronic posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:1220-30.
200. Tomei F, Ciarrocca M, Cherubini E, Rosati MV, Monti C, Capozzella A, i sur. Prolactin levels in workers exposed to chemical, physical and psycho-social urban stressors. *J Occup Health* 2006;48:253-60.
201. Safarinejad MR. Evaluation of endocrine profile and hypothalamic-pituitary-testis axis in selective serotonin reuptake inhibitor-induced male sexual dysfunction. *J Clin Psychopharmacol* 2008;28:418-23.

-
202. Svestka J, Synek O, Tomanová J, Rodáková I, Cejpková A. Differences in the effect of second-generation antipsychotics on prolactinaemia: six weeks open-label trial in female in-patients. *Neuro Endocrinol Lett* 2007;28:881-8.
203. Lu M-L, Shen WW, Chen C-H. Time course of the changes in antipsychotic-induced hyperprolactinemia following the switch to aripiprazole. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:1978-81.
204. Spivak B, Shohat B, Mester R, Avraham S, Gil-Ad I, Bleich A, i sur. Elevated levels of serum interleukin-1 beta in combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 1997;42:345-8.
205. Tucker P, Ruwe WD, Masters B, Parker DE, Hossain A, Trautman RP, i sur. Neuroimmune and cortisol changes in selective serotonin reuptake inhibitor and placebo treatment of chronic posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2004;56:121-8.
206. Maes M, Lin A-h, Delmeire L, Van Gastel A, Kenis G, De Jongh R, i sur. Elevated serum interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor concentrations in posttraumatic stress disorder following accidental man-made traumatic events. *Biol Psychiatry* 1999;45:833-9.
207. Baker DG, Ekhtor NN, Kasckow JW, Hill KK, Zoumakis E, Dashevsky BA, i sur. Plasma and cerebrospinal fluid interleukin-6 concentrations in posttraumatic stress disorder. *Neuroimmunomodulation* 2001;9:209-17.
208. Pervanidou P, Kolaitis G, Charitaki S, Margeli A, Ferentinos S, Bakoula C, i sur. Elevated morning serum interleukin (IL)-6 or evening salivary cortisol concentrations predict posttraumatic stress disorder in children and adolescents six months after a motor vehicle accident. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:991-9.
209. Miller RJ, Sutherland AG, Hutchison JD, Alexander DA. C-reactive protein and interleukin 6 receptor in post-traumatic stress disorder: a pilot study. *Cytokine* 2001;13:253-5.
210. Woods AB, Page GG, O'Campo P, Pugh LC, Ford D, Campbell JC. The mediation effect of posttraumatic stress disorder symptoms on the relationship of intimate partner violence and IFN-gamma levels. *Am J Community Psychol* 2005;36:159-75.
211. Segman RH, Shefi N, Goltser-Dubner T, Friedman N, Kaminski N, Shalev AY. Peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles identify emergent post-traumatic stress disorder among trauma survivors. *Mol Psychiatry* 2005;10:500-13, 425-500-13, 425.

212. Song Y, Zhou D, Guan Z, Wang X. Disturbance of serum interleukin-2 and interleukin-8 levels in posttraumatic and non-posttraumatic stress disorder earthquake survivors in northern China. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:248-54.
213. Laudenslager ML, Aasal R, Adler L, Berger CL, Montgomery PT, Sandberg E, i sur. Elevated cytotoxicity in combat veterans with long-term post-traumatic stress disorder: preliminary observations. *Brain Behav Immun* 1998;12:74-9.
214. Lauc G, Dabelić, Dumić J, Flögel M. Stressin and natural killer cell activity in professional soldiers. *Ann N Y Acad Sci* 1998;851:526-30.
215. Weiss DW, Hirt R, Tarcic N, Berzon Y, Ben-Zur H, Breznitz S, i sur. Studies in psychoneuroimmunology: psychological, immunological, and neuroendocrinological parameters in Israeli civilians during and after a period of Scud missile attacks. *Behav Med* 1996;22:5-14.
216. Delahanty DL, Dougall AL, Craig KJ, Jenkins FJ, Baum A. Chronic stress and natural killer cell activity after exposure to traumatic death. *Psychosom Med* 1997;59:467-76.
217. Inoue-Sakurai C, Maruyama S, Morimoto K. Posttraumatic stress and lifestyles are associated with natural killer cell activity in victims of the Hanshin-Awaji earthquake in Japan. *Prev Med* 2000;31:467-73.
218. Mosnaim AD, Wolf ME, Maturana P, Mosnaim G, Puente J, Kucuk O, i sur. In vitro studies of natural killer cell activity in post traumatic stress disorder patients. Response to methionine-enkephalin challenge. *Immunopharmacology* 1993;25:107-16.
219. Kawamura N, Kim Y, Asukai N. Suppression of cellular immunity in men with a past history of posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 2001;158:484-6.
220. Boscarino JA, Chang J. Higher abnormal leukocyte and lymphocyte counts 20 years after exposure to severe stress: research and clinical implications. *Psychosom Med* 1999;61:378-86.
221. Altemus M, Dhabhar FS, Yang R. Immune function in PTSD. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1071:167-83.
222. Wilson SN, van der Kolk B, Burbridge J, Fisler R, Kradin R. Phenotype of blood lymphocytes in PTSD suggests chronic immune activation. *Psychosomatics* 1999;40:222-5.
223. Altemus M, Dhabhar FS, Yang R. Immune function in PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1071:167-83.

