

# Promjene stanične imunosti u bolesnika s teškom ozljedom mozga

---

**Sotošek Tokmadžić, Vlatka**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2010**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:188:905604>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Vlatka Sotošek Tokmadžić**

**PROMJENE STANIČNE IMUNOSTI U BOLESNIKA S  
TEŠKOM OZLJEDOM MOZGA**

**Doktorski rad**

**Rijeka, 2010.**

**SVUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Vlatka Sotošek Tokmadžić**

**PROMJENE STANIČNE IMUNOSTI U BOLESNIKA S  
TEŠKOM OZLJEDOM MOZGA**

**Doktorski rad**

**Rijeka, 2010.**

**Mentori rada:** prof. dr. sc. Alan Šustić i prof. dr. sc. Gordana Laškarin

Doktorski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ na Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Rijeci, pod povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Zlatko Trobonjača
2. Prof. dr. sc. Renata Mažuran
3. Doc. dr. sc. Željko Župan
4. Prof. dr. sc. Alan Šustić
5. Prof. dr. sc. Gordana Laškarin

Radi ima 229 listova.

UDK: \_\_\_\_\_

Rad je izrađen na Klinici za anesteziologiju i intenzivno liječenje Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Mikrobiološkom laboratoriju Zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije i na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanja su dio znanstveno-istraživačkog projekta broj 062-0000000-0220 pod naslovom “Perkutana traheostomija u prevenciji pneumonije u strojno ventiliranih bolesnika” glavnog istraživača prof. dr. sc. Alana Šustića koje financira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

Dio rezultata ovog istraživanja je prikazan na 22. godišnjem kongresu Europskog društva intenzivne medicine i objavljen u njegovom službenom časopisu Critical Care Medicine. Rezultati ovog doktorskog rada su objavljeni u časopisima Scandianvian Journal of Immunology i Injury.

Hvala svim ljudima koji su na bilo koji način sudjelovali u izradi ovog rada.

Iskreno zahvaljujem svojim mentorima prof. dr. sc. Alanu Šustiću i prof. dr. sc. Gordani Laškarin na njihovoj svesrdnoj pomoći i podršci, konstruktivnim raspravama, motivaciji i inspiraciji.

Zahvaljujem se svim djelatnicama Klinike za anesteziologiju i intenzivno liječenje, osobito osoblju Jedinice intenzivnog liječenja lokalitet Sušak, zatim djelatnicima Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Rijeka kao i djelatnicima Mikrobiološkog laboratorija Zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije.

Hvala svim djelatnicima Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci na podršci i suradnji.

Neizmjerne hvala mojoj obitelji, dragim prijateljima i svim dobrim ljudima koji moj život čine ljepšim.

Vlatka Sotošek Tokmadžić

## SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Infekcije su vodeći uzrok pobola i smrtnosti bolesnika s teškom ozljedom mozga. Do danas još uvijek nije u potpunosti razjašnjen mehanizam odgovoran za povećanu sklonost infekcijama u ovih bolesnika. Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi najčešće infekcije i njihove uzročnike u bolesnika s teškom ozljedom mozga, ispitati promjene stanične imunosti, poglavito udjela leukocitnih subpopulacija, izražavanje citotoksičnog posrednika perforina, aktivnost stanica NK i izražaj pojedinih citokina u različitim imunokompetentnim stanicama periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ranom razdoblju nakon ozljede.

**Ispitanici, materijal i metode:** U istraživanje je bilo uključeno 40 bolesnika s teškom ozljedom mozga u dobi od 18. do 75. godine života. Zdravi i dobrovoljni davaoci krvi su bili kontrolna skupina. Demografski, klinički i laboratorijski podatci sakupljeni su i analizirani su za svakog bolesnika. Svakom bolesniku s teškom ozljedom mozga 1., 4., 7. i 10. dana nakon ozljede uzimali smo uzorak trahealnog aspirata, krvi i mokraće te slali na mikrobiološku analizu. Prvog, 4. i 7. dana nakon ozljede svakom bolesniku uzimali smo 20 ml heparinizirane venske krvi za imunološka istraživanja. Mononuklearne stanice periferne krvi izdvojili smo centrifugiranjem na gradijentu gustoće, te višestrukim obilježavanjem površinskih biljega metodom izravne imunofluorescencije analizirali njihov fenotip i stupanj aktivacije protočnom citometrijom. Izdvojene mononuklearne stanice obilježavali smo istovremeno protutijelima na površinske biljege kako bi utvrdili njihovu pripadnost pojedinim leukocitnim populacijama, permeabilizirali njihovu membranu te metodom izravne i neizravne imunofluorescencije unutarstanično obilježavali perforin, interleukin (IL)-4, IL-15, IFN $\gamma$  (interferon gama), TNF $\alpha$  (engl. tumor necrosis factor alpha, čimbenik tumorske nekroze alfa) korištenjem odgovarajućih monoklonskih protutijela, te smo stanice analizirali na protočnom citometru. Uzorci koji su bili predviđeni za unutarstanično obilježavanje citokina prethodno smo stimulirali s PMA (engl. phorbol myristate acetat), ionomicinom i monenzinom radi prikazivanja citokina u stanici. Imunocitokemiju smo koristili za prikazivanje molekule perforina i citokina IL-15 u preparatima svježe izdvojenih mononuklearnih stanica periferne krvi. Metodom pozitivne i negativne magnetske separacije iz mononuklearnih stanica periferne krvi izdvojili smo stanice NK i određivali njihovu citotoksičnu aktivnost prema K-562 NK osjetljivoj staničnoj liniji korištenjem PKH-26 (red) dvosatnog testa citotoksičnosti uz očitavanje protočnim citometrom.

**Rezultati:** U 55% bolesnika s teškom ozljedom mozga došlo je do razvoja infekcije (pneumonije, sepsa i infekcije mokraćnih putova) s najvećom učestalosti pojave 4. dana nakon ozljede. Najčešći uzročnici pneumonije bili su *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*. Sepsa je bila najčešće uzrokovana bakterijom *Staphylococcus aureus*, dok su najčešći uzročnici infekcije mokraćnih putova bili bakterije *Enterococcus faecalis* i *Escherichia coli*, te gljivca *Candida albicans*. Četvrtog dana nakon ozljede u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga zabilježili smo statistički značajano smanjenje postotka limfocita T, osobito CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> subpopulacije, smanjenje udjela stanica NK-T, stanica NK i njihovih CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> i CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> subpopulacija. Postotak limfocita B nije se značajno mijenjao u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga, dok je udio monocita značajno porastao 1. dana nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu i smanjio se 7. dana. Inficirani bolesnici s teškom ozljedom mozga imali su statistički značajno smanjenje udjela limfocita T i stanica NK 4. dana nakon ozljede u odnosu na 1. dan i kontrolnu skupinu. U bolesnika s teškom ozljedom mozga zabilježili smo vrlo niski udio proupalnih citokina (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-15) i prevlast IL-4 nad IFN $\gamma$  u svim leukocitnim subpopulacijama. Stimulacija monocita periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga s različitim koncentracijama lipopolisaharida (LPS) potiče stvaranje IFN $\gamma$  1. i 7. dana nakon ozljede kao i u kontrolnoj skupini, ali nema učinka 4. dana nakon ozljede. Statistički značajno smanjenje postotka perforin pozitivnih limfocita, uključujući limfocite T, stanice NK i stanice NK-T, zabilježeno je u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede. Sedmog dana nakon ozljede povećao se udio perforin pozitivnih limfocita s citotoksičnim fenotipom (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfociti T, stanice NK i stanice NK-T) u odnosu na 1. dan. Izdvojene stanice NK iz periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga imaju statistički značajno manju citotoksičnost prema NK osjetljivoj staničnoj liniji K-562 4. i 7. dana nakon ozljede u odnosu na 1. dan i kontrolnu skupinu. Četvrtog dana nakon ozljede u bolesnika s teškom ozljedom mozga nađena je pozitivna korelacija između GCS, kao pokazatelja težine ozljede mozga, te postotka limfocita T i stanica NK, kao i između GCS i postotka perforin pozitivnih stanica, uključujući CD3<sup>+</sup> perforin<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup> perforin<sup>+</sup> stanice.

**Zaključak:** Visoka učestalost infekcija u bolesnika s teškom ozljedom mozga u ranom razdoblju nakon ozljede mogla bi se objasniti smanjenjem postotka stanica s citotoksičnim fenotipom, smanjenim udjelom perforina u limfocitnih subpopulacijama i njihove citotoksične aktivnosti, te stvaranja proupalnih citokina.



**Ključne riječi:** Perforin; Pneumonije uzrokovane strojnom ventilacijom; Stanice NK; Stanice NKT; Stanična imunost; Teška ozljeda mozga.

## SUMMARY

**Objectives:** Infections are leading causes of increased morbidity and mortality of severe brain injured patients. The mechanism underlying the susceptibility to the infections is still unexplained. The purpose of the study was to identify the most common infection and their infection agents in severe brain injured patients, and to analyze the changes in cell-mediated immunity, especially the frequency of leukocytes subpopulations, expression of cytotoxic mediator perforin, activity of NK cells and expression of cytokines in different immune cells in peripheral blood of severe brain injured patients.

**Patients, material and methods:** Forty severe brain injured patients between age of 18 and 75 years we included in the study. Healthy volunteers served as controls. Demographic, clinical and laboratory data were collected and analyzed for each patient. The sample of endothacheal aspirate, blood and urine were taken for each severe brain injured patient and sent for further microbiologic analysis on day 1, 4, 7 and 10 after the injury. The sample of 20 ml of heparinised peripheral blood was taken from each severe brain injured patient on day 1, 4 and 7 after the injury and used for further immunological investigations. Peripheral blood mononuclear cells were obtained after gradient centrifugation and their phenotype and activation levels were analyzed by simultaneous multiple staining of surface antigens using direct immunofluorescence and flow cytometry analyzes. Isolated mononuclear cells were stained simultaneously by monoclonal antibody against surface antigens, specific for different leukocyte populations, and were further permeabilised for intracellular staining of perforin, interleukin (IL)-4, IL-15, IFN $\gamma$  (interferon gamma), TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha). The labelled cells were analysed by flow cytometry. Cell samples that were scheduled for intracellular cytokine staining, were previously stimulated with PMA, ionomycin and monensin which are necessary for cytokine visualisation. Immunocytochemistry was used for visualisation of perforin molecule and IL-15 cytokine in the samples of freshly isolated peripheral blood mononuclear cells. CD56<sup>+</sup> NK cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells by positive and negative magnetic cell separation method. The cytotoxic activity of separated CD56<sup>+</sup> NK cells against NK sensitive cell K-562 cell line was analysed by PKH-26 (red) cell linker kit and flow cytometry.

**Results:** Infection (pneumonia, sepsis, uroinfection) occurred in 55% of severe brain injured patients with the highest incidence on day 4 after the injury. The most common infection agents of pneumonia were *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Sepsis was caused by bacteria *Staphylococcus aureus*, while uroinfection was caused by

bacteria *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*, and fungus *Candida albicans*. On day 4 after the injury statistically significant decrease of peripheral blood lymphocyte T, their CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> subpopulation, as well as percentage of NK-T cell, NK cells including their CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> and CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> subpopulation in peripheral blood of severe brain injured patients was observed. The frequency of B lymphocytes in peripheral blood of severe brain injured patients did not change basically during the investigated period, while the frequency of monocytes increased on day 1 in comparison to healthy controls and decreased on day 7. Infected patients with severe brain injury had statistically significant decrease of T lymphocytes and NK cell on day 4 after the injury. Low frequency of proinflammatory cytokines (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-15), as well as domination of IL-4 over IFN $\gamma$  were observed in all leukocytes populations in severe brain injured patients. LPS stimulate IFN $\gamma$  production by monocytes in peripheral blood of healthy controls and severe brain injured patients on day 1 and 7, but not on day 4 after the injury. Statistically significant decrease of perforin-positive lymphocytes including T, natural killer (NK) and NKT cells was observed in peripheral blood of severe brain injured patients on day 4 after the injury. On day 7, perforin expression was restored in lymphocyte of cytotoxic phenotype (CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, NK cells, and NKT cells) compared with day 1. Isolated CD56<sup>+</sup> NK cells for peripheral blood of severe brain injured patients showed statistically significant lower cytotoxic activity against NK sensitive cells line K-562 on day 4 and 7 when compared to day 1 and healthy controls. On day 4 after the injury positive correlation was found between GCS, as a measure of severity of brain injury, and percentage of T lymphocytes, and NK cells, as well as between GCS and all perforin positive cells, including CD3<sup>+</sup> perforin<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup> perforin<sup>+</sup> cells.

**Conclusion:** High incidence of infection in severe brain injured patients in early posttraumatic period could be explained by diminished percentage of cells with cytotoxic phenotype, decrease in frequency in their perforin expression and cytotoxic activity as well as proinflammatory cytokine production.

**Key words:** Cellular Immunity; NK Cells; NKT Cells; Perforin; Severe Brain Injury; Ventilator Associated Pneumonia.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. OZLJEDA MOZGA.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1. Povijest ozljede mozga.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2. Definicija i razradba ozljede mozga.....</b>	<b>2</b>
<i>1.1.2.1. Klinička razradba ozljede mozga.....</i>	<i>2</i>
<i>1.1.2.2. Neuropatološka razradba ozljede mozga.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2.3. Razradba ozljede mozga na osnovu mehanizma nastanka ozljede.....</i>	<i>5</i>
<b>1.1.3. Patofiziologija teške ozljede mozga.....</b>	<b>5</b>
<i>1.1.3.1. Ionska neravnoteža u patofiziologiji teške ozljede mozga.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.3.2. Citokini i kemokini u patofiziologiji teške ozljede mozga.....</i>	<i>7</i>
<i>1.1.3.3. Promjene moždanog krvnog protoka u patofiziologiji teške ozljede mozga.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.3.4. Promjene oksigenacije i metabolizma mozga u patofiziologiji teške ozljede mozga.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.3.5. Patofiziologija moždanog edema.....</i>	<i>10</i>
<b>1.1.4. Epidemiologija bolesnika s teškom ozljedom mozga.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1.5. Mjere sprječavanja ozljede mozga.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1.6. Dijagnostika bolesnika s teškom ozljedom mozga.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.7. Liječenje bolesnika s teškom ozljedom mozga.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.7.1. Opća načela liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga...13</b>	
<i>1.1.7.1.1. Smjernice za liječenje bolesnika s teškom ozljedom mozga.....</i>	<i>13</i>
1.1.7.1.1.1. Liječenje hipoksije i hipertenzije.....	13
1.1.7.1.1.2. Hiperosmolarno liječenje .....	14
1.1.7.1.1.3. Postavljanje sustava za mjerenje untarmoždanog tlaka.....	14
1.1.7.1.1.4. Analgezija i sedacija.....	15
1.1.7.1.1.5. Nadzor moždane oksigenacije.....	15

1.1.7.1.1.6. Hiperventilacija .....	16
1.1.7.1.1.7. Profilaktična hipotermija.....	16
1.1.7.1.1.8. Sprječavanje epileptičkih napadaja.....	16
1.1.7.1.1.9. Sprječavanje duboke venske tromboze .....	17
1.1.7.1.1.10. Prehrana.....	17
1.1.7.1.1.11. Kortikosteroidi.....	18
<i>1.1.7.1.2. Specifično liječenje bolesnika s teškom ozljedom mozga.....</i>	<i>18</i>
1.1.7.1.2.1. Antagonisti kalcijevih kanala.....	18
1.1.7.1.2.2. Aminosteroidi.....	19
1.1.7.1.2.3. Antagonisti NMDA receptora.....	19
1.1.7.1.2.4. Magnezij.....	19
1.1.7.1.2.5. Sintetski kanabinoidi.....	19
1.1.7.1.2.6. Modulatori kinin/kalikreinskog sustava.....	20
1.1.7.1.2.7. Progesteron.....	20
<b>1.1.8. Komplikacije u bolesnika s teškom ozljedom mozga .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2. STANICE KOJE SUDJELUJU U IMUNOLOŠKOJ REAKCIJI .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.1. Limfociti B.....</b>	<b>22</b>
<i>1.2.1.1. Biljezi limfocita B.....</i>	<i>22</i>
<i>1.2.1.2. Sazrijevanje limfocita B.....</i>	<i>23</i>
<i>1.2.1.3. Subpopulacije limfocita B.....</i>	<i>24</i>
<i>1.2.1.4. Funkcija limfocita B.....</i>	<i>24</i>
<b>1.2.2. Limfociti T.....</b>	<b>25</b>
<i>1.2.2.1. Biljezi limfocita T.....</i>	<i>25</i>
<i>1.2.2.2. Sazrijevanje limfocita T.....</i>	<i>27</i>
<i>1.2.2.3. Subpopulacije limfocita T.....</i>	<i>28</i>
<i>1.2.2.3.1. Obilježja i funkcija CD4<sup>+</sup> limfocita T.....</i>	<i>28</i>
<i>1.2.2.3.2. Obilježja i funkcija CD8<sup>+</sup> limfocita T.....</i>	<i>30</i>
<i>1.2.2.3.3. Obilježja i funkcija <math>\gamma/\delta</math> limfocita T.....</i>	<i>30</i>
<b>1.2.3. Stanice NK-T.....</b>	<b>31</b>
<i>1.2.3.1. Biljezi stanica NK-T.....</i>	<i>31</i>
<i>1.2.3.2. Sazrijevanje stanica NK-T.....</i>	<i>31</i>
<i>1.2.3.3. Subpopulacije i funkcija stanica NK-T.....</i>	<i>32</i>

1.2.4. Stanice NK .....	32
1.2.4.1. Receptori stanica NK.....	33
1.2.4.2. Sazrijevanje stanica NK.....	34
1.2.4.3. Subpopulacije i funkcije stanica NK.....	35
1.2.5. Monociti.....	36
1.2.5.1. Biljezi monocita.....	36
1.2.5.2. Razvoj monocita.....	37
1.2.5.3. Subpopulacije i funkcija monocita.....	37
1.3. MEHANIZMI STANIČNE CITOTOKSIČNOSTI.....	38
1.3.1. Stanična citotoksičnost posredovana perforinom.....	38
1.4. CITOKINI.....	40
1.4.1. Interleukin-4.....	40
1.4.2. Interferon-gama.....	41
1.4.3. Čimbenik tumorske nekroze alfa.....	42
1.4.4. Interleukin-15.....	43
1.5. MEĐUDJELOVANJE SREDIŠNJEG ŽIVČANOG I IMUNOLOŠKOG SUSTAVA.....	45
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	48
3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE.....	50
3.1. ISPITANICI.....	51
3.1.1. Kliničke značajke bolesnika.....	52
3.1.2. Etičnost istraživanja i informirani pristanak.....	52
3.2. MATERIJAL.....	52
3.2.1. Biološki materijal.....	52
3.2.2. Stanične linije.....	53
3.2.3. Kemikalije .....	53
3.2.4. Mediji i puferi.....	54
3.2.5. Protutijela.....	55
3.2.6. Laboratorijski materijal .....	58
3.2.7. Uredaji.....	58
3.3. METODE.....	59
3.3.1. Metode određivanja biokemijskih sastojaka u serumu.....	59
3.3.2. Metode bakteriološke analize.....	59

3.3.3. Imunološke metode.....	60
3.3.3.1. Izdvajanje mononuklearnih stanica.....	60
3.3.3.2. Višestruko obilježavanje površinskih biljega metodom imunofluorescencije.....	60
3.3.3.3. Istovremeno obilježavanje površinskih i unutarstaničnih biljega u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima .....	60
3.3.3.3.1. Istovremeno obilježavanje površinskih biljega i unutarstanične molekule perforina u različitim limfocitnim subpopulacijama .....	60
3.3.3.3.2. Istovremeno obilježavanje površinskih biljega i unutarstaničnih citokina u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima .....	61
3.3.3.3.3. Stimulacija monocita s lipopolisaharidom i unutarstanično obilježavanje IFN $\gamma$ .....	62
3.3.3.4. Magnetska separacija stanica NK.....	63
3.3.3.4.1. Izdvajanje stanica iz suspenzije mononuklearnih stanica periferne krvi pomoću magnetskih kuglica.....	63
3.3.3.4.2. Negativna i pozitivna magnetska selekcija stanica NK.....	63
3.3.3.5. Test citotoksičnosti stanica NK.....	64
3.3.3.6. Očitavanje na protočnome citometru i analiza rezultata .....	65
3.3.3.7. Imunocitokemija.....	65
3.3.4. Statistička obrada podataka.....	66
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1. Kliničke značajke i ishod liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga.....</b>	<b>68</b>
<b>4.2. Praćenje promjena laboratorijskih parametara u bolesnika s teškom         ozljedom mozga.....</b>	<b>72</b>
<b>4.3. Rezultati mikrobiološke analize.....</b>	<b>76</b>
<b>4.4. Učestalost infekcija u bolesnika s teškom ozljedom mozga.....</b>	<b>77</b>
<b>4.5. Rezultati imunoloških istraživanja.....</b>	<b>80</b>
<b>4.5.1. Zastupljenost, promjene učestalosti i stupanj aktivacije             mononuklearnih stanica periferne krvi bolesnika s teškom             ozljedom mozga.....</b>	<b>80</b>

4.5.1.1. Zastupljenost, promjene učestalosti i stupanj aktivacije limfocita T i njihovih subpopulacija u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga.....	82
4.5.1.2. Zastupljenost, promjene učestalosti i stupanj aktivacije stanica NK i njihovih subpopulacija u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga.....	90
4.5.1.3. Zastupljenost, promjene učestalosti i stupanj aktivacije stanica NK-T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga.....	98
4.5.1.4. Zastupljenost i dinamičke promjene limfocita B u bolesnika s teškom ozljedom mozga.....	105
4.5.1.5. Zastupljenost, promjene učestalosti i stupanj aktivacije monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga.....	107
4.5.2. Izražavanje citokina u pojedinim limfocitnim subpopulacijama i monocitama periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga.....	113
4.5.2.1. Izražavanje IL-4 u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga.....	113
4.5.2.2. Izražavanje IFN $\gamma$ u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga.....	117
4.5.2.3. Odnos IL-4 i IFN $\gamma$ u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga.....	121
4.5.2.4. Stvaranje IFN $\gamma$ u monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga na stimulaciju s LPS.....	123
4.5.2.5. Izražavanje TNF $\alpha$ u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga.....	125
4.5.2.6. Izražavanje IL-15 u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga.....	129



<b>4.5.3. Izražavanje perforina u pojedinim limfocitnim subpopulacijama bolesnika s teškom ozljedom mozga.....</b>	<b>134</b>
<i>4.5.3.1. Izražavanje perforina u limfocitima T i njihovim subpopulacijama u bolesnika s teškom ozljedom mozga.....</i>	<i>138</i>
<i>4.5.3.2. Izražavanje perforina u stanicama NK i njihovim subpopulacijama u bolesnika s teškom ozljedom mozga.....</i>	<i>142</i>
<i>4.5.3.3. Izražavanje perforina u stanicama NK-T u bolesnika s teškom ozljedom mozga.....</i>	<i>146</i>
<b>4.5.4. Citotoksična aktivnost stanica NK u bolesnika s teškom ozljedom mozga.....</b>	<b>148</b>
<b>4.5.5. Korelacija između težina ozljede mozga i imunoloških parametara.....</b>	<b>151</b>
<i>4.5.5.1. Korelacija između težine ozljede mozga i postotka pojedinih limfocitnih subpopulacija.....</i>	<i>151</i>
<i>4.5.5.2. Korelacija između težine ozljede mozga i postotka perforin pozitivnih stanica.....</i>	<i>155</i>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>158</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>172</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>175</b>
<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>199</b>

## **1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA**

## **1.1. OZLJEDA MOZGA**

### **1.1.1. Povijest ozljede mozga**

Ozljede glave i mozga se spominju još od antičkog perioda. O tome svjedoče lubanje na kojima su nađeni brojni prijelomi uključujući i znakove trepanacije. Drevni Mezopotamci su poznavali što znači ozljeda glave i njezine posljedice kao što su paraliza, gubitak vida, sluha ili govora (1). Stari grčki liječnici, osobito Hipokrat, opisuje mozak kao centar mišljenja, a do te spoznaje dolaze na osnovu ozljeda glave (2). Tijekom srednjega vijeka i razdoblja renesanse trepanacija se često izvodila u bolesnika s ozljedom glave. U 16. stoljeću prvi puta se opisuju stupnjevi stanja svijesti. U 18. stoljeću je pretpostavljeno da je ICP (ICP, engl. intracranial pressure) posljedica patofizioloških mehanizama ozljede mozga. U 19. stoljeću otvaranje lubanje se opisuje kao način liječenja teške ozljede mozga (3). Dvadeseto stoljeće je obilježeno napretkom tehnologije koja je unaprijedila dijagnostiku i liječenje bolesnika s ozljedom mozga. Bilo je to doba otkrića kompjuterizirane tomografije (CT) i nuklearne magnetske rezonancije (NMR). Uvođenje sustava za mjerenje unutar-moždanog tlaka 1950. godine označilo je „novo razdoblje“ liječenja teške ozljede mozga. Od 1970. godine teška ozljeda mozga se opisuje kao javno-zdravstveni problem (4). Kraj 20. stoljeća obilježen je ekspanzijom znanstvenog istraživanja u području ozljede mozga i to je doba otkrića primarne i sekundarne ozljede mozga. Od 1990. godine uvode se standardizirani protokoli za dijagnostiku i liječenje teške ozljede mozga.

### **1.1.2. Definicija i razradba ozljede mozga**

Ozljeda mozga je oštećenje moždanog tkiva uzrokovana djelovanjem vanjske sile. Posljedica su prolazna ili trajna oštećenja strukture i funkcije mozga. Ozljeda mozga može se javiti kao izolirana ozljeda ili u sklopu višestrukih ozljeda tijela. Najčešće se ozljeda mozga dijeli na osnovi težine kliničke slike, patoloških osobitosti i mehanizma nastanka ozljede.

#### ***1.1.2.1. Klinička razradba ozljede mozga***

Glasgov koma ljestvica (GCS, od engl. Glasgow Coma Scale) je najčešće korišteni sustav u kliničkoj procjeni i razradbi ozljede mozga. Prvi puta su GCS u kliničku praksu uveli Teasdale i Janett (5). Ovaj sustav bodovanja ocjenjuje stanje svijesti na osnovu zbroja triju sastavnica: otvaranje očiju, verbalni odgovor i motorički odgovor bolesnika (Tablica 1).

**Tablica 1. Glasgow koma ljestvica**

<b>očni odgovor (O)</b>	
spontano otvara oči	4
oči otvara na glasovnu naredbu	3
oči otvara na bolni podražaj	2
ne otvara oči	1
<b>verbalni (govorni) odgovor (V)</b>	
odgovara orijentirano	5
odgovara konfuzno	4
odgovara besmislenim riječima	3
odgovara nerazumljivim zvukovima	2
nema glasovnog odgovara	1
<b>motorički odgovor (M)</b>	
prati naredbe	6
lokalizira bolni podražaj	5
odmiče se od bolnog podražaja	4
odgovara fleksijom na bolni podražaj	3
odgovara ekstenzijom na bolni podražaj	2
nema motoričkog odgovora	1

Prema GCS težina ozljede mozga se dijeli na blagu, umjerena i tešku ozljedu mozga. Opće je prihvaćeno mišljenje da se ozljeda mozga definirana kao GCS 13 i više označava kao blaga, umjerena kao GCS od 9-12, a teška ozljeda mozga kao GCS 8 i manje (6-8). Iako jednostavan u svojoj primjeni, ovaj sustav je ograničavajući u predviđanju ishoda liječenja bolesnika s ozljedom mozga. Dodatni kriteriji, kao što su trajanje post-traumatske amnezije, duljina trajanja gubitka svijesti uz GCS primjenjuju se kao bolja procjena i razradba ozljede mozga (Tablica 2).

**Tablica 2. Klinička razradba ozljede mozga**

Ozljeda mozga	GCS	PTA	GS
Umjerena	13 - 15	<1 sat	<30 min
Blaga	9 - 12	30 min - 24 sata	30 min - 24 sata
Teška	3 - 8	>24 sata	>24 sata

**GCS** = Glasgow koma ljestvica (od engl. Glasgow Coma Scale); **PTA** = poslijetraumatska amnezija; **GS** = gubitak svijesti

### *1.1.2.2. Neuropatološka razradba ozljede mozga*

Na osnovu patoloških promjena koje su uočavaju na CT, NMR i obdukcijom ozljeda mozga može biti fokalna ili difuzna. Fokalna ozljeda nastaje kao posljedica udarca, laceracije ili unutarlubanjskog krvarenja i očituje se simptomima vezanim za funkciju oštećenog dijela mozga (9). Fokalna ozljeda mozga se obično javlja u orbiti, čeonom i prednjem sljepoočnom režnju mozga, rjeđe u malome mozgu, a vrlo rijetko u tjemenom ili zatiljnom dijelu mozga. Morfološki se fokalna ozljeda mozga očituje degeneracijom živčanih stanica na čijem mjestu dolazi do stvaranja glijalnog ožiljka te demijelinizacijom na mjestu krvarenja (9).

Difuzna ozljeda mozga najčešće je posljedica akceleracijsko/deceleracijske ozljede mozga, očituje se kao difuzna aksonalna ozljeda i može se utvrditi obdukcijom ili NMR (10).

Nadalje, ozljeda mozga se mogu očitovati kao unutar-aksijalne, koje se javljaju u moždanom tkivu i izvan-aksijalne koje se javljaju unutar lubanje, ali izvan moždanog tkiva no svojim položajem oštećuju moždano tkivo (11). Unutar-aksijalna ozljeda je unutar-moždano (intracerebralno) krvarenje. Ono predstavlja krvarenje u moždano tkivo, obično je mnogostruko i najčešće se javlja u čeonom i zatiljnom režnju mozga. Izvan-aksijalne ozljede su: epiduralni hematoma, subduralni hematoma, subarahnoidalno i intraventrikularno krvarenje (12). Epiduralni hematoma označava krvarenje između kosti lubanje i tvrde moždane ovojnice. Najčešći je uzrok oštećenje grane meningealne arterije, ali može nastati zbog oštećenja sinusa tvrde moždane ovojnice. Obično zahvaća lateralnu površinu moždane polutke. Ukoliko nastane zbog oštećenja arterije vrlo brzo se širi i uzrokuje neurološke ispade (6). Kod subduralnog hematoma krvarenje se javlja između tvrde i paučaste moždane ovojnice i obično je posljedica kidanja vena koje povezuju subarahnoidalni prostor (13). Subduralno krvarenje se očituje akutno, subakutno i kronično. Akutno krvarenje se javlja 48 sati od ozljede i sastoji se od krvi i krvnih ugrušaka. Subakutno krvarenje se razvija između 2 i 14 dana od ozljede i sadrži krvne ugruške i tekuću krv. Kronično krvarenje se razvija 14 dana od ozljede i sastoji

se od tekućeg ugruška (13). Subarahnoidalni hematom označava krvarenje u prostor između meke i paučaste moždane ovojnice. Intraventricularno krvarenje obilježava krvarenje u moždane komore (13).

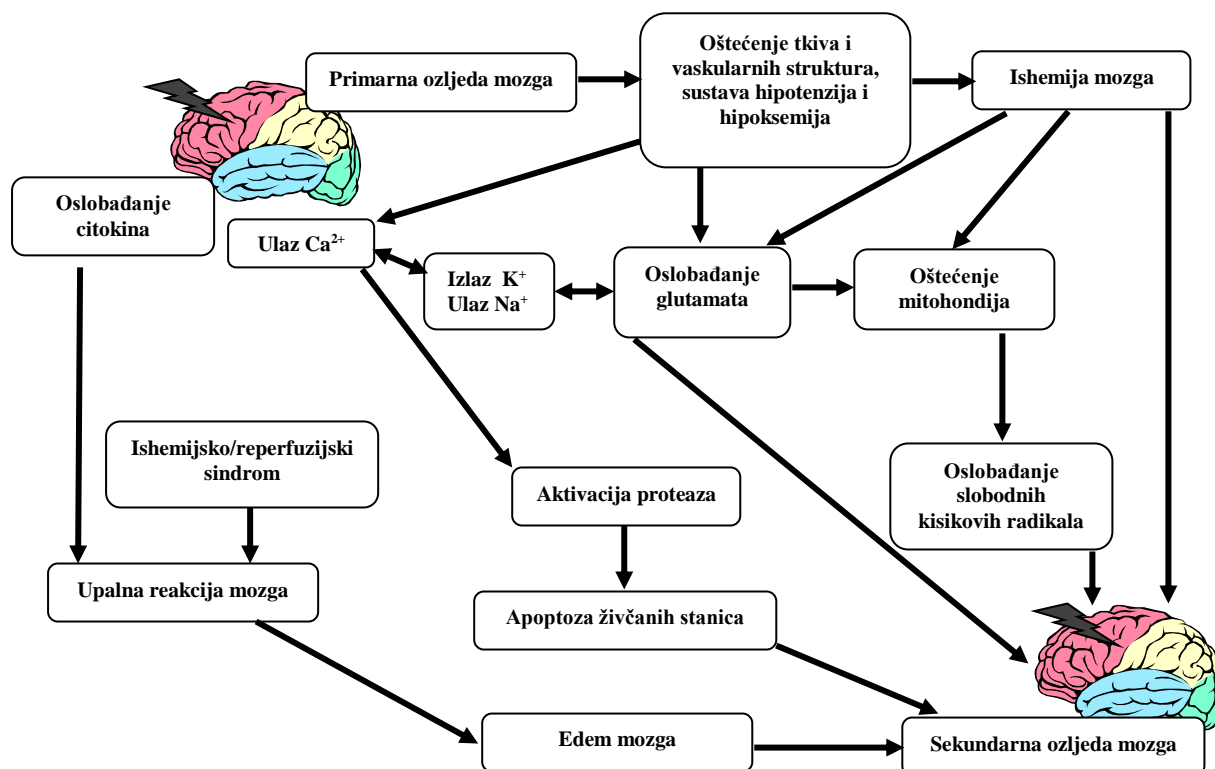
### ***1.1.2.3. Razradba ozljede mozga na osnovu mehanizma nastanka ozljede***

Opće je prihvaćeno mišljenje da postoje dva osnovna mehanizma ozljede mozga: izravni udarac i akceleracijsko/deceleracijska ozljeda (14,15).

Ozljede mozga uzrokovane direktnim udarcem je posljedica udarca predmeta u glavu i dodira kostiju glave i mozga. Direktni udarac koji dovodi do ozljede mozga može imati različiti smjer djelovanja (izravni, kutni, rotacijski), jakost i trajanje. Ovisno o navedenim čimbenicima nastaju i različita oštećenja mozga. Oštećenje moždanog tkiva obično se javlja ispod mjesta udarca, ali i na suprotnoj strani od udarca. Ovakva ozljeda se naziva *coup/coutercoup* (udarac/protuudarac). Ozljede izravnog udarca svojstvene su u okolnostima kada predmet udara u glavu koja se ne miče, dok ozljeda koja nastaje zbog protuudara nastaje kada glava udara u stacionarni predmet. Izravni udarci u glavu najčešće dovode do fokalne ozljede. Ozljeda mozga koja nastaje zbog akceleracije/deceleracije glave nije posljedica izravnog udarca već nastaje uslijed neograničenog gibanja glave što dovodi naprezanja i oštećenja moždanog tkiva i krvožilja (15). Ovakav mehanizam ozljede najčešće dovodi do difuzne ozljede mozga (10). I izravni udarac i akceleracijsko/deceleracijska ozljeda mozga najčešći su mehanizmi zatvorenih ozljeda glave, dok metak, projektil ili neki drugi oštri predmet probijaju lubanju i moždane ovojnice te dovode do nastanka otvorenih (penetrirajućih) ozljeda mozga (13).

### **1.1.3. Patofiziologija teške ozljede mozga**

S obzirom na patofiziološka zbivanja teška ozljeda mozga se dijeli na primarnu i sekundarnu ozljedu mozga (16,17,18). Primarna ozljeda mozga je oštećenje moždanog tkiva i moždanih krvnih žila u trenutku djelovanja vanjske sile koja dovodi do njihovog potiskivanja, istezanja i cijepanja. Suprotno primarnoj ozljedi, koja nastaje u trenutku izravnog djelovanja vanjske sile, sekundarna ozljeda mozga se razvija satima i danima nakon ozljede. Sekundarna ozljeda je posljedica moždane hipertenzije, ishemije, povišenja unutar-moždanog tlaka, oštećenja krvno-moždane zapreke, stvaranja moždanog edema te oslobađanja brojnih posrednika upale (17,18).



**Slika 1. Patofiziološki mehanizam primarne i sekundarne ozljede mozga (objašnjenje u tekstu; slika prilagođena iz Beauchamp K, Mutlak H, Smith WR, Shohami E, Stahel PF. Pharmacology of traumatic brain injury: where is the „golden bullet“? Mol Med 2008;14:731-40.)**

### ***1.1.3.1. Ionska neravnoteža u patofiziologiji teške ozljede mozga***

Najraniju fazu teške ozljede mozga obilježava kidanje stanične membrane, nedostatna regulacija protoka cerebrospinalne tekućine i poremećaj metabolizma mozga (19). Ove promjene dovode do hipoperfuzije i prijelaza na anaerobni metabolizam s posljedičnim stvaranjem mliječne kiseline, smanjenim stvaranjem adenozin-fosfata (ATP) te zakazivanjem membranske ionske crpke. Zbog membranske depolarizacije oslobađa se velika količina podraživajućih živčanih prijenosnika, glutamata i aspartata. Ovi prijenosnici aktiviraju N-metil-D-aspartatne (NMDA) i alfa-amino-3-hidroksi-metil-4-izopropionatne i glutaminske receptore koji dovode do otvaranja kalcijevih i natrijevih kanala. Rezultat ovih promjena je ulazak velike količine iona kalcija i natrija u stanicu te oštećenje, bubrenje i konačnici smrt stanice nekrozom (20). Ulazak kalcijevih i natrijevih iona u stanicu dovodi do aktivacije unutarstaničnih enzima koji cijepaju bjelančevine citoskeleta. Aktiviraju se lipidne peroksidaze, proteaze i fosfolipaze koje dovode do povećanja unutarstanične koncentracije

slobodnih masnih kiselina i slobodnih kisikovih radikala (19,20). Dodatno, ulazak kalcija u mitohondrije uzrokuje prekid lanca stvaranje energije i oslobađanje slobodnih kisikovih radikala. Prekomjerno stvaranje slobodnih kisikovih radikala i iscrpljivanje unutarstaničnog antioksidativnog sustava (superoksidne dismutaze, glutation peroksidaze, katalaze) dovode do peroksidacije staničnih i krvožilnih struktura, oksidacije bjelančevina, cijepanja DNK i sprječavanja prijenosa iona u mitohondrijima. Posljedica ovih promjena je smrt stanice i poticanje upalnog odgovora (21). Iz oštećenih stanica oslobađa se velika količina kalija koji dodatno dovodi do poremećaja transmembranskog prijenosa iona (20). Suvišak izvanstaničnog kalija apsorbiraju astrociti što ima za posljedicu njihovo bubrenje i smrt (20). Dodatna ionska neravnoteža koja se javlja kod teške ozljede mozga uključuje i smanjenu koncentraciju magnezija. S obzirom da magnezij ima važnu ulogu u regulaciji transporta i kalcija, promjene koncentracije magnezija doprinose neurotoksičnom učinku kalcija u oštećenom moždanom tkivu (22).

#### ***1.1.3.2. Citokini i kemokini u patofiziologiji teške ozljede mozga***

Osim ionske neravnoteže teška ozljeda mozga je obilježena oslobađanjem brojnih posrednika upale kao što su citokini i kemokini koje luče stanice moždanog tkiva (astrociti, glija stanice) i polimorfonuklearni leukociti za koje se vjeruje da su iz krvi u moždano tkivo stigli preko oštećene krvno-moždane zapreke. Prijelaz polimorfonuklearnih stanica u moždano tkivo posredovana je i izražajem intracelularne adhezijske molekule (ICAM, engl. intracellular adhesion molecule) na žilnom endotelu moždanih krvnih žila, koja se ushodno regulira u nekoliko pokusnih životinjskih modela s teškom ozljedom mozga (23,24). Makrofagi, stanice NK i limfociti T nađeni su u lezijama kore mozga pokusnih životinja s teškom ozljedom mozga (25). Citokini kao što su čimbenik tumorske nekroze alfa (TNF $\alpha$ , engl. Tumor necrosis factor alpha), interleukin (IL)-1, IL-6, IL-18 važni su posrednici upalnog odgovora i luče se kao odgovor na akutnu ozljedu mozga (26-30). Pokusima na životinjskim modelima teške ozljede mozga utvrđeno je da ove citokini proizvode i luče astrociti, glija stanice, živčane stanice te endotelne stanice krvnih žila mozga (25). Interleukin-1 čine tri molekule IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL1 receptor (R) agonist. Sva tri njegova oblika opsežno su proučavana na životinjskim modelima teške ozljede mozga, te je pokazano da je IL-1 glavni pokretač upalnog odgovora mozga. Snažan izražaj IL-1R nađen je u glija stanicama kod fokalne ozljede mozga te u živčanim stanicama i astrocitima kod difuzne aksonalne ozljede mozga (31-33). Interlukin-1 zajedno s drugim proupalnim čimbenicima kao što su TNF $\alpha$ , fosfolipaza A, prostagladini,



ciklooksigenaza (COX)-2, doprinosi sekundarnoj ozljedi mozga. I kod fokalne i kod difuzne ozljede mozga povišena koncentracija IL-1 vidljiva je u moždanome tkivu već nekoliko sati nakon ozljede. Slično se ponaša i IL-18, proupalni citokin, čije je koncentracija znatno povišena u cerebrospinalnoj tekućini pokusnih životinja i bolesnika s teškom ozljedom mozga (29). TNF $\alpha$  je proupalni citokin za kojeg je pokazano pokusima *in vitro* i *in vivo* da uzrokuje apoptozu živčanih stanica, glija stanica te endotelnih stanica krvnih žila mozga. TNF $\alpha$  potiče ulazak leukocita iz periferne krvi u oštećeno moždano tkivo, uzrokuje oslobađanje proteolitičkih enzima koji oštećuju krvno-moždanu zapreku. Noviji radovi su pokazali da TNF $\alpha$  ima i protuupalni i neuroprotektivni učinak u životinja i bolesnika s teškom ozljedom mozga koji se očituju u sprječavanju ishemičkog oštećenja moždanih stanica te njegovoj ulozi u stvaranju ožiljka u oštećenom moždanom tkivu (34).

Interleukin-6 je citokin koji luče brojne stanice uključujući živčane i endotelne stanice mozga. Pokusi u životinjskim modelima te u bolesnika s teškom ozljedom mozga su pokazali da se interleukin-6 počinje lučiti odmah nakon ozljede mozga i najvišu razinu u cerebrospinalnoj tekućini doseže 2 do 8 sati u životinjskom modelu, a 3 do 6 dana u bolesnika s teškom ozljedom mozga (25). Interleukin-6 pokazuje i pro- i protu-upalni učinak. Protuupalni učinak IL-6 se očituje sprječavanjem lučenja TNF $\alpha$ , poticanjem lučenja živčanog čimbenika rasta (NGF, engl. Nerve growth factor), sudjelovanjem u obrani od toksičnog učinka gultamata i slobodnih kisikovih radikala. Pro-upalni učinak IL-6 očituje se poticanjem kemotaksije, uzhodnoj regulaciji kemokina i adhezijskih molekula (35). Glavni izvori lučenja IL-6 u patofiziologiji teške ozljede mozga su živčane stanice, astrociti i glija stanice (36).

I IL-10 i transformirajući čimbenik rasta beta (TGF $\beta$ , engl. transforming growth factor beta) su protuupalni citokini i svoj protuupalni učinak ostvaruju sprječavanjem lučenja proupalnih citokina kao što su TNF $\alpha$ , IL-1, interferona gama (IFN $\gamma$ ) (37). Pokusi su pokazali da egzogeno davanje IL-10 ima za posljedicu povoljan učinak ne neurološki oporavak životinja s teškom ozljedom mozga (37). Interleukin-10 i TGF $\beta$  su nađeni u cerebrospinalnoj tekućini i serumu životinja i bolesnika s teškom ozljedom mozga te se pretpostavlja da ovi citokini smanjuju upalni odgovor u mozgu, ali pri tome uzrokuju sustavnu imuodepresiju (25).

Osim citokina, u životinja i bolesnika s teškom ozljedom mozga dolazi do lučenja kemokina u mozgu koji imaju ulogu privlačenja stanica periferne krvi u oštećeno moždano tkivo. Za IL-8, poznat kao i upalni protein makrofaga (MIP-2, engl. macrophage inflammatory protein-2), je utvrđeno da se pojačano luči u cerebrospinalnoj tekućini bolesnika s teškom ozljedom mozga u prvih 6 sati nakon ozljede mozga (38). Morganti-Kossmann i sur. su u svojim radovima

pokazali da IL-8 sudjeluje u poremećaju funkcije krvno-moždane zapreke, potiče stvaranje NGF iz astrocita u miša (39). Protein kemoatrakcije monocita 1 (MCP-1, engl. monocyte chemoattractant protein-1) nađen je u mozgu životinja sa zatvorenim ozljedom mozga 4 sata poslije ozljede, te u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4 do 16 sati nakon difuzne ozljede mozga ukazujući na njegovu značajnu ulogu u prijelazu monocita/makrofaga u oštećeno moždano tkivo gdje ove stanice potiču upalni odgovor (40).

#### ***1.1.3.3. Promjene moždanog krvnog protoka u patofiziologiji teške ozljede mozga***

Brojni pokusi na životinjama i mnoga klinička istraživanja su pokazala da teška ozljeda mozga dovodi do fokalne ili opće moždane ishemije (41-43). Iako samo 10% moždanog tkiva može biti zahvaćeno ishemijom, moždana ishemija obično dovodi do lošeg ishoda bolesnika ili pokusne životinje. Ishemija koja se javlja u životinja ili bolesnika s teškom ozljedom mozga posljedica je oštećenja živčanih stanica, astrocita, glija stanica te moždanih mikrovaskulanih i endotelnih stanica (44-46). Oštećenje moždanog tkiva i krvnih žila mozga dovodi do poremećaja moždane autoregulacije, hipoperfuzije i prostagladinima potaknutog suženja moždanih krvnih žila (16). Vrlo često bolesnik s teškom ozljedom mozga u ranom razdoblju nakon ozljede može razviti moždanu hiperperfuziju nakon koje obično slijedi razdoblje hipoperfuzije i posljedične ishemije.

U životinja i bolesnika s teškom ozljedom mozga značajno je poremećen mehanizam moždane autoregulacije koji je ključan za regulaciju moždano-krvnog protoka (suženje ili proširenje moždanih krvnih žila kao odgovor na povećanje ili sniženje moždanog perfuzijskog tlaka). Poremećaj moždane autoregulacije se može javiti odmah nakon ozljede ili se razviti tijekom vremena, a može biti prolazni ili trajni (16).

U bolesnika s teškom ozljedom mozga dolazi do poremećaja odgovora moždanih krvnih žila na koncentraciju CO<sub>2</sub> (suženje ili proširenje moždanih krvnih žila kao odgovor na hipo ili hiperkapniju) i obično se javlja odmah nakon ozljede (16). U vrlo ranom razdoblju nakon ozljede moždanog tkiva dolazi do razvoja post-traumatskog suženja krvnih žila. Post-traumatsko suženje moždanih krvnih žila je posljedica trajne depolarizacije membrane glatkih mišićnih stanica moždanih krvnih žila, a rezultat je smanjene aktivnosti kalijevih kanala, smanjenog stvaranja ATP i oslobađanja prostagladina i slobodnih kisikovih radikala (16,45).

#### ***1.1.3.4. Promjene oksigenacije i metabolizma mozga u patofiziologiji teške ozljede mozga***

Tešku ozljedu mozga obilježava neravnoteža između dostave i potrošnje kisika što ima za posljedicu razvoj tkivne hipoksije. Dužina trajanja hipoksije izravno se odražava na stupanj

oštećenja moždanog tkiva te vodi lošem ishodu. Smanjena dostava i potrošnja kisika dovodi do razvoja hipoperfuzije i moždane ishemije i prijelaza s aerobnog u anaerobni metabolizam uz povećano stvaranje energijom siromašnog laktata. Poremećaj metabolizma mozga u bolesnika s teškom ozljedom mozga rezultat je i velike koncentracije kalcija u mitohondrijima koja dovodi do poremećaja funkcije mitohondrija i nedostatnog stvaranja energijom bogatog ATP. Alternativno, kod bolesnika s teškom ozljedom mozga može se pojaviti hipermetabolizam glukoze koji je posljedica prolaznog masovnog transmembranog ulaska iona kalcija i natrija u stanicu koji dovode do sekundarne ozljede mozga (16,22).

#### ***1.1.3.5. Patofiziologija moždanog edema***

Edem mozga se često javlja u životinja i bolesnika s teškom ozljedom mozga. S obzirom na primarni mehanizam nastanka moždani edem se dijeli na vazogeni i citotoksični moždani edem (47,48). Vazogeni moždani edem je uzrokovan mehaničkim oštećenjem endotelne membrane moždanih krvnih žila. Oštećenje endotelne membrane moždanih krvnih žila dovodi do nekontroliranog ulaska iona i bjelančevina iz vaskularnog u intestinalni prostor moždanog tkiva. Anatomski, ove promjene dovode do povećanja volumena izvanstaničnog prostora (45,47). Citotoksični moždani edem je obilježen unutarstaničnim nakupljanjem vode u živčanim stanicama, astrocitima i glija stanicama, a zbog povećane propusnosti njihove stanične membrane i zatajivanja ionske pumpe. I vazogeni i citotoksični moždani edem dovodi do povećanja unutar moždanog tlaka i razvoja sekundarne ozljede (48,49).

#### **1.1.4. Epidemiologija bolesnika s teškom ozljedom mozga**

Teška ozljeda središnjeg živčanog sustava vodeći je uzrok smrtnosti i trajnih neuroloških oštećenja u mladim ljudima, u dobi između 18. i 45. godine života, u industrijaliziranim zemljama (25). Svjetska zdravstvena organizacija u svojem izvještaju iz 2004. godine o prevenciji ozljeda uzrokovanim prometnim nesrećama utvrdila je da će do 2020. godine ozljede zadobivene u prometnim nesrećama, osobito teška ozljeda središnjeg živčanog sustava, biti među tri najčešće bolesti suvremenog svijeta i uzroka invalidnosti i smrtnosti stanovništva (50). Učestalost bolesnika s teškom ozljedom mozga varira s obzirom na dob, spol, zemljopisno podneblje i druge čimbenike. Iako su epidemiološki podaci o učestalosti bolesnika s teškom ozljedom mozga u različitim zemljama različiti, procjenjuje se da se ozljeda mozga javlja u oko 100 do 600 osoba na 100 000 stanovnika, a od toga su 10% bolesnici s teškom ozljedom mozga (51). Najčešći uzrok ozljede mozga su prometne nesreće (34-50%), padovi (10%), ranjavanja hladnim ili vatrenim oružjem (9-39%) te ostali uzorci,

kao npr. zlostavljanje djece (17%) (52). S obzirom na povećani broj prometnih nesreća učestalost bolesnika s ozljedom mozga značajno je porasla u posljednjih nekoliko desetljeća (53). Procjenjuje se da godišnje oko 180 do 250 osoba na 100 000 stanovnika zadobije ozljedu mozga u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), u Francuskoj 281, u Južnoj Africi 361 osoba, u Australiji 322, a u Velikoj Britaniji 430 osoba na 100 000 stanovnika (54,55). U Europskoj Uniji godišnje se bolnički zbrinjava oko 230 osoba s ozljedom mozga na 100 000 stanovnika (53). Najveća učestalost bolesnika s ozljedom mozga je u dobi između 18. i 45. godine života. Djeca u dobi do 5. godina te starija populacija od 80. godina života također predstavljaju rizičnu skupinu za ozljedu mozga koja je i najučestaliji uzrok hospitalizacije i smrtnosti ovih bolesnika (56). S obzirom na spol, najveća učestalost ozljede mozga su mladi muškarci i procjenjuje se da dvostruko više muškaraca nego žena ima tešku ozljedu mozga i četiri puta veći rizik od smrtnog ishoda (56). Socijalno-ekonomski status također znatno utječe na učestalost osoba s ozljedom mozga, te se pokazalo da zemlje nižeg socijalno-ekonomskog statusa imaju veću učestalost bolesnika s ozljedom mozga nego visoko razvijene zemlje (57). Teška ozljeda mozga je uzrok smrtnosti u jedne trećine do jedne polovice svih smrtnosti uzrokovanih vanjskom ozljedom (54). Oko polovice bolesnika s teškom ozljedom mozga umire na mjestu nesreće (54). Prema epidemiološkim podacima SAD, procjenjuje se da će 21% bolesnika s teškom ozljedom mozga umrijeti unutar 39 dana od ozljede (58). Smrtnost bolesnika s teškom ozljedom mozga ovisi o mehanizmu ozljede, načinu liječenja i biološkim osobitostima bolesnika. Istraživanja u SAD su pokazala da bolesnici s teškom ozljedom mozga koja je zadobivena vatrenim oružjem imaju veću smrtnost (38-91%), nego bolesnici s teškom ozljedom mozga zadobivenom u prometnoj nesreći ili pri padu (10%) (54).

### **1.1.5. Mjere sprječavanja ozljede mozga**

S obzirom da se ozljede mozga vrlo često javljaju pri stradavanju osoba u prometnim nesrećama, unapređenje i pridržavanje mjera zaštite u prometu su najvažnije mjere u sprječavanju ozljede mozga. Ove mjere uključuju nošenje zaštitnih kaciga, vezanje sigurnosnim pojasevima, vožnja djece u sigurnosnim stolicama, prilagođavanje brzine vozila uvjetima u prometu i slično. Padovi se mogu spriječiti postavljanjem rukohvata na stubištima, micanju klizavih tepiha, postavljanjem sigurnosne zaštite na podove, vrata i slične mjere. Ozljede na sportskim i dječjim igralištima potrebno je spriječiti provođenjem sigurnosnih mjera kao što su ograđivanje igrališta, postavljanje podloge koja ublažava udarce i slično. Učinkovito obrazovanje i provođenje sigurnosnih mjera pri nošenju i uporabi oružja postupci su kojima se može spriječiti ranjavanje (59,60).

### 1.1.6. Dijagnostika bolesnika s teškom ozljedom mozga

Dijagnoza bolesnika s teškom ozljedom mozga postavlja se na osnovi kliničkog pregleda, nalaza CT i NMR. Klinički pregled podrazumijeva neurološku procjenu stanja svijesti bolesnika korištenjem GCS. Na osnovu GCS bolesnici s teškom ozljedom mozga su oni kod kojih je GCS manja ili jednaka 8. Neurološki pregled procjenjuje težinu ozljede mozga ispitivanjem oblika i veličine zjenica te njihovog odgovora na svjetlost. Sužavanje zjenica posredovano je parasimpatičkim podražajem trećeg moždanog živca i njegovih jezgara u mozgu. Jednostrano široka zjenica je rezultat pritiska na treći moždani živac, oštećenja njegovih jezgri ili samoga živca. Oštećenje optičkog živca, koji se obično javlja kod ozljeda prednjeg moždanog režnja, očituje se ukočenim i tromim zjenicama. Obostrano ukočene zjenice se javljaju u oko 20% do 30% bolesnika s teškom ozljedom mozga i obično ukazuje na loš ishod liječenja (58). Nereaktivne zjenice su obično povezane s nikim GCS, lošim nalazom CT na kojem se vide zatvorene bazalne cisterne (58). Detaljna dijagnoza teške ozljede mozga postavlja se radiološkim tehnikama: CT i NMR. Pokazalo se da 68% do 94% bolesnika s teškom ozljedom mozga ima patološki nalaz CT koji se najčešće očituje kao pritisak na bazalne cisterne, traumatsko subarahnoidalno krvarenje, subduralni hematom, unutar moždano krvarenje, pomak srednje moždane crte (58). Na osnovi CT nalaza ozljeda mozga se najčešće dijeli na šest razreda korištenjem Marshalllove razradbe (Tablica 3) (61).

**Tablica 3. Marshallova razradba ozljede mozga**

<b>razina 1</b>	normalni nalaz CT (smrtnost 9,6%)
<b>razina 2</b>	cisterne otvorene, pomak < 5 mm (smrtnost 13,5%)
<b>razina 3</b>	cisterne potisnute, pomak < 5 mm (smrtnost 34%)
<b>razina 4</b>	pomak > 5 mm (smrtnost 56,2%)

Kompjuterizirana tomografija je brza, visoko pouzdana i široko primjenjivana tehnika u dijagnostici i praćenju tijeka liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga. Uz CT i NMR se koristi u dijagnostici ozljede mozga, a njezina je prednost u detaljnijem prikazu moždanih struktura i njihovih oštećenja. Nuklearna magnetska rezonancija je vrlo učinkovita tehnika u dijagnostici difuzne aksonalne ozljede (10).

## **1.1.7. Liječenje bolesnika s teškom ozljedom mozga**

### ***1.1.7.1. Opća načela liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga***

Opća načela liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga čine održavanje prikladnog i stabilnog moždanog perfuzijskog tlaka, održavanje prikladne moždane i tkivne oksigenacije, izbjegavanje hipo- i hiperkapnije, hipo- i hiperglikemije te sekundarne ozljede mozga. Uvođenje ovih načela u kliničku praksu razlikuje se između različitih centara za zbrinjavanje ozljede mozga. Uzrok ove različitosti je u različitoj povijesnoj praksi, lokalnim načelima te nedostatku jasnih dokaza o koristi pojedinih terapijskih postupaka u liječenju bolesnika s teškom ozljedom mozga. Većina centara danas primjenjuje Smjernice za liječenje teške ozljede mozga donijete od strane Zaklade za ozljedu mozga (BTF engl. Brain Trauma Foundation), Američkog udruženja neurokirurga (AANS, engl. American Association of Neurological Surgeons) i Kongresa neurokirurga (CNS, engl. Congress of Neurological Surgeons) koje su prvi puta donijete 1995., prerađene 2001. te konačno dopunjene 2007. godine (67).

#### *1.1.7.1.1. Smjernice za liječenje bolesnika s teškom ozljedom mozga*

##### **1.1.7.1.1.1. Liječenje hipoksije i hipertenzije**

U bolesnika s teškom ozljedom mozga hipoksija i hipotenzija uzrokuju sekundarnu ozljedu mozga, te povećavaju postotak razvoja komplikacija i smrtnosti (16,18). Cilj liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga je izbjegavati i liječiti hipotenziju tj. održavati hemodinamsku stabilnost ovih bolesnika. Potrebno je spriječiti pad sistoličkog tlaka ispod 90 mmHg, održavati srednji arterijski tlak između 90 do 110 mmHg, a puls održavati između 60 i 100 otkucaja u minuti. Ovi ciljevi se postižu prikladnom volumskom nadoknadom i primjenom vazoaktivnih lijekova. Održavanje prikladnog sustavnog krvnog tlaka preduvjet je zadovoljavajuće moždane cirkulacije. Uz hemodinamsku stabilnost bolesnika s teškom ozljedom mozga potrebno je izbjegavati hipoksiju tj. smanjenje parcijalnog tlaka ugljikovog dioksida u arterijskoj krvi ( $\text{PaCO}_2$ ) ispod 60 mmHg ili saturacije arterijske krvi ( $\text{sO}_2$ ) ispod 90%, a to se postiže prikladnom strojnom ventilacijom. Bolesnike s teškom ozljedom mozga potrebno je endotrahealno intubirati i strojno ventilirati da bi se postigli ciljni respiracijski parametri, a to su:  $\text{sO}_2 > 95\%$ ,  $\text{PaCO}_2$  4,5–5,0 kPa. Ove vrijednosti se postižu podešavanjem parametara strojne ventilacije, a oni uključuju: udisajni volumen 6-8 ml/kg tjelesne težine uz udahnutu frakciju kisika ( $\text{FiO}_2$ )  $< 0,6$ , podešavanje pozitivnog tlaka na kraju izdaha (PEEP, engl. positive end expiratory pressure) od 4  $\text{cmH}_2\text{O}$  do razine potrebne za primjerenu

oksidaciju, inspiracijski plato oko 0,2 sekunde, vršni tlak u dišnim putovima < 30 cm H<sub>2</sub>O, odnos udisaja i izdisaja 1:2 (63).

#### 1.1.7.1.1.2. Hiperosmolarno liječenje

Hiperosmolarne tekućine koje se danas koriste u kliničkoj praksi bolesnika s teškom ozljedom mozga su manitol i hipertonična otopina. Manitol se koristi za snižavanje povišenog unutar moždanog tlaka zbog povoljnog učinka na ICP, moždani perfuzijski tlak (CPP, engl. cerebral perfusion pressure) te metabolizam mozga. Još uvijek postoje nesuglasice o točnom mehanizmu djelovanja manitola. Smatra se da manitol djeluje putem dva različita mehanizma. Jedan je da manitol djeluje kao plazma ekspander, smanjuje hematokrit, povećava elastičnost eritrocita smanjujući time viskoznost krvi, što povećava protok krvi kroz mozak i dostavu kisika u moždano tkivo (64-65). Ovaj učinak manitola se ostvaruje unutar nekoliko minuta od primjene te se smatra da se ovim mehanizmom može objasniti brzi učinak manitola na smanjenje ICP. Drugi mehanizam djelovanja manitola je njegov osmotski učinak tj. povlačenje vode iz stanica u međustanični i unutaržilni prostor. Za ovaj učinak je potrebno oko 15 do 30 minuta, a traje od 90 minuta do 6 sati. Osim manitola, za snižavanje ICP ograničeno se preporuča korištenje hipertoničnih otopina. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja hipertoničnih otopina na ICP je osmotski prijelaz vode preko krvno-moždane zapreke i smanjenje tekućine unutar moždanog tkiva. Drugi mehanizam je da hipertonične otopine „dehidriraju“ endotelne stanice i eritrocite povećavajući promjer krvnih žila dovodeći do povećanja volumena plaze i povećanog protoka krvi kroz moždano tkivo. Negativni učinak hipertoničnih otopina je povećani rizik razvoja plućnoga edema kod bolesnika u kojih dodatno postoje srčana ili plućna patologija (66).

#### 1.1.7.1.1.3. Postavljanje sustava za mjerenje unutar moždanog tlaka

Postavljanje sustava za mjerenje ICP podrazumijeva postavljanje katetera za mjerenje ICP u epiduralni, subduralni, subarahnoidalni, tkivni ili ventrikularni prostor. Ventrikularni sustav za mjerenje ICP se najčešće koristi i predstavlja standard za mjerenje ICP. Unutar moždani tlak označava tlak unutar lubanje, a time i moždanog tkiva i cerebrospinalne tekućine i normalno iznosi od 7 do 15 mmHg. Unutar moždani tlak znatno utječe na CPP koji predstavlja razliku između srednjeg arterijskog tlaka (MAP, engl. mean arterial pressure) i ICP i najvažniji je čimbenik o kojemu ovisi funkcionalna sposobnost i cjelovitost moždanih stanica. U bolesnika s teškom ozljedom mozga dolazi do povišenja ICP i razvoja intrakranijalne hipertenzije koje nepovoljno utječe na ishod liječenja ovih bolesnika. Postavljanje sustava za mjerenje ICP te

stalno mjerenje ICP se preporuča u bolesnika s teškom ozljedom mozga. Ciljevi liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga je održavanje ICP < 15 mmHg i CPP 60 do 70 mmHg. To se može postići prikladnom ventilacijom, analgosedacijom, drenažom cerebrospinalne tekućine i primjenom hiperosmolarnih otopina (67).

#### 1.1.7.1.1.4. Analgezija i sedacija

Brojni analgetici i sedativi se koriste u liječenju bolesnika s teškom ozljedom mozga zbog svojih povoljnih učinaka (68). Oni smanjuju lokalne i druge štetne podražaje koji mogu dovesti do povećanja ICP, sustavnog arterijskog tlaka i tjelesne temperature koji dodatno kompliciraju tijek liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga. Najčešći korišteni sedativi u liječenju bolesnika s teškom ozljedom mozga su barbiturati, propofol i benzodijazepini. Od 1930.-tih godina prošloga stoljeća zna se da visoke doze barbiturata smanjuju ICP na način da smanjuju tonus i otpor krvnih žila mozga, metabolizam mozga, sprječavaju stvaranje slobodnih kisikovih radikala posredovano aktivacijom lipidne peroksidaze te sprječavaju aminokiselinama posredovano oštećenje moždanog tkiva (69,70). Propofol smanjuje moždani metabolizam i moždanu potrošnju kisika te se često primjenjuje za smanjenje i kontrolu ICP (71). Međutim zbog mogućeg razvoja tzv. sindroma infuzije propofolom (hiperkalijemija, hepatomegalija, lipemija, metabolička acidoza, popuštanje srca, randomioliza, bubrežno zatajivanje) uporabu propofola u bolesnika s teškom ozljedom mozga treba ograničiti na kraći vremenski period (72). Tradicionalno, benzodijazepini su se dugo vremena izbjegavali primjenjivati u bolesnika s teškom ozljedom mozga zbog svojeg depresivnog učinka na središnji živčani sustav i dugotrajnog djelovanja. Međutim, otkrićem midazolam započela je široka primjena benzodijazepina u bolesnika s teškom ozljedom mozga zbog kraćeg djelovanja i dobre kontrole agitacije uzrokovane strojnom ventilacijom (73). Uz sedative, analgezija opijatima (morfin) i opioidima (fentanil, sufentanil, alfentanil, remifentanil) se primjenjuje u liječenju bolesnika s teškom ozljedom mozga. Iako su brojne studije pokazale malo, ali značajno povećanje ICP nakon davanja fentanila i sufentanila, istraživanje Lavera i sur. je pokazalo da sporo davanje opioida ne dovodi do povećanja ICP (74).

#### 1.1.7.1.1.5. Nadzor moždane oksigenacije

Liječenje teške ozljede mozga je usmjereno sprječavanju sekundarne ozljede mozga. Da bi se ovaj cilj postigao potrebno je osigurati dostatnu dostavu kisika i glukoze u moždano tkivo. Dostava kisika u mozak je rezultat sadržaja kisika u krvi moždanog krvnog protoka. Dostava glukoze u mozak također ovisi o moždanom krvnom protoku. Da bi se omogućio nadzor



dostave kisika i drugih tvari moždanom tkivu, posljednjih nekoliko godina razvile se su metode stalnog nadzora moždanog krvnog protoka. Ove metode nadziru moždani krvi protok izravno (trans-kranijalni dopler, termalne difuzijske probe) ili neizravno (nadzor saturacije jugularne vene, infracrvena spektrometrija) ili procjenjuju metaboličko stanje mozga (moždana mikrodijaliza). Brojna su istraživanja koja preporučuju njihovu uporabu u kliničkoj praksi u bolesnika s teškom ozljedom mozga, ali do sada nema dovoljno čvrstih dokaza koji bi ukazali da su podatci, koje ove metode donose, korisni u liječenju i prognozi ovih bolesnika (75).

#### 1.1.7.1.1.6. Hiperventilacija

Agresivna hiperventilacija ( $\text{PaCO}_2 < 25 \text{ mmHg}$ ) se dugo vremena koristila za liječenje bolesnika s teškom ozljedom mozga zbog svojeg učinka u snižavanju ICP. Hiperventilacija smanjuje ICP uzrokujući suženje moždanih krvnih žila i posljedično smanjenje moždanog krvnog protoka. Zadnjih 20 godina istraživanja su pokazala da je moždani krvni protok značajno smanjen prvog dana nakon ozljede mozga te postoji mogućnost moždane ishemije primjenom agresivne hiperventilacije u prvim danima nakon ozljede. Stoga se preporuča da se agresivna hiperventilacija izbjegava 24 sata nakon teške ozljede mozga, a ako se i koristi tijekom daljnjeg liječenja preporuča se nadzor jugularne venske saturacije i moždane tkivne oksigenacije (76).

#### 1.1.7.1.1.7. Profilaktična hipotermija

Iako se hipotermija (snižavanje tjelesne temperature) često profilaktički primjenjuje za snižavanje ICP u bolesnika s teškom ozljedom mozga, znanstvena literatura je nedostatna da podrži činjenicu da hipotermija povoljno djeluje na ishod liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga. Preliminarni rezultati ukazuju da bi hipotermija mogla smanjiti smrtnost s teškom ozljedom mozga ako se primjenjuje više od 48 sati (77).

#### 1.1.7.1.1.8. Sprječavanje epileptičkih napadaja

Procjenjuje se da u 4 do 42% bolesnika s teškom ozljedom mozga dolazi do pojave epileptičkih napadaja. Oni mogu biti rani i pojavljuju se unutar 7 dana od ozljede ili kasni koji se javljaju nakon 7 dana. Epileptički napadaji mogu dovesti do povećanja ICP, sustavnog arterijskog tlaka, smanjene dostave kisika moždanome tkivu te oslobađanja velike količine živčanih prijenosnika. S druge strane, antikonvulzivni lijekovi mogu uzrokovati osip, ataksije,

Steven-Johnsonov sindrom pa se stoga profilaktična uporaba antikonvulzivnih lijekova ne preporuča. Njihovu primjenu treba procijeniti individualno ovisno o bolesniku (78).

#### 1.1.7.1.1.9. Sprječavanje duboke venske tromboze

Bolesnici s teškom ozljedom mozga imaju veliki rizik za razvoj duboke venske tromboze. Većina dubokih venskih tromboza je tiha bez značajnih nepovoljnih učinaka (79). Studija Page i sur. je pokazala da se u 0,38% bolesnika s teškom ozljedom mozga javlja plućna embolija kao posljedica tromboze dubokih vena nogu (80). Plućna embolija je povezana s visokim stupnjem smrtnosti u ovih bolesnika. Stoga je sprječavanje duboke venske tromboze u bolesnika s teškom ozljedom mozga važna mjera njihovog liječenja. Mjere sprječavanja duboke venske tromboze uključuju bandažu nogu i davanje niskomolekularnog heparina. Davanje niskomolekularnog heparina može uzrokovati unutar moždano i sustavno krvarenje koje može biti tek neznatno, ali i smrtonosno. Iako Smjernice za liječenje bolesnika s teškom ozljedom mozga preporučuju davanje niskomolekularnog heparina, izbor i način davanja lijeka ovisi o osobinama samog bolesnika (81)

#### 1.1.7.1.1.10. Prehrana

Do 80-tih godina prošloga stoljeća opće je bilo prihvaćeno mišljenje da su kod bolesnika s teškom ozljedom mozga smanjene energetske potrebe. Međutim zadnjih 25 godina brojne studije su pokazale da u bolesnika s teškom ozljedom mozga postoji stanje hipermetabolizma i povećano stvaranje dušikovih spojeva (83,83). Mjerenja su pokazala da se utrošak energije u bolesnika s teškom ozljedom mozga kreće od 120% do 250% od očekivanog (83). Stoga je u bolesnika s teškom ozljedom mozga potrebno ostvariti potpunu kalorijsku nadoknadu unutar tjedan dana od ozljede. Kalorijsku nadoknadu treba započeti za ne dulje od 72 sata od ozljede. Ona se ostvaruje bilo parenteralnim, bilo enteralnim putem te njihovom kombinacijom. Najčešći način prehrane je enteralni putem oro- ili nazo-gastrične sonde. Ne postoje posebne formule za prehranu bolesnika s teškom ozljedom mozga već se daju one formule koje sadrže i ugljikohidrate i lipide i bjelančevine, često uz dodatak glutamina, arginina, omega-3-masnih kiselina, vitamina i drugih tvari. S obzirom da hiperglikemija pogoršava hiposkično-ishemijsko oštećenje mozga preporuča se održavati normoglikemiju u bolesnika s teškom ozljedom mozga (84).

#### 1.1.7.1.1.11. Kortikosteroidi

Kortikosteroidi su prvi puta uvedeni u liječenje moždanog edema ranih 60-tih godina prošloga stoljeća. Pokusi su pokazali da su kortikosteroidi vrlo korisni u obnovi povećane popustljivosti krvnih žila mozga kod moždanog edema, smanjenja lučenja cerebrospinalne tekućine i sprječavanju stvaranja slobodnih kisikovih radikala (98). Povoljan učinak kortikosteroida očituje se u smanjenju moždanog edema, osobito u bolesnika s tumorom mozga (86). Kortikosteroidi su se koristili u širokoj praksi u različitim neurokirurškim zahvatima te su se 70-tih godina prošloga stoljeća počeli primjenjivati i u liječenju bolesnika s teškom ozljedom mozga. Međutim, istraživanja u 80-tim i 90-tim godinama prošloga stoljeća nisu uspjela pokazati povoljan učinak kortikosteroida u liječenju bolesnika s teškom ozljedom mozga (87-90). Da bi se ispitao učinak kortikosteroida na ishod liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga početkom ovoga stoljeća provedena je velika prospektivna randomizirana placebo kontrolirana multicentrična studija (CRASH trail, engl. Corticosteroid Randomization after Significant Head Injury) koja je uključila 10 008 bolesnika s teškom ozljedom mozga (91). Ova studija je pokazala nepovoljan učinak visoke doze kortikosteroida na ishod liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga. Ovi rezultati su ukazali na imunosupresivni učinak kortikosteroida u bolesnika s teškom ozljedom mozga. Stoga današnje Smjernice za liječenje bolesnika s teškom ozljedom mozga ne preporučuju primjenu kortikosteroida već ih smatraju potencijalno štetnima (92).

#### *1.1.7.1.2. Specifično liječenje bolesnika s teškom ozljedom mozga*

Razumijevanje patofiziologije teške ozljede mozga dovelo je do uvođenja brojnih farmakoloških tvari u liječenju bolesnika s teškom ozljedom mozga. Iako se ciljane farmakološka terapija pokazala učinkovitom u životinjskim pokusnim modelima, njihova primjena u kliničku praksu nije polučila zadovoljavajuće rezultate.

#### 1.1.7.1.2.1. Antagonisti kalcijevih kanala

Antagonisti kalcijevih kanala smanjuju ulazak kalcija u stanicu na način da blokiraju kalcijeve kanale. S obzirom da je teška ozljeda mozga obilježena brzim ulaskom velike količine kalcija u stanicu s posljedičnom staničnom disfunkcijom, antagonisti kalcijevih kanala korišteni su u životinjskim pokusnim modelima teške ozljede mozga i pokazali su se vrlo učinkovitim u ishodu njihovog liječenja (93). Primjena antagonista kalcijevih kanala, osobito nimodipina, pokazala se učinkovita u liječenju bolesnika s aneurizmatiskim subarahnoidalnim krvarenjem (94), pa je stoga bilo logično očekivati da će njihova primjena biti učinkovita i u bolesnika s

teškom ozljedom mozga. Međutim, provedena klinička istraživanja su pokazala da primjena antagonista kalcijevih kanala, uključujući i nimodipin, u liječenju bolesnika s teškom ozljedom mozga značajno ne pridonose boljem ishodu liječenja ovih bolesnika (95).

#### 1.1.7.1.2.2. Aminosteroidi

Teška ozljeda mozga dovodi do disfunkcije mitohondrija, aktivacije lipidne peroksidaze, oslobađanja slobodnih kisikovih radikala i u konačnici smrti stanice (16). Predklinička istraživanja u pokusnim životinjskim modelima teške ozljede mozga su pokazala da inhibitori lipidne peroksidaze, kao što je tirilazad mesilat, smanjuje razvoj komplikacija i smrtnog ishoda ovih životinja (96). Međutim, klinička primjena aminosteroida kao što je tirilazad mesilat, nije bila učinkovita u liječenju bolesnika s teškom ozljedom mozga (97).

#### 1.1.7.1.2.3. Antagonisti NMDA receptora

U pokusnim i kliničkim istraživanjima jasno je dokazano da u životinja i bolesnika s teškom ozljedom mozga dolazi do oslobađanja velike količine glutamata koji aktivacijom svojim NMDA receptora uzrokuje ionsku neravnotežu s posljedičnim bubrenjem i u konačnici smrti stanice (18). Iako su istraživanja na pokusnim životinjskim modelima pokazala povoljan učinak antagonista NMDA receptora (npr. selfotel, traxoprodil, D-CCP-ene) na preživljavanje životinja s teškom ozljedom mozga, njihova primjena u kliničkoj praksi nije bila učinkovita (98-100).

#### 1.1.7.1.2.4. Magnezij

Magnezij djeluje kao antagonist kalcijevih kanala i NMDA receptora, a utvrđeno je i da povećava moždani krvi protok (101). S obzirom na navedena svojstva, očekivalo bi se da magnezij ima povoljan učinak na ishod liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga. Davanje magnezija u životinjskim pokusnim modelima s teškom ozljedom mozga pokazalo se učinkovitim, međutim klinička istraživanja nisu polučila ovakve rezultate (102-106).

#### 1.1.7.1.2.5. Sintetski kanabinoidi

Zadnjih nekoliko godina intenzivno se istražuje endokanabinoidni sustav za koji vjeruje da može imati potencijalno zaštitnu ulogu u središnjem živčanom sustavu. Ovaj se sustav sastoji od dva receptora, CB1 i CB2 i tri tipa ednokanabinodinih liganada te endogenih kanabinoida koji su derivati arahidonske kiseline (107). CB1 receptor se nalazi na središnjem živčanom sustavu i brojnim perifernim tkivima dok je CB2 receptor nađan na stanicama imunološkog

sustava, ali ne i u mozgu (107-109).Vezujući se na svoj receptor kanabionidi, među ostalim učincima, smanjuju oslobađanja glutamata i proupalnih citokina te sprječavaju oslobađanje slobodnih kisikovih radikala za koje se zna da imaju nepovoljan učinak u patofiziološkim zbivanjima ozljede moždanog tkiva (111,112). Primjena sintetskog kanabionoida HV-211 (dexanabinola) pokazala je povoljan učinak u smanjenju smrtnosti pokusnih životinja i bolesnika s teškom ozljedom mozga u fazi I i fazi II kliničkog ispitivanja (112). Međutim, velika multicentrična placebo-kontrolirana faza III kliničkog ispitivanja primjene dexanabinola u bolesnika s teškom ozljedom mozga je pokazala da njegova primjena nema povoljan učinak na ishod liječenja ovih bolesnika (113).

#### 1.1.7.1.2.6. Modulatori kinin/kalikeinskog sustava

Oštećenje moždanih struktura dovodi do aktivacije kinin/kalikerinskog sustava koji pojačavanja upalni odgovor oslobađanjem dušičnog oksida, citokina, slobodnih kisikovih radikala i glutamata (114). Ove učinke bradikinin, tvar kininskog/kalikeinskog sustava, ostvaruje vezivanje za receptore B1 i B2 (115,116). Davanje antagonista receptora B1 i B2 testirano je u nekoliko životinjskih modela i u kliničkim studijama bolesnika s teškom ozljedom mozga (117,119). Iako su se rezultati činili obećavajući, osobito u istraživanjima na životinjskim modelima, niti jedna studija nije pokazala povoljan učinak njihove primjene na ishod liječenja u bolesnika s teškom ozljedom mozga (118).

#### 1.1.7.1.2.7. Progesteron

Značajan broj radova je pokazao da se progesteron nalazi u mozgu čovjeka i životinja i da ima potencijalno zaštitni učinak na mozak (120,121). U pokusima u životinjama s teškom ozljedom mozga se pokazalo da progesteron značajno smanjuje moždani edem, gubitak živčanih stanica te sprječava razvoj sekundarne ozljede mozga (120,). Rezultati predkliničkih studija doveli su do kliničke primjene progesterona u liječenje bolesnika s teškom ozljedom mozga. I faza I i faza II kliničkog ispitivanja su pokazale da bolesnici s teškom ozljedom mozga koji su liječeni progesteronom imaju manju smrtnost i bolji ishod liječenja (124). Ovi rezultati ukazuju da bi progesteron mogao biti jedan od značajnih specifičnih farmakoloških tvari u liječenju bolesnika s teškom ozljedom mozga.

### **1.1.8. Komplikacije u bolesnika s teškom ozljedom mozga**

Komplikacije koje se javljaju u bolesnika s teškom ozljedom mozga su brojne i predstavljaju značajan medicinski i socijalno-ekonomski problem. Ovisno o osobitostima i duljini trajanja

ozljede mozga, komplikacije mogu biti fizičke, kognitivne, emocionalne i bihevioralne. Teška ozljeda mozga može uzrokovati prolazni ili trajni poremećaj stanja svijesti kao što je moždana koma, trajno vegetativno stanje ili moždana smrt (125,126). Često se u bolesnika s teškom ozljedom mozga javljaju poremećaji motorike kao što je tremor, ataksija, mioklonusi ili Parkinsonova bolest (125,126). Rizik pojave post-traumatskih epileptičkih napadaja je izrazito velik u ovih bolesnika (127). Gubitak vida, sluha ili okusa se javlja kada je oštećen onaj dio mozga gdje se nalazi centar za pojedini osjet (6). Dijabetes insipidus s posljedičnom elektrolitnom neravnotežom dodatna je komplikacija teške ozljede mozga koja zahtijeva brzo i učinkovito liječenje. Poremećaji u ponašanju često se javljaju u preživjelih bolesnika s teškom ozljedom mozga, a očituju se kao nedostatak pažnje, amnezija, poremećaj rasuđivanja i mišljenja, smanjenje brzine obrađivanja informacija, nedostatak izvršnih funkcija kao što su planiranje, procjenjivanje, rješavanje zadanih problema (125). Bolesnici koji prežive tešku ozljedu mozga mogu imati problema u shvaćanju ili izgovaranju izgovorenih i napisanih riječi i rečenica. Oni često pate od depresije, anksioznosti, manije, apatije, agresije, bipolarnog poremećaja, shizofrenije te ovisnosti o alkoholu ili drogama (128).

Tijek liječenja ovih bolesnika često se dodatno komplicira razvojem tzv. nozokomijalnih infekcija. Nozokomijalne infekcije su infekcije koje se javljaju 48-72 sata nakon primitka bolesnika u bolnicu, a očituju se kao upala pluća, infekcija mokraćnog sustava i/ili sepsa. Najčešći uzročnici nozokomijalnih infekcija ovise o podneblju, o putu ulaska uzročnika infekcije, o karakteristikama svakog pojedinog bolesnika, te brojnim ostalim čimbenicima. Nozokomijalne infekcije zahvaćaju oko 30% svih bolesnika liječenih u jedinicama intenzivnog liječenja (129). Bolesnici s ozljedom središnjeg živčanog sustava različite etiologije najpodložniji su pojavi nozokomijalnih infekcija s učestalošću od 21-60%. Nozokomijalne infekcije u ovih bolesnika predstavljaju najčešću ekstrakranijalnu komplikaciju koja produljuje tijek i negativno utječe na ishod njihovog liječenja (130). Mogući uzroci razvoja infekcija u bolesnika s teškom ozljedom mozga su mnogostruki, a uključuju primjenu invazivnih mjera intenzivnog liječenja. Danas se zna da je ozljeda središnjeg živčanog sustava neovisni čimbenik koji nepovoljno utječe na imunološki sustav čineći bolesnike s ozljedom središnjeg živčanog sustava sklonim k razvoju infekcija.

## **1.2. STANICE KOJE SUDJELUJU U IMUNOLOŠKOJ REAKCIJI**

### **1.2.1. Limfociti B**

Limfociti B su populacija stanica koja na svojoj površini izražava B stanični receptor (BCR, engl. B cell receptor) tj. molekulu imunoglobulina (Ig) koja predstavlja receptor za specifične antigenske epitope (131). Limfociti B su nosioci protutijelima posredovane imunosti. Naziv im potječe od kratice za limfni organ gdje nastaju, a to je koštana srž u sisavaca (engl. bone marrow) ili Fabriciusova burze u ptica (engl. bursa of Fabricius). Glavna funkcija limfocita B je stvaranje protutijela, služe kao antigen predočne stanice (APS), mogu lučiti i citokine te sudjelovati u regulaciji imunološkog odgovora.

#### ***1.2.1.1. Biljezi limfocita B***

Receptor za antigen za limfocite B (BCR) je molekula protutijela (Ig) i integralni je dio stanične membrane. Molekula Ig se sastoji od dva jednaka laka i teška lanca na kojim se razlikuje varijabilna (V) i konstantna (C) regija. Varijabilna regija teškog lanca sadrži tri dijela V, D i J koji se nasumice rekombiniraju u procesu zvanom VDJ rekombinacija i stvaraju jedinstvenu varijabilnu domenu Ig za svaki limfocit B (132). Na osnovi građe teškog lanca Ig se dijele u klase ili razrede te se razlikuje pet osnovnih protutijela: IgA, IgD, IgE, IgG i IgM. Membranski odsječak molekule Ig je kratak pa se nakon vezivanja s antitijelom ne može prenijeti signal u stanicu. Za to dodatno služi heterodimerna molekula građena od dvaju polipeptidnih lanaca  $Ig\alpha/\beta$  ( $CD79\alpha$  i  $CD79\beta$ ). Zajedno s receptorom Ig ove molekule čine B stanični receptorski kompleks. Molekule  $Ig\alpha/\beta$  imaju citoplazmatski rep na kojem su ITAM sekvencije (engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif) preko kojih se pokreće unutarstanično signaliranje (131). Limfociti B na svojoj površini izražavaju molekule koje se nazivaju koreceptorskim molekulama i čine B stanični koreceptorski kompleks (132). Taj kompleks čine molekule CD19, CD21, CD81. Citoplazmatski dijelovi ovih molekula su povezani citoplazmatskim dijelovima molekula  $Ig\alpha/\beta$  i pojačavaju prijenos signala u stanicu. Na površini limfociti B izraženi su i receptori koji vežu nespecifični dio molekule protutijela (Fc ulomak), a to su CD23 i CD32. CD23 je receptor slabog afiniteta za Fc ulomak IgE te se smatra da mu je glavna funkcija endocitoza imunokompleksa sastavljenih od IgE i antigena. CD32 je receptor za Fc ulomak IgG i izražen je na površini svih limfocita B, a odgovoran je prijenos inhibicijskog signala u stanicu (132). Na površini limfocita B nalaze se molekule ili antigeni MHC-II i kostimulacijska molekule B7 koje osposobljavaju limfocite B da djeluju kao APC. Aktivirani limfocit B izražavaju molekulu CD40 koja se veže za CD40 ligand na

aktiviranom limfocitu T što je ključno za daljnju aktivaciju i diferencijaciju limfocita B nakon prepoznavanja antigena. Aktivirani biljezi na limfocitima B uključuju i receptore za različite citokine kao što su receptor za IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 (131,132).

### ***1.2.1.2. Sazrijevanje limfocita B***

Limfociti B u većine sisavaca nastaju u koštanoj srži, zatim prolaze nekoliko stadija razvoja koji se dijelom događaju u koštanoj srži, a dijelom u sekundarnim limfnim organima. Sazrijevanje limfocita B u koštanoj srži unaprijed je programiran slijed događaja, dok se sazrijevanje u sekundarnim limfnim organima događa pod utjecajem tuđeg antigena i podložno je djelovanju limfocita T. Glavna zbivanja u sazrijevanju limfocita B odnose se na preuređenje gena za molekulu protutijela (membranski imunoglobulin). S obzirom na vrijeme i mjesto pojave imunoglobulina na površini stanice, može se razlikovati nekoliko stadija u sazrijevanju limfocita B: prastanice limfocita B, stanice pro-B, stanice pre-B, nezreli limfociti B, zreli naivni limfociti B, memorijski limfocit B i plazma stanice (132). Prastanice limfocita B izražavaju molekulu CD34, biljeg matičnih stanica, ali ne i biljeg svojstven limfocitima B. U stadiju pro-B budući limfocit B započinje preuređivanje gena za varijabilnu regiju teškog lanca Ig razreda IgM za koji je nužna aktivnost proteina RAG-1 i RAG-2 (engl. recombinant activatory genes) i koji su odgovorni za aktivaciju procesa genetske rekombinacije. Slijedi rekombinacija, a na stanici se počinju izražavati molekule glavnog sustava tkivne srodnosti (MHC, engl. major histocompatibility complex) razreda II, signalne molekule CD79 $\alpha$  i CD79 $\beta$  i koreceptorske molekule CD19, te molekule CD10 i CD20. Zatim slijede stanice pre-B u kojih dolazi do preuređenja gena i aktivnog stvaranja lanca  $\mu$ . Stanice pre-B udružuju teški lanac  $\mu$  s lažnim lakim lancem tvoreći pro-B stanični receptor koji je važan za daljnje sazrijevanje limfocita B. U daljnjem stadiju, stanica preuređuje gene i za laki lanac pa nastaju pravi Ig koji se izražavaju na površini stanice zajedno sa signalnim i koreceptorskim molekulama. Tako nastaje nezreli limfocit B koji iz koštane srži prelazi u periferne limfatične organe (131). Poslije odlaska u periferiju nezreli limfocit B podliježe odabiru (selekciji) na osnovi prilagodbe receptora za vlastite molekule. Ako prilagodba receptora ne uspije limfocit B će biti uklonjen klonalnom delecijom (132). Nezreli limfocit B uz IgM na svojoj površini izražava i IgG te koreceptorski kompleks CD21. Ovaj limfocit se naziva zreli naivnim ili djevičanskim. Kada zreli naivni limfocit B dođe u kontakt s tuđim antigenom započinje proces sekundarne diferencijacije koji se odvija uz pomoć CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> limfocita T i pod utjecajem citokina (132). Pod utjecajem limfocita T i citokina dolazi do genskog prekapčanja



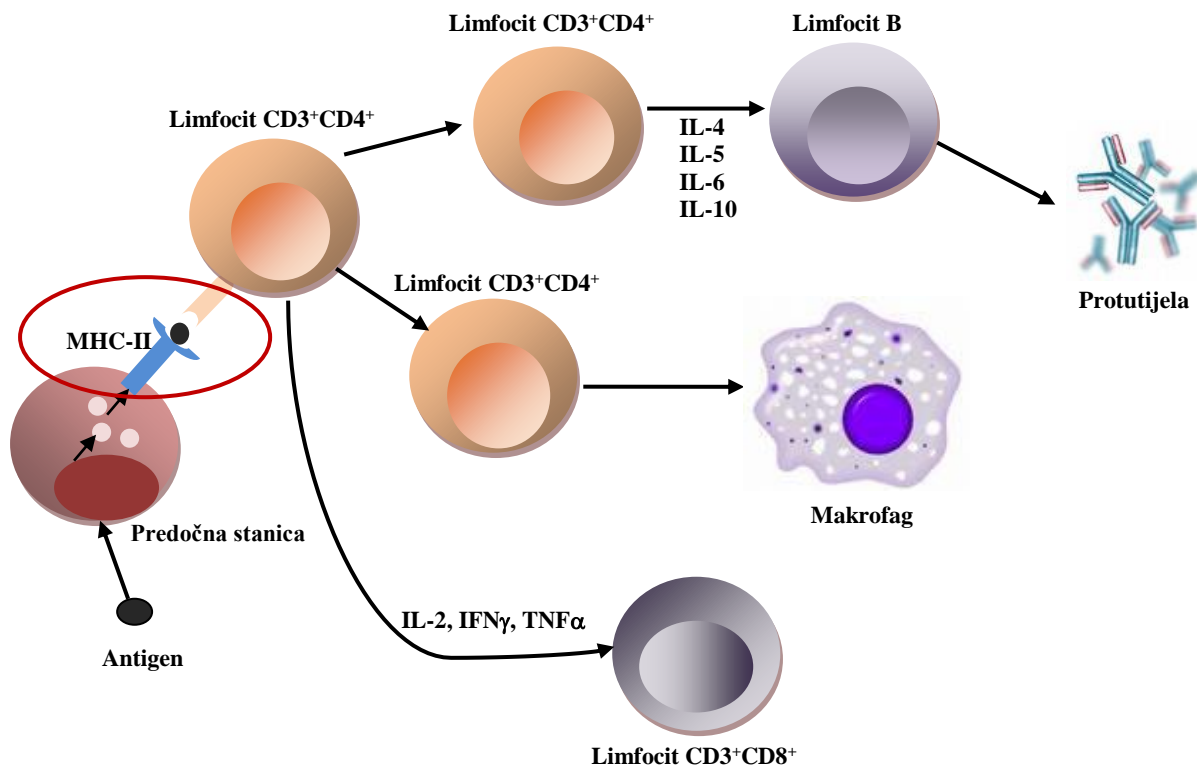
i izražaja molekula Ig (IgM, IgG, IgA, IgE) na površini limfocita B. Konačno limfociti B se diferenciraju u plazma stanice, koje luče protutijela, ili memorijske stanice. Plazma stanice su vrlo kratkoga vijeka i gube većinu biljega limfocita B. Memorijske stanice su dugoga vijeka i imaju sposobnost recirkulacije.

#### ***1.2.1.3. Subpopulacije limfocita B***

Najbrojnija skupina limfocita B su limfociti B2. Oni su nosioci humoralne imunosti, nastaju u koštanoj srži i razvijaju se na prethodno opisani način. Oko 5% do 10% svih limfocita u krvi i perifernim tkivima čine limfociti B1. Većina ih izražava biljeg CD5 koji je svojstven limfocitima T (133). Molekula CD5 ublažava prijenos signala nakon aktivacije BCR tako da limfociti B1 mogu biti aktivirani samo jakim antigenima kao što je bakterijski polisaharidi. Svojstvo limfocita B1 je da spontano izlučuju samo protutijela razreda IgM, ne surađuju s limfocitima T, ne razvijaju imunološko pamćenje te stoga predstavljaju stanice urođene imunosti (134). Nedavno je utvrđeno da postoji još jedna subpopulacija limfocita B tzv. regulacijski limfociti B. Za njih je svojstveno da se diferenciraju tijekom upale kao što je autoimuni eksperimentalni encefalitis, reumatoidni artritis, sustavni eritematozni lupus (135). Ove stanice smanjuju upalni odgovor lučenjem IL-10 i TGF $\beta$  i na taj način potiču proces cijeljenja i oporavka (136).

#### ***1.2.1.4. Funkcija limfocita B***

Funkcija limfocita B je prepoznavanje tuđeg antigena, predočavanje antigena limfocitima T i lučenje protutijela. Svaki limfocit B na svojoj površini izražava BCR koji veže specifični antigenski epitop. Limfociti B odgovorni su i za predočavanje antigena, osobito topljivih, koji ne mogu predočiti druge antigen predočne stanice. Nakon što se antigen veže za odgovarajući imunoglobulinski receptor na limfocitu B, on se internalizira, preradi i predoči CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> limfocitu T na površini stanice u sklopu molekule MHC-II. Međudjelovanjem receptora limfocita Th2 i kompleksa MHC/antigen na limfocitu B, adhezijskih molekula (CD40/CD40L) te citokina (IL-4, IL-5, IL-6) limfocit B proliferira i diferencira se u plazma satnicu koja luči protutijela (Slika 2) (137).



**Slika 2. Shematski prikaz funkcije limfocita B. (objašnjenje u tekstu; slika prilagođena iz Čulo F, Višnjic S. Stanična imunost. U: Čulo I, Batinić D, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska Naklada; 2010; str. 225-237.)**

### 1.2.2. Limfociti T

Limfociti T su uz stanice NK, nosioci stanične imunosti. Naziv im potječe od timusa, limfatičnog organa gdje limfociti sazrijevaju. Limfociti T nastaju u koštanoj srži iz hematopoetskih matičnih stanica, sazrijevaju u timusu, a svoju funkciju vrše u krvi, limfi i perifernim limfnim organima.

#### 1.2.2.1. Biljezi limfocita T

Za limfocite T je svojstven receptor limfocita T (TCR, engl. T cell receptor) koji je izražen na površini njihove membrane, a odgovoran je za prepoznavanje antigena vezanog za vlastite molekule MHC na površini APS (132). Receptor limfocita T je heterodimer koji se sastoji od  $\alpha$  i  $\beta$  lanca ( $TCR\alpha\beta$ ) ili  $\gamma$  i  $\delta$  lanca ( $TCR\gamma\delta$ ). Oko 95% limfocita T izražava  $TCR\alpha\beta$ , a samo 5%  $TCR\gamma\delta$ . Građa obje vrste TCR je slična. Svaki lanac TCR se sastoji od izvanstaničnog dijela kojeg čine N-terminalne imunoglobulinske varijabilne domene i jedna Ig konstantna

domena, zatim transmembranske regije i kratkog citoplazmatskog repa na C terminalnom kraju lanca (138). U varijabilnoj izvanstraničnoj domeni nalaze se hipervarijabilne regije koje su drugačije za svaki pojedini klon limfocita T. Konstantni dio je isti unutar pojedine podvrste lanaca. Lanci su međusobno povezani disulfidnim vezama. S obzirom da TCR ima vrlo kratke unutarstanične domene i signal se ne može prenijeti u stanicu, za to je potreban T stanični receptorski kompleks. Njega čine molekule CD3 i lanac zeta. Molekula CD3 sadrži tri različita polipeptidna lanca ( $\gamma, \delta, \epsilon$ ) koji su vrlo slični lancima  $Ig\alpha$  i  $Ig\beta$  u limfocitima B. Njihov citoplazmatski dio sadrži sekvenciju ITAM koja sudjeluje u aktivaciji tirozin kinaze i prijenosu aktivacijskog signala u stanicu. Limfociti T na svojoj površini izražavaju kostimulacijske molekule CD4 i CD8. To su polipeptidi koji se vežu za molekule MHC izvan mjesta vezivanja TCR i time učvršćuju vezu između TCR na limfocitima T i sustava MHC/antigen na APS (138). I molekulu CD4 i CD8 izražavaju limfociti s  $TCR\alpha\beta$  i na osnovu njihove izraženosti razlikuju se pojedine subpopulacije.  $CD3^+CD4^+$  limfociti T prepoznaju tuđi antigen vezan za molekulu MHC-II, dok  $CD3^+CD8^+$  limfociti T prepoznaju tuđi peptid u sklopu molekule MHC-I (132). Za aktivaciju limfocita T, osim TCR i koreceptora, potreban je i drugi kostimulacijski signal koji se ostvaruje vezivanjem nekoliko kostimulacijskih molekula. Najpoznatiji kostimulacijski par čine molekule CD28 na limfocitu T i molekule B7-1 (CD80) i B7-2 (CD86) na APS. Vezivanjem ovih molekula dolazi do unutarstaničnog signaliranja i lučenja čimbenika rasta za limfocite T. Po aktivaciji limfociti T prestaju izražavati molekulu CD28, a izražavaju molekulu CD152 (CTLA-4) koja prenosi negativni signal i smanjuje aktivaciju limfocita T. Aktivirani limfociti T na svojoj površini izražavaju CD40L koja se veže za molekulu CD40 na površini limfocita B i pomaže njihovoj aktivaciji. Tijekom prepoznavanja antigena i prijenosa signala limfociti T izražavaju molekulu CD2 čija je glavna uloga adhezija limfocita. Molekula CD45 je izražena na svim leukocitima i ima aktivnost tirozin-fosfataze, a važna je u prijenosu signala. Izoforma molekule CD45 na aktiviranim limfocitima T (CD45RO) se udružuje s receptorskim kompleksom limfocita T i pospješuje prijenos signal u stanicu, dok izoforma molekule CD45 na nepodraženim stanicama (CD45RA) ne stvara aktivacijski kompleks (132). Aktivacijski biljezi limfocita T mogu biti rani i kasni. Rani aktivacijski biljezi se pojavljuju na površini stanice nekoliko sati nakon aktivacije, a kasni mnogo kasnije. Rani aktivacijski biljezi limfocita T su molekula CD25 ( $\alpha$  lanac za receptor IL-2), receptor za transferin (CD71), kostimulacijska molekula CD69 (132). Kasni aktivacijski biljezi limfocita T su molekula MHC-II i aktivacijski biljezi integrinske obitelji adhezijskih molekula (VLA-1-5) (138).

### ***1.2.2.2. Sazrijevanje limfocita T***

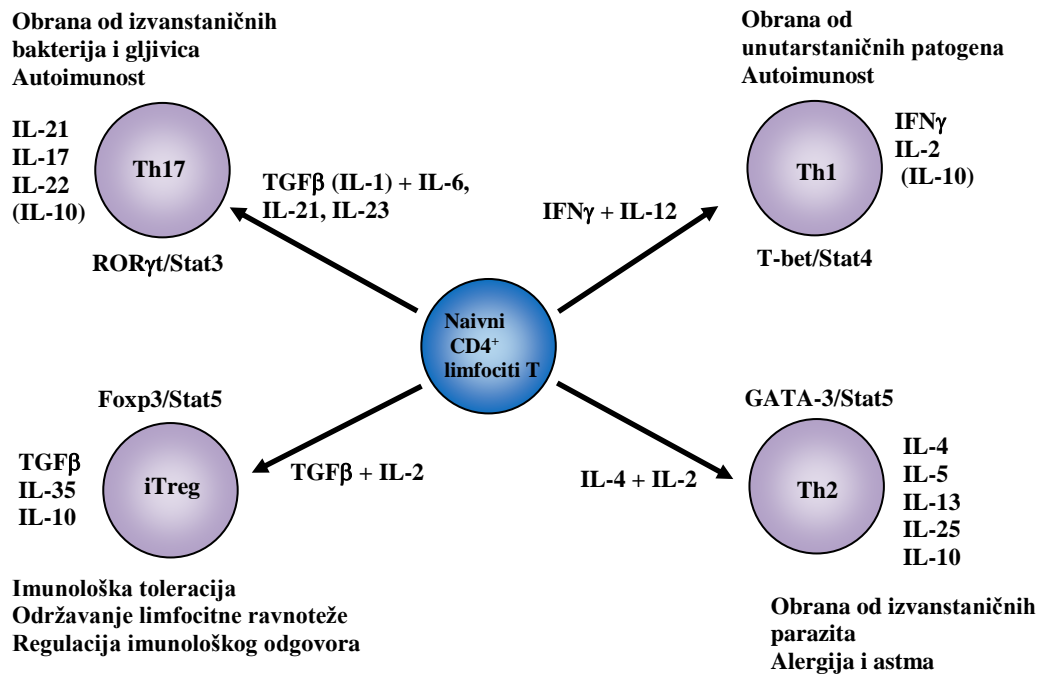
Prastanice limfocita T nastaju u koštanoj srži i dolaze u timus gdje limfociti T sazrijevaju i postaju spregnuti na vlastito tj. prepoznaju antigen samo kad je predočen u sklopu molekule MHC na površini APS. Prastanice limfocita T kada dođu u timus još nemaju biljege svojstvene za limfocite T već izražavaju samo adhezijske molekule CD34 i CD44 te receptor za čimbenik rasta matičnih stanica (CD117) (139). U jezgri ovih stanica nalazi se enzim terminalna-deoksinukleotidil-transferaza (TdT) koja sudjeluje u preuredbi gena za antigenski receptor limfocita. Dolaskom u timus, timociti sazrijevaju u kontaktu sa stromom timusa. Prvi stadij timocita su dvostruko negativni ( $CD4^-CD8^-$ ) timociti koji ne izražavaju ni TCR niti molekulu CD3. Prva molekula koju izražavaju timociti je CD25, a aktiviraju se RAG-1 i RAG-2 nakon čega slijedi preuredba gena za lanac  $\beta$  TCR, sinteza  $\beta$  TCR i sinteza CD3 kompleksa. Lanac  $\beta$  se izražava na površini timocita i udružuje s lažnim  $\alpha$  lancem (pre-T $\alpha$ ). Većina dvostruko negativnih timocita razvit će se u limfocite T s receptorom građenim od  $\alpha$  i  $\beta$  lanca, a tek manji dio s receptorom koji su građeni od  $\gamma$  i  $\delta$  lanca. Uspješna sinteza pre-T receptora dovodi do sinteze molekula CD4 i CD8. Takvi timociti sada su dvostruko pozitivni jer izražavaju istovremeno biljege CD4 i CD8. U ovoj fazi stanice započinju sintezu  $\alpha$  lanca i stvaranje pravog TCR $\alpha\beta$ . Istovremeno se sintetiziraju molekule CD3 kompleksa. Sazrijevanje dvostruko pozitivnih stanica s TCR se zbiva u kortikomedularnoj granici, ali i srži timusa gdje timociti dolaze u dodir s APS. Ovdje se događa pozitivna ili negativna selekcija što znači da će preživjeti samo one stanice koje slabim afinitetom vežu vlastite peptide u sklopu molekule MHC. Nakon pozitivnog odabira dvostruko pozitivni timociti postaju intermedijarne stanice ( $CD4^+CD8^{low}$ ) koje se diferenciraju u jednostruko pozitivne ( $CD4^+CD8^-$  ili  $CD4^-CD8^+$ ) zrele timocite. Točan mehanizam kojim se dvostruko pozitivni timociti diferenciraju u  $CD4^+$  ili  $CD8^+$  stanice nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da u tome važnu ulogu ima IL-7 i transkripcijski čimbenici koji reguliraju prijenos gena Cd4 i Cd8, a to su Th-PKO (engl. T-helper-inducing POK/Knupper-like factor) RUNX-3 (engl. run related transcription factor 3), TOX (engl. thymus high- mobility group box protein) i GATA-3 (engl. