

# Duljina telomera i imunoreaktivnost u posttraumatskom stresnom poremećaju

---

Jergović, Mladen

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:427089>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Mladen Jergovi

**DULJINA TELOMERA I  
IMUNOREAKTIVNOST U  
POSTTRAUMATSKOM STRESNOM  
POREMEĆAJU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.



University of Zagreb

UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF SCIENCE  
DIVISION OF BIOLOGY

Mladen Jergovi

**TELOMERE LENGTH AND  
IMMUNOREACTIVITY IN POSTTRAUMATIC  
STRESS DISORDER**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014.

Ovaj je doktorski rad izrađen na Imunološkom zavodu d.d., Odjel za istraživanje i razvoj, Odsjek za celularnu imunologiju, Zagreb, Hrvatska, pod vodstvom dr. sc. Kreše Bendelje i dr. sc. Anjelke Vidovića, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## Zahvala

Zahvaljujem dr. sc. Anti Sabioncellu na pomoći sa statističkom obradom podataka te svim zaposlenicima Odjela za istraživanje i razvoj Imunološkog zavoda, koji su pomogli u izvršavanju ovog istraživanja. Veliko hvala mojim mentorima te svim kolegama i osobljem u suradničkim kliničkim ustanovama koji su sudjelovali u prikupljanju uzoraka i kliničkih podataka.

Ovu disertaciju posvećujem svojoj obitelji, Ani i Jasenu, koji su mi najvrednija podrška i inspiracija.

Mladen Jergović

# DULJINA TELOMERA I IMUNOREAKTIVNOST U POSTTRAUMATSKOM STRESNOM POREME AJU

Mladen Jergovi

Ovaj rad izra en je na Imunološkom zavodu, Zagreb, Hrvatska

## SAŽETAK

Sve je više dokaza da kroni ni stres ubrzava skra ivanje telomera u leukocitima i mononuklearnim stanicama iz periferne krvi. Funkcionalne posljedice skra ivanja telomera nisu razjašnjene. U ovom istraživanju mjerena je duljina telomera i aktivnost telomeraze u mononuklearnim stanicama iz periferne krvi 62 osobe: (pacijenti oboljeli od posttraumatskog stresnog poreme aja (PTSP) (N = 30); zdrave kontrole (N = 17), starije osobe (N = 15)). Paralelno, izmjerena je proliferacija aktiviranih T-limfocita i njihova proizvodnja citokina interferona (IFN)- , interleukina (IL)-2, IL-4; proizvodnja faktora nekroze tumora (TNF)- i IL-6 od strane monocita te izraženost receptora programmed death 1 (PD-1) i njegovog liganda PD-L1 na aktiviranim T-limfocitima. Ovo istraživanje pridonosi rastu em broju dokaza da psihološka trauma i kroni ni stres doprinose skra ivanju telomera. Iako manje izraženi kod pacijenata oboljelih od PTSP-a nego kod starijih osoba, smanjeni proliferativni odgovori T-limfocita i kra a duljina telomera mogli bi biti znakovi rane imunosenescencije. Zajedno sa smanjenom proizvodnjom Th1-citokina, ove promjene imunološkog sustava mogle bi doprinijeti zdravstvenim rizicima povezanim s PTSP-om.

**Ključne riječi:** telomere, posttraumatski stresni poreme aj, imunost, imunosenescencija

**Mentori:** dr. sc. Krešo Bendelja viši znan. sur., dr. sc. An elko Vidovi znan. sur.

**Ocjenjiva i:** dr.sc. Ivica Rubelj viši znan. sur., prof.dr.sc. Nada Oršoli , dr.sc. Neda Slade viši znan. sur.

# TELOMERE LENGTH AND IMMUNOREACTIVITY IN POSTTRAUMATIC STRESS DISORDER

Mladen Jergovi

This work has been performed at the Institute of Immunology, Zagreb, Croatia

## ABSTRACT

There is increasing evidence that chronic stress accelerates telomere erosion in leukocytes/peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). However, functional changes associated with telomere shortening are poorly understood. We measured relative telomere length and basal telomerase activity in PBMCs of 62 individuals (patients with posttraumatic stress disorder (PTSD) (N=30); age-matched healthy controls (N=17), elderly volunteers (N=15)). In parallel, we have assessed proliferation of activated T cells, interferon (IFN)- $\gamma$ , interleukin (IL)-2, IL-4, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and IL-6 cytokine production and expression of programmed death 1 (PD-1) receptor and its ligand PD-L1 on activated T cells. This study adds to the accumulating evidence that psychological trauma and chronic stress are associated with accelerated telomere attrition. Although much less pronounced in PTSD patients than in elderly persons, reduced proliferative responses of T cells accompanied by shorter telomeres might be a sign of early immunosenescence. Together with reduced production of Th1 cytokines, observed immune changes may contribute to health risks associated with PTSD.

**Keywords:** telomeres; posttraumatic stress disorder; immunity; immunosenescence.

**Supervisors:** dr.sc. Krešo Bendelja, dr.sc. Anđelko Vidovi

**Reviewers:** dr.sc. Ivica Rubelj, prof.dr.sc. Nada Oršolić, dr.sc. Neda Slade

## POPIS KRATICA

ACTH	od engl. <i>adrenocorticotropic hormone</i> , adrenokortikotropni hormon
AVP	arginin-vazopresin
AŽS	autonomni živčani sustav
BCR	od engl. <i>B cell receptor</i>
BDI	od engl. <i>Beck Depression Inventory</i> , upitnik za procjenu simptoma depresije
BDNF	od engl. <i>brain-derived neurotropic factor</i> , možani neurotropni faktor
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
CMV	citomegalovirus
CRH	od engl. <i>corticotropin-releasing hormone</i> , faktor oslobađanja kortikotropina
CRP	C-reaktivni protein
CV	od engl. <i>coefficient of variation</i> , koeficijent varijacije
DNA	od engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , deoksiribonukleinska kiselina
DSM-IV	od engl. <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV</i> , Dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje, 4. izdanje
EBV	Epstein Barrov virus
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>
GM-CSF	od engl. <i>granulocyte monocyte colony-stimulating factor</i> , faktor stimulacije kolonija granulocita i monocita
GR	glukokortikoidni receptor
HNN	hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda
IFN	interferon
IL	interleukin
LH	luteotropni hormon
LPS	lipopolisaharid
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> , urođenoubilačke
PAMPs	od engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i> , molekularni obrasci vezani za patogene
PBS	od engl. <i>phosphate buffered saline</i> , fosfatni pufer



PD-1	od engl. <i>programmed cell death 1</i>
PD-L1	od engl. <i>programmed cell death ligand 1</i>
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
RNA	od engl. <i>ribonucleic acid</i> , ribonukleinska kiselina
RPMI	od engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> , naziv za hranjivu podlogu za stanice
STAI	od engl. <i>Spielberger State-Trait Anxiety Inventory</i> , upitnik za procjenu simptoma tjeskobe
SŽS	središnji živčani sustav
TCR	od engl. <i>T cell receptor</i>
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

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. TELOMERE I TELOMERAZA.....	2
2.2. IMUNOLOŠKI SUSTAV.....	7
2.2.1. Stanice imunološkog sustava.....	7
2.2.2. Citokini.....	9
2.2.3. Imunosenescencija.....	12
2.3. STRES.....	13
2.3.1. Biologija stresne reakcije.....	14
2.3.2. Utjecaj stresa na imunost.....	16
2.4. POSTTRAUMATSKI STRESNI POREMEĆAJ.....	19
3. OBRAZLOŽENJE TEME I HIPOTEZA.....	23
4. MATERIJALI I METODE.....	24
4.1. Ispitanici.....	24
4.2. Materijali.....	25
4.3. Uzorci krvi.....	27
4.4. Izolacija genomske DNA.....	27
4.5. Mjerenje duljine telomera.....	28
4.6. Mjerenje aktivnosti enzima telomeraze.....	29
4.7. Mjerenje proliferacije T-limfocita.....	30
4.8. Određivanje izraženosti receptora PD-1 i PD-L1 na površini T-limfocita.....	31
4.9. Mjerenje proizvodnje citokina od strane T-limfocita.....	31
4.10. Mjerenje proizvodnje citokina od strane monocita.....	32
4.11. Statistička obrada podataka.....	33

5. REZULTATI.....	35
5.1. Karakteristike ispitanika.....	35
5.2. Duljina telomera i aktivnost telomeraze.....	38
5.3. Proliferacija T-limfocita.....	40
5.4. Izraženost PD-1 i PD-L1 na aktiviranim T-limfocitima.....	42
5.5. Proizvodnja citokina.....	46
5.6. Korelacijske i regresijske analize.....	50
6. RASPRAVA.....	51
7. ZAKLJUČAK.....	57
8. ŽIVOTOPIS.....	58
9. LITERATURA.....	59

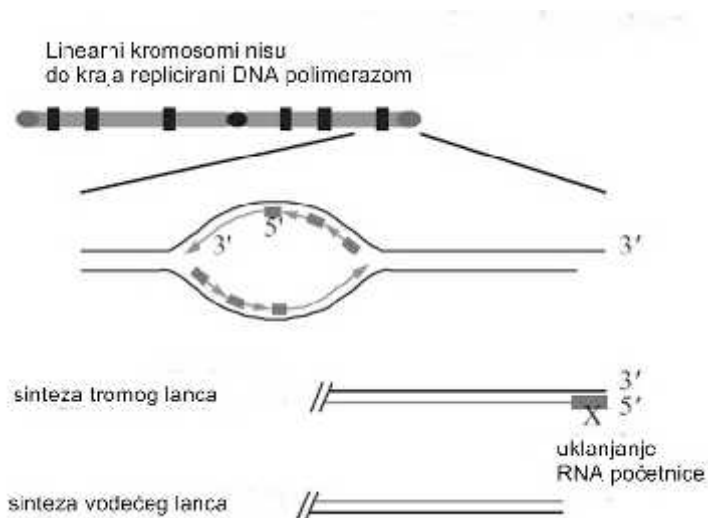
## 1. UVOD

Posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) je s traumom povezan psihički poremećaj. Traumatsko iskustvo uključuje osjećaje intenzivnog straha, bespomoćnosti i užasa kao reakciju na ekstremni stresor (American Psychiatric Association, 2013). PTSP je jedan od češćih psihijatrijskih poremećaja te se u prevalenciji u općoj populaciji procjenjuje na oko 9% u svijetu (Kessler i sur. 2005). Ratni veterani i osobe izložene ratnim sukobima imaju povećani rizik od razvoja PTSP-a (Sundin i sur. 2010). U Hrvatskoj je tijekom Domovinskog rata velik broj osoba bio izložen teškoj psihološkoj traumi. Pretpostavlja se da je kod prognanika i izbjeglica u prevalenciji PTSP-a između 25 i 50%, a među braniteljima 25-30% (Kozarić-Kovač i sur. 2007). Uz poremećenu psihičku funkcionalnost PTSP je povezan i s povećanom pojavnosti u raznih somatskih bolesti (Barrett i sur. 2002). Imaju li to na umu, jasno je da PTSP i danas predstavlja značajan javno zdravstveni problem u Hrvatskoj. Mnoge od tih somatskih bolesti povezane su ili posredovane s promijenjenim funkcioniranjem imunološkog sustava (Boscarino 2004), te se smatra da se uz PTSP često izražava pojačana upalna aktivnost u organizmu (Gill i sur. 2009). Mehanizmi kojima neurološke i endokrine promjene u PTSP-u dovode do poremećaja u funkcioniranju imunološkog sustava i pojavnosti somatskih bolesti nisu u potpunosti razjašnjeni. Mnoge od promjena imunološkog sustava, koje se događaju uslijed kroničnog stresa, nalikuju onima koje se događaju tijekom prirodnog starenja organizma (Bauer 2005). Stoga je nužno bolje razumijevanje PTSP-om posredovanih promjena imunološkog sustava, u kontekstu funkcionalnog slabljenja istoga tijekom starenja, procesu koji se naziva imunosenescencija.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. TELOMERE I TELOMERAZA

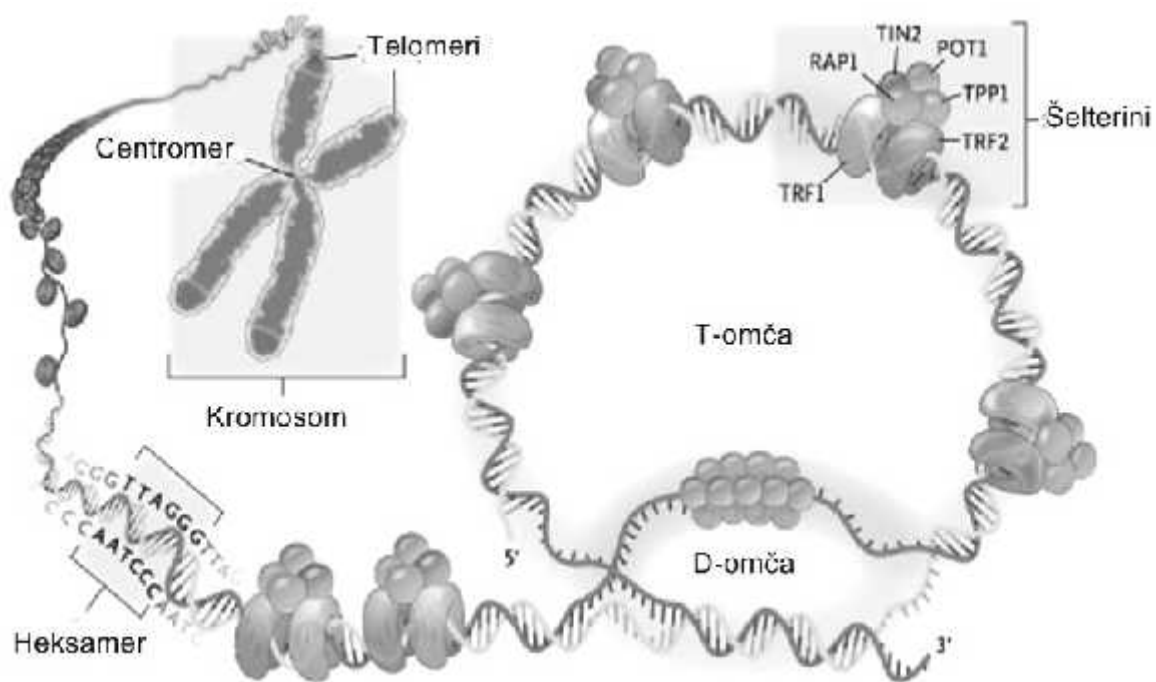
Telomere su ponavljaju i heksamerni sljedovi deoksiribonukleinske kiseline (DNA, od engl. *deoxyribonucleic acid*) koje se nalaze na krajevima kromosoma, povezani s kompleksom proteina te održavaju stabilnost kromosoma i reguliraju replikativni životni vijek stanica (Blackburn, 2001). Tijekom replikacije eukariotske linearne DNA potrebni su dodatni mehanizmi, osim djelovanja DNA-polimeraza, kako bi se dovršila replikacija njihovih krajeva. Replikacija DNA je semikonzervativan proces (kopira se roditeljski lanac) pri emu DNA-polimeraze mogu sintetizirati DNA samo u 5' 3' smjeru i zahtijevaju po etnice. Replikacija zapo inje nastankom replikacijskih rašlji koje se pomi u od sredine prema krajevima kromosoma. Na vode em lancu DNA-polimeraza može sintetizirati cijeli komplementarni lanac u 5' 3' smjeru. Me utim, na tromom lancu potrebne su ribonukleinske (RNA, od engl. *ribonucleic acid*) po etnice kako bi se kopirao roditeljski lanac (**Slika 1**). Nakon sinteze RNA-po etnice se uklanjaju i enzim DNA-ligaza popunjava nastale praznine. Bez telomernog mehanizma, uklanjanje terminalne RNA po etnice ostavilo bi prazninu na 5'



**Slika 1.** Replikacija vode eg i tromog lanca DNA (prilago eno prema Chan i Blackburn 2003).

kraju ime bi dio genetske informacije bio izgubljen sa svakom diobom stanice, što je poznato kao završni replikacijski problem (Ohki i sur. 2001).

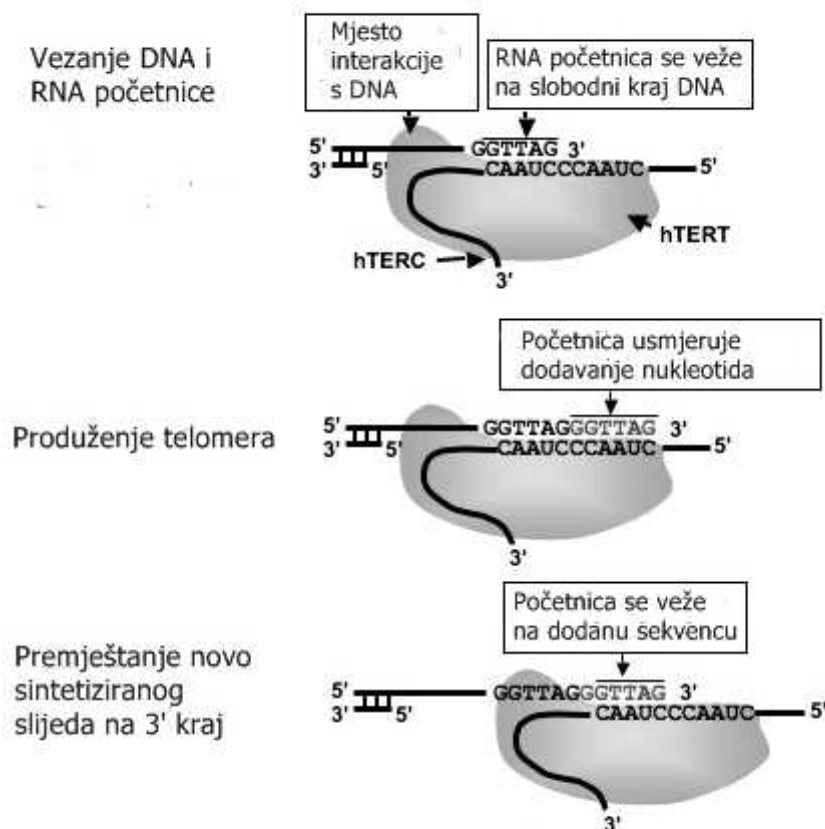
Dodavanje telomernog slijeda na krajeve kromosoma evolucijski je mehanizam kojim se spreava gubitak DNA informacije predviđen završnim replikacijskim problemom (Wellinger i sur. 1996). Većina prokariota ima kružne kromosome i stoga, za razliku od eukariota, nemaju telomere. Telomere imaju i funkciju „zaštitne kape“ na krajevima kromosoma (O’Sullivan i Karlseder 2010), nisu podložne razgradnji, rekombinaciji ili fuziji s drugim kromosomskim krajevima. U kombinaciji s kompleksom proteina nazvanim šelterini (od engl. *shelterins*) telomere tvore omotač, tzv. T-omotač (Griffith i sur. 1999) u kojima je jednolančana DNA kružno omotana oko kompleksa proteina. Na samom kraju T-omotača jednolančana DNA je vezana na dvočlanu DNA prekida i sparivanje parova baza jednog od dva lanca; ova dvočlana struktura naziva se D-omotač (Zvereva i sur. 2010) (Slika 2).



**Slika 2. Shematski prikaz telomera** (prilagođeno prema Blackburn 2001)

Omotač koji telomere tvore s proteinima šelterinima stabilizira telomerne krajeve i spreava da ih stani na mašinerija za popravak DNA prepozna kao dvostruki lom DNA.

Telomerna DNA svih eukariotskih organizama sastoji se od kratkih ponavljajućih sljedova (Greider i Blackburn 1985) obogaćena nukleotidom gvanozinom. Kod svih kralješnjaka, uključujući i ljude, taj ponavljajući slijed je d(TTAGGG) (Plohl i sur. 2002). Duljina telomera je veoma različita među vrstama, od 300 parova baza u kvasca do mnogo kilobaza kod ljudi. Budući da DNA-polimeraza ne može u potpunosti replicirati krajeve telomernog slijeda, za njihovu potpunu replikaciju potreban je dodatni enzim – telomeraza (Nandakumar i Cech 2013). Za otkriće enzima telomerase i načina na koji telomere štite krajeve kromosoma, Elizabeth Blackburn, Carol Greider i Jack Szostak 2009. godine primili su Nobelovu nagradu. Telomeraza je reverzna transkriptaza koja dodaje ponavljajuće sljedove DNA (TTAGGG) na 3' kraj lanca DNA u telomernim regijama. Kod ljudi ribonukleoprotein telomeraza je sastavljen od katalitičke podjedinice hTERT, RNA komponente hRT koja služi kao pomoćnica za dodavanje ponavljajućih sljedova na 3' kraj lanca DNA i nekoliko specifičnih pridruženih proteina (Wyatt i sur. 2010). Poznato je nekoliko proteina pridruženih telomerazi: NHP2, NOP10, pontin/reptin, Gar1 and TCAB1 (Fu i Collins 2007) i oni reguliraju biogenezu, stanišnu lokalizaciju i funkciju telomerase *in vivo* iako u potpunosti nije razriješen način na koji ti proteini reguliraju aktivnost telomerase. RNA-komponenta telomerase duga je 451 nukleotida i sadrži ponavljajući slijed od 11 nukleotida (5'-CAAUCCCAAUC-3') koji kodira telomerne ponavljajuće sljedove (Drosopoulos i sur. 2005). Produženje telomera enzimom telomerezom (**Slika 3**) je proces koji se odvija u tri faze: prvo se nukleotidi 3' kraja telomerne DNA hibridiziraju na RNA pomoćnicu unutar RNA-domene telomernog kompleksa. Nakon toga katalitička podjedinica enzima hTERT produžuje kraj kromosoma koristeći RNA kao pomoćnicu što rezultira dodavanjem novog heksamernog slijeda. Naposljetku, produženi DNA kraj se odvaja od RNA pomoćnice postajući dostupan za novi ciklus produženja (Chan i Blackburn 2004).



**Slika 3. Produljivanje telomera telomerazom** (prilagođeno prema Chan i Blackburn 2004).

Kod većine višestanih eukariotskih organizama telomeraza je aktivna samo u stanicama zametne linije, matičnim stanicama i nekim leukocitima, dok je neaktivna u većini somatskih stanica (Gomez i sur. 2012). Somatske stanice stoga postepeno gube svoje telomerne sljedove, kako se telomere skraćuju stanice naposljetku dosegnu replikativni limit (Counter i sur. 1992). Broj dioba kroz koje stanice prolaze prije nego dosegnu kraj svog replikativnog vijeka naziva se Hayflickov limit (Campisi, 2013). Kada telomere dosegnu kritičnu kratku duljinu, struktura na njihovim krajevima se odmotava i stanična mašinerija za popravak DNA ju prepoznaje kao dvostrani lom DNA, što kroz aktivaciju kinaze p53 naposljetku dovodi do apoptoze ili obustave staničnog ciklusa (Collado i sur. 2007). Indukcija izražaja telomeraze u *in vitro* kultiviranim fibroblastima sprečava skraćivanje telomera, što dovodi do imortalizacije fibroblasta i upućuje da je skraćivanje telomera kritični faktor koji dovodi do staničnog starenja (senescencije) (Bodnar, 1998). Nekoliko istraživanja (Cawthon i sur. 2003; Canela i



sur. 2007) opisalo je obrnuto proporcionalnu vezu između duljine telomera i dobi u raznim ljudskim tkivima, te između duljine telomera i starosnih bolesti (Ogami i sur. 2004). Važnost sustava održavanja telomera očitovana je i u mutacijama enzima telomeraze koje se manifestiraju kao *dyskeratosis congenita*, poremećaj koji dovodi do preuranjenog starenja i smrtnosti zbog propadanja koštane srži (Mitchell i sur. 1999). Iako je telomeraza aktivna u dijelu leukocita, duljina telomera u leukocitima se ipak smanjuje s vremenom te se smatra pouzdanim biološkim pokazateljem ljudskog starenja (Kimura i sur. 2008). Duljina telomera se smatra nasljednom (Prescott i sur. 2011), iako još nije razjašnjen stupanj nasljednosti, a na duljinu telomera utječu i okolišni čimbenici, kako fizički tako i psihološki (Huda i sur. 2007). Kraća duljina telomera u leukocitima je povezana s povećanom smrtnošću i nizom starosnih bolesti i čimbenika životnog stila koji skraćuju životni vijek poput kardiovaskularnih bolesti, demencije, pretilosti, pušenja, psihološkog stresa i niskog socioekonomskog statusa (Kimura i sur. 2008). I životni vijek i prosječna duljina telomera duži su kod žena (Barrett i Richardson 2011) nego kod muškaraca. Osim replikativne senescencije skraćivanje telomera može biti uzrokovano i izlaganjem genotoksičnim agensima kao što su reaktivne vrste kisika, ultraljubičasto zračenje i nukleazama posredovana razgradnja (Morgan 2013). Tijekom starenja ljudskog organizma tkiva su izložena oksidativnom stresu uzrokovanom akumulacijom reaktivnih vrsta kisika, npr. superoksida, stoga je oksidativni stres vjerojatno važna odrednica skraćivanja telomera s dobi (Thomas von Zglinicki, 2002). U prvom istraživanju koje je upućivalo na utjecaj psihološkog stresa na skraćivanje telomera (Epel i sur. 2004) opisana je kraća duljina telomera u leukocitima majki kronično bolesne djece u odnosu da dobno podudarne kontrole. Nakon toga je veza između kroničnog stresa i skraćivanja telomera opisana u više različitih modela kroničnog stresa (Shalev i sur. 2013). Nekoliko istraživanja pokazalo je da ponašanja s pozitivnim učinkom na zdravlje poput fizičke vježbe, zdrave prehrane i redukcije stresa imaju učinak na povećanje aktivnosti telomeraze i duljine telomera (Paolisso 2013). Prvi potencijalni aktivator telomeraze, mala molekula TA-65, izoliran je iz biljke *Astragalus membranaceus*. Primjenom TA-65 kao dodatka prehrani kod miševa povećana je aktivnost telomeraze, duljina telomera i životni vijek miševa bez povećanja pojavnosti tumorskih bolesti (Bernardes de Jesus i sur. 2011). Budući da razne besmrtno tumorske stanice imaju povećanu izraženost i aktivnost telomeraze postoji bojazan da bi primjena aktivatora telomeraze kod ljudi mogla povećati učestalost tumorskih bolesti. Prva ispitivanja primjene molekule TA-65 na ljudima pokazala su povoljan učinak na razne čimbenike metaboličkog, kardiovaskularnog i koštanog zdravlja (Harley i sur. 2013).

## 2.2. IMUNOLOŠKI SUSTAV

Imunološki sustav je složena i integrirana mreža stanica i limfoidnih organa, sačinjena od dvije komponente – urođene i stečene imunosti koje, zajedno djeluju i štite organizam od napada stranih mikroorganizama (virusa, bakterija, gljivica i parazita), njihovih kemijskih tvari (toksina), kao i vlastitih izmijenjenih (npr. tumorske) i istrošenih stanica. Urođena imunost sudjeluje u prvoj fazi obrane organizma te je nespecifična dok stečenu imunost karakterizira specifičnost i sposobnost imunološkog pamćenja.

### 2.2.1. Stanice imunološkog sustava

Stanice imunološkog sustava neprestano cirkuliraju između limfnih organa i periferne krvi. Bijele krvne stanice ili leukociti uključuju granulocite (neutrofile, eozinofile, bazofile), monocite, mastocite i nekoliko tipova limfocita. Fokus ovog istraživanja bit će na funkcionalnim osobinama monocita i T-limfocita koji čine većinu stanica unutar populacije perifernih mononuklearnih stanica.

**Monociti** su stanice mijeloidne linije koje potječu iz koštane srži, zatim cirkuliraju u krvi nekoliko dana prije nego migriraju u tkiva gdje se diferenciraju u različite tipove makrofaga (Chang i sur. 2012). Stanice ove linije kolektivno se nazivaju mononuklearni fagociti ili monociti/makrofagi. To su multifunkcionalne stanice koje imaju brojne uloge u homeostazi, imunološkim odgovorima i popravku tkiva te pokazuju vrlo raznolik transkriptom (Wells i sur. 2006). Osim u makrofage, monociti se mogu diferencirati i u dendritičke stanice koje su glavne antigen-predodajne stanice (Randolph i sur. 1999; Varol i sur. 2007). Glavne uloge koje obavljaju monociti i stanice u koje se diferenciraju su fagocitoza, predodavanje antigena i proizvodnja citokina (Murphy, 2012). Prepoznavanje antigena odvija se uglavnom putem Toll-uzoraklikih receptora (TLR, od engl. *Toll-like receptor*) koji prepoznaju molekularne uzorke prisutne u mikroorganizmima a dosada ih je poznato trinaest vrsta (Shi i sur. 2011; Oldenburg i sur. 2012). Antigen-predodajne stanice prezentiraju dijelove mikroorganizama na svojoj površini u sklopu molekula MHC (od engl. *major histocompatibility complex*) te njihovo prepoznavanje od strane specifičnih limfocita, uz nužni kostimulacijski signal, dovodi do proliferacije limfocita i izražavanja različitih efektorskih molekula (kemokina, citokina, adhezijskih molekula) (Kindt i sur. 2006). Od posebnog značenja za stresni odgovor i ljudsko starenje je sposobnost monocita da proizvode proupalne citokine kao što su IL-6, TNF- $\alpha$  i IL-

1 (Pinke i sur. 2013). S obzirom na razne funkcije monocita u imunološkom odgovoru, njihov adaptivni odgovor na stres vrlo je važan za održavanje imunološke homeostaze.

**Limfociti** ine oko 25-35% cirkuliraju ih leukocita i poti u od zajedni ke pluripotentne mati ne stanice iz koštane srži. Glavne podvrste limfocita su T-limfociti, B-limfociti i NK-stanice. B-limfociti imaju kratak vijek u krvnoj cirkulaciji te se nakon stimulacije diferenciraju u plazma-stanice koje proizvode antitijela, te su uklju eni prvenstveno u humoralnu, protutijelima posredovanu, imunost. NK-stanice su citotoksi ni limfociti, zna ajni za uro enu imunost, koji pružaju brze odgovore na virusnu infekciju stanica i formaciju tumora. T-limfociti sazrijevaju u timusu te imaju dugi vijek u krvnoj cirkulaciji koji traje godinama te su zna ajni za stani nu imunost. Glavne podvrste T-limfocita su pomo ni ki T-limfociti (CD4+), citotoksi ni T-limfociti (CD8+) i regulacijski T-limfociti (Murphy, 2012). Pomo ni ki T-limfociti dalje se dijele na tip I (Th1, poti u imunološke odgovore posredovane stanicama), tip II (Th2, poti u humoralne imunološke odgovore) i tip III (Th3, proizvode inhibitorne citokine IL-10 i TGF- ) (Fukaura i sur. 1996). U novijoj literaturi, ovisno o citokinima koje izlu uju, opisani su i drugi oblici pomo ni kih T-limfocita: Th9, TH17 i Th22 (Jutel i Akdis 2011). Raspodjela razli itih tipova pomo ni kih T-limfocita utje e na ravnotežu izme u stani ne (Th1-posredovane) i humoralne (Th2-posredovane) imunosti. Citotoksi ni T-limfociti imaju sposobnost ubijanja tumorskih stanica, stanica inficiranih virusom i ošte enih stanica no tako er mogu proizvoditi neke citokine. Regulacijski T-limfociti ine mali dio pomo ni kih T-limfocita i karakterizira ih izraženost transkripcijskog faktora FOXP3 i visoka izraženost interleukin-2 receptora CD25 (Fontenot i sur. 2003; Hori i sur. 2003). Regulacijski T-limfociti igraju važnu ulogu u homeostazi imunološkog sustava ograni avaju i aktivnost efektorskih i autoreaktivnih T-limfocita, te njihova disfunkcija dovodi do razvoja autoimunih bolesti (Long i Buckner 2011).

T-limfociti prepoznaju dijelove antigena u kompleksu s MHC-molekulama na antigen-predo nim stanicama putem T-limfocitnog receptora (TCR, od engl. *T cell receptor*) na svojoj površini. Svi T-limfociti na svojoj površini imaju kostimulacijsku molekulu CD3 pridruženu TCR-u, koja je nužna za aktivaciju stanice. Prema izraženosti kostimulacijskih molekula, CD4 i CD8, razlikujemo pomo ni ke i citotoksi ne T-limfocite. Pomo ni ki T-limfociti (CD4+) prepoznaju antigene u kompleksu s MHC II-molekulama a citotoksi ni T-limfociti u kompleksu s MHC I-molekulama. Djevi anski T-limfociti se nakon susreta sa specifi nim antigenom aktiviraju i diferenciraju u memorijske T-limfocite. Da bi T-limfocit postao potpuno aktiviran potrebna su dva signala. Prvi signal, koji daje specifi nost imunološkom

odgovoru, je me udjelovanje kompleksa antigenski peptid-MHC-molekula s TCR-om. Drugi signal, kostimulacijski signal koji nije antigen-specifičan, T-limfocitima daju antigenpredone stanice i time potiču njihovu klonalnu ekspanziju, proizvodnju citokina i efektorsku funkciju. Najbolje je istraženo me udjelovanje kostimulacijske molekule B7 na antigenprednim stanicama i CD28 na T-limfocitima, no postoje i druge kostimulacijske molekule (Taylor i sur. 2003). U odsutnosti kostimulacijskog signala antigen-specifični T-limfociti ne odgovaraju efektivno ili su funkcionalno inaktivirani te otporni na daljnju aktivaciju istim antigenom. Određeni negativni regulatori imunološkog sustava, poput molekule CTLA-4 mogu se vezati na molekulu B7 i sprječiti njeno vezanje za CD28 te posljedično aktivaciju T-limfocita (Wang i sur. 2012). Protein PD-1 (od engl. *programmed cell death 1*), član proširene obitelji CD28/CTLA-4 regulatora (Ishida i sur. 1992), negativno regulira imunološke odgovore kroz me udjelovanje sa svojim ligandima PD-L1 i PD-L2, članovima obitelji B7 molekula (Ishida i sur. 1992; Latchman i sur. 2001). PD-1 je izražen na površini aktiviranih T-limfocita, B-limfocita i makrofaga, što znači da PD-1 negativno regulira imunološke odgovore u širem kontekstu nego CTLA-4 (Agata i sur. 1996). Njegov ligand PD-L1 pojačano je izražen na T-limfocitima i B-limfocitima nakon aktivacije TCR-a i B-limfocitnog receptora (BCR, od engl. *B cell receptor*) (Yamazaki i sur. 2002) dok je izraženost PD-L2 uglavnom ograničena na dendritičke stanice (Latchman i sur. 2001). *In vitro* tretman stimuliranih T-limfocita s anti PD-L1 protutijelom rezultira smanjenom proliferacijom tih stanica i smanjenim lučenjem IFN- $\gamma$  (Freeman i sur. 2000). Ta smanjena proliferacija povezana je sa smanjenom proizvodnjom IL-2 i može se poništiti dodavanjem egzogenog IL-2 ili aktivacijom s anti-CD28 protutijelom (Carter i sur. 2002). Miševi s nefunkcionalnim receptorom PD-1 imaju fenotip podložan autoimunim bolestima i razvijaju glomerulonefritis sličan lupusu (Nishimura i sur. 1999; Nishimura i sur. 2001). Svi ti podaci upućuju na to da je interakcija PD-1 i njegovih liganada vrlo važna za negativnu regulaciju odgovora T-limfocita.

### 2.2.2. Citokini

Citokini su široka skupina malih proteina koji sudjeluju u staničnoj signalizaciji te uključuju kemokine, interferone, interleukine, faktore nekroze tumora, faktore stimulacije rasta kolonija i limfokine (Thomson i Lotze 2003). Citokine proizvode stanice imunološkog sustava kao što su T-limfociti, B-limfociti, monociti/makrofazi i mastociti, ali i brojne druge stanice poput endotelnih stanica, fibroblasta i različitih stromalnih stanica. Citokini djeluju putem receptora

i osim što sudjeluju u razvoju i proliferaciji stanica imunološkog sustava i usmjeravanju upalnog odgovora, također su važni posrednici u višesmjernoj komunikaciji imunološkog sustava, središnjeg živčanog sustava i endokrinog sustava.

**Faktor nekroze tumora** (TNF- $\alpha$ , od engl. *tumor necrosis factor*) je citokin uključen u sistemsku upalu i dio je grupe citokina koji stimuliraju reakcije akutne faze upale. TNF- $\alpha$  proizvode većina mononuklearnih stanica iz periferne krvi, najviše monociti/makrofagi ali mogu ga proizvoditi i druge stanice poput neurona i stanica masnog tkiva. TNF- $\alpha$  ima snažnu proupalnu aktivnost i njegove glavne funkcije su aktivacija protuvirusne aktivnosti i uništavanja tumorskih stanica od strane makrofaga (Aggarwal i sur. 2011). Slično interleukinu-1, TNF- $\alpha$  pokazuje međudjelovanje sa endokrinim sustavom te hormoni osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, ACTH i kortikosteron, negativno reguliraju proizvodnju TNF- $\alpha$  u štakora (Fantuzzi i sur. 1995). Istraživanja upućuju i na ulogu TNF- $\alpha$  u neurološkom propadanju povezanim sa stresom kroz pozitivnu regulaciju sinteze dušikovog oksida putem aktivacije nuklearnog faktora kapa B (NF- $\kappa$ B) u moždanoj kori (Madrigal i sur. 2002).

**Interleukin-6** (IL-6) proizvode u najvećoj mjeri monociti/makrofagi i T-limfociti ali i brojne druge stanice poput fibroblasta, endotelnih stanica i keratinocita (Fujisawa i sur. 1997). Monociti i makrofagi proizvode IL-6 kao odgovor na prepoznavanje raznih molekularnih obrazaca vezanih za patogene (PAMP, od engl. *pathogen-associated molecular pattern*), poput lipopolisaharida (LPS). IL-6 promovira upalni odgovor, potiče diferencijaciju B-limfocita u plazma-stanice, povećava proliferaciju T-limfocita i citotoksičnost NK-stanica (Murphy, 2012). S druge strane, IL-6 može imati i protuupalnu funkciju te za razliku od monocita/makrofaga, signalizacija putem IL-6 u mišjim stanicama ima protuupalnu funkciju (Brandt i Pedersen 2010). IL-6 može prijeći krvno-moždanu barijeru te u hipotalamusu potiče proizvodnju prostaglandina E<sub>2</sub>, tako povisujući tjelesnu temperaturu (Banks i sur. 1994). Signalizacija putem IL-6 može potaknuti epigenetske promjene u mozgu (Smith i sur. 2007) te je u inak IL-6 na smanjenu izraženost moždanog neurotrofnog faktora (BDNF, od engl. *brain-derived neurotrophic factor*) uključen u patogenezu depresije (Sharma i sur. 2008; Pei i sur. 2012).

**Interleukin-2** (IL-2) proizvode T-limfociti, uglavnom nakon stimulacije, kao rezultat vezanja antigena na TCR. IL-2 je nužan za rast, proliferaciju i diferencijaciju T-limfocita u efektorske stanice (Malek 2008; Boyman i Sprent 2012). Signalizacija IL-2 odvija se putem receptora

(IL-2R) je izraženost također potaknuta prepoznavanjem antigena od strane TCR-a. Interakcija IL-2 i njegovog receptora potiče klonalnu ekspanziju i diferencijaciju antigen-specifičnih pomoćnih i citotoksičnih T-limfocita (Beadling i Smith 2002), stoga je IL-2 ključan za razvoj imunološke memorije koja ovisi o broju klonova antigen-specifičnih stanica. IL-2 je također nužan za razvoj i sazrijevanje regulacijskih T-limfocita i njihove supresivne funkcije (Thornton i Shevach 1998; Thornton i sur. 2004).

**Interleukin-4 (IL-4)** je citokin koji potiče diferencijaciju naivnih T-limfocita (Th0) u Th2 pomoćne T-limfocite, posrednike humoralne imunosti. Th2-limfociti zatim proizvode dodatne količine IL-4. Tip stanice koji inicijalno proizvodi IL-4, također potiče i diferencijaciju Th0 stanica, još nije identificiran no postoje i podaci upućuju na to da bi bazofili mogli biti ključne stanice u toj diferencijaciji (Sokol i sur. 2008). IL-4 djeluje na B-limfocite na nekoliko načina: 1) kao aktivacijski faktor, potiče u B-limfocite na rast i izražavanje MHC II-molekula, 2) kao proliferacijski faktor, povećava i replikaciju B-limfocita, 3) kao diferencijacijski faktor, potiče i proizvodnju imunoglobulina tipa IgE. Djelovanje IL-4 inhibirano je u prisutnosti IFN- $\gamma$  kojeg proizvode Th1 stanice, što upućuje na važnost ispravne ravnoteže između Th1 i Th2 citokina. Povećana proizvodnja IL-4 povezana je s razvojem alergija i astme (Steinke i Borish 2001; Sterclova i sur. 2013).

**Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )** je citokin koji je jedini pripadnik razreda interferona tipa II (Schoenborn i Wilson 2007). Interferoni su skupina citokina koje proizvode razne stanice kao odgovor na stimulaciju virusima, parazitima, bakterijama i tumorskim stanicama. Interferoni su nazvani po svojoj mogućnosti da ometaju (engl. *interfere*) virusnu replikaciju u stanicama. IFN- $\gamma$  proizvode inficirani monociti i limfociti, IFN- $\gamma$  uglavnom inficirani fibroblasti a IFN- $\alpha$  proizvode aktivirani T-limfociti i NK-stanice ali i mijeloidne i dendritičke stanice. Dok se IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$  vežu na isti receptor, IFN- $\gamma$  ima vlastiti specifični receptor. Svi interferoni potiču stanični rast, povećavaju izraženost MHC I-molekula i aktiviraju citotoksične T-limfocite i NK-stanice. IFN- $\gamma$  uz to povećava i izraženost MHC II-molekula, aktivira makrofage i neutrofile, aktivira krvožilni endotel, potiče diferencijaciju B- i T-limfocita i povećava sekreciju IgG2, IL-1 i IL-2 (Murphy, 2012). Te funkcije su dio Th1 imunološkog odgovora pomoćnih T-limfocita koji proizvode IFN- $\gamma$  a ovaj potom potiče diferencijaciju daljnjih Th0 stanica u Th1 stanice. IFN- $\gamma$  kroz međudjelovanje s endokrinim odgovorom na stresor može povećati sekreciju hormona kortizola i ACTH (de Metz i sur. 1999).

### 2.2.3. Imunosenescencija

Pojam imunosenescencija odnosi se na progresivni gubitak funkcije imunološkog sustava koji se odvija tijekom starenja. Neko se smatralo da proces imunosenescencije ponajviše zahvaća funkcije stečene imunosti (Franceschi i sur. 2000), no danas je sve više dokaza da su promjene povezane sa starenjem uočljive u gotovo svim stanicama i procesima imunološkog sustava, uključujući i urođenu imunost. Imunosenescencija uključuje smanjenu mogućnost odgovora na infekcije i razvoja dugoročne imunološke memorije, osobito nakon vakcinacije, što posljedično dovodi do povećane smrtnosti od infektivnih bolesti u starijih osoba (LaCroix i sur. 1989; Yoshikawa 2000). Taj gubitak funkcije nije samo nasumično propadanje već genetski reguliran proces koji predstavlja obrnuto ponavljanje evolucijskog uzorka tijekom razvoja organizma (Franceschi i sur. 1999). Smanjenje imunološke funkcije sa starenjem osobito je izraženo u T-limfocitima. U doba adolescencije timus, organ koji je ključan za sazrijevanje T-limfocita, se polako smanjivati što rezultira postupnim smanjenjem u otpuštanju naivnih T-limfocita. Posljedično imunost postaje sve više ovisna o postojećem dijapazonu memorijskih T-limfocita (Woodland i Blackman 2006). Kako bi se kompenzirao gubitak naivnih T-limfocita, povećava se broj memorijskih T-limfocita s fenotipom krajnje diferencijacije (npr. CD27-CD28-/CD45RA+). Te starosne promjene osobito su izražene kod citotoksičnih T-limfocita te se nakupljanje CD8+CD27-CD28-/CD45RA+ T-limfocita u cirkulaciji smatra jednim od biljega imunosenescencije (Akbar i Fletcher 2005; Pawelec 2006). Psihološki stres može pridonijeti akumulaciji tih citotoksičnih T-limfocita sa starosnim fenotipom (Bosch i sur. 2009). Mnogi od tih perifernih T-limfocita imaju smanjenu sposobnost proliferacije zbog krajnje diferencijacije i skraćivanja telomera u brojnim prethodnim diobama. Replikativno starenje stanice je dosegnuto kada stanica više nije sposobna za daljnju replikaciju (Kuilman i sur. 2010). Najpouzdaniji prediktor toga je skraćivanje telomera koje se događa tijekom progresivnih dioba stanice, te kada telomere dosegnu kritičnu duljinu dolazi do obustave staničnog ciklusa (Herbig i sur. 2004). No osim što imaju smanjenu mogućnost proliferacije, mnogi od tih zrelih T-limfocita imaju TCR koji specifično prepoznaje antigene latentnih i ustalih virusa poput Epstein-Barrovog virusa (EBV) i citomegalovirusa (CMV) (Olsson i sur. 2001; Nikolich-Zugich 2008). Mlade osobe bez timusa, koje su inficirane s CMV-om pokazuju već promjene povezane sa starenjem T-limfocita od onih koje nisu inficirane (Sauce i sur. 2009). Ti podatci upućuju na to da i drugi mehanizmi, osim involucije timusa, značajno doprinose procesu imunosenescencije. Kombinacija smanjenog otpuštanja iz timusa i selektivne ekspanzije određene populacije T-

limfocita, dovodi do ispunjavanja imunološkog prostora sa T-limfocitima koji imaju ograničen (oligoklonalni) TCR repertoar specifičan za nekoliko imuno dominantnih antigena (van Lier i sur. 2003; Brunner i sur. 2011). Uz skraćene telomere, smanjenu mogućnost proliferacije T-limfocita i smanjeni antigenski repertoar, postoje brojni dugi pokazatelji imunosenescencije. Primjerice, starenje je povezano sa smanjenom citotoksičnošću NK-stanica i promjenama u migraciji neutrofila (Panda i sur. 2009). Kapacitet limfocita za proizvodnju određenih citokina je smanjen dok je povećana proizvodnja proupalnih citokina, poput IL-6 (Linton i Dorshkind 2004). Dolazi i do smanjenja humoralne imunosti uzrokovanog manjim brojem B-limfocita koji proizvode protutijela, kao i smanjenom raznolikošću i afinitetu imunoglobulina (Han i sur. 2003). Starosne promjene imunološkog sustava nalikuju onima induciranim kroničnim stresom ili djelovanjem glukokortikoida (Bauer, 2005), što upućuje na to da bi neurološke i endokrine promjene tijekom kroničnog stresa mogle značajno pridonositi procesu imunosenescencije.

### **2.3. STRES**

Iako ne postoji jasna i opće prihvaćena definicija stresa najjednostavnije je stres opisati kao reakciju na podražaj koji narušava fizičku ili mentalnu ravnotežu organizma. Pojam stres u njegovom današnjem značenju prvi puta je upotrijebio Hans Selye 1936 godine kako bi definirao odgovor organizama na različite štetne podražaje kao što su fizička trauma, kemikalije, infekcija ili niska temperatura. Selye je proveo brojne pokuse i uočio da laboratorijske životinje izložene akutnim štetnim fizičkim i emocionalnim podražajima (ekstremne temperature, buka, jaka svjetlost, frustracija) pokazuju identične patološke promjene: krvarenje unutar gastrointestinalnog sustava, smanjenje limfoidnog tkiva i povećanje nadbubrežnih žlijezda (Selye 1936). Kasnije je pokazao da opetovan stres može kod tih životinja uzrokovati bolesti kao što su srčani udar, bolest bubrega i reumatoidni artritis (Selye 1946). Selye je smatrao stres nespecifičnom adaptivnom reakcijom organizma na podražaj koji naziva stresor. Uočio je tri faze u odgovoru na stresor: inicijalna alarmna reakcija tijekom koje organizam mobilizira obranu; ako je podražaj potrajao organizam bi ušao u fazu otpora, tijekom koje se organizam uspješno nosi s podražajem; ukoliko podražaj i dalje nije prestao organizam bi ušao u fazu iscrpljenja u kojoj bi pokušaji prilagodbe na podražaj prestali. Selye je ovaj odgovor organizma nazvao općim adaptacijskim sindromom.



Podražaj koji uzrokuje stresnu reakciju Selye je nazvao stresorom te je razlikovao stresore s negativnim (distres) i pozitivnim predznakom (eustres).

U današnje doba napušteno je Selyeovo shvaćanje stresne reakcije kao nespecifične, generalizirane reakcije. Danas je jasno da je stresna reakcija donekle specifična, te ovisi o vrsti, broju, jačini i vremenskom trajanju stresora. Vrlo bitna razlikovna karakteristika stresa je njegov intenzitet i trajanje. Tako je akutni stres definiran kao stres koji traje od nekoliko minuta do nekoliko sati dok kronični stres traje više sati u danu tjednima ili mjesecima (Dhabhar i McEwen 1997). Uz to, postoji značajna varijabilnost u individualnom odgovoru na stresore. Neke od tih individualnih razlika odražavaju stabilne karakteristike (genetsko naslijeđe, osobnost, mogućnost odupiranja (engl. *coping*) ali i situacijske razlike kao npr. da li se izloženost nekom patogenu dogodila tijekom perioda napora (npr. ispitni rokovi) ili tijekom vremena odmora (Daruna 2012). Richard Lazarus u svojoj teoriji kognitivne procjene naglašava da način na koji jedinka procjenjuje situaciju i mogućnost odupiranja izazovu definiraju stres (Lazarus, 1993). U modernoj terminologiji proces prilagodbe na akutne stresne promjene naziva se alostaza (održavanje stabilnosti ili homeostaza kroz promjene) a nemogućnost prilagodbe rezultira alostatskim opterećenjem tj. opterećenjem tijela i mozga koje potječe od kronične prekomjerne aktivnosti ili neaktivnosti fizioloških mehanizama koji su uključeni u prilagodbu na promjene u okolišu (McEwen, 1998). Sve promjene iniciraju stres, koji nije nužno štetan. Samo kad odgovor organizma nije učinkovit u prilagodbi nastaju štetne posljedice djelovanja promjena.

### **2.3.1. Biologija stresne reakcije**

Organizmi održavaju homeostazu kroz niz složenih fizioloških mehanizama koji se opiru izvanjskim silama, stresorima. Tijekom stresne reakcije povećana je pažnja i mozak se fokusira na percipiranu prijetnju. Ubrzavaju se otkucaji srca i respiracija, katabolizam se povećava i krvotok se preraspodjeljuje kako bi se povećala opskrbljenost mozga, srca i mišića (Chrousos i Gold 1992). Glavne kontrolne stanice stresnog sustava smještene su u hipotalamusu i moždanom deblu i uključuju parvocelularnu regiju hipotalamusa koja proizvodi CRH (faktor oslobađanja kortikotropina, od engl. *corticotropin-releasing hormone*), neurone paraventrikularne jezgre (PVN, od engl. *paraventricular nucleus*) koji proizvode arginin-vazopresin (AVP) i sustav jezgara locus coeruleusa koji otpušta noradrenalin (centralni simpatički sustav) (Tsigos i Chrousos 1994).

Osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HHN), zajedno s eferentnim simpatičko/adrenomedularnim sustavom, predstavlja efektorske krakove putem kojih mozak utječe na sve tjelesne organe tijekom izloženosti prijetenim podražaju (Smith i Vale 2006). Kontrolne stanice stresnog sustava uzajamno djeluju sa tri područja koja kontroliraju više moždane funkcije: afekt (mezokortikalni/mezolimbički sustav), pokretanje i prekidanje aktivnosti stresnog sustava (amigdala/hipokampus) te osjećaj boli (arcuate nucleus/pro-opiomelanokortin (POMC)) (Gray, 1993).

Hipotalamus kontrolira izlučivanje adrenokortikotropnog hormona (ACTH, od engl. *adrenocorticotropic hormone*) koji potiče izlučivanje glukokortikoida, primarno kortizola, iz kore nadbubrežne žlijezde. CRH je primarni signal kojim hipotalamus potiče hipofizu na proizvodnju ACTH (Majzoub, 2006) ali značajno je i sinergističko djelovanje AVP-a (Livesey i sur. 2000).

Kada tijelo osjeti stresor, središnji živčani sustav (SŽS) aktivira autonomni živčani sustav (AŽS) i HHN-osovinu. Stimulacija AŽS-a rezultira aktivacijom simpatičkog sustava i otpuštanjem kateholamina (adrenalina i noradrenalina) koji povećavaju krvni tlak i ubrzavaju srčani ritam. Dodatni kateholamin, dopamin, je uključen u proces učenja, socijalnost i koncentraciju (Arias-Carrión i Poppel 2007). Njegovo oslobađanje kontrolira razinu prolaktina koji je uključen u regulaciji brojnih tjelesnih funkcija: reprodukcije, neurološke funkcije i imunosti (Kelly i sur. 2001).

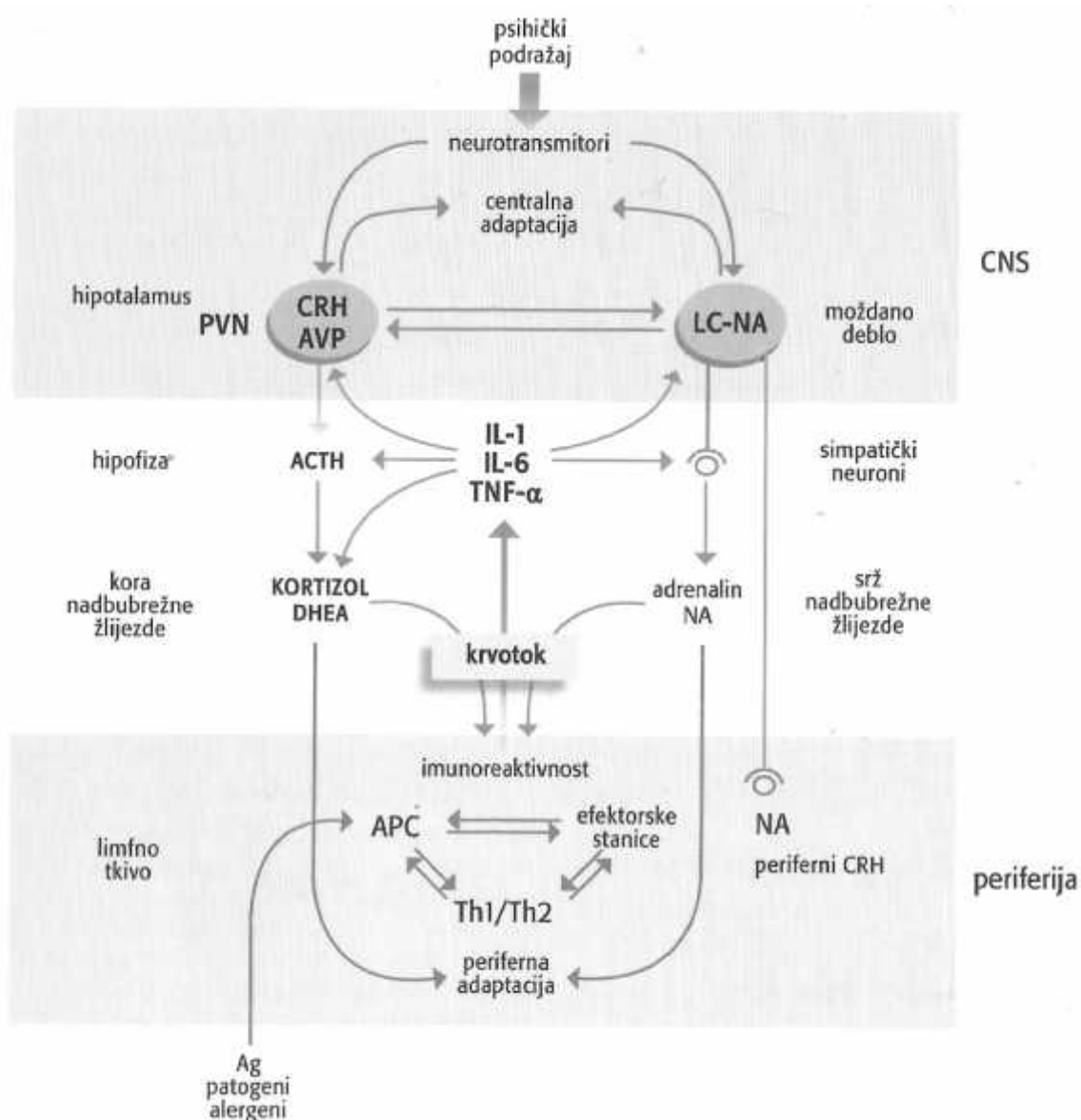
Aktivacija HHN-osovine uzrokuje oslobađanje CRH-a iz hipotalamusa što na kraju dovodi do izlučivanja glukokortikoida iz nadbubrežne žlijezde. Glukokortikoidi su finalni efektori HHN-osovine koji sudjeluju u tjelesnoj homeostazi i odgovoru organizma na stres. Imaju ključnu ulogu u regulaciji bazalne aktivnosti HHN-osovine i prekidanju stresnog odgovora. Negativna povratna sprega pri otpuštanju ACTH-a skraćuje trajanje izloženosti tkiva glukokortikoidima i tako minimalizira njihovo katabolno, antireproduktivno i imunosupresivno djelovanje (Tsigos i Chrousos 2002). Receptori za glukokortikoide prisutni su na gotovo svim tipovima stanica (Smith i Toft 1993) te putem njih glukokortikoidi djeluju na izražaj gena u raznim tkivima (Carrasco i Van de Kar 2003).

Gore opisane promjene zajedno čine stresnu reakciju koja utječe na fiziologiju organizma ali i na ponašanje. Organizam si povećava šanse za preživljavanje gase i fiziološke funkcije koje nisu trenutno nužne i preusmjerava energiju na važnije funkcije. Na primjer, nakon otkrivanja stresora organizam usporava probavu, rast i smanjuje reproduktivni nagon. Nasuprot tome,

povećava se kardiovaskularni obujam, respiratorni ritam i proizvodnja energije. Bihevioralno, jedinka postaje opreznija, fokusirana i ima povećane mentalne mogućnosti za procesuiranje okoliša i novih okolnosti (Charmandari i sur. 2005).

### 2.3.2. Utjecaj stresa na imunost

Neurološki, endokrini i imunološki sustav komuniciraju međusobno, ali i sa svim drugim tkivima održavaju i homeostazu. Stanice imunološkog sustava izražavaju receptore za neurotransmitore (acetil-kolin, adrenalin, noradrenalin, serotonin), neuropeptide (tvar P, endorfin) i hormone (kortikosteroide, prolaktin, hormon rasta, inzulin, spolne hormone) (Besedovsky i del Rey 1996; Blalock 2005). Stoga promjene u razini neuroloških i endokrinih medijatora pri stresu mogu modulirati aktivnost imunološkog sustava. S druge strane, citokini i drugi humoralni medijatori upale su potentni aktivatori središnjeg stresnog odgovora. Glavna tri upalna citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6 mogu uzrokovati stimulaciju HHN-osovine (**Slika 4**) djeluju i sami ili u sinergiji jedni s drugima (Chrousos 1995; Tsigos i sur. 1997). Osim toga, ovi citokini, djeluju i sami ili u kombinaciji sa stresnim hormonima, induciraju vrucicu, pospanost, umor, gubitak apetita i smanjeni libido te potiču sintezu proteina akutne faze u jetri – promjene poznate kao bolesničko ponašanje (engl. *sickness behavior*) (Elenkov i Chrousos 1999). Aktivacija HHN-osovine i sustava *locus coeruleus*-noradrenalin rezultira sustavnim povećanjem koncentracija glukokortikoida i kateholamina, koji djeluju i uzajamno održavaju homeostazu (Constantine Tsigos & Chrousos, 2002). Ti hormoni stresne reakcije, osobito glukokortikoidi, mogu inhibirati proliferaciju leukocita i limfocita, citotoksičnost, migraciju i proizvodnju određenih citokina (Elenkov & Chrousos, 1999). Stanice imunološkog sustava mogu i same sintetizirati hormone (npr. CRH, ACTH, prolaktin, oksitocin) i neuropeptide (npr. endorfini, somatostatin, tvar P, vazoaktivni intestinalni polipeptid) (Blalock i Smith 2007). Jedan od glavnih učinaka kroničnog stresa na imunološki sustav je preusmjerenje imunoreakcija iz Th1 u Th2 tip (Elenkov 2008) uslijed dugotrajnog djelovanja glukokortikoida i kateholamina. Glukokortikoidi i dva glavna kateholamina, adrenalin i noradrenalin, kroz stimulaciju citoplazmatskih i nuklearnih glukokortikoidnih receptora i  $\beta_2$ -adrenergičnih receptora ( $\beta_2$ -AR) suprimiraju proizvodnju IL-12 od strane antigen-predodajnih stanica (Blotta i sur. 1997; Panina-Bordignon i sur. 1997; Haskó i sur. 1998).



**Slika 4.** Shematski prikaz me udjelovanja živ anog sustava, endokrinog i imunostava (prema Elenkovu i Chrousos, 1999.) Kratice: ACTH, adrenokortikotropni hormon; Ag, antigen; APC, antigenpredna stanica; AVP, arginin-vazopresin; CNS, centralni nervni sustav; CRH, hormon oslobađanja kortikotropina; DHEA, dehidroepiandrosteron; LC, *locus ceruleus*; NA, noradrenalin.

IL-12 je jedan od glavnih Th1 citokina koji je vrlo potentan u poticanju proizvodnje IFN- $\gamma$  i inhibiciji proizvodnje IL-4 od strane T-limfocita (DeKruyff i sur. 1998). Glukokortikoidi imaju i direktan i indirektan utjecaj na Th2 T-limfocite povećavajući njihovu proizvodnju citokina IL-4, IL-10 i IL-13 (Ramírez i sur. 1996). I glukokortikoidi i kateholamini inhibiraju proizvodnju

IL-1, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  od strane mijeloidnih stanica (Van der Poll i Lowry 1997; Nakamura i sur. 1998). S obzirom da su  $\beta_2$ -AR izraženi samo na Th1 stanicama ali ne i Th2 stanicama (Sanders i sur. 1997), kateholamini nemaju direktan učinak na proizvodnju citokina od strane Th2 T-limfocita.

Aktivacija stresnog sustava (uključuje glukokortikoida i kateholamina) događa se i za vrijeme upale što suprimira lučenje Th1 citokina (npr. proupalni citokini, IL-2) i potiče se lučenje Th2 citokina (npr. TGF $\beta$  (od engl. *transforming growth factor*)- $\beta$ , 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- $\alpha$  i C-reaktivnog proteina (CRP) (Elenkov 2008). Zbog toga se smatra da su stanja koja su karakterizirana dugotrajnom aktivacijom stresnog sustava (npr. depresija i PTSP) karakterizirana kroničnom upalom niskog stupnja na što upućuje sve više dokaza o povišenim bazalnim vrijednostima brojnih citokina u ovim stanjima (Simon i sur. 2008; Hoge i sur. 2009). S druge strane, smatra se da bi smanjena aktivnost stresnog sustava mogla imati ulogu u Th1 pomaku koji se događa u nekim autoimunim bolestima poput reumatoidnog artritisa i multiple skleroze (Sternberg 2001; Elenkov i Chrousos 2002). Nekoliko istraživanja upućuje na to da je smanjena proizvodnja kortizola uključena u pojavu i napredovanje reumatoidnog artritisa (Wilder i Elenkov 1999; Straub i Cutolo 2001). Pacijenti oboljeli od reumatoidnog artritisa imaju snižene koncentracije kortizola u plazmi uz snažnu kroničnu upalu karakteriziranu povišenim koncentracijama citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6. Moguće je da smanjena koncentracija kortizola pridonosi nastanku i održanju tog proupalnog stanja, no da li je ta abnormalnost primarna ili sekundarna nije jasno (Wilder i Elenkov 1999).

Jedan od učinaka stresa na imunološki sustav jest i mogućnost da inducira promjene u raspodjeli leukocita u tijelu (Dhabhar i sur. 1995). Te promjene mogu imati značajan utjecaj na imunološko funkcioniranje u raznim dijelovima tijela koji su obogaćeni ili osiromašeni leukocitima tijekom stresa. Akutni stres može utjecati na promet i sazrijevanje limfocita na način koji pojačava i urođenu i stečenu imunost. Tako npr. akutni stres koji prethodi kožnom izlaganju novom antigenu povećava formaciju memorijskih T-limfocita i rezultira značajnim i trajnim povećanjem imunosti na taj antigen (Saint-Mezard i sur. 2003; Dhabhar & Viswanathan 2005; Viswanathan et al. 2005). Slično, akutni stres tijekom ponovnog izlaganja antigenu pojačava sekundarne imunološke odgovore (Dhabhar i McEwen 1996). Nasuprot tome, kronični stres suprimira i uzrokuje poremećaje u regulaciji imunoloških odgovora kroz

mehanizme koji osim narušavanja Th1/Th2 ravnoteže uključuju i smanjenje broja leukocita, njihovog prometovanja i funkcije (Dhabhar, 2008).

Dhabhar i kolege (2008) su prvi predložili da stresom potaknute promjene u raspodjeli leukocita između u krvi i limfoidnih organa mogu predstavljati adaptivni odgovor. Akutnim stresom posredovano smanjenje broja leukocita u krvi uzrokovano je preraspodjelom leukocita iz krvi prema koži, limfnim krvotokovima i drugim organima. Takva preraspodjela bi mogla pojačavati imunološku funkciju u odjeljcima u koje leukociti migriraju tijekom stresa. U skladu s tom hipotezom je i opservacija da je stresom posredovana preraspodjela leukocita iz krvi prema koži popraćena značajnim pojačanjem imunosti u koži (Dhabhar i sur. 2000). Suprotno akutnom stresu, kronični stres suprimira staničnu imunost u koži te se supresija preraspodjele leukocita u kroničnom stresu smatra jednim od faktora kojim je posredovan imunosupresivni učinak kroničnog stresa (Dhabhar i McEwen 1997). Dakle stres može utjecati na imunološku funkciju na staničnom nivou (npr. utječući na proliferaciju, predodavanje antigena, citotoksičnost, proizvodnju citokina) ali i kroz raspodjelu leukocita koja može smanjiti ili povećati broj leukocita u određenom dijelu organizma.

#### **2.4. POSTTRAUMATSKI STRESNI POREMEĆAJ**

Prema Američkom dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje, posttraumatski stresni poremećaj je definiran kao s traumom povezan poremećaj koji uključuje osjećaje intenzivnog straha, bespomoćnosti i užasa kao reakciju na ekstremni traumatski stresor (American Psychiatric Association, 2013). Trauma mora uključivati prijetnju životu, ozbiljnu ozljedu, prijetnju fizičkoj cjelovitosti osobe i svjedočenje smrti ili ugroženosti života drugih. Dijagnoza PTSP-a uključuje tri grupe simptoma: a) ponovno proživljavanje traumatskog događaja (npr. noćne more, prisilne misli), b) izbjegavanje podsjetnika na traumu (npr. izbjegavanje misli i osjećaja povezanih s traumom, nemogućnost prisjećanja bitnih prizora traumatskog doživljaja) i emocionalna obamrlost (npr. smanjena afektivnost); c) pojačana podražljivost (npr. pretjerana plašljivost, pojačana opreznost, nesanica, teškoće u koncentraciji). Ti simptomi moraju trajati duže od jednog mjeseca i biti povezani sa značajnim poremećajem funkcioniranja.

Raspon traumatskih događaja koji mogu prouzročiti PTSP je širok i uključuje ratne sukobe, seksualno zlostavljanje, obiteljsko nasilje, zanemarivanje u djetinjstvu, traume povezane s

obavljanjem posla, prijetnju oružjem i prirodne katastrofe (Perkonigg i sur. 2000; Ahmed 2007). Posebne populacije poput vojnika, policajaca i spasioaca su pod povećanim rizikom izlaganja traumi i shodno tome imaju veći rizik od razvoja PTSP-a. No većina ljudi izložena traumatskom događaju ne razviti PTSP, dok je podložnost žena razvoju PTSP-a nešto veća nego kod muškaraca. Tako je rizik od razvoja PTSP-a nakon traumatskog događaja kod žena procijenjen na 20,4% a kod muškaraca na 8,1%. Muškarci doživljavaju više traumatskih događaja nego žene, no žene doživljavaju traumatske događaje već u inkakoj mjeri i dovode do razvoja PTSP-a (Stein i sur. 2009). Shodno tome Kessler i suradnici (2007) procjenjuju životnu učestalost na 7.8% u općoj populaciji (10,4% kod žena i 5% kod muškaraca) no izvještaji o učestalosti u općoj populaciji se razlikuju i sežu od 1% do 14% (Kozarić-Kovač i sur. 2007). Zadnji literaturni podaci upućuju na životnu učestalost od 6,8% u SAD-u i 9% u svijetu (Kessler i sur. 2005) što čini PTSP jednim od češćih psihijatrijskih poremećaja. Ratni veterani i osobe izložene ratnim sukobima imaju povećani rizik od PTSP-a i stope učestalosti u tim skupinama sežu od 1,4% do 31% (Sundin i sur. 2010). Longitudinalno istraživanje na veteranima Vijetnamskog rata pokazala je da 30 godina nakon traume 10% veterana još uvijek pokazuje simptome PTSP-a (Koenen i sur. 2008). Epidemiološka slika u Hrvatskoj je nejasna jer nisu provedena sustavna epidemiološka istraživanja u svezi broja psiho-traumatiziranih osoba u Domovinskom ratu. Pretpostavlja se da je kod prognanika i izbjeglica učestalost PTSP-a između 25 i 50%, a među braniteljima 25-30% (Kozarić-Kovač i sur. 2007). Imaju li na umu da u 40% slučajeva PTSP nije zabilježen ni 10 godina nakon traume unatoč liječenju (Kessler i sur. 1995), može se zaključiti da PTSP i danas predstavlja veliki javnozdravstveni problem u republici Hrvatskoj.

PTSP može biti izoliran no u većini slučajeva (oko 80%) se javlja u komorbiditetu s drugim psihijatrijskim poremećajima (Brady, 1997). PTSP se najčešće javlja s depresivnim poremećajem, anksioznim poremećajem, paničnim poremećajem, alkoholizmom, ovisnostima o psihoaktivnim tvarima i poremećajima ličnosti (Kozarić-Kovač i Borovečki 2005). Unatoč visokom stupnju komorbiditeta brojna istraživanja upućuju na biološke promjene karakteristične za PTSP. Ispitivanja HHN-osovine upućuju na specifični obrazac u PTSP-u koji se razlikuje od nalaza u depresiji. Uz povećanu koncentraciju CRH u cerebrospinalnom likvoru oboljelih od PTSP-a, brojne studije su pokazale smanjene periferne koncentracije kortizola u PTSP-u (Wessa i Rohleder 2007; Heim i Nemeroff 2009). No u nekim istraživanjima nisu pronađene smanjene koncentracije cirkulirajućeg kortizola u pacijenata oboljelih od PTSP-a (Meewisse i sur. 2007). Na varijabilnost rezultata ovih istraživanja

vjerojatno je utjecalo nekoliko faktora poput komorbidne depresije, trenutne izraženosti simptoma PTSP-a, vremena proteklog od traumatskog događaja i trajanja izlaganja traumi. Nekoliko istraživanja je pokazalo i da oboljeli od PTSP-a pokazuju pojačanu osjetljivost na glukokortikoide koja se očituje testom supresije lučenja kortizola nakon administracije deksametazona (Yehuda, 2009). No i tu su rezultati opretni te nije pronađena razlika u supresiji lučenja kortizola između oboljelih od PTSP-a i kontrola izloženih traumi bez PTSP-a (Wessa i Rohleder 2007). Lizozimska aktivnost u leukocitima oboljelih od PTSP-a osjetljivija je na supresiju deksametazonom nego kod zdravih osoba (Rohleder i sur. 2004). Kod osoba u kojih se trauma dogodila kasnije u životu potrebno više deksametazona da bi se suprimirala lizozimska aktivnost u mononuklearnim stanicama iz periferne krvi (Yehuda i sur. 2004). U ranijem istraživanju naše grupe, na uzorku hrvatskih ratnih veterana kod kojih je od traume prošlo više od deset godina pokazano je da izraženost GR u limfocitima pozitivno korelira s vremenom od traumatskog iskustva (Vidović i sur. 2007). Sve to upućuje na to da duljina aktivacije stresnog sustava i vrijeme proteklo od traumatskog događaja utječu na profil HHN-osovine. Moguće je da se u uvjetima kroničnog stresa organizam štiti od štetnih učinaka kortizola smanjujući ukupno lučenje kortizola (Miller i sur. 2007) ili smanjujući osjetljivost na kortizol (Butts i Sternberg 2008).

Istraživanja koja se odnose na promjene imunološkog sustava u PTSP-u dala su opretno rezultate, no mogu se izdvojiti povećani upalni pokazatelji u cirkulaciji, povećana reaktivnost na antigenske kožne testove, smanjena aktivnost NK-stanica i smanjeni ukupni broj T-limfocita (Pace i Heim 2011). Uz smanjenu glukokortikoidnu signalizaciju, PTSP je povezan sa povećanjem upalne aktivnosti (Raison i Miller 2003). Istraživanje provedeno na traumatiziranim ratnim veteranima sa i bez PTSP-a pokazalo je da iako je aktivnost glukokortikoidnih receptora bila smanjena u obje grupe, imunoregulacija je bila smanjena samo u traumatiziranim osobama s PTSP-om (de Kloet i sur. 2007).

Neke autoimune bolesti poput reumatoidnog artritisa, dijabetesa i lupusa su povezane s promijenjenom koncentracijom kortizola i povišenom razinom proupalnih citokina IL-6, IL-1 i TNF- $\alpha$  (Sanchez i sur. 2004; Calcagni i Elenkov 2006). Slično tome, postoje istraživanja koja pokazuju povećanu koncentraciju proupalnih citokina IL-6 i TNF- $\alpha$  u plazmi ili serumu oboljelih od PTSP-a (Pace i Heim 2011; Baker i sur. 2012). Ratni veterani oboljeli od PTSP-a imali su povećane i druge pokazatelje upale poput povećane sedimentacije eritrocita i povećani broj leukocita (Boscarino, 2008b). Poremećena regulacija kortizola, povećane koncentracije kateholamina i povećan broj cirkulirajućih T-limfocita, pronađeni su u oboljelih od



PTSP-a, su sve potencijalni prekursori autoimunih bolesti. Postoje naznake da postoji povezanost nekih specifičnih aspekata PTSP-a i patologije autoimunih bolesti. Pronađen je pozitivan odnos između PTSP-simptoma ponovnog proživljavanja i izraženosti IL-6 receptora (Miller i sur. 2001), koji djeluje kao agonist IL-6 i ima vlastito pro-upalno djelovanje.

Epidemiološki gledano, biološke i bihevioralne promjene u osoba s PTSP-om, predstavljaju veći rizik za obolijevanje od raznih somatskih bolesti (Barrett i sur. 2002). Epidemiološko istraživanje iz 2009. godine pokazalo je da je artritis bolest koja je najčešće bila povezana s PTSP-om u američkih ratnih veterana, a postojala je i naznaka o povećanoj pojavnosti dijabetesa i koronarnih bolesti srca (Qureshi i sur. 2009). Ratni veterani oboljeli od PTSP-a imaju povećanu smrtnost od srčanih bolesti u odnosu na veterane koji nisu oboljeli od PTSP-a, te je povećana smrtnost također povezana s izmjerenom razinom simptoma PTSP-a (Boscarino, 2008a). Uestalost raznih autoimunih bolesti povećana je u oboljelih od PTSP-a, prije svega reumatoidnog artritisa, zatim psorijaze, hipotiroidizma i Basedowljeve (Gravesove) bolesti (Boscarino, 2004).

Imaju li na umu povećanu uestalost raznih somatskih bolesti, povećanu smrtnost i psihičku disfunkciju u PTSP-u, jasno je da je uspješno liječenje PTSP-a predstavlja velik javnozdravstveni problem. Pri liječenju PTSP-a prednost se daje psihoterapiji, no često je nužna i farmakoterapija (Kozarić-Kovačić i sur. 2007). Razni lijekovi su se pokazali uspješnim pri smanjenju simptoma PTSP-a, no ne postoji standardna farmakoterapija za PTSP. Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina predstavljaju prvi terapijski izbor za liječenje PTSP-a (Cooper i sur. 2005), no ovisno o komorbiditetima, koriste se i triciklički antidepressivi, stabilizatori raspoloženja, antipsihotici, beta blokatori, bendodiazepini itd. (Berger i sur. 2009).

### 3. OBRAZLOŽENJE TEME I HIPOTEZA

Svrha naše studije je istražiti funkcionalne karakteristike mononuklearnih stanica iz periferne krvi (monocita i limfocita) u osoba oboljelih od posttraumatskog stresnog poremećaja i njihovu povezanost s duljinom telomera i aktivnošću telomeraze.

Hipoteza istraživanja glasi: telomere u mononuklearnim stanicama iz periferne krvi oboljelih od posttraumatskog stresnog poremećaja kraće su od telomera dobno podudarnih zdravih kontrola. To skraćivanje telomera povezano je s funkcionalnim promjenama karakterističnim za starenje imunostava.

Ciljevi istraživanja su:

1. Izmjeriti duljinu telomera i aktivnost enzima telomeraze mononuklearnih stanica iz periferne krvi u tri skupine ispitanika: oboljeli od posttraumatskog stresnog poremećaja, dobno podudarne zdrave kontrole i skupina ispitanika starijih od 80 godina.
2. U istih ispitanika izmjeriti funkcionalne osobine mononuklearnih stanica iz periferne krvi (proliferacija i proizvodnja citokina) te ispitati njihovu povezanost s duljinom telomera i aktivnosti enzima telomeraze.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ispitanici

U ovo istraživanje bile su uključene tri skupine ispitanika: oboljeli od PTSP-a, dobro podudarne zdrave kontrole i skupina osoba starijih od 80 godina. Skupinu oboljelih od PTSP-a činili su muškarci, veterani Domovinskog rata koji su se ambulantno liječili zbog kroničnog PTSP-a u Općoj bolnici „dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod. Dijagnoza PTSP-a postavljena je na temelju kriterija MKB-10 (Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema, deseta revizija) (World Health Organisation, 1994), 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)-IV (American Psychiatric Association, 2013) korištenjem Kliničke skale za procjenu posttraumatskog stresnog poremećaja (CAPS, od engl. *Clinician Administered PTSD Scale*) (Blake i sur. 1995). Ispitivanje PTSP pacijenata i zdravih kontrola obavio je liječnik, specijalist psihijatar. Ispitanici iz ove dvije skupine klinički su pregledani kako bi se isključila prisutnost akutne ili kronične somatske bolesti.

Ratni veterani i zdrave kontrole ispunili su upitnik koji je uključivao informacije o slijedećim: osnovne demografske karakteristike, težina, visina, konzumacija alkohola, fizička aktivnost, prisutnost akutnih ili kroničnih somatskih bolesti, korištenje lijekova. Zatim su ispunili upitnike koji procjenjuju simptome depresije i tjeskobe. Simptomi depresije procijenjeni su s upitnikom *Beck Depression Inventory* (BDI) (Beck i sur. 1988) a simptomi trenutne tjeskobe s upitnikom *Spielberger State-Trait Anxiety Inventory* (STAI) (Julian, 2011). Ispitanici iz kontrolne skupine uključeni su u istraživanje ukoliko nisu imali anamnezu akutne psihoze, demencije, shizofrenije, poremećaja raspoloženja ili poremećaja osobnosti. Kriteriji isključenja za ratne veterane kao i za zdrave kontrole uključivali su ovisnost o drogama, simptome ili znake akutne ili kronične somatske bolesti, uključujući i zarazne, alergijske ili endokrine poremećaje.

Uzimanje krvi izvršeno je nakon kliničkog pregleda ali prije strukturiranog psihijatrijskog intervjua i ispunjavanja upitnika kako bi se minimalizirao utjecaj akutnog stresa na rezultate istraživanja.

Skupina starijih osoba iz Doma za starije i nemoćne osobe „Slavonski Brod“ uključena je u istraživanje kao biološke kontrole za skrivanje telomera i promjene u imunoreaktivnosti povezane s dobi. S obzirom da su starije osobe služile samo kao biološke kontrole nisu podvrgnuti psihijatrijskom ispitivanju, jedini kriterij za uključivanje u istraživanje bila je dob viša od 80 godina i odsutnost prijašnjih ili trenutnih neoplastičnih i autoimunih bolesti.

## 4.2. Materijali

### **Puferirana fiziološka otopina (PBS) (Imunološki zavod, Zagreb, Hrvatska)**

8,47 g NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska)	145 mM
3,14 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Kemika)	18 mM
1,36 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kemika)	10 mM

Dest. H<sub>2</sub>O do 1000ml

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

### **Dulbeccov PBS (Imunološki zavod)**

8 g NaCl (Kemika)	137 mM
2 g KCl (Kemika)	3 mM
2 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 mM
14,2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Kemika)	8 mM
1 g MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O (Kemika)	0,5 mM
1,47 g CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Kemika)	0,1 mM

Dest. H<sub>2</sub>O do 1000ml

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

### **Otopina za obilježavanje**

500 mg NaN<sub>3</sub>            0,1%

5 mL fetalni tele i serum (FBS, od engl. *fetal bovine serum*) (Life Technologies, Carlsbad, SAD)            1%

Dulbeccov PBS do 500 mL

### **Otopina za permeabiliziranje**

500 mg saponina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)            0,1%

500 mg NaN<sub>3</sub> (Kemika)            0,1%

5 mL fetalni tele i serum            1%

Dulbeccov PBS do 500 mL

### **Otopina za fiksiranje (F1)**

5 ml 36%-tnog formaldehida (Kemika)            1%

175 ml otopine za obilježavanje

### **Otopina za fiksiranje (F2)**

20 ml 36%-tnog formaldehida (Kemika)            4%

160 ml Dulbeccov PBS (Imunološki zavod)

**Teku a hranjiva podloga RPMI** (engl. *Roswell Park Memorial Institute*)-1640 (Imunološki zavod) s gentamicinom (Sigma-Aldrich) (50 mg/l) uz dodatak 10% seruma gove eg fetusa (RPMI + 10% FBS)

## Medij za zamrzavanje

10 ml FBS	10%
10 ml dimetil sulfoksid (DMSO) (Kemika)	10%
80 ml RPMI 1640	80%

### 4.3. Uzorci krvi

Periferna krv ispitanika prikupljena je venipunkcijom iz antekubitalne vene između 7 h i 9 h. 10-15 mL krvi po ispitaniku prikupljeno je u Vacutainer® epruvete (BD Biosciences, Franklin Lakes, SAD) s natrij-heparinom.

Periferno mononuklearne stanice (PBMC, od eng. *peripheral blood mononuclear cells*) izolirane su iz heparinizirane krvi na gradijentu gustoće Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Krv je razrijeđena 1:1 s puferiranom fiziološkom otopinom (PBS) te nadslojena na jednak volumen Ficoll-a i centrifugirana na 900 x g kroz 30 minuta pri sobnoj temperaturi u Omnifuge 2.0 RS centrifugi (Heraeus, Hanau, Njemačka). Prsten PBMC-a sakupljen je Pasteurovom pipetom (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) i prebačen u novu epruvetu (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgija) te ispran s 10 mL medija RPMI + 10% FBS i centrifugiran na 6000 x g kroz 10 min. pri sobnoj temperaturi. Broj i vijabilnost PBMC-a određeni su Neubauerovim hemocitometrom u 0,4% otopini reagensa Trypan Blue (Sigma-Aldrich). Stanice su resuspendirane u mediju za zamrzavanje u koncentraciji  $2 \times 10^6$  stanica/mL i prebačene u epruvete za zamrzavanje (Sarstedt). Epruvete su pohranjene preko noći na  $-80^{\circ}\text{C}$  u Mr. Frosty (Sigma-Aldrich) spremniku s isopropanolom (Kemika) za postepeno zamrzavanje. Epruvete s PBMC-ima slijedećeg su dana pohranjene u tekućem dušiku.

### 4.4. Izolacija genomske DNA

U Eppendorfovu epruvetu sa  $5 \times 10^6$  PBMC-a dodano je 500  $\mu\text{L}$  pufera za lizu (0.1 M NaCl, 10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8) i 5  $\mu\text{L}$  10% SDS-a. Nakon inkubacije kroz 1,5 h pri  $37^{\circ}\text{C}$  dodano je 200  $\mu\text{g/mL}$  proteinaze K (Sigma-Aldrich) i inkubirano 3 h u vodenoj kupelji

na 56°C. Nakon inkubacije dodano je 500 µL smjese fenol-kloroforma i zatvorena epruveta promiješana okretima zgloba tijekom 5 minuta. Uslijedilo je centrifugiranje 5 min. na 12 000 x g nakon čega je gornji sloj koji sadrži DNA pažljivo pokupljen nastavkom i prebačen u novu epruvetu. Dodan je dvostruki volumen smjese kloroform-izoamilnog alkohola i zatvorena epruveta je promiješana okretima zgloba kroz 5 minuta. Uslijedilo je ponovno centrifugiranje (5 min. na 12000 x g) nakon čega je gornji sloj koji sadrži DNA pažljivo pokupljen pipetom i prebačen u novu epruvetu. Dodana je jedna desetina volumena 3 M Na-acetata i 2 volumena 96%-tnog etanola (ohlađenog na -20°C) te inkubirano preko noći na -20°C. Slijedeći dan uzorci su centrifugirani 45 min. na 12 000 x g te je odliven supernatant. Na talog je dodan 1 mL 70%-tnog etanola (ohlađenog na -20°C) te ponovno centrifugirano na 12 000 x g kroz 45 min., nakon čega je odliven supernatant. Talog DNA je osušen u koncentratoru 10 min. te zatim otopljen u 20 µL vode tretirane dietilpirokarbonatom (DEPC). Koncentracija ista DNA je izmjerena na spektrofotometru.

#### 4.5. Mjerenje duljine telomera

Lanana reakcija DNA-polimeraze (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) je tehnika kojom se *in vitro* umnožava određeni dio molekule DNA te se koristi za pripremu određenog fragmenta ili analizu prisutnosti određene regije u uzorku. Metoda lanane reakcije DNA-polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*) koristi se za apsolutnu ili relativnu kvantifikaciju DNA ili RNA.

Relativna duljina telomera ispitanika izmjerena je tehnikom višestrukog real time PCR-a kao što je ranije opisano (Cawthon, 2009). Ovom metodom relativna duljina telomera se izražava kao omjer (T/S) broja ponavljanja telomernog slijeda (T) u odnosu na broj ponavljanja gena koji je u genomskoj DNA prisutan u jednoj kopiji (S) (engl. *single copy gene*) (Cawthon, 2002). Kako bi mjerenja uzoraka bila standardizirana, omjer T/S je mjereno u odnosu na referentnu DNA koja je u ovom slučaju bila mješavina DNA nekoliko zdravih kontrola. Real time PCR mjeri za svaku jažicu Ct, broj ciklusa pri kojem fluorescencija PCR-produkta prelazi određeni prag. Krivulja Ct naspram logaritma količine korištene referentne DNA je linearna što omogućava mjerenje nepoznate količine DNA (u ovom slučaju broja ponavljanja DNA slijeda) usporedbom sa standardnom krivuljom. Početnice korištene za umnažanje telomernog slijeda bile su:

telg: AACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGTTTGGGTTAGTGT

telc: TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA

Gen koji je u genomskoj DNA prisutan u jednoj kopiji (S) je bio albumin i za njegovo umnažanje korištene su po etnice:

albu: CGGCGGCGGGCGGCGGGGCTGGGCGGAAATGCTGCACAGAATCCTTG

albd: GCCCGGCCCGCCGCG CCCGTCCCGCCGGAAAAGCATGGTTCGCCTGTT

PCR-reakcije izvedene su u triplikatu koriste i 20 ng genomske DNA po jažici. U reakcijama je korišten komercijalno dostupan SYBR® Green mastermix (Life Technologies) koji sadrži AmpliTaq® Gold DNA polimerazu.

Termalni ciklusi bili su: Faza 1: 15 min na 95°C; Faza 2: 2 ciklusa po 15 s na 94°C; Faza 3: 32 ciklusa po 15 s na 94°C, 10 s na 62°C, 15 s na 74 °C s o itanjem signala, 10 s na 84°C, 15 s na 88°C s o itanjem. O itanja na 74°C mjerila su Ct-vrijednosti za telomernu sekvencu a o itanja na 88°C Ct vrijednosti albumina. Sva mjerenja izvedena su na ure aju iCycler iQ™ (Bio-Rad, Hercules, SAD).

#### **4.6. Mjerenje aktivnosti enzima telomeraze**

Aktivnost enzima telomeraze mjerena je komercijalno dostupnim kitom TRAPEZE® RT Telomerase Detection Kit (Chemicon, Billerica, SAD) prema uputama proizvo a a. Ova metoda zasniva se na uporabi Amplifluor® po etnica koje su dizajnirane tako da emitiraju fluorescenciju samo kada su ugra ene u PCR-produnkt. U prvom koraku ove PCR-reakcije enzim telomeraza iz uzorka dodaje odre eni broj telomernih sljedova (GGTTAG) na 3' kraj oligonukleotidnog supstrata iz kita. U drugom koraku enzim Taq-polimeraza umnožava produžene telomerne slijedove koriste i Amplifluor® RP (reverzne) po etnice. Fluorescencija nastala ugradnjom Amplifluor® po etnica direktno je proporcionalna broju telomernih sljedova koji je enzim telomeraza dodao na oligonukleotidni supstrat, odražavaju i tako aktivnost telomeraze u uzorku. Prije izvo enja PCR-reakcije prema uputama proizvo a a, 1 x 10<sup>6</sup> mononuklearnih stanica je lizirano CHAPS puferom za lizu (Chemicon). Koncentracija proteina u stani nom lizatu je izmjerena standardnim Bradfordovim testom. Metoda se bazira na reakciji proteina sa bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich) u otopini (NaCl, 0.15 M). Tijekom vezanja boje na pobo ne aminokiselinske grupe proteina, apsorpcijski maksimum boje pomi e se sa 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski. Koncentracija nepoznatog proteina o itava se sa standardne krivulje dobivene serijskim



razrije enjem otopine albumina iz gove eg seruma (Life Technologies) poznate koncentracije. Za PCR reakciju korišteno je 200 ng/ $\mu$ L stani nog lizata.

#### 4.7. Mjerenje proliferacije T-limfocita

Iako proliferacija nije specifi na efektorska funkcija T-limfocita poput citotoksi nosti ili aktivacije B-limfocita, funkcionalnost T-limfocita uvelike ovisi o njihovoj proliferaciji. Stoga je uobi ajeno da se mjerenje proliferacije T-limfocita koristi za procjenu njihove funkcionalnosti i op enito imuno kompetencije organizma.

Bojom CFSE (karboksifluorescein sukcinimidil ester) (Life Technologies) obilježeno je  $3 \times 10^6$  mononuklearnih stanica. CFSE je permeabilna fluorescentna boja koju nakon ulaska u stanicu cijepaju unutarstani ne esteraze. Nakon cijepanja esterske veze CFSE postaje puno manje permeabilan i zadržava se u stanici te se svakom diobom razrije uje me u stanicama k erima. Stanice su inkubirane u 1  $\mu$ M CFSE-a kroz 15 min. na 37°C. Nakon toga su resuspendirane u 5 mL hladnog RPMI-a + 10% FBS medija u kojem se inkubiraju 5 min. na 4°C. Stanice su isprane još dva puta u 10 mL RPMI + 10% FBS te je po  $1 \times 10^6$  stanica preba eno u odgovaraju e jažice na plo ici s 24 jažice (BD Biosciences), kako slijedi: 1. neobilježene stanice, 2. nestimulirane stanice obilježene s CFSE-om, 3. stanice obilježene s CFSE-om i stimulirane s 10  $\mu$ g/mL fitohemaglutininina (PHA, od engl. *phytohemagglutinin*) (Sigma-Aldrich) i 4. stanice obilježene s CFSE-om i stimulirane s 1  $\mu$ g/mL PHA. PHA je mitogen koji poti e proliferaciju limfocita T. Nakon 72 h inkubacije na 37°C u atmosferi s 5% CO<sub>2</sub> u inkubatoru Heracell Heraus (Thermo Fisher Scientific, Walthon, SAD) plo ice su preba ene na 4 °C kroz 20 min. Stani ne suspenzije su zatim preba ene u epruvete za proto nu citometriju i jažice dodatno isprane 2 puta s po 1 mL 2mM EDTA u PBS-u. Stanice su isprane s 3 mL pufera za obilježavanje i polovina je stanica odvojena za obilježavanje površinskih biljega CD3, CD4 i CD8 odgovaraju im monoklonskim protutijelima (vidi **Tablicu 1**) (Biolegend, San Diego, SAD). Nakon obilježavanja, stanice su isprane s 3 mL otopine za obilježavanje te resuspendirane u 0,5 mL pufera za fiksiranje (F2). Tako pripremljena stani na suspenzija analizirana je na proto nom citometru.

#### 4.8. Određivanje izraženosti receptora PD-1 i PD-L1 na površini T-limfocita

Po  $1 \times 10^6$  stanica resuspendirano je u 1 mL RPMI + 10% FBS i prebaeno u odgovarajuće jažice na pločici s 24 jažice. Stanice su inkubirane 24 h na 37 °C u atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>, bilo same (nestimulirane), bilo stimulirane s PHA u koncentraciji od 1 µg/ml. Nakon inkubacije stanice su prebaene u epruvete za proto nu citometriju, isprane otopinom za obilježavanje i obilježene protutijelima za biljege CD3, CD4, CD8, CD274 (PD-L1) i CD279 (PD-1) (vidi **Tablicu 1**), fiksirane puferom F2 i analizirane proto nim citometrom.

#### 4.9. Mjerenje proizvodnje citokina od strane T-limfocita

Periferne mononuklearne stanice su odmrznute u mediju RPMI + 10% FBS zagrijanom na 37°C te izbrojane. Po  $0,5 \times 10^6$  stanica raspoređeno je u jažice polistirenske ploče s 96 jažica (Orange Scientific) u 200 µL medija RPMI + 10% FBS. Stimulirani i nestimulirani uzorci pripremljeni su u duplikatu. T-limfocite smo stimulirali s 50 ng/ml forbol miristat acetata (PMA) i 0,75 ng/ml ionomicina (Sigma-Aldrich). Ova kombinacija tvari omogućava poliklonsku, nespecifičnu stimulaciju T-limfocita. Time se oponašaju procesi koji se odvijaju u stanicama nakon aktivacije antigenom preko TCR-kompleksa. Stimulacija se odvijala u prisutnosti blokatora proteinske sekrecije kako bi se sintetizirane molekule citokina zadržale unutar stanice, omogućavajući tako njihovu detekciju proto nom citometrijom. Korišten je brefeldin A (BFA) (Sigma-Aldrich) u koncentraciji od 10 µg/mL koji sprečava transport proteina iz endoplazmatskog u Golgijev aparat. Nakon 5 h inkubacije na 37°C u atmosferi s 5% CO<sub>2</sub> stanice su pipetom pokupljene iz jažica i isprane s 3 mL otopine za obilježavanje. Pola stanica je odvojeno kao neobilježena kontrola a pola inkubirano kroz 15 min. s protutijelima za površinske biljege CD3, CD16, CD56 (vidi **Tablicu 1**). Nakon ispiranja s 3 mL PBS-a stanice su fiksirane sa 100 µL otopine za fiksiranje (F1) i inkubirane 30 min na 4°C. Stanice su tada isprane s 3 mL otopine za permeabiliziranje i inkubirane 30 min s biljezima za unutarstanične citokine IFN- $\gamma$ , IL-2 i IL-4 (vidi **Tablicu 1**). Stanice su ponovo isprane s 3 ml otopine za permeabiliziranje, resuspendirane u 250 µl otopine za obilježavanje i propuštene na citometru.

**Tablica 1. Protutijela korištena za proto nu citometriju.**

Antigen	Fluorokrom	Volumen (µL)	Klon
CD3	Alexa Fluor 647	1,25	HIT3a
CD3	PerCP	1,25	SK7
CD4	APC/Cy7	5	OKT4
CD4	Brilliant Violet 570	1,25	RPA-T4
CD8	Alexa Fluor 488	1,25	SK1
CD8	PerCP	1,25	SK1
CD16	Pacific Blue	1,25	3G8
CD56	Pacific Blue	1,25	HCD56
CD68	FITC	5	Y1/82A
CD274	APC	5	29E.2A3
CD279	PE/Cy7	5	EH12.2H7
IL-6	PE	5	MQ2-13A5
TNF-	FITC	5	Mab11
IL-2	APC	5	MQ1-17H12
IL-4	PE	5	8D4-8
IFN-	FITC	5	4S.B3

#### **4.10. Mjerenje proizvodnje citokina od strane monocita**

Postupak je istovjetan postupku mjerenja proizvodnje citokina od strane limfocita T uz nekoliko bitnih razlika. Za stimulaciju monocita korišten je lipopolisaharid (LPS) (Sigma-Aldrich), sastojak stani ne stjenke gram negativnih bakterija koji potiče monocite na proizvodnju proupalnih citokina. Inkubacija stanica s LPS-om trajala je 6 h nakon čega su

stanice obilježene protutijelima za CD68 (monocitni biljeg) i proupalne citokine TNF- $\alpha$  i IL-6 (vidi **Tablicu 1**).

#### **4.11. Statisti ka obrada podataka**

Kategori ki podaci poput demografskih karakteristika ispitanika uspore eni su Fisherovim egzaktnim testom. Raspodjela svih kontinuiranih varijabli provjerena je Shapiro-Wilkovim W-testom i vizualnim ispitivanjem podataka (oblik i simetrija distribucije, identifikacija strše ih vrijednosti (engl. *outlier*), P-P dijagrami). Kontinuirane varijable koje se odnose na karakteristike ispitanika (dob, indeks tjelesne mase), rezultati psihometrijski testovi (CAPS, STAI, BDI), kao i duljina telomera, bili su normalno distribuirani. Preliminarne analize izvršene su neparametarskim testovima, analiza podskupina Mann-Whitneyevim U-testom a korelacije Spearmanovom rang korelacijom. Linerana regresija primijenjena je kako bi se ispitao odnos karakteristika PTSP-pacijenata (dob, indeks, tjelesne mase, pušenje, konzumacija alkohola), lijekova, komorbiditeta i iznosa psihometrijskih testova (CAPS, STAI, BDI) s duljinom telomera (kao zavisnom varijablom). Spomenute analize izvršene su koriste i program Statistica, v6 (Statsoft Inc., Tulsa, SAD).

Budu i da ve ina bioloških varijabli nije imala normalnu distribuciju, kod svih bioloških varijabli primijenili smo neparametarski postupak ponavljanog [opetovanog, višestrukog] uzorkovanja (engl. *resampling*) s 5000 replikacija dobivenih iz sva tri uzoraka uklju ena u studiju. Opisna i inferencijalna statistika izra unata je iz izvornog skupa podatak koriste i *bootstrap*-metodu (ponavljano uzorkovanje uz povrat). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (aritmeti ka sredina 5000 srednjih vrijednosti *bootstrap*-uzoraka; procjena srednje vrijednosti populacije)  $\pm$  standardna devijacija distribucije srednjih vrijednosti dobivenih ponavljanim uzorkovanjem (standardna pogreška procjene). Kod ispitivanja razlika izme u tri grupe, dvosmjerne (engl. *two-tailed*) *p*-vrijednosti odre ene su kao udio od 5000 nasumi nih uzorkovanja kod kojih je suma kvadrata razlika izme u srednjih vrijednosti triju skupina bila ve a ili jednaka sumi kvadrata razlika izvornih uzoraka.

Kako bi se smanjila mogu nost pogreške tipa I zbog izvršenih višestrukih usporedbi, *p*-vrijednosti su korigirane metodom FDR (engl. false discovery rate). Vrijednost praga FDR-metode (vrijednost *d*) je izra unata s razinom zna ajnosti od 0,05 za ukupno 21 usporedbu izvršenu s biološkim varijablama. Ako su razlike izme u srednjih vrijednosti triju skupina i

nakon FDR-korekcije još uvijek bile značajne, izvršene su *post-hoc* usporedbe između parova skupina *bootstrap*-metodom a dobivene *p*-vrijednosti korigirane su Bonferronijevim postupkom. Sva uzorkovanja i izračuni vršeni su programiranjem u proširenom Resampling Stats jeziku (Grosberg, 2014) i korišten je online program Statistics101, v 2.8. dostupan na [www.statistics101.net](http://www.statistics101.net).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Karakteristike ispitanika

Osnovne demografske i socioekonomske karakteristike ispitanika prikazane su u **Tablici 2**. PTSP skupina sastojala se od 30 srednje vje nih ispitanika oboljelih od PTSP-a prosje ne dobi 45,9 godina dok je u zdrave kontrole uklju eno 17 ispitanika prosje ne dobi 47,2 godine. Izme u skupina nije bilo statisti ke razlike obzirom na dob ( $p = 0,502$ ). Grupe se tako er nisu razlikovale po bra nom statusu i pušenju dok su ispitanici iz grupe PTSP-a imali niži stupanj obrazovanja od zdravih kontrola a ve ina ih je bila umirovljena. Nije bilo razlike u indeksu tjelesne mase i dnevnoj tjelovježbi izme u skupina dok je tjedna konzumacija alkohola bila eša u zdravih kontrola, no kod niti jednog od uklju enih ispitanika nije utvr ena trenutna ovisnost o alkoholu.

Da bi zadovoljio kriterije za dijagnozu PTSP-a, ispitanik je morao imati barem jedan simptom iz skupine simptoma ponovnog proživljavanja traumatskog iskustva, barem tri simptoma iz skupine simptoma izbjegavanja i obamrlosti te barem jedan simptom iz skupine simptoma poja ane pobu enosti vegetativnog živ anog sustava. Trenutni PTSP potvr en je CAPS-om kod svih ispitanika iz skupine oboljelih od PTSP-a i nikoga od zdravih kontrola iako je 5 ispitanika (29,4%) u grupi zdrave kontrole doživjelo tešku traumu. O ekivano, simptomi depresije (BDI-iznos) i tjeskobe (STAI-iznos) bili su izraženiji u PTSP grupi.

**Tablica 2. Demografske i socioekonomske karakteristike ispitanika**

Varijabla	Pacijenti s PTSP-om (N = 30)	Zdrave kontrole (N = 17)	p
Dob <sup>a</sup>	45,9 ± 1,12	47,2 ± 1,71	0,502
Indeks tjelesne mase <sup>a</sup>	27,13 ± 4	27,3 ± 2,62	0,883
Obrazovanje <sup>b</sup>			
osnovna/srednja škola	29 (96,4%)	11 (64,7%)	<b>0,0048</b>
fakultet	1 (3,4%)	6 (35,3%)	
Bra ni status <sup>b</sup>			
oženjen	25 (86,2%)	13 (76,5%)	0,0595
samac/razveden	4 (13,8%)	4 (23,5%)	
Radni status <sup>b</sup>			
zaposlen	1 (3,4%)	15 (88,2%)	< 0,001
nezaposlen/umirovljen	29 (96,4%)	2 (11,8%)	
Pušenje <sup>b</sup>			
da	17 (58,6%)	9 (52,9%)	0,708
ne	12 (41,4%)	8 (47,1%)	
Tjedna konzumacija alkohola <sup>b</sup>			
da	5 (20%)	11 (64,7%)	< <b>0,001</b>
ne	24 (80%)	6 (35,3%)	
Dnevna tjelovježba <sup>b</sup>	1 (3,33%)	1 (5,88%)	0,867
BDI <sup>a</sup>	29,38 ± 8,7	4,9 ± 5,4	< <b>0,001</b>
CAPS <sup>a</sup>			
Ponovno proživljavanje	17,3 ± 5,7		
Izbjegavanje	23,4 ± 7,5		
Poja ana podražljivost	15,8 ± 4,8		
Ukupno	56,7 ± 14,8		
STAI-S <sup>a</sup>	54,5 ± 9,9	39,0 ± 0,2	<b>0,001</b>
STAI-T <sup>a</sup>	57,9 ± 8,9	36,9 ± 6,7	<b>0,001</b>

<sup>a</sup>Podaci prikazani kao srednja vrijednost (procjena srednje vrijednosti populacije temeljena na 5000 *bootstrap* uzoraka) ± standardna devijacija distribucije uzorkovanja (procjena standardne greške uzorka). Pridružene dvosmjerne *p*-vrijednosti su izražene kao udio distribucije uzorkovanja kod kojih je apsolutna razlika između 5000 srednjih vrijednosti bila veća ili jednaka razlici srednjih vrijednosti izvornih uzoraka.

<sup>b</sup>Podaci prikazani kao N (%). Pridružene dvosmjerne *p*-vrijednosti su izražene Fisherovim egzaktnim testom.

Komorbiditeti koji su bili izraženi kod ratnih veterana uz PTSP prikazani su u **Tablici 3**. Naj češće i komorbiditeti bili su depresivni poremećaj izražen kod većine pacijenata (80%) i panični poremećaj izražen kod gotovo polovice ispitanika (43,3%). Samo 4 ispitanika u PTSP grupi nisu imala nikakav komorbiditet uz PTSP.

**Tablica 3. Komorbiditeti izraženi uz PTSP.**

Komorbiditet	Prisustvo	N	%
Depresivni poremećaj	NE	6	20,0
	DA	24	80,0
Panični poremećaj	NE	17	56,7
	DA	13	43,3
Socijalna fobija	NE	23	76,7
	DA	7	23,3
Opsesivno-kompulzivni poremećaj	NE	21	70,0
	DA	9	30,0

Prikazan je broj ispitanika (N) i udio (%) u ukupnom broju ispitanika s PTSP-om.

Zbog etičkih razloga farmakoterapija pacijentima s PTSP-om nije mogla biti prekinuta tijekom ispitivanja i većina ih je koristila više lijekova za vrijeme uzorkovanja. Većina ispitanika oboljelih od PTSP-a (N=28, 93%) liječena je psihotropnim lijekovima za vrijeme studije, gdje su najzastupljeniji bili antidepresivi (N = 27, 90%), anksiolitici (26, 87%) i hipnotici (N = 22, 73%). Manji broj pacijenata uzimao je stabilizatore raspoloženja i anti-psihotike. Od ostalih lijekova naj češća je bila uporaba analgetika, prvenstveno nesteroidnih protuupalnih lijekova (N = 18, 60%) dok je manji broj pacijenata koristio antihipertenzive i hipolipemike. Detaljan prikaz korištenih lijekova prikazan je u **Tablici 4**.



**Tablica 4. Lijekovi koje su koristili ispitanici oboljeli od PTSP-a u tjednu prije ispitivanja.**

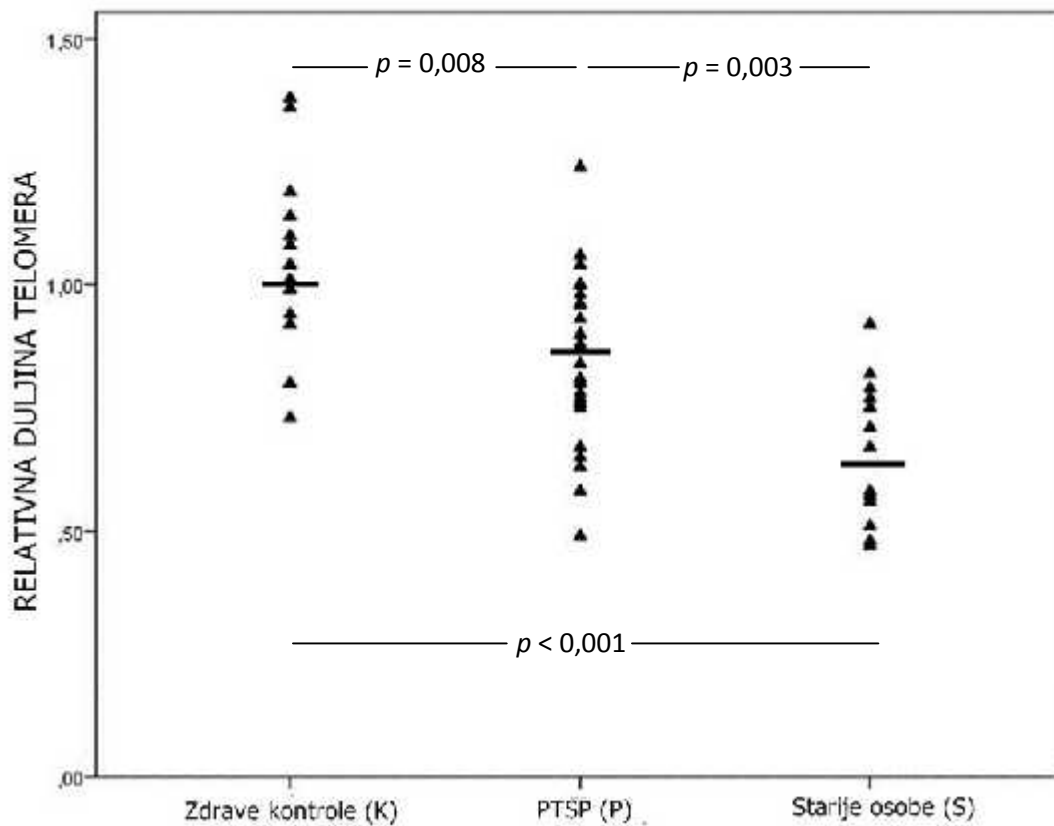
Farmakoterapija	Korištena	N	%
Nesteroidni protuupalni lijekovi	NE	12	40,0
	DA	18	60,0
Opioidni analgetici	NE	27	90,0
	DA	3	10,0
Antidepresivi	NE	3	10,0
	DA	27	90,0
Atipični antipsihotici	NE	16	53,3
	DA	14	46,7
Stabilizatori raspoloženja	NE	23	76,7
	DA	7	23,3
Anksiolitici	NE	4	13,3
	DA	26	86,7
Hipnotici	NE	8	26,7
	DA	22	73,3
Hipolipemici	NE	27	90,0
	DA	3	10,0
Antihipertenzivi	NE	27	90,0
	DA	3	10,0
Inhibitori protonske pumpe	NE	29	96,7
	DA	1	3,3

Prikazan je broj ispitanika (N) i udio (%) u ukupnom broju ispitanika s PTSP-om.

## 5.2. Duljina telomera i aktivnost telomeraze

PCR-metodom izmjerena je relativna duljina telomera u mononuklearnim stanicama iz periferne krvi izražena kao omjer (T/S) broja ponavljanja telomerne sekvence (T) u odnosu na broj ponavljanja gena koji je u genomskoj DNA prisutan u jednoj kopiji (S). T/S-omjeri tri skupine ispitanika prikazani su na **Slici 5**. Budući da je *p*-vrijednost usporedbe triju skupina (*p* = 0,00001) niža od vrijednosti praga FDR-metode (*d* = 0,0048) izračunate na temelju ukupno 21 usporedbe s razinom značajnosti 0,05 može se zaključiti da se grupe razlikuju obzirom na relativnu duljinu telomera. U pacijenata s PTSP-om (N = 28) bila je manja ( $0,86 \pm 0,031$ )

nego u dobno podudarnih zdravih kontrola ( $1,03 \pm 0,041$ ;  $N = 17$ ) dok su starije osobe ( $N = 14$ ) imale najkraće telomere ( $0,67 \pm 0,036$ ).

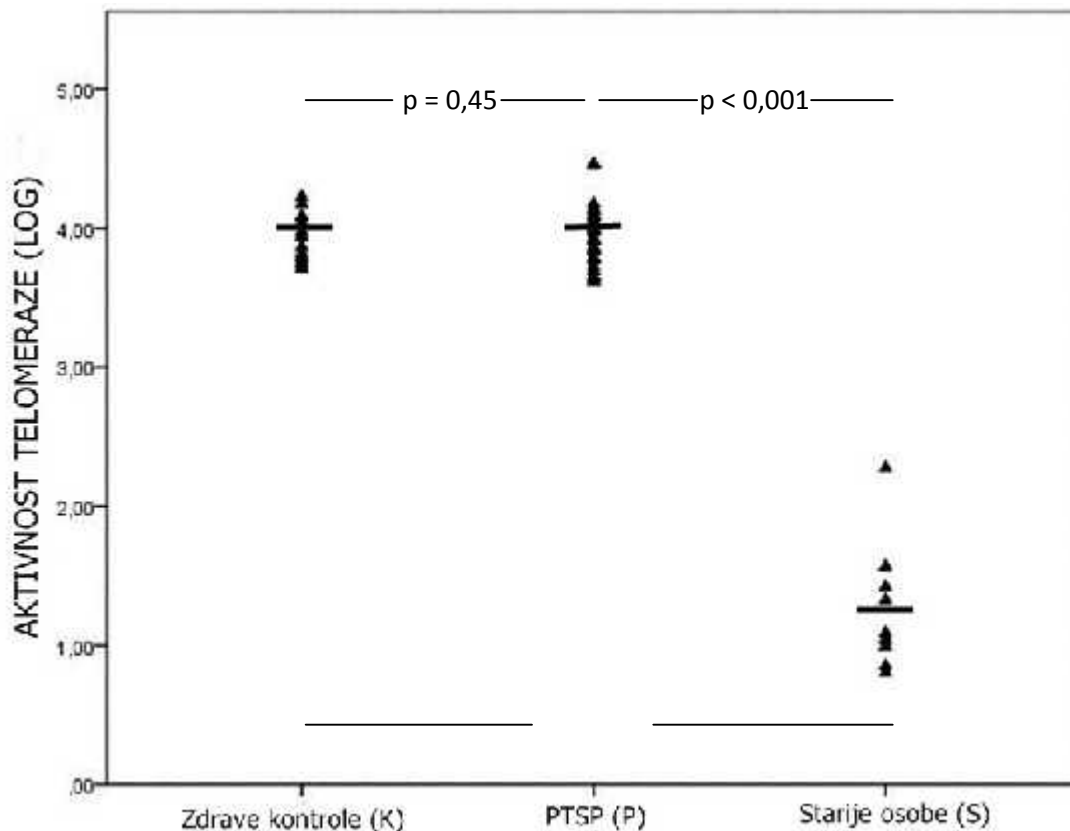


**Slika 5. Relativna duljina telomera u perifernim mononuklearnim stanicama.**

Crni trokuti predstavljaju pojedinačne vrijednosti ispitanika dok su srednje vrijednosti skupina (procjena srednje vrijednosti populacije temeljena na 5000 *bootstrap*-uzoraka) označene vodoravnim linijama. Prikazane su Bonferronijevom metodom korigirane *p*-vrijednosti za pojedinačne *post-hoc* usporedbe.

Bazalna aktivnost telomeraze izražena kao logaritam broja telomernih sekvenci koji je enzim telomeraza iz uzorka perifernih mononuklearnih stanica ispitanika dodao na umjetni oligonukleotidni supstrat prikazan je na **Slici 6**. Budući da je *p*-vrijednost usporedbe triju skupina ( $p = 0,00001$ ) niža od vrijednosti praga FDR-metode ( $d = 0,0048$ ) izračunate na temelju ukupno 21 usporedbe s razinom značajnosti 0,05 može se zaključiti da se grupe razlikuju obzirom na relativnu duljinu telomera. U pacijenata s PTSP-om ( $N = 30$ ) bila je manja ( $0,86 \pm 0,031$ ) nego u dobno podudarnih zdravih kontrola ( $1,03 \pm 0,041$ ;  $N=17$ ) dok su

starije osobe (N = 14) imale najkraće telomere ( $0,67 \pm 0,036$ ). Nije bilo razlike u aktivnosti enzima telomeraze između pacijenata koji boluju od PTSP-a ( $3,94 \pm 0,038$ ; N = 30) i zdravih kontrola ( $3,39 \pm 0,261$ ; N = 17) ali starije osobe (N = 12), su imale drastično manju aktivnost telomeraze ( $1,25 \pm 0,115$ ) nego pacijenti s PTSP-om i zdrave kontrole.

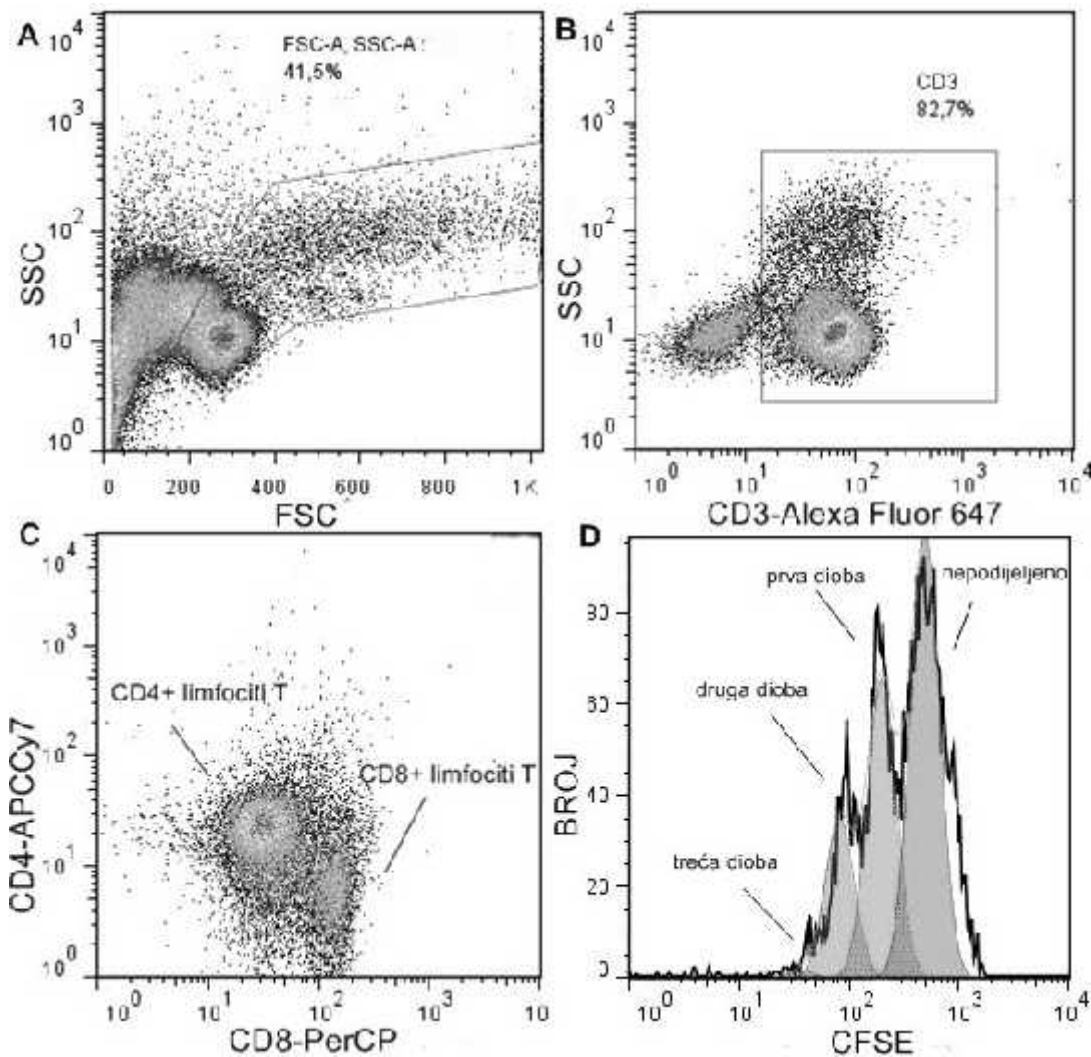


**Slika 6. Bazalna aktivnost telomeraze u perifernim mononuklearima.** Crni trokuti predstavljaju pojedinačne vrijednosti ispitanika dok su srednje vrijednosti skupina (procjena srednje vrijednosti populacije temeljena na 5000 *bootstrap*-uzoraka) označene vodoravnim linijama. Prikazane su Bonferronijevom metodom korigirane *p*-vrijednosti za pojedinačne *post-hoc* usporedbe.

### 5.3. Proliferacija T-limfocita

Strategija postavljanja elektronskih ograda za identifikaciju pomoćnih i citotoksičnih T-limfocita te mjerenje njihove proliferacije nakon stimulacije fitohemaglutininom prikazana je

na Slici 7.



**Slika 7. Primjer postavljanja elektronskih ograda za mjerenje proliferacije T-limfocita.**

**A)** Elektronska ograda postavljena oko populacije limfocita definiranih na temelju veličine (FSC) i zrnatosti (SSC) stanica; **B)** T-limfociti dalje su ograničeni na temelju izražaja biljega CD3; **C)** na dvoparametarskom dijagramu fluorescencije biljega CD4 i CD8 identificirani su i ograničeni pomoćni (CD4+) odnosno citotoksični (CD8+) T-limfociti; **D)** proliferacija je mjerena na temelju razrjeđivanja citoplazmatske boje CFSE gdje je ograda postavljena na temelju nestimulirane kontrole

Limfociti T identificirani su na temelju izraženosti koreceptora CD3 a pomoćni i citotoksični limfociti na temelju koreceptora CD4 odnosno CD8 te je mjerena proliferacija na temelju razrjeđivanja citoplazmatske boje CFSE čiji intenzitet postaje manji u svakoj slijedećoj generaciji stanica.

Kao što je prikazano u **Tablici 5**, postotak proliferirajućih pomoćnih i citotoksičnih T-limfocita nakon stimulacije mitogenom bio je značajno manji kod starijih osoba nego kod oboljelih od PTSP-a i zdravih kontrola, kod obje koncentracije PHA (1 i 10 µg/mL). Kod koncentracije PHA 10 µg/mL oboljeli od PTSP-a su pokazivali manju proliferaciju citotoksičnih T-limfocita (CD8+) ali ne i pomoćnih (CD4+) u usporedbi sa zdravim kontrolama. Nije bilo statistički značajne razlike u proliferaciji između oboljelih od PTSP-a i zdravih kontrola pri manjoj koncentraciji PHA od 1 µg/mL.

**Tablica 5. Proliferacija T-limfocita stimuliranih PHA-om.**

Varijabla	Pacijenti s PTSP-om (P) N=30	Zdrave kontrole (K) N=17	Starije osobe (S) N=15	Usporedba tri grupe <sup>a</sup>		Pojedinačne usporedbe p-vrijednosti <sup>b</sup>		
				d <sup>0,05</sup>	p	P:K	P:S	K:S
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (1 µg/ml PHA)	9,4 ± 1,11	14,0 ± 2,24	4,9 ± 0,96	0,017	<b>0,002</b>	0,132	0,051	<b>0,008</b>
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (1 µg/ml PHA)	11,5 ± 1,39	16,0 ± 2,03	3,9 ± 0,97	0,004	<b>&lt;0,001</b>	0,191	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (10 µg/ml PHA)	18,0 ± 2,70	25,8 ± 4,19	11,7 ± 2,50	0,025	<b>0,019</b>	0,315	0,372	<b>0,041</b>
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (10 µg/ml PHA)	16,2 ± 1,96	25,1 ± 2,85	7,7 ± 2,11	0,004	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,047</b>	<b>0,034</b>	<b>0,001</b>

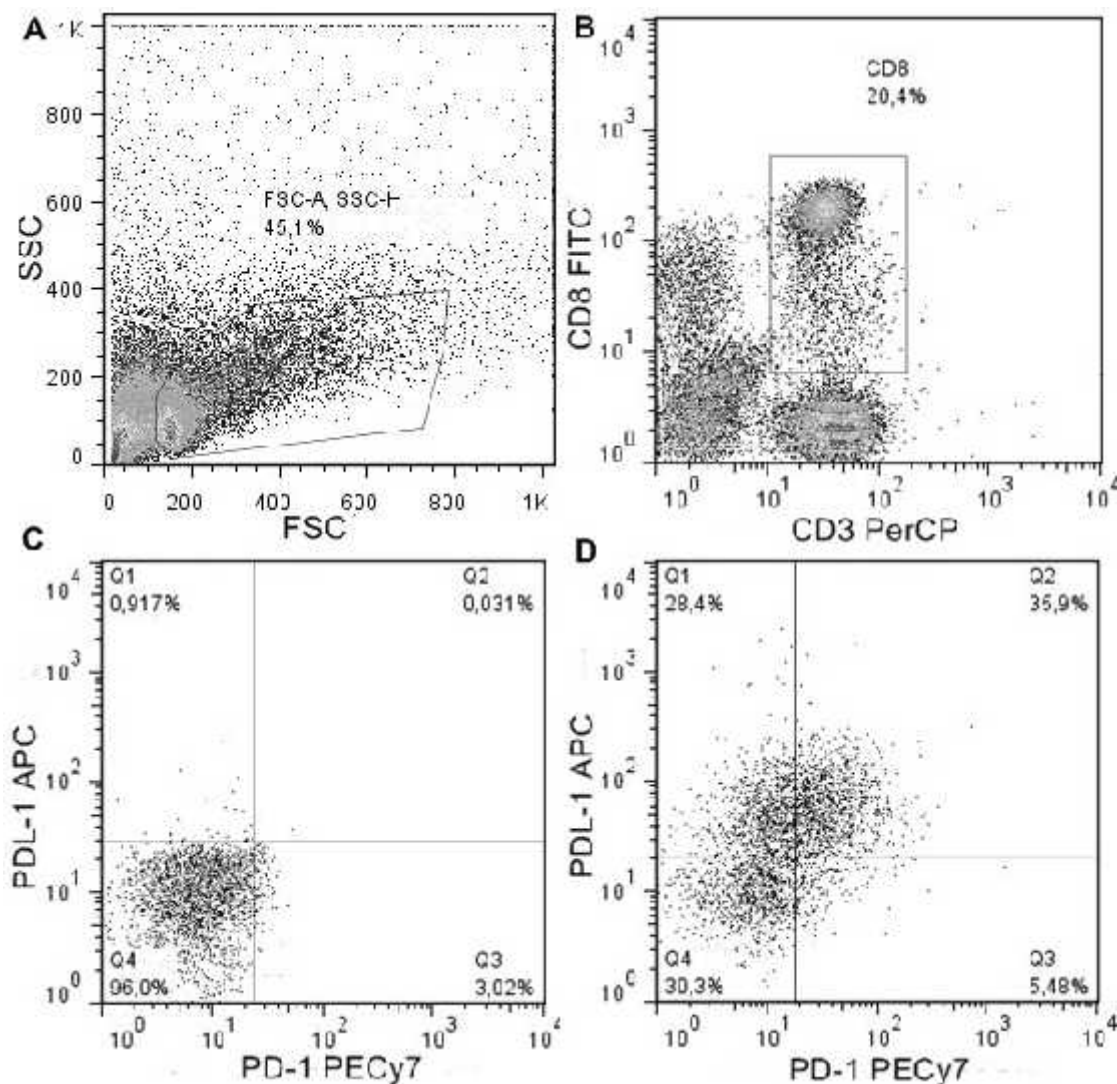
<sup>a</sup>Razlika se smatra značajnom na razini 0,05 ako je p-vrijednost niža od odgovarajuće d-vrijednosti izračunate FDR-metodom.

<sup>b</sup>p-vrijednosti za pojedinačne *post-hoc* usporedbe korigirane Bonferronijevom metodom.

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost postotka proliferirajućih stanica (procjena srednje vrijednosti populacije temeljena na 5000 *bootstrap*-uzoraka) ± standardna devijacija distribucije uzorkovanja (procjena standardne greške uzorka).

#### 5.4. Izraženost PD-1 i PD-L1 na aktiviranim T-limfocitima

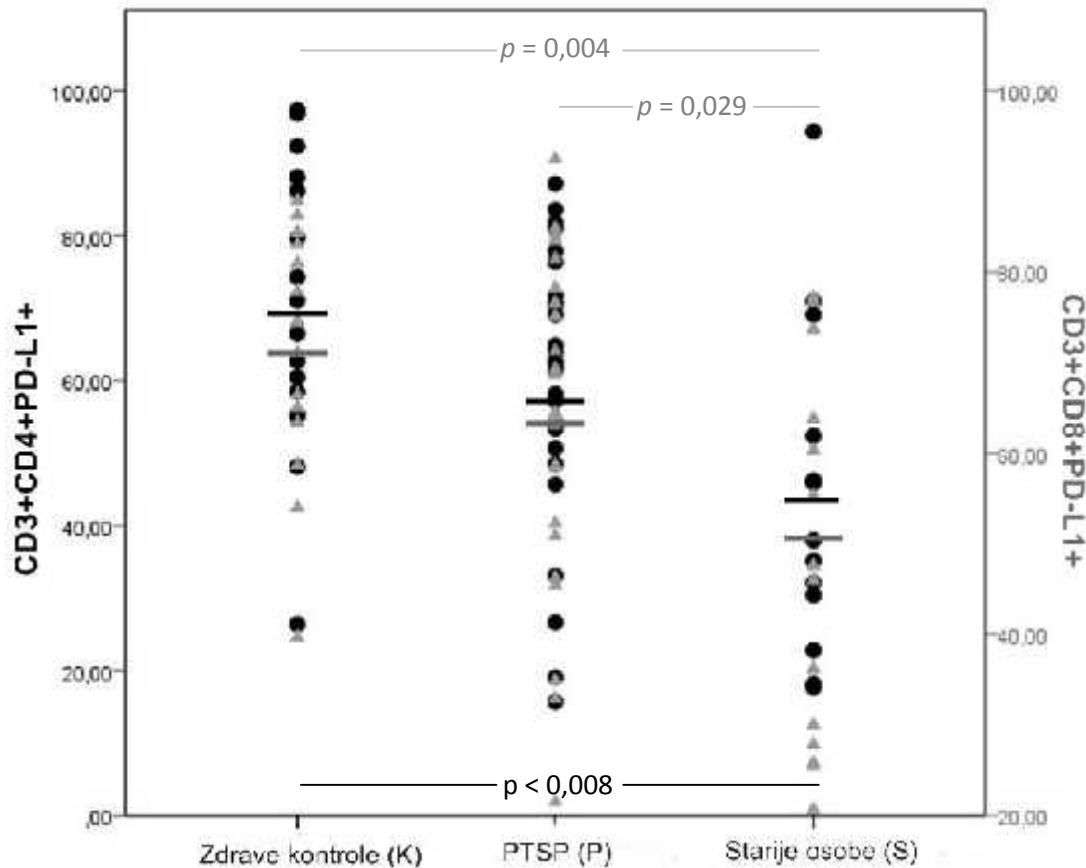
Strategija postavljanja elektronskih ograda za utvrđivanje broja pomoćnih i citotoksičnih T-limfocita te mjerenje površinske izraženosti negativnih regulatora imunološkog dogovora PD-1 i PD-L1, nakon stimulacije s PHA u koncentraciji 1 µg/mL prikazana je na **Slici 8**.



**Slika 8. Primjer postavljanja elektronskih ograda za mjerenje izraženosti PD-1 i PD-L1 na T-limfocitima.** **A)** Elektronska ograda postavljena oko populacije limfocita definiranih na temelju veličine (FSC) i zrnatosti (SSC) stanica; **B)** citotoksični T-limfociti dalje su ograničeni na temelju izraženosti biljega CD3 i CD8, isto je učinjeno i za pomoćne limfocite T (nije prikazano); **C)** na dvoparametarskom dijagramu fluorescencije biljega PD-1 i PD-L1 postavljene su elektronske razdjelnice (engl. *cursors*) na temelju nestimulirane kontrole; **D)** izraženost biljega na stanicama stimuliranim mitogenom.

Postotci aktiviranih T-limfocita koji izražavaju PD-L1 na svojoj površini prikazani su na **Slici 9**. Za obje subpopulacije T-limfocita *p*-vrijednosti usporedbe triju skupina niže su od vrijednosti praga FDR-metode izračunate na temelju ukupno 21 usporedbe s razinom značajnosti 0,05 (CD4:  $p = 0,002$ ,  $d = 0,019$ ; CD8:  $p < 0,001$ ,  $d = 0,14$ ) te se može zaključiti

da se skupine razlikuju s obzirom na izraženost PD-L1. Broj PD-L1+ pomoćnih i citotoksičnih limfocita T pokazivao je trend smanjenja od zdravih kontrola ka starijim osobama.



**Slika 9. Izraženost PD-L1 na aktiviranim T-limfocitima.**

Crni krugovi (CD4) i sivi trokuti (CD8) su pojedinačne vrijednosti ispitanika dok su srednje vrijednosti skupina (procjena srednje vrijednosti populacije temeljena na 5000 *bootstrap*-uzoraka) označene vodoravnim linijama odgovarajuće boje. Prikazane su Bonferronijevom metodom korigirane p-vrijednosti za značajne pojedinačne *post-hoc* usporedbe.

Zdrave kontrole imale su najveći broj T-limfocita koji su bili PD-L1+ (CD4: 70,0 ± 4,62; CD8: 71,4 ± 3,22; N = 16), oboljeli od PTSP-a nešto manje (CD4: 59,7 ± 3,53; CD8: 64,1 ± 3,26; N = 27) a starije osobe imale su najmanji postotak ovih stanica (CD4: 44,3 ± 5,63; CD8: 47,6 ± 5,33; N = 14). Kod pomoćnih T-limfocita, statistički značajna razlika u izraženosti PD-L1 dosegnuta je samo pri usporedbi starijih osoba i zdravih kontrola ( $p < 0,008$ ) dok se

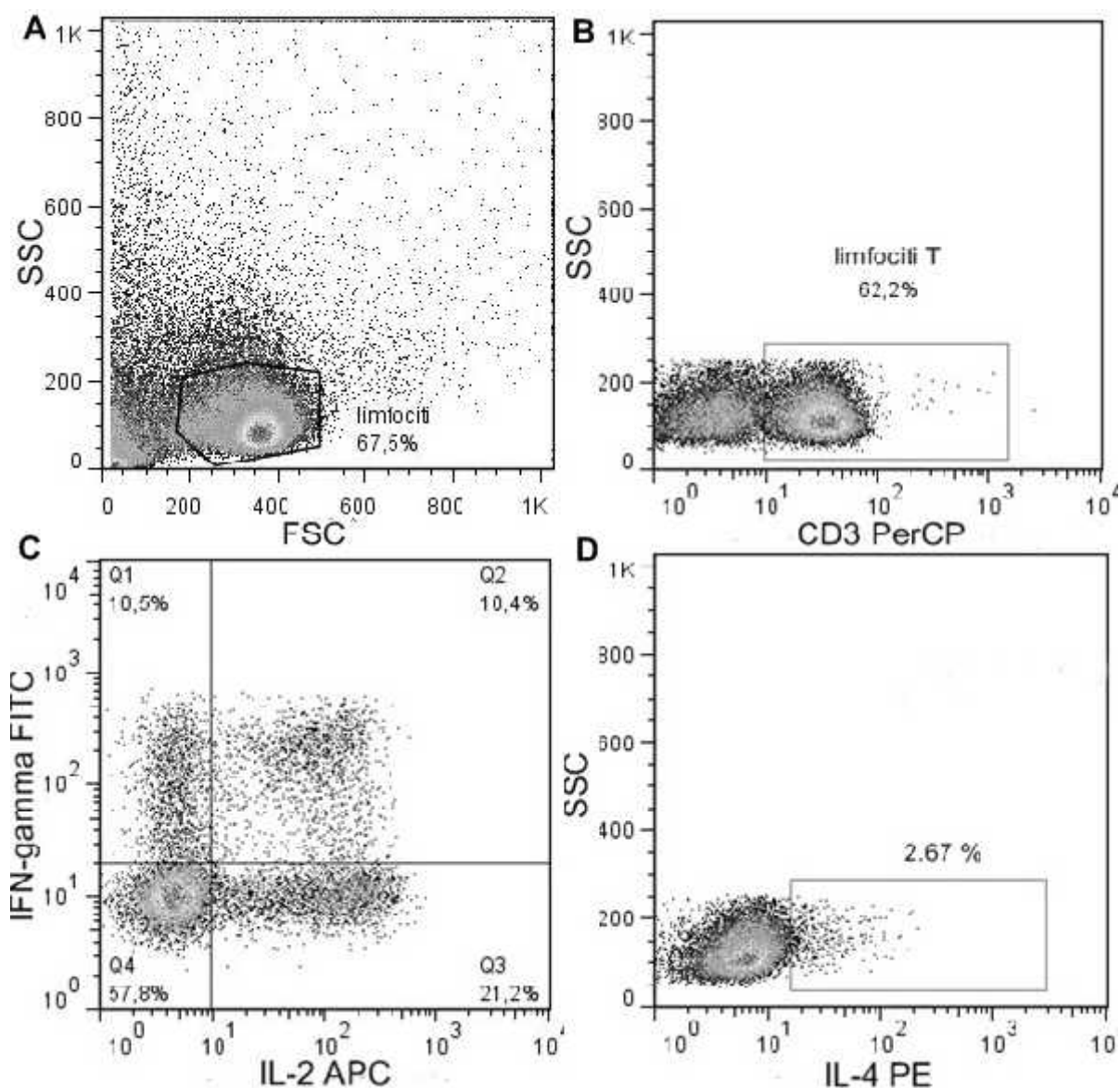
kod citotoksi nih T-limfocita izraženost PD-L1 starijih osoba razlikovala u odnosu na zdrave kontrole ( $p = 0,004$ ) i pacijente s PTSP-om ( $p = 0,029$ ) (vidi **Sliku 9**).

U slučaju izraženosti PD-1 na subpopulacijama T-limfocita, ona je po skupinama ispitanika iznosila kako slijedi: zdrave kontrole (CD4:  $34,9 \pm 3,41$ ; CD8:  $49,1 \pm 0,51$ ;  $N = 16$ ), PTSP-pacijenti (CD4:  $29,5 \pm 1,89$ ; CD8:  $50,2 \pm 0,86$ ;  $N = 27$ ), starije kontrole (CD4:  $25,3 \pm 3,02$ ; CD8:  $51,4 \pm 1,31$ ;  $N = 14$ ). Kod obje subpopulacije T-limfocita  $p$ -vrijednosti usporedbe triju skupina više su od vrijednosti praga FDR-metode izračunate na temelju ukupno 21 usporedbe s razinom značajnosti 0,05 (CD4:  $p = 0,051$ ,  $d = 0,036$ ; CD8:  $p = 0,232$ ,  $d = 0,043$ ) te se može zaključiti da se grupe ne razlikuju obzirom na izraženost PD-1 (nije prikazano grafički).



## 5.5. Proizvodnja citokina

Strategija postavljanja elektronskih ograda za utvrđivanje broja T-limfocita koji nakon stimulacije forbol miristat acetatom i ionomicinom proizvode citokine IL-2, IFN- $\gamma$  i IL-4 prikazana je na **Slici 10**.



**Slika 10. Primjer postavljanja elektronskih ograda za mjerenje proizvodnje citokina od strane T-limfocita.** **A)** Elektronska ograda postavljena oko populacije limfocita definiranih na temelju veličine (FSC) i zrnatosti (SSC) stanica; **B)** T-limfociti dalje su ograničeni na temelju izraženosti biljega CD3; **C)** na dvoparametarskom dijagramu fluorescencije IL-2 i IFN- $\gamma$  identificirani su T-limfociti koji proizvode jedan od ta dva citokina (Q1, Q3) ili oba

(Q2). Elektronski razdjelnici postavljeni su na temelju izotipskih kontrola; **D**) na dijagramu znatosti i fluorescencije IL-4, identificirani su T-limfociti koji proizvode citokin IL-4.

Proizvodnja citokina od strane, s PMA/ionomicinom stimuliranih i nestimuliranih, T-limfocita prikazana je u **Tablici 6**. U slučaju stimuliranih T-limfocita nije bilo razlike u proizvodnji Th1/Th2 citokina između skupina, iako je proizvodnja IL-2 u starijih osoba na rubu statističke značajnosti ( $p = 0,045$ ,  $d = 0,033$ ). Postotak stimuliranih T-limfocita koji istovremeno proizvode oba Th2 citokina (IFN- $\gamma$  i IL-2) također je jednoliko raspodijeljen među skupinama (zdrave kontrole:  $2,98 \pm 0,33$  %; pacijenti s PTSP-om:  $3,99 \pm 0,58$  %; starije osobe:  $2,82 \pm 0,47$  %; usporedba triju skupina:  $p = 0,182$ , FDR  $d = 0,041$ ; nije prikazano u Tablici). Spontana (nestimulirana) proizvodnja IFN- $\gamma$  i IL-2 je bila značajno manja kod pacijenata s PTSP-om nego u ostale dvije skupine (**Tablica 6**).

**Tablica 6. Proizvodnja citokina u limfocitima stimuliranim (s) i nestimuliranim (ns) s PMA/ionomicinom.**

Varijabla	Pacijenti s PTSP-om N=30	Zdrave kontrole N=17	Starije osobe N=15	Usporedba tri grupe <sup>a</sup>		Pojedinačne usporedbe p vrijednosti <sup>b</sup>		
				$d^{0,05}$	p	P:K	P:S	K:S
IFN- $\gamma$ (ns)	$0,29 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,05$	0,029	<b>0,020</b>	<b>0,010</b>	<b>0,002</b>	0,999
IL-4 (ns)	$0,39 \pm 0,04$	$0,65 \pm 0,09$	$0,50 \pm 0,05$	0,031	0,036			
IL-2 (ns)	$0,47 \pm 0,03$	$0,62 \pm 0,05$	$0,71 \pm 0,07$	0,021	<b>0,008</b>	<b>0,048</b>	<b>0,004</b>	0,595
IFN- $\gamma$ (s)	$13,1 \pm 1,19$	$16,0 \pm 1,60$	$16,7 \pm 1,82$	0,045	0,242			
IL-2 (s)	$17,6 \pm 2,15$	$21,0 \pm 1,98$	$12,5 \pm 2,33$	0,033	0,045			
IL-4 (s)	$2,13 \pm 0,17$	$2,16 \pm 0,23$	$2,48 \pm 2,26$	0,029	0,036			

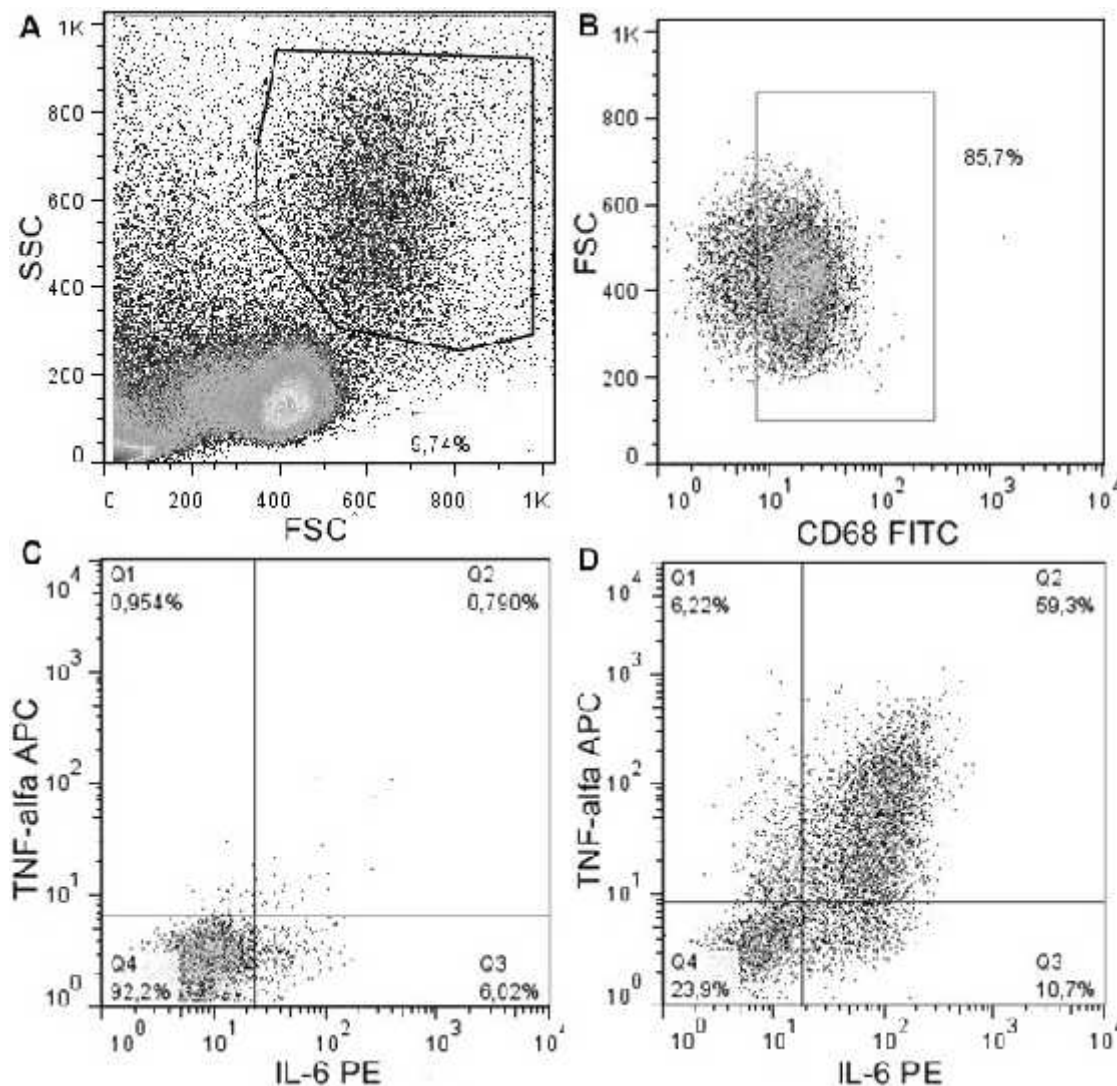
<sup>a</sup>Razlika se smatra značajnom na razini 0,05 ako je  $p$ -vrijednost niža od odgovarajuće  $d$ -vrijednosti izračunate FDR-metodom.

<sup>b</sup> $p$ -vrijednosti za pojedinačne *post-hoc* usporedbe korigirane Bonferronijevom metodom.

Rezultati su prikazani kao % T-limfocita koji proizvode Th1/Th2 citokine. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost (procjena srednje vrijednosti populacije temeljena na 5000 *bootstrap*-

uzoraka)  $\pm$  standardna devijacija distribucije uzorkovanja (procjena standardne greške uzorka).

Monociti su identificirani na temelju svoje veličine (FSC) i zrnatosti (SSC) te izraženosti biljega CD68, transmembranskog glikoproteina kojeg u velikoj mjeri izražavaju monociti i makrofagi (Holness & Simmons, 1993). Strategija postavljanja elektronskih ograda za utvrđivanje broja nestimuliranih i LPS-om stimuliranih monocita koji proizvode citokine IL-6 i TNF- $\alpha$ , prikazana je na **Slici 11**.



**Slika 11. Primjer postavljanja elektronskih ograda za mjerenje proizvodnje citokina od strane monocita.** **A)** Elektronska ograda postavljena oko populacije monocita definiranih na temelju veličine (FSC) i zrnatosti (SSC) stanica; **B)** monociti su dalje preciznije ograničeni na temelju izraženosti biljega CD68; **C)** na dvoparametarskom dijagramu fluorescencije IL-6 i TNF- $\alpha$  identificirani su nestimulirani monociti a **D)** monociti stimulirani LPS-om koji

proizvode jedan od ta dva citokina (Q1, Q3) ili oba (Q2). Elektronski razdjelnici postavljeni su na temelju izotipskih kontrola.

Kao ni u slučaju stimuliranih limfocita nije bilo razlike u proizvodnji citokina od strane LPS-om stimuliranih monocita između ispitanika s PTSP-om i zdravih kontrola, no starije osobe su pokazivale visoku spontanu proizvodnju proupalnih citokina IL-6 i TNF- $\alpha$  (Tablica 7).

**Tablica 7. Proizvodnja proupalnih citokina u monocitima stimuliranim (s) i nestimuliranim (ns) s LPS-om.**

Varijabla	Pacijenti s PTSP-om N=30	Zdrave kontrole N=17	Starije osobe N=15	Usporedba tri grupe <sup>a</sup>		Pojedina ne usporedbe p vrijednosti <sup>b</sup>		
				d <sup>0,05</sup>	p	P:K	P:SE	K:S
TNF- $\alpha$ (ns)	2,04 ± 0,24	2,74 ± 0,37	4,02 ± 0,37	0,025	<b>0,019</b>	0,132	0,051	<b>0,008</b>
IL-6 (ns)	3,02 ± 0,32	3,78 ± 0,34	8,80 ± 1,60	0,012	<b>&lt;0,001</b>	0,191	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>
TNF- $\alpha$ (s)	61,7 ± 3,64	72,1 ± 3,27	66,8 ± 5,27	0,048	0,267			
IL-6 (s)	52,7 ± 2,55	56,7 ± 2,28	61,2 ± 3,68	0,038	0,140			

<sup>a</sup>Razlika se smatra značajnom na razini 0,05 ako je *p*-vrijednost niža od odgovarajuće *d*-vrijednosti izračunate FDR-metodom.

<sup>b</sup>*p*-vrijednosti za pojedinačne *post-hoc* usporedbe korigirane Bonferronijevom metodom.

Rezultati su prikazani kao % monocita koji proizvode citokine IL-6 i TNF- $\alpha$ . Podaci su izraženi kao srednja vrijednost (procjena srednje vrijednosti populacije temeljena na 5000 *bootstrap*-uzoraka) ± standardna devijacija distribucije uzorkovanja (procjena standardne greške uzorka).

## 5.6. Korelacijske i regresijske analize

Duljina telomera, aktivnost telomeraze i sve imunološke varijable nisu korelirale sa psihometrijskim testovima BDI i STAI, kao ni sa intenzitetom pojedina nih skupina simptoma PTSP-a procijenjenim strukturiranim psihijatrijskim intervjuom (CAPS). Nije bilo statistički značajne korelacije između duljine telomera pacijenata s PTSP-om te imunoloških varijabli, dok je aktivnost telomeraze oboljelih od PTSP-a negativno korelirala s proizvodnjom IFN- $\gamma$  (Spearmanov  $r = -0,47, p = 0,018$ ) što je otkriveno obzirom na raniji nalaz kako signalizacija IFN- $\gamma$  negativno regulira aktivnost telomeraze (S.-H. Lee et al., 2005). Iznenadujuće, dob nije korelirala sa duljinom telomera unutar pojedina nih skupina (Spearmanova korelacija, zdrave kontrole:  $r = -0,23, p = 0,376, N = 17$ ; pacijenti s PTSP-om:  $r = -0,31, p = 0,104, N = 28$ ; starije osobe:  $r = 0,01, p = 0,961, N = 14$ ) vjerojatno zato što su ispitanici unutar skupina bili podjednake dobi. Obzirom da pušenje može utjecati na duljinu telomera (Valdes i sur. 2005), ispitano je da li postoji razlika između pušača i nepušača u duljini telomera. Sadašnji pušači unutar PTSP-grupe ( $N = 15$ ) imali su kraću duljinu telomera [medijan (interkvartilni raspon): 0,80 (0,65 - 0,96)] nego nepušači ( $N = 12$ ) [0,95 (0,85 - 1,03)] (Mann Whitney  $U = 41, p = 0,017$ ). Tijekom daljnjih analiza pronađeno je da su PTSP-pacijenti koji su uzimali stabilizatore raspoloženja također imali kraće telomere [0,64 (0,56 - 0,92) vs. 0,91 (0,80 - 1,00); Mann Whitney  $U = 24,5, p = 0,020$ ]. Kako bi se dalje utvrdilo u kakvoj mjeri pušenje i povezanost duljine telomera s karakteristikama oboljelih od PTSP-a, korištenim lijekovima, komorbiditetima i rezultatima psihometrijskih testova, izvršena je regresijska analiza. Kontinuirani prediktori bili su dob, indeks tjelesne mase, psihometrijski testovi CAPS; BDI i STAI koji su svi bili normalno distribuirani; dihotomni prediktori bili su pušenje, konzumacija alkohola, lijekovi i komorbiditeti. Vrijednosti koje su nedostajale zamijenjene su srednjim vrijednostima grupe. Statistički značajan model [ $F(2,27) = 7,364, p = 0,003, R^2 = 0,305$ ] je sadržavao stabilizatore raspoloženja ( $\beta = -0,377, p = 0,029$ ) i pušenje ( $\beta = -0,358, p = 0,037$ ) kao značajne prediktore duljine telomera. U daljnjoj analizi isključeno je 7 pacijenata koji su uzimali stabilizatore raspoloženja, te je duljina telomera preostalih PTSP-pacijenata ( $N = 21$ ) uspoređena sa duljinom telomera zdravih kontrola ( $N = 17$ ) koristeći kovarijantnu analizu s dobi i pušenjem kao kovarijancama. Razlika u duljini telomera između PTSP-pacijenata i zdravih kontrola i dalje je bila statistički značajna [ $F(1,34) = 8,070, p = 0,008$ ].

## 6. RASPRAVA

Na temelju opisanih rezultata proizlazi da sredovje ni ratni veterani oboljeli od PTSP-a imaju kra e telomere u mononuklearnim stanicama iz periferne krvi od dobno podudarnih zdravih kontrola (**Slika 5**). Od raznih mjera imunoreaktivnosti ispitanih u ovom istraživanju, oboljeli od PTSP-a pokazivali su smanjenu spontanu produkciju citokina IFN- i IL-2 i smanjeni proliferativni odgovor citotoksi nih T-limfocita pri visokoj koncentraciji mitogena.

Sli no ovom istraživanju skra ivanje telomera u leukocitima civila oboljelih od PTSP-a prona eno je u nekoliko nedavnih istraživanja (Shalev i sur. 2014). U istraživanju O'Donovana i suradnika, skra ivanje telomera u leukocitima oboljelih od PTSP-a bilo je povezano sa doživljenom traumom u djetinjstvu (O'Donovan i sur. 2011). Populacijsko istraživanje provedeno na 3 000 ispitanika pokazalo je da je skra ivanje telomera u leukocitima povezano prvenstveno s PTSP-om a ne depresijom (Ladwig i sur. 2013). U proteklom desetlje u dokumentirano je skra ivanje telomera u leukocitima ili mononuklearnim stanicama iz periferne krvi oboljelih od raznih psihijatrijskih poreme aja te u raznim modelima kroni nog stresa (Simon i sur. 2006; O'Donovan i sur. 2009; Shalev i sur. 2013; Zhang i sur. 2013; Shalev i sur. 2014). U skladu s time skra ivanje telomera u leukocitima smatra se biološkim pokazateljem raznih mentalnih oboljenja i poreme aja povezanih s psihološkom traumom i kroni nim stresom (Wolkowitz i sur. 2010; Shalev i sur. 2013) te je bilo o ekivano da i naša skupina ratnih veterana oboljelih od PTSP-a ima kra e telomere od dobno podudarnih kontrola.

Postoji više na ina na koje bi neurološke i endokrine promjene u PTSP-u mogle utjecati na duljinu telomera. Enzim telomeraza produžuje telomere dodaju i ponavljaju e sekvence na njihove krajeve i *in vitro* istraživanja su pokazala da je aktivnost tog enzima smanjena u T-limfocitima izloženim djelovanju kortizola (Choi i sur. 2009). No mjerenja aktivnosti telomeraze u ljudskim modelima kroni nog stresa dala su opre ne rezultate; postoje izvještaji pove ane bazalne aktivnosti telomeraze u kroni nom stresu (Damjanovic i sur. 2007) kao i snižene aktivnosti (Epel i sur. 2004). U našem uzorku nije bilo razlike u bazalnoj aktivnosti telomeraze izme u oboljelih od PTSP-a i zdravih kontrola (**Slika 6**), no budu i da je aktivnost telomeraze dinami na i brzo se mijenja s promjenama u okolišu poput akutnog stresa (Epel i

sur. 2010) ona je manje informativna mjera od duljine telomera koja odražava replikativnu povijest stanice (Lin i Yan 2005).

Još jedan čimbenik koji bi mogao značajno pridonijeti skraćivanju telomera je oksidativni stres obzirom da kronični psihološki stres potiče oksidativnu štetu kroz trajnu aktivaciju osovine HHN (Aschbacher i sur. 2013). Tijekom starenja ljudskog organizma oksidativni je stres posljedica nakupljanja reaktivnih vrsta kisika poput superoksida (Fulle i sur. 2004; Campisi i d'Adda di Fagagna 2007). Oksidativni stres tako ubrzava skraćivanje telomera (Kawanishi i Oikawa 2004) slično kao i drugi genotoksični stresori poput ultraljubičastog zračenja i nedostatka zaštitnih proteina, šelterina (Hockemeyer i sur. 2008). Mjere oksidativnog stresa su bile povećane tijekom progresije PTSP-a u modelu na glodavcima (Wilson i sur. 2013). No ispitivanja biljega oksidativnog stresa vršena kod ljudi oboljelih od PTSP-a dala su oprečne rezultate (Tezcan i sur. 2003; Ceprnja i sur. 2011) te uloga oksidativnog stresa u skraćivanju telomera u PTSP-u nije sasvim jasna.

Još jedna mogućnost je da pojačana upalna aktivnost za koju se smatra da se odvija u PTSP-u (Gill i sur. 2009) može povećati replikaciju stanica i tako pridonijeti skraćivanju telomera (Allsopp i sur. 1995). No nismo naišli na povećanu proizvodnju proupalnih citokina IL-6 i TNF- $\alpha$  u monocitima ispitanika s PTSP-om u odnosu na zdrave kontrole (**Tablica 7**). Zanimljivo je da je pojačano umnažanje stanica, uslijed kojeg dolazi do skraćivanja telomera tijekom starenja, posredovano klonalnom ekspanzijom i krajnjom diferencijacijom klonova T-limfocita specifičnih za viruse u čestale u ljudskoj populaciji poput CMV-a i EBV-a (Pawelec i sur. 2009; Simpson 2011). Izvan dosega ovog istraživanja je bilo provjeriti seropozitivnost ispitanika na CMV i EBV, kao i zastupljenost T-limfocita s TCR-om specifičnim za antigene ovih virusa. Nemoguće je da neurološke i endokrine promjene u PTSP-u pospješuju klonalnu ekspanziju tih specifičnih T-limfocita i njihovo nakupljanje u perifernoj krvi, što bi također uzrokovalo smanjenje prosječne duljine telomera mononuklearnih stanica iz periferne krvi. Nemoguće se isključiti ni mogućnost da su ratni veterani oboljeli od PTSP-a iskusili više antigenskog stresa tijekom vojne službe, što bi također povećalo replikaciju stanica (Mueller i Ahmed 2009).

Na duljinu telomera mogu utjecati razni biološki i bihevioralni čimbenici: nasljednost (Prescott i sur. 2011), dob (von Zglinicki i Martin-Ruiz 2005), spol (Barrett i Richardson 2011), pušenje (Valdes i sur. 2005), pretilost (Lee i sur. 2011), tjelesna aktivnost (Savela i sur. 2013), konzumacija alkohola (Pavanello i sur. 2012), infekcije (Ilmonen i sur. 2008) i razne

kronične bolesti (Fitzpatrick i sur. 2007, Hohensinner i sur. 2011; Xie i sur. 2013). Kao i u svim drugim istraživanjima, bilo je nemoguće kontrolirati sve ove čimbenike, no oboljeli od PTSP-a i zdrave kontrole nisu se razlikovali po dobi, spolu, indeksu tjelesne mase, pušenju i uestalosti tjelesne aktivnosti (**Tablica 1**). Svi spomenuti čimbenici uzeti su u obzir u regresijskom modelu koji je pokazao da je unutar skupine oboljelih od PTSP-a, skraćena duljina telomera bila povezana sa pušenjem i uzimanjem stabilizatora raspoloženja. No izvršena je i analiza sa isključenim ispitanicima koji su uzimali stabilizatore raspoloženja, ali duljina telomera je i dalje bila kraća u odnosu na zdrave kontrole. Komorbidni poremećaji nisu bili povezani sa duljinom telomera i nije bilo korelacije između intenziteta PTSP-simptoma, tjeskobe i simptoma depresije s duljinom telomera. Ranije je pokazano da biološke promjene u ratnih veterana mogu biti povezane s traumom neovisno o samoj dijagnozi PTSP-a (de Kloet i sur. 2007). Stoga je moguće da je izmjereno skraćivanje telomera posljedica same traume a ne PTSP-a. Uključenje ratnih veterana bez dijagnoze PTSP-a razjasnilo bi da li je skraćivanje telomera povezano s traumom prije nego li PTSP-om, no iz tehničkih razloga to nije bilo moguće u ovom istraživanju. Uz to, pokazano je i da trauma iz djetinjstva može biti povezana s duljinom telomera (O'Donovan i sur. 2011), no to nije bilo moguće ispitati u ovom istraživanju.

Kao ni mehanizmi koji dovode do skraćivanja telomera, tako ni funkcionalne posljedice tog skraćivanja nisu sasvim jasne. Stoga su u ovom istraživanju ispitane stanične funkcije mononuklearnih stanica iz periferne krvi i njihova povezanost sa skraćivanjem telomera. Rezultati upućuju na to da skraćivanje telomera u oboljelih od PTSP-a nije povezano s velikim promjenama imunoreaktivnosti, obzirom da su jedine razlike u odnosu na zdrave kontrole bile smanjena proliferacija CD8<sup>+</sup> T-limfocita pri koncentraciji PHA 10 µg/mL i smanjena nestimulirana proizvodnja citokina tipa Th1 IL-2 i IFN- $\gamma$ . Prijašnja istraživanja pokazala su supresiju proizvodnje citokina tipa Th1 u poremećajima kroničnog stresa (Elenkov 2004; Hou i sur. 2013) ali podaci na PTSP-u u ljudi su oprečni. Smanjene koncentracije IL-2 u serumu pronađene su u žrtava potresa (s PTSP-om i bez njega) (Song i sur. 2007) dok je veća koncentracija IFN- $\gamma$  pronađena u supernatantima stimuliranih staničnih kultura leukocita zlostavljenih žena i žena s trenutnim PTSP-om (Woods i sur. 2005). Suprotno tome, smanjena proizvodnja IFN- $\gamma$  i citokina tipa Th2 IL-4 pronađena je kod muškaraca koji su u prošlosti imali PTSP (Kawamura i sur. 2001). Ključna prednost ovog istraživanja je što je mjerena mogućnost stanica da proizvode citokine protokimnometrijom, s unutarstaničnim obilježavanjem. Većina prijašnjih istraživanja koja su se



bavila proizvodnjom citokina kod oboljelih od PTSP-a provedena je na uzorcima seruma i plazme ili supernatantima stanih kultura. Iste se ne može razlučiti doprinos proizvodnji citokina od strane različitih tipova stanica.

Povećana proizvodnja proupalnog citokina IL-6 povezana je sa starenjem posredovanim oštećenjima DNA keratinocita, melanocita, monocita i fibroblasta u ljudi (Coppé i sur. 2010). Stoga je pomalo iznenađujuće da u ovom istraživanju PTSP-ispitanici sa skraćenim telomerama nisu pokazivali povećanu proizvodnju proupalnih citokina. Obzirom da je većina istraživanja koja pokazuju povećanje proupalnih citokina u oboljelih od PTSP-a provedena na uzorcima seruma ili plazme (Baker i sur. 2012), naši podaci ukazuju da bi druge stanice osim PBMC-a mogle značajno pridonositi povećanoj koncentraciji proupalnih citokina u cirkulaciji. Osobito su fibroblasti podložni starosnoj transformaciji u proupalne stanice, stanje poznato kao sekrecijski fenotip povezan sa senescencijom (Coppé i sur. 2010).

U ovom istraživanju, oboljeli od PTSP-a pokazivali su trend ka smanjenom izražaju PD-L1 na površini aktiviranih T-limfocita; razlika u odnosu na zdrave kontrole bila je malo iznad prag značajnosti ( $p = 0,08$ ). Ovaj trend bi trebao biti dalje istražen na većem uzorku, obzirom da je interakcija PD-1 i PD-L1 vrlo važna za negativnu regulaciju imunoloških odgovora i ima veliku kliničku značajnost u autoimunosti (Mozaffarian i sur. 2008) i tumorskim bolestima (Velcheti i sur. 2014). Samo jedno prijašnje istraživanje ispitalo je imunološke funkcije povezane sa skraćivanjem telomera u PBMC-ima u ljudskom modelu kroničnog stresa (Damjanovic i sur. 2007), gdje je utvrđena smanjena proliferacija T-limfocita i povećana proizvodnja imunoregulacijskih citokina (TNF- $\alpha$  i IL-10) u osoba pod kroničnim stresom. To istraživanje provedeno je na grupi skrbnika pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti s prosječnom dobi od 65 godina što bi mogao biti razlog zašto su promjene u mjerama imunoreaktivnosti bile izraženije nego kod naših veterana s PTSP-om koji su bili mlađi (prosječna dob 45,9 godina). Genetska istraživanja na miševima pokazale su da je kritično kratka duljina telomera, a ne njihova prosječna duljina, povezana sa starosnim degenerativnim defektima (Hemann i sur. 2001; Armanios i sur. 2009). Stoga, čini se da telomere u većini PBMC-a ispitanika s PTSP-om nisu dosegle kritično kratku duljinu pri kojoj bi promjene u imunoreaktivnosti bile izraženije. To bi mogao biti i razlog zašto nije bilo statistički značajne korelacije između duljine telomera i mjera imunološke aktivnosti unutar PTSP-grupe. Osim toga, sustav održavanja telomera nije jedini mehanizam koji može utjecati na starenje stanica i proces imunosenescencije. Imunosenescencija je složen proces koji nije u potpunosti

razriješen ali poznato je da na proces imunosenescencije može utjecati i niz drugih genetskih i okolišnih čimbenika (Su i sur. 2013).

Skupina starijih osoba u ovom je istraživanju pokazivala povećanu spontanu proizvodnju citokina IL-6, TNF- $\alpha$  i IL-2 u odnosu na ispitanike s PTSP-om a isto su imali kraće telomere i slabiju aktivnost telomeraze od ostale dvije grupe. Ti su rezultati podudarni s nalazima drugih autora (Weng 2008; Ershler i Keller 2000; Hohensinner i sur. 2011). Usporedba grupe starijih osoba sa zdravim kontrolama otkrila je nekoliko zanimljivih razlika. Prema mojim saznanjima ovo je prvi izvještaj dobno ovisne smanjene izraženosti molekule PD-L1 na aktiviranim T-limfocitima. Obzirom da je međudjelovanje PD-1 i PD-L1 vrlo važno za negativnu regulaciju imunoloških odgovora, smanjena izraženost PD-liganda mogla bi igrati ulogu u povećanoj pojavnosti autoimunosti i tumorskih bolesti kod starijih osoba (Vadasz i sur. 2013). Zanimljivo je i da iako je broj stanica koje proizvode IL-2 bio značajno smanjen, broj vrlo važnih polifunkcionalnih T-limfocita (Ciuffreda i sur. 2008; Qiu i sur. 2012) koji simultano proizvode IFN- $\gamma$  i IL-2 je, čini se, dobro očuvan kod starijih osoba.

Jedno od ograničenja ovog istraživanja je činjenica da se skupina starijih osoba sastojala uglavnom od žena. Vjeruje se da žene imaju duže telomere od muškaraca iste dobi, iako su rezultati različitih istraživanja po tom pitanju oprečni (Gardner i sur. 2014). Dakle, može se pretpostaviti da bi izmjerene razlike između starijih osoba i zdravih kontrola bile još izraženije da su starije osobe bile pretežito muškog spola. Skupina starijih osoba uključena je kao biološka kontrola za ostarjeli imunološki sustav, stoga nisu podvrgnuti psihijatrijskom ispitivanju i nema podataka o njihovim traumatskim iskustvima i možebitnim psihičkim poremećajima. Jedini kriterij uključena u studiju bio je nedostatak autoimunih i tumorskih bolesti. Razni lijekovi koje su mogle uzimati osobe iz te grupe mogli su utjecati na razne mjerene imunološke varijable, no imunološki profil starijih osoba u ovom istraživanju bio je u skladu s očekivanjima prema prijašnjoj literaturi (Franceschi i sur. 2007). Dob veća od 80 godina odabrana je zato da bi imunosenescentni profil bio jasno vidljiv.

Još jedan nedostatak studije je to što je većina ispitanika oboljelih od PTSP-a bila pod farmakoterapijom koja nije mogla biti prekinuta iz etičkih razloga. Neki od lijekova koje su uzimali mogu imati imunomodulatorne učinke. *In vitro* izlaganje T-limfocita selektivnim inhibitorima ponovne pohrane serotonina, koje je uzimala većina oboljelih od PTSP-a, može smanjiti njihov proliferativni odgovor na stimulaciju mitogenom (Taler i sur. 2007; Fazzino i sur. 2008; Taler i sur. 2008). Iako *in vivo* učinci ovih lijekova na proizvodnju citokina kod

ljudi nisu sasvim jasni, može se pretpostaviti da bi razlike imunoloških varijabli između PTSP-ispitanika i zdravih kontrola bile veće i da PTSP-ispitanici nisu bili pod farmakoterapijom, te bi farmakoterapija mogla biti jedan od razloga zašto u ovoj grupi nije zabilježena povećana proizvodnja proupalnih citokina. Manje je vjerojatno da je farmakoterapija utjecala na duljinu telomera što su pokazale i korelacijske i regresijske analize.

## 7. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje imalo je dva glavna gledišta: prvo je izmjerena duljina telomera i aktivnost enzima telomeraze mononuklearnih stanica iz periferne krvi u tri skupine ispitanika: oboljelih od posttraumatskog stresnog poremećaja, dobno podudarnih zdravih kontrola i skupine ispitanika starijih od 80 godina; drugo, kod istih ispitanika izmjerene su funkcionalne osobine mononuklearnih stanica iz periferne krvi (proliferacija i proizvodnja citokina) te je ispitana njihova povezanost sa duljinom telomera i aktivnosti enzima telomeraze. S obzirom da su oboljeli od PTSP-a imali kraću duljinu telomera od dobno podudarnih zdravih kontrola, ovo istraživanje pridonosi rastućem broju dokaza da psihološka trauma i kronični stres mogu imati nepovoljan učinak na sustav održavanja telomera. Mehanizmi kojima kronični stres dovodi do skraćivanja telomera nisu jasni te je malo podataka o funkcionalnim posljedicama tog skraćivanja. Ovo istraživanje ukazuje na to da je skraćivanje telomera u mononuklearnim stanicama iz periferne krvi sredovječnih osoba oboljelih od PTSP-a, povezano s promjenama u imunoaktivnosti tih stanica koje nisu toliko izražene kao kod starijih osoba, ali bi mogle pridonositi zdravstvenim rizicima povezanim s PTSP-om. Potrebna su daljnja prospektivna istraživanja kako bi se razjasnila dinamika skraćivanja telomera u PTSP-u kao i funkcionalne posljedice tog skraćivanja.

## 8. ŽIVOTOPIS

Mladen Jergović rođen je 19. 10. 1981. g. u Slavanskom Brodu, gdje završava osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Od 2000 g. pohađava studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Studij završava 25. 1. 2008. g. s diplomskim radom na temu "Utjecaj nikotina na strukturu lipoproteina visoke gustoće" i prosječnom ocjenom studija 4,24. Nakon završetka studija volontira u laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju instituta Ruđer Bošković. Od 11. mjeseca 2008. zaposlen je kao znanstveni novak na Imunološkom zavodu u sklopu projekta "Psihološki faktori u modulaciji imunoreaktivnosti" pod vodstvom dr. sc. Ante Sabioncella. Od 1. 9. 2013. zaposlenik je Centra za prijenos znanja i istraživanje u biotehnologiji, Sveučilišta u Zagrebu. Trenutačno je suradnik na znanstvenom projektu „Genomics and molecular epidemiology of human paramyxoviruses in Croatia“ pod voditeljstvom dr. sc. Dubravka Forića.

### Znanstveni radovi:

**Jergović, M., Tomićević, M., Vidović, A., Bendelja, K., Savić, A., Vojvoda, V., ... Sabioncello, A.** (2014). Telomere shortening and immune activity in war veterans with posttraumatic stress disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 54C, 275–283.

**Jergović, M., Bendelja, K., Vidović, A., Savić, A., Vojvoda, V., Aberle, N., ... Sabioncello, A.** (2014). Patients with posttraumatic stress disorder exhibit an altered phenotype of regulatory T cells. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 10(1), 43.

Vojvoda, V., Savić Mlakar, A., **Jergović, M.**, Kukuruzović, M., Markovinović, L., Aberle, N., ... Bendelja, K. (2014). The increased type-1 and type-2 chemokine levels in children with acute RSV infection alter the development of adaptive immune responses. *BioMed Research International*, 750521.

## 9. LITERATURA

- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., & Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International Immunology*, 8(5), 765–72.
- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Kim, J. H. (2011). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey, *119*(3), 651–665.
- Ahmed, a. S. (2007). Post-traumatic stress disorder, resilience and vulnerability. *Advances in Psychiatric Treatment*, 13(5), 369–375.
- Akbar, A. N., & Fletcher, J. M. (2005). Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Current Opinion in Immunology*, 17(5), 480–485.
- Allsopp, R. C., Chang, E., Kashefi-Aazam, M., Rogaev, E. I., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., & Harley, C. B. (1995). Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Experimental Cell Research*, 220(1), 194–200.
- American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.), American Psychiatric Publishing, Arlington
- Arias-Carrión, O., & Poppel, E. (2007). Dopamine, learning, and reward-seeking behavior. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 67(4), 481–488.
- Armanios, M., Alder, J. K., Parry, E. M., Karim, B., Strong, M. a, & Greider, C. W. (2009). Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *American Journal of Human Genetics*, 85(6), 823–832.
- Aschbacher, K., O'Donovan, A., Wolkowitz, O. M., Dhabhar, F. S., Su, Y., & Epel, E. (2013). Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9), 1698–1708.

- Baker, D. G., Nievergelt, C. M., & O'Connor, D. T. (2012). Biomarkers of PTSD: neuropeptides and immune signaling. *Neuropharmacology*, *62*(2), 663–673.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., & Gutierrez, E. G. (1994). Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neuroscience Letters*, *179*(1-2), 53–56.
- Barrett, D. H., Doebbeling, C. C., Schwartz, D. A., Voelker, M. D., Falter, K. H., Woolson, R. F., & Doebbeling, B. N. (2002). Posttraumatic Stress Disorder and Self-Reported Physical Health Status Among U.S. Military Personnel Serving During the Gulf War Period: A Population-Based Study. *Psychosomatics*, *43*(3), 195–205.
- Barrett, E. L. B., & Richardson, D. S. (2011). Sex differences in telomeres and lifespan. *Aging Cell*, *10*(6), 913–921.
- Bauer, M. E. (2005). Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress*, *8*(1), 69–83.
- Beadling, C., & Smith, K. A. (2002). DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes. *Medical Immunology*, *1*(1), 2.
- Beck, A. T., Steer, R. A., & Carbin, M. G. (1988). Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: Twenty-five years of evaluation. *Clinical Psychology Review*, *8*(1), 77–100.
- Berger, W., Mendlowicz, M. V, Marques-Portella, C., Kinrys, G., Fontenelle, L. F., Marmar, C. R., & Figueira, I. (2009). Pharmacologic alternatives to antidepressants in posttraumatic stress disorder: a systematic review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *33*(2), 169–180.
- Bernardes de Jesus, B., Schneeberger, K., Vera, E., Tejera, A., Harley, C. B., & Blasco, M. a. (2011). The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. *Aging Cell*, *10*(4), 604–621.
- Besedovsky, H. O., & del Rey, A. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, *17*(1), 64–102.
- Blackburn, E. H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, *106*(6), 661–673.

- Blake, D. D., Weathers, F. W., Nagy, L. M., Kaloupek, D. G., Gusman, F. D., Charney, D. S., & Keane, T. M. (1995). The development of a Clinician-Administered PTSD Scale. *Journal of Traumatic Stress, 8*(1), 75–90.
- Blalock, J. E. (2005). The immune system as the sixth sense. *Journal of Internal Medicine, 257*(2), 126–138.
- Blalock, J. E., & Smith, E. M. (2007). Conceptual development of the immune system as a sixth sense. *Brain, Behavior, and Immunity, 21*(1), 23–33.
- Blotta, M. H., DeKruyff, R. H., & Umetsu, D. T. (1997). Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *Journal of Immunology, 158*(12), 5589–5595.
- Bodnar, A. G. (1998). Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science, 279*(5349), 349–352.
- Boscarino, J. A. (2004). Posttraumatic stress disorder and physical illness: results from clinical and epidemiologic studies. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1032*, 141–153.
- Boscarino, J. A. (2008a). A prospective study of PTSD and early-age heart disease mortality among Vietnam veterans: implications for surveillance and prevention. *Psychosomatic Medicine, 70*(6), 668–676.
- Boscarino, J. A. (2008b). Psychobiologic predictors of disease mortality after psychological trauma: implications for research and clinical surveillance. *The Journal of Nervous and Mental Disease, 196*(2), 100–107.
- Bosch, J. A., Fischer, J. E., & Fischer, J. C. (2009). Psychologically adverse work conditions are associated with CD8+ T cell differentiation indicative of immunosenescence. *Brain, Behavior, and Immunity, 23*(4), 527–534.
- Boyman, O., & Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews. Immunology, 12*(3), 180–190.



- Brady, K. T. (1997). Posttraumatic stress disorder and comorbidity: recognizing the many faces of PTSD. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 58 Suppl 9, 12–15.
- Brandt, C., & Pedersen, B. K. (2010). The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 520258.
- Brunner, S., Herndler-Brandstetter, D., Weinberger, B., & Grubeck-Loebenstien, B. (2011). Persistent viral infections and immune aging. *Ageing Research Reviews*, 10(3), 362–9.
- Butts, C. L., & Sternberg, E. M. (n.d.). Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. *Cellular Immunology*, 252(1-2), 7–15.
- Calcagni, E., & Elenkov, I. (2006). Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1069, 62–76.
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual Review of Physiology*, 75, 685–705.
- Campisi, J., & d’Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740.
- Canela, A., Vera, E., Klatt, P., & Blasco, M. a. (2007). High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5300–5305.
- Carrasco, G. a, & Van de Kar, L. D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 235–272.
- Carter, L., Fouser, L. A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C. R., ... Carreno, B. M. (2002). PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *European Journal of Immunology*, 32(3), 634–643.
- Cawthon, R. M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(10), e47.

- Cawthon, R. M. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*, 37(3), e21.
- Cawthon, R. M., Smith, K. R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., & Kerber, R. A. (2003). Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *The Lancet*, 361(9355), 393–395.
- Cepnija, M., Derek, L., Uni, A., Blazev, M., Fistonj, M., Kozari-Kovaci, D., ... Romi, Z. (2011). Oxidative stress markers in patients with post-traumatic stress disorder. *Collegium Antropologicum*, 35(4), 1155–60.
- Chan, S. R. W. L., & Blackburn, E. H. (2004). Telomeres and telomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 359(1441), 109–121. 0
- Chang, M. Y., Chan, C. K., Braun, K. R., Green, P. S., O'Brien, K. D., Chait, A., ... Wight, T. N. (2012). Monocyte-to-macrophage differentiation: synthesis and secretion of a complex extracellular matrix. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 14122–14135.
- Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*, 67, 259–284.
- Choi, J., Fauce, S. R., & Effros, R. B. (2009). Reduced telomerase activity in human T lymphocytes exposed to cortisol. *Brain, Behavior, and Immunity* 22(4), 600–605.
- Chrousos, G. P. (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 332(20), 1351–1362.
- Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 267(9), 1244–52.
- Ciuffreda, D., Comte, D., Cavassini, M., Giostra, E., Bühler, L., Perruchoud, M., ... Dutoit, V. (2008). Polyfunctional HCV-specific T-cell responses are associated with effective control of HCV replication. *European Journal of Immunology*, 38(10), 2665–2677.

- Collado, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 130(2), 223–233.
- Cooper, J., Carty, J., & Creamer, M. (2005). Pharmacotherapy for posttraumatic stress disorder: empirical review and clinical recommendations. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 39(8), 674–682.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology*, 5, 99–118.
- Counter, C. M., Avilion, a a, LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., & Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO Journal*, 11(5), 1921–1929.
- Damjanovic, A. K., Yang, Y., Glaser, R., Kiecolt-glaser, J. K., Nguyen, H., Laskowski, B., ... Weng, N. (2007). Accelerated Telomere Erosion Is Associated with a Declining Immune Function of Caregivers of Alzheimer's Disease Patients *Journal of Immunology*, 179(6): 4249–4254
- Daruna, J. H. (2012). Introduction to Psychoneuroimmunology (2nd ed.), Academic Press, Waltham
- De Kloet, C. S., Vermetten, E., Bikker, A., Meulman, E., Geuze, E., Kavelaars, A., ... Heijnen, C. J. (2007). Leukocyte glucocorticoid receptor expression and immunoregulation in veterans with and without post-traumatic stress disorder. *Molecular Psychiatry*, 12(5), 443–453.
- De Metz, J., Sprangers, F., Endert, E., Ackermans, M. T., ten Berge, I. J., Sauerwein, H. P., & Romijn, J. A. (1999). Interferon-gamma has immunomodulatory effects with minor endocrine and metabolic effects in humans. *Journal of Applied Physiology*, 86(2), 517–522.

- DeKruyff, R. H., Fang, Y., & Umetsu, D. T. (1998). Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4<sup>+</sup> lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *Journal of Immunology*, *160*(5), 2231–2237.
- Dhabhar, F. S. (2008). Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function□: Implications for Immunoprotection versus, *4*(1), 2–11.
- Dhabhar, F. S., & McEwen, B. S. (1996). Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *Journal of Immunology*, *156*(7), 2608–2615.
- Dhabhar, F. S., & McEwen, B. S. (1997). Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain, Behavior, and Immunity*, *11*(4), 286–306.
- Dhabhar, F. S., Miller, A. H., McEwen, B. S., & Spencer, R. L. (1995). Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *Journal of Immunology*, *154*(10), 5511–5527.
- Dhabhar, F. S., Satoskar, A. R., Bluethmann, H., David, J. R., & McEwen, B. S. (2000). Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for gamma interferon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(6), 2846–2851.
- Dhabhar, F. S., & Viswanathan, K. (2005). Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *289*(3), 738–744.
- Drosopoulos, W. C., Drenzo, R., & Prasad, V. R. (2005). Human telomerase RNA template sequence is a determinant of telomere repeat extension rate. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(38), 32801–32810.
- Elenkov, I. J. (2004). Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1024*, 138–146.

- Elenkov, I. J., & Chrousos, G. P. (1999). Stress Hormones, Th1/Th2 Patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends in endocrinology and metabolism*, 10(9), 359-368.
- Elenkov, I. J., & Chrousos, G. P. (2002). Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966, 290–303.
- Epel, E. S., Blackburn, E. H., Lin, J., Dhabhar, F. S., Adler, N. E., Morrow, J. D., & Cawthon, R. M. (2004). Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17312–5.
- Epel, E. S., Lin, J., Dhabhar, F. S., Wolkowitz, O. M., Puterman, E., Karan, L., & Blackburn, E. H. (2010). Dynamics of telomerase activity in response to acute psychological stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(4), 531–539.
- Ershler, W. B., & Keller, E. T. (2000). Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annual Review of Medicine*, 51, 245–270.
- Fantuzzi, G., Di Santo, E., Sacco, S., Benigni, F., & Ghezzi, P. (1995). Role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the regulation of TNF production in mice. Effect of stress and inhibition of endogenous glucocorticoids. *Journal of Immunology*, 155(7), 3552–5.
- Fazzino, F., Montes, C., Urbina, M., Carreira, I., & Lima, L. (2008). Serotonin transporter is differentially localized in subpopulations of lymphocytes of major depression patients. Effect of fluoxetine on proliferation. *Journal of Neuroimmunology*, 196(1-2), 173–80.
- Fitzpatrick, A. L., Kronmal, R. a, Gardner, J. P., Psaty, B. M., Jenny, N. S., Tracy, R. P., ... Aviv, A. (2007). Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *American Journal of Epidemiology*, 165(1), 14–21.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(4), 330–336.

- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, 244–254.
- Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., ... Salvioli, S. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(1), 92–105.
- Franceschi, C., Valensin, S., Fagnoni, F., Barbi, C., & Bonafè, M. (1999). Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Experimental Gerontology*, 34(8), 911–921.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., ... Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1027–1034.
- Fu, D., & Collins, K. (2007). Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation. *Molecular Cell*, 28(5), 773–785.
- Fujisawa, H., Wang, B., Sauder, D. N., & Kondo, S. (1997). Effects of interferons on the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human keratinocytes. *Journal of Interferon & Cytokine Research*: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 17(6), 347–353.
- Fukaura, H., Kent, S. C., Pietruszewicz, M. J., Khoury, S. J., Weiner, H. L., & Hafler, D. A. (1996). Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(1), 70–77.
- Fulle, S., Protasi, F., Di Tano, G., Pietrangelo, T., Beltramin, A., Boncompagni, S., ... Fanò, G. (2004). The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Experimental Gerontology*, 39(1), 17–24.

- Gardner, M., Bann, D., Wiley, L., Cooper, R., Hardy, R., Nitsch, D., ... Ben-Shlomo, Y. (2014). Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Experimental Gerontology*, *51*, 15–27.
- Gill, J. M., Saligan, L., Woods, S., & Page, G. (2009). PTSD is associated with an excess of inflammatory immune activities. *Perspectives in Psychiatric Care*, *45*(4), 262–277.
- Giuseppe Paolisso, V. B. (2013). Malleability of Short Telomeres by Telomerase Activators: A Mini-review. *Journal of Aging Science*, *01*(02), 1–2.
- Gold, P. W., Goodwin, F. K., & Chrousos, G. P. (1988). Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (2). *The New England Journal of Medicine*, *319*(7), 413–420.
- Gomez, D. E., Armando, R. G., Farina, H. G., Menna, P. L., Cerrudo, C. S., Ghiringhelli, P. D., & Alonso, D. F. (2012). Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *International Journal of Oncology*, *41*(5), 1561–1569.
- Gray, T. S. (1993). Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *697*, 53–60.
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, *43*(2 Pt 1), 405–413.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, a, Moss, H., & de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, *97*(4), 503–514.
- Grosberg, J. (2014). Introduction to Resampling Statistics Using Statistics101. Available at: [www.statistics101.net](http://www.statistics101.net)
- Han, S., Yang, K., Ozen, Z., Peng, W., Marinova, E., Kelsoe, G., & Zheng, B. (2003). Enhanced differentiation of splenic plasma cells but diminished long-lived high-affinity bone marrow plasma cells in aged mice. *Journal of Immunology*, *170*(3), 1267–1273.
- Harley, C. B., Liu, W., Flom, P. L., & Raffaele, J. M. (2013). A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program: metabolic and cardiovascular response. *Rejuvenation Research*, *16*(5), 386–395.

- Haskó, G., Szabó, C., Németh, Z. H., Salzman, A. L., & Vizi, E. S. (1998). Stimulation of beta-adrenoceptors inhibits endotoxin-induced IL-12 production in normal and IL-10 deficient mice. *Journal of Neuroimmunology*, 88(1-2), 57–61.
- Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2009). Neurobiology of posttraumatic stress disorder. *CNS Spectrums*, 14(1 Suppl 1), 13–24.
- Hemann, M. T., Strong, M. a, Hao, L. Y., & Greider, C. W. (2001). The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*, 107(1), 67–77.
- Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular Cell*, 14(4), 501–513.
- Hockemeyer, D., Palm, W., Wang, R. C., Couto, S. S., & de Lange, T. (2008). Engineered telomere degradation models dyskeratosis congenita. *Genes & Development*, 22(13), 1773–1785.
- Hoge, E. A., Brandstetter, K., Moshier, S., Pollack, M. H., Wong, K. K., & Simon, N. M. (2009). Broad spectrum of cytokine abnormalities in panic disorder and posttraumatic stress disorder. *Depression and Anxiety*, 26(5), 447–455.
- Hohensinner, P. J., Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2011). Telomere dysfunction, autoimmunity and aging. *Aging and Disease*, 2(6), 524–537.
- Holness, C. L., & Simmons, D. L. (1993). Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*, 81(6), 1607–1613.
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5609), 1057–1061.
- Hou, N., Zhang, X., Zhao, L., Zhao, X., Li, Z., Song, T., & Huang, C. (2013). A novel chronic stress-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(4), 471–476.



- Huda, N., Tanaka, H., Herbert, B.-S., Reed, T., & Gilley, D. (2007). Shared environmental factors associated with telomere length maintenance in elderly male twins. *Aging Cell*, 6(5), 709–713.
- Ilmonen, P., Kotrschal, A., & Penn, D. J. (2008). Telomere attrition due to infection. *PloS One*, 3(5), e2143.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal*, 11(11), 3887–3895.
- Julian, L. J. (2011). Measures of anxiety: State-Trait Anxiety Inventory (STAI), Beck Anxiety Inventory (BAI), and Hospital Anxiety and Depression Scale-Anxiety (HADS-A). *Arthritis Care & Research*, 63 Suppl 1(S11), S467–472.
- Jutel, M., & Akdis, C. a. (2011). T-cell subset regulation in atopy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 11(2), 139–145.
- Kawamura, N., Kim, Y., & Asukai, N. (2001). Suppression of cellular immunity in men with a past history of posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 158(3), 484–486.
- Kawanishi, S., & Oikawa, S. (2004). Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019, 278–284.
- Kelly, P. A., Binart, N., Freemark, M., Lucas, B., Goffin, V., & Bouchard, B. (2001). Prolactin receptor signal transduction pathways and actions determined in prolactin receptor knockout mice. *Biochemical Society Transactions*, 29(2), 48.
- Kessler, R.C., Sonnega, A., Bromet, E., Hughes, M., Nelson, C.B. (1995) Posttraumatic stress disorder in the national comorbidity survey. *Archives of General Psychiatry*, 52(12), 1048–1060.
- Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., & Walters, E. E. (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*, 62(6), 593–602.

- Kimura, M., Hjelmborg, J. V. B., Gardner, J. P., Bathum, L., Brimacombe, M., Lu, X., ... Christensen, K. (2008). Telomere length and mortality: a study of leukocytes in elderly Danish twins. *American Journal of Epidemiology*, *167*(7), 799–806.
- Kindt, J. T., Osborne, B. A., Goldsby, R. A., (2006). *Kuby Immunology* 6th ed., Freeman, W. H. & Company, London
- Koenen, K. C., Stellman, S. D., Sommer, J. F., & Stellman, J. M. (2008). Persisting posttraumatic stress disorder symptoms and their relationship to functioning in Vietnam veterans: a 14-year follow-up. *Journal of Traumatic Stress*, *21*(1), 49–57.
- Kozari -Kovaci , D., & Boroveckii, A. (2005). Prevalence of psychotic comorbidity in combat-related post-traumatic stress disorder. *Military Medicine*, *170*(3), 223–6.
- Kozari -Kova i , D., Kova i , Z., & Rukavina, L. (2007.). Posttraumatski stresni poreme aj. *Medix*, *71*, 102–106.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & Development*, *24*(22), 2463–2479.
- LaCroix, A. Z., Lipson, S., Miles, T. P., & White, L. (n.d.). Prospective study of pneumonia hospitalizations and mortality of U.S. older people: the role of chronic conditions, health behaviors, and nutritional status. *Public Health Reports*, *104*(4), 350–360.
- Ladwig, K.-H., Brockhaus, A. C., Baumert, J., Lukaschek, K., Emeny, R. T., Kruse, J., ... Peters, A. (2013). Posttraumatic stress disorder and not depression is associated with shorter leukocyte telomere length: findings from 3,000 participants in the population-based KORA F4 study. *PloS One*, *8*(7), e64762.
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., ... Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, *2*(3), 261–268.
- Lazarus, R. S. (1993). From psychological stress to the emotions: a history of changing outlooks. *Annual Review of Psychology*, *44*, 1–21.

- Lee, M., Martin, H., Firpo, M. A., & Demerath, E. W. (n.d.). Inverse association between adiposity and telomere length: The Fels Longitudinal Study. *American Journal of Human Biology*: *The Official Journal of the Human Biology Council*, 23(1), 100–106.
- Lee, S.-H., Kim, J.-W., Oh, S.-H., Kim, Y.-J., Rho, S.-B., Park, K., ... Lee, J.-H. (2005). IFN- $\gamma$ /IRF-1-induced p27kip1 down-regulates telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase expression in human cervical cancer. *FEBS Letters*, 579(5), 1027–1033.
- Lin, K.-W., & Yan, J. (2005). The telomere length dynamic and methods of its assessment. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(4), 977–989.
- Linton, P. J., & Dorshkind, K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nature Immunology*, 5(2), 133–139.
- Livesey, J. H., Evans, M. J., Mulligan, R., & Donald, R. A. (2000). Interactions of CRH, AVP and cortisol in the secretion of ACTH from perfused equine anterior pituitary cells: “permissive” roles for cortisol and CRH. *Endocrine Research*, 26(3), 445–463.
- Long, S. A., & Buckner, J. H. (2011). CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *Journal of Immunology*, 187(5), 2061–2066.
- Madrigal, J. L. M., Hurtado, O., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Castrillo, A., ... Leza, J. C. (2002). The increase in TNF- $\alpha$  levels is implicated in NF- $\kappa$ B activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharmacology*, 26(2), 155–63.
- Majzoub, J. A. (2006). Corticotropin-releasing hormone physiology. *European Journal of Endocrinology*, 155(suppl\_1), S71–S76. doi:10.1530/eje.1.02247
- Malek, T. R. (2008). The biology of interleukin-2. *Annual Review of Immunology*, 26, 453–479.
- McEwen, B. S. (1998). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840, 33–44.

- Meewisse, M.-L., Reitsma, J. B., de Vries, G. J., Gersons, B. P. R., & Olf, M. (2007). Cortisol and post-traumatic stress disorder in adults: systematic review and meta-analysis. *The British Journal of Psychiatry*: *The Journal of Mental Science*, *191*, 387–392.
- Miller, G. E., Chen, E., & Zhou, E. S. (2007). If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychological Bulletin*, *133*(1), 25–45.
- Miller, R. J., Sutherland, A. G., Hutchison, J. D., & Alexander, D. A. (2001). C-reactive protein and interleukin 6 receptor in post-traumatic stress disorder: a pilot study. *Cytokine*, *13*(4), 253–235.
- Mitchell, J. R., Wood, E., & Collins, K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, *402*(6761), 551–555.
- Mozaffarian, N., Wiedeman, a E., & Stevens, a M. (2008). Active systemic lupus erythematosus is associated with failure of antigen-presenting cells to express programmed death ligand-1. *Rheumatology (Oxford, England)*, *47*(9), 1335–1341.
- Mueller, S. N., & Ahmed, R. (2009). High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(21), 8623–8628.
- Murphy, K., (2012). Janeway's Immunobiology 8th ed., Garland Science, New York
- Nakamura, A., Johns, E. J., Imaizumi, A., Abe, T., & Kohsaka, T. (1998). Regulation of tumour necrosis factor and interleukin-6 gene transcription by beta2-adrenoceptor in the rat astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, *88*(1-2), 144–153.
- Nandakumar, J., & Cech, T. R. (2013). Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *14*(2), 69–82.
- Nikolich-Zugich, J. (2008). Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nature Reviews. Immunology*, *8*(7), 512–522.

- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., & Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, *11*(2), 141–151.
- Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., ... Honjo, T. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*, *291*(5502), 319–322.
- O'Donovan, A., Lin, J., Tillie, J., Tillie, J. M., Dhabhar, F. S., Wolkowitz, O. M., ... Epel, E. (2009). Pessimism correlates with leukocyte telomere shortness and elevated interleukin-6 in post-menopausal women. *Brain, Behavior, and Immunity*, *23*(4), 446–449.  
doi:10.1016/j.bbi.2008.11.006
- O'Donovan, A., Epel, E., Lin, J., Wolkowitz, O., Cohen, B., Maguen, S., ... Neylan, T. C. (2011). Childhood trauma associated with short leukocyte telomere length in posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*, *70*(5), 465–471.
- O'Sullivan, R. J., & Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(3), 171–181.
- Ogami, M., Ikura, Y., Ohsawa, M., Matsuo, T., Kayo, S., Yoshimi, N., ... Ueda, M. (2004). Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(3), 546–550.
- Ohki, R., Tsurimoto, T., & Ishikawa, F. (2001). In vitro reconstitution of the end replication problem. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(17), 5753–5766.
- Oldenburg, M., Krüger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., ... Kirschning, C. J. (2012). TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science*, *337*(6098), 1111–1115.
- Olsson, J., Wikby, A., Johansson, B., Löfgren, S., Nilsson, B.-O., & Ferguson, F. G. (2001). Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. *Mechanisms of Ageing and Development*, *121*(1-3), 187–201.

- Pace, T. W. W., & Heim, C. M. (2011). A short review on the psychoneuroimmunology of posttraumatic stress disorder: from risk factors to medical comorbidities. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(1), 6–13.
- Panda, A., Arjona, A., Sapey, E., Bai, F., Fikrig, E., Montgomery, R. R., ... Shaw, A. C. (2009). Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends in Immunology*, 30(7), 325–333.
- Panina-Bordignon, P., Mazzeo, D., Lucia, P. D., D'Ambrosio, D., Lang, R., Fabbri, L., ... Sinigaglia, F. (1997). Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(6), 1513–1519.
- Pavanello, S., Hoxha, M., Dioni, L., Bertazzi, P. A., Snenghi, R., Nalesso, A., ... Baccarelli, A. (2012). Shortened telomeres in individuals with abuse in alcohol consumption. *International Journal of Cancer* . 129(4), 983–992.
- Pawelec, G. (2006). Immunity and ageing in man. *Experimental Gerontology*, 41(12), 1239–1242.
- Pawelec, G., Derhovanessian, E., Larbi, A., Strindhall, J., & Wikby, A. (2009). Cytomegalovirus and human immunosenescence. *Reviews in Medical Virology*, 19(1), 47–56.
- Pei, Y., Smith, A. K., Wang, Y., Pan, Y., Yang, J., Chen, Q., ... Ma, X. (2012). The brain-derived neurotrophic-factor (BDNF) val66met polymorphism is associated with geriatric depression: a meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics*, 159B(5), 560–566.
- Perkonig, A., Kessler, R. C., Storz, S., & Wittchen, H.-U. (2000). Traumatic events and post-traumatic stress disorder in the community: prevalence, risk factors and comorbidity. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 101(1), 46–59.
- Pinke, K. H., Calzavara, B., Faria, P. F., do Nascimento, M. P. P., Venturini, J., & Lara, V. S. (2013). Proinflammatory profile of in vitro monocytes in the ageing is affected by lymphocytes presence. *Immunity & Ageing*, 10(1), 22.
- Plohl, M., Prats, E., Martinez-Lage, A., Gonzalez-Tizon, A., Mendez, J., & Cornudella, L. (2002). Telomeric localization of the vertebrate-type hexamer repeat, (TTAGGG)<sub>n</sub>, in

- the wedgeshell clam *Donax trunculus* and other marine invertebrate genomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19839–19846.
- Prescott, J., Kraft, P., Chasman, D. I., Savage, S. a, Mirabello, L., Berndt, S. I., ... De Vivo, I. (2011). Genome-wide association study of relative telomere length. *PloS One*, 6(5), e19635.
- Morgan, G., (2013). Telomerase Regulation and the Intimate Relationship with Aging. *Research and reports in Biochemistry* 3:71–78.
- Qiu, Z., Zhang, M., Zhu, Y., Zheng, F., Lu, P., Liu, H., ... Chen, X. (2012). Multifunctional CD4 T cell responses in patients with active tuberculosis. *Scientific Reports*, 2, 216.
- Qureshi, S., Pyne, J., Magruder, K., Schulz, P., & Kunik, M. (2009). The Link Between Post-traumatic Stress Disorder and Physical Comorbidities: A Systematic Review. *Psychiatric Quarterly*, 80(2), 87–97.
- Raison, C. L., & Miller, A. H. (2003). When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *The American Journal of Psychiatry*, 160(9), 1554–1565.
- Ramírez, F., Fowell, D. J., Puklavec, M., Simmonds, S., & Mason, D. (1996). Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *Journal of Immunology*, 156(7), 2406–2412.
- Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M., & Muller, W. A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*, 11(6), 753–61.
- Rohleder, N., Joksimovic, L., Wolf, J. M., & Kirschbaum, C. (2004). Hypocortisolism and increased glucocorticoid sensitivity of pro-Inflammatory cytokine production in Bosnian war refugees with posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*, 55(7), 745–751.
- Saint-Mezard, P., Chavagnac, C., Bosset, S., Ionescu, M., Peyron, E., Kaiserlian, D., ... Bérard, F. (2003). Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. *Journal of Immunology*, 171(8), 4073–80.

- Sanchez, P. L., Morinigo, J. L., Pabon, P., Martin, F., Piedra, I., Palacios, I. F., & Martin-Luengo, C. (2004). Prognostic relations between inflammatory markers and mortality in diabetic patients with non-ST elevation acute coronary syndrome. *Heart (British Cardiac Society)*, *90*(3), 264–269.
- Sanders, V. M., Baker, R. A., Ramer-Quinn, D. S., Kasprovicz, D. J., Fuchs, B. A., & Street, N. E. (1997). Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. *Journal of Immunology*, *158*(9), 4200–10.
- Sauce, D., Larsen, M., Fastenackels, S., Duperrier, A., Keller, M., Grubeck-Loebenstien, B., ... Appay, V. (2009). Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(10), 3070–8.
- Savela, S., Saijonmaa, O., Strandberg, T. E., Koistinen, P., Strandberg, A. Y., Tilvis, R. S., ... Fyhrquist, F. (2013). Physical activity in midlife and telomere length measured in old age. *Experimental Gerontology*, *48*(1), 81–84.
- Schoenborn, J. R., & Wilson, C. B. (2007). Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in Immunology*, *96*, 41–101.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, *138*(3479), 32–32.
- Selye, H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *6*(2), 117–230.
- Shalev, I., Entringer, S., Wadhwa, P. D., Wolkowitz, O. M., Puterman, E., Lin, J., & Epel, E. S. (2013). Stress and telomere biology: a lifespan perspective. *Psychoneuroendocrinology*, *38*(9), 1835–1842.
- Shalev, I., Moffitt, T. E., Braithwaite, a W., Danese, a, Fleming, N. I., Goldman-Mellor, S., ... Caspi, a. (2014). Internalizing disorders and leukocyte telomere erosion: a prospective study of depression, generalized anxiety disorder and post-traumatic stress disorder. *Molecular Psychiatry*, 1–8.



- Shalev, I., Moffitt, T. E., Sugden, K., Williams, B., Houts, R. M., Danese, A., ... Caspi, A. (2013). Exposure to violence during childhood is associated with telomere erosion from 5 to 10 years of age: a longitudinal study. *Molecular Psychiatry*, 18(5), 576–581.
- Sharma, R. P., Tun, N., & Grayson, D. R. (n.d.). Depolarization induces downregulation of DNMT1 and DNMT3a in primary cortical cultures. *Epigenetics*: Official Journal of the DNA Methylation Society, 3(2), 74–80.
- Shi, Z., Cai, Z., Sanchez, A., Zhang, T., Wen, S., Wang, J., ... Zhang, D. (2011). A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4517–4524.
- Simon, N. M., McNamara, K., Chow, C. W., Maser, R. S., Papakostas, G. I., Pollack, M. H., ... Wong, K. K. (2008). A detailed examination of cytokine abnormalities in Major Depressive Disorder. *European Neuropsychopharmacology*: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology, 18(3), 230–233.
- Simon, N. M., Smoller, J. W., McNamara, K. L., Maser, R. S., Zalta, A. K., Pollack, M. H., ... Wong, K.-K. (2006). Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biological Psychiatry*, 60(5), 432–435.
- Simpson, R. J. (2011). Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: can exercise “make space”? *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 39(1), 23–33.
- Smith, D. F., & Toft, D. O. (1993). Steroid receptors and their associated proteins. *Molecular Endocrinology*, 7(1), 4–11.
- Smith, S. E. P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., & Patterson, P. H. (2007). Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *The Journal of Neuroscience*: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 27(40), 10695–10702.
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress, *Dialogues in Clinical Neurosciences*, 8(4), 383–395.

- Sokol, C. L., Barton, G. M., Farr, A. G., & Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature Immunology*, 9(3), 310–318.
- Song, Y., Zhou, D., Guan, Z., & Wang, X. (2007). Disturbance of serum interleukin-2 and interleukin-8 levels in posttraumatic and non-posttraumatic stress disorder earthquake survivors in northern China. *Neuroimmunomodulation*, 14(5), 248–254.
- Stein, D. J. & Seedat, S. (2009). Pharmacotherapy for post traumatic stress disorder. The Cochrane Library, John Wiley & Sons Ltd., Hoboken
- Steinke, J. W., & Borish, L. (2001). Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory Research*, 2(2), 66–70.
- Sterclova, M., Matej, R., Mandakova, P., Skibova, J., & Vasakova, M. (2013). Role of interleukin 4 and its receptor in clinical presentation of chronic extrinsic allergic alveolitis: a pilot study. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 8(1), 35.
- Stern, J. B., & Smith, K. A. (1986). Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression. *Science (New York, N.Y.)*, 233(4760), 203–206.
- Sternberg, E. M. (2001). Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *The Journal of Endocrinology*, 169(3), 429–435.
- Straub, R. H., & Cutolo, M. (2001). Involvement of the hypothalamic--pituitary--adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis and Rheumatism*, 44(3), 493–507.
- Su, D.M., Aw, D., & Palmer, D. B. (2013). Immunosenescence: a product of the environment? *Current Opinion in Immunology*, 25(4), 498–503.
- Sundin, J., Fear, N. T., Iversen, a, Rona, R. J., & Wessely, S. (2010). PTSD after deployment to Iraq: conflicting rates, conflicting claims. *Psychological Medicine*, 40(3), 367–382.

- Taler, M., Bar, M., Korob, I., Lomnitski, L., Baharav, E., Grunbaum-Novak, N., ... Gil-Ad, I. (2008). Evidence for an inhibitory immunomodulatory effect of selected antidepressants on rat splenocytes: possible relevance to depression and hyperactive-immune disorders. *International Immunopharmacology*, 8(4), 526–533.
- Taler, M., Gil-Ad, I., Lomnitski, L., Korov, I., Baharav, E., Bar, M., ... Weizman, A. (2007). Immunomodulatory effect of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on human T lymphocyte function and gene expression. *European Neuropsychopharmacology*: *The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 17(12), 774–780.
- Taylor, P. A., Lees, C. J., Fournier, S., Allison, J. P., Sharpe, a. H., & Blazar, B. R. (2003). B7 Expression on T Cells Down-Regulates Immune Responses through CTLA-4 Ligation via R-T Interactions. *The Journal of Immunology*, 172(1), 34–39.
- Tezcan, E., Atmaca, M., Kuloglu, M., & Ustundag, B. (2003). Free radicals in patients with post-traumatic stress disorder. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 253(2), 89–91.
- Thomson, A. W. and Lotze, M. T. (2003). *The Cytokine Handbook, Fourth Edition, Two Volume Set*, Academic Press, Waltham
- Thornton, A. M., Donovan, E. E., Piccirillo, C. A., & Shevach, E. M. (2004). Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Journal of Immunology*, 172(11), 6519–6523.
- Thornton, A. M., & Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(2), 287–296.
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (1994). Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 23(3), 451–466.
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53(4), 865–871.

- Tsigos, C., Papanicolaou, D. A., Defensor, R., Mitsiadis, C. S., Kyrou, I., & Chrousos, G. P. (1997). Dose effects of recombinant human interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. *Neuroendocrinology*, *66*(1), 54–62.
- Vadasz, Z., Haj, T., Kessel, A., & Toubi, E. (2013). Age-related autoimmunity. *BMC Medicine*, *11*(1), 94.
- Valdes, A. M., Andrew, T., Gardner, J. P., Kimura, M., Oelsner, E., Cherkas, L. F., ... Spector, T. D. (n.d.). Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet*, *366*(9486), 662–664.
- Van der Poll, T., & Lowry, S. F. (1997). Epinephrine inhibits endotoxin-induced IL-1 beta production: roles of tumor necrosis factor-alpha and IL-10. *The American Journal of Physiology*, *273*(6 Pt 2), 1885–1890.
- Van Lier, R. A. W., ten Berge, I. J. M., & Gamadia, L. E. (2003). Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses. *Nature Reviews. Immunology*, *3*(12), 931–939.
- Varol, C., Landsman, L., Fogg, D. K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., ... Jung, S. (2007). Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(1), 171–180.
- Velcheti, V., Schalper, K. a, Carvajal, D. E., Anagnostou, V. K., Syrigos, K. N., Sznol, M., ... Rimm, D. L. (2014). Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *94*(1), 107–116.
- Vidovi , A., Vilibi , M., Sabioncello, A., Gotovac, K., Rabati , S., Folnegovi -Smalc, V., & Dekaris, D. (2007). 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. *Croatian Medical Journal*, *48*(2), 198–206.
- Viswanathan, K., Daugherty, C., & Dhabhar, F. S. (2005). Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. *International Immunology*, *17*(8), 1059–1069.

- Von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(7), 339–344.
- Von Zglinicki, T., & Martin-Ruiz, C. M. (2005). Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Current Molecular Medicine*, 5(2), 197–203.
- Wang, C. J., Kenefeck, R., Wardzinski, L., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., ... Walker, L. S. K. (2012). Cutting edge: cell-extrinsic immune regulation by CTLA-4 expressed on conventional T cells. *Journal of Immunology*, 189(3), 1118–11122.
- Wellinger, R. J., Ethier, K., Labrecque, P., & Zakian, V. a. (1996). Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell*, 85(3), 423–433.
- Wells, C. A, Chalk, A. M., Forrest, A., Taylor, D., Waddell, N., Schroder, K., ... Grimmond, S. M. (2006). Alternate transcription of the Toll-like receptor signaling cascade. *Genome Biology*, 7(2), R10.
- Weng, N. (2008). Aging of the Immune System: How Much Can the Adaptive, 24(5), 495–499.
- Wessa, M., & Rohleder, N. (2007). Endocrine and inflammatory alterations in post-traumatic stress disorder. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 2(1), 91–122.
- Wilder, R. L., & Elenkov, I. J. (1999). Hormonal regulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-12 and interleukin-10 production by activated macrophages. A disease-modifying mechanism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 876, 14–31.
- Wilson, C. B., McLaughlin, L. D., Nair, A., Ebenezer, P. J., Dange, R., & Francis, J. (2013). Inflammation and oxidative stress are elevated in the brain, blood, and adrenal glands during the progression of post-traumatic stress disorder in a predator exposure animal model. *PloS One*, 8(10), e76146.
- Wolkowitz, O. M., Epel, E. S., Reus, V. I., & Mellon, S. H. (2010). Depression gets old fast: do stress and depression accelerate cell aging? *Depression and Anxiety*, 27(4), 327–338.

- Woodland, D. L., & Blackman, M. A. (2006). Immunity and age: living in the past? *Trends in Immunology*, 27(7), 303–307.
- Woods, A. B., Page, G. G., O'Campo, P., Pugh, L. C., Ford, D., & Campbell, J. C. (2005). The mediation effect of posttraumatic stress disorder symptoms on the relationship of intimate partner violence and IFN-gamma levels. *American Journal of Community Psychology*, 36(1-2), 159–175.
- World Health Organisation. (1992). ICD-10, International statistical classification of diseases and health related problems, 10th revision. 1st ed. World Health Organisation, Geneva
- Wyatt, H. D. M., West, S. C., & Beattie, T. L. (2010). InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Research*, 38(17), 5609–5622.
- Xie, H., Wu, X., Wang, S., Chang, D., Pollock, R. E., Lev, D., & Gu, J. (2013). Long telomeres in peripheral blood leukocytes are associated with an increased risk of soft tissue sarcoma. *Cancer*, 119(10), 1885–1891.
- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., ... Yagita, H. (2002). Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *Journal of Immunology*, 169(10), 5538–5545.
- Yehuda, R. (2009). Status of glucocorticoid alterations in post-traumatic stress disorder. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1179, 56–69.
- Yehuda, R., Golier, J. A., Yang, R.-K., & Tischler, L. (2004). Enhanced sensitivity to glucocorticoids in peripheral mononuclear leukocytes in posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*, 55(11), 1110–1116.
- Yoshikawa, T. T. (2000). Epidemiology and unique aspects of aging and infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 30(6), 931–933.
- Zhang, L., Hu, X.-Z., Benedek, D. M., Fullerton, C. S., Forsten, R. D., Naifeh, J. A., ... Ursano, R. J. (2013). The interaction between stressful life events and leukocyte telomere length is associated with PTSD. *Molecular Psychiatry*, 1–2.

Zvereva, M. I., Shcherbakova, D. M., & Dontsova, O. A. (2010). Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry*, 75(13), 1563–1583.