- 224. Glover DA, Steele AC, Stuber ML, Fahey JL. Preliminary evidence for lymphocyte distribution differences at rest and after acute psychological stress in PTSD-symptomatic women. *Brain Behav Immun* 2005;19:243-51.
- 225. Lemieux A, Coe CL, Carnes M. Symptom severity predicts degree of T cell activation in adult women following childhood maltreatment. *Brain Behav Immun* 2008;22:994-1003.
- 226. Sommershof A, Aichinger H, Engler H, Adenauer H, Catani C, Boneberg E-M, i sur. Substantial reduction of nai ve and regulatory T cells following traumatic stress. *Brain Behav Immun* 2009;ahead of print.
- 227. Gordon J. CD23: novel disease marker with a split personality. *Clin Exp Immunol* 1991;86:356-9.
- 228. Rosenwasser LJ, Meng J. Anti-CD23. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;29:61-72.
- 229. Gagro A, Rabatić S, Tresćec A, Dekaris D, Medar-Lasić M. Expression of lymphocytes Fc epsilon RII/CD23 in allergic children undergoing hyposensitization. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101:203-8.
- 230. McKinnon W, Weisse CS, Reynolds CP, Bowles CA, Baum A. Chronic stress, leukocyte subpopulations, and humoral response to latent viruses. *Health Psychol* 1989;8:389-402.
- 231. De Bellis MD, Burke L, Trickett PK, Putnam FW. Antinuclear antibodies and thyroid function in sexually abused girls. *J Trauma Stress* 1996;9:369-78.

10 BIOGRAFIJA

Anđelko Vidović rođen je 25. veljače 1978. godine u Krapini gdje je polazio osnovnu školu i Opću gimnaziju. Student je Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od 1996. do 2002. kada je i diplomirao s odličnim uspjehom. Godine 2003. zapošljava se kao znanstveni novak Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa u Imunološkom zavodu u Zagrebu. Ovdje obavlja istraživanja na polju psihoneuroimunologije radeći na projektu „Stres i imunoreaktivnost“ (MZOŠ, 0021003) voditelja akademika Dragana Dekarisa, a od 2007. na projektu „Psihološki faktori u modulaciji imunoreaktivnosti“ voditelja Ante Sabioncella. Istovremeno je polaznik (2003.-2007.) znanstvenog poslijediplomskog doktorskog studija "Biomedicina i zdravlje" Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Tijekom rada na Imunološkom zavodu obavio je i istraživanja koja se odnose na imunoreaktivnost osoba s posttraumatskim stresnim poremećajem što je i tema njegove doktorske disertacije. Aktivno je sudjelovao na više kongresa, radionica i simpozija u zemlji i inozemstvu. Autor je i koautor više znanstvenih i stručnih radova te poglavlja u knjizi. Dobitnik je dvije nagrade Hrvatskog imunološkog društva i nagrade namijenjene mladim znanstvenicima Europskog udruženja za oralnu medicinu. Član je Hrvatskog imunološkog društva (HID) te tajnik ovog društva od 2006. do 2009. godine. Kao tajnik sudjelovao je i u organizaciji skupova HID-a. Aktivno je sudjelovao i u nastavnim aktivnostima kao voditelj laboratorijskih vježbi i seminara iz kolegija „Imunobiologija stresa“ pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Od 2008. godine na specijalističkom je usavršavanju iz psihijatrije u Klinici za psihijatriju Kliničke bolnice Dubrava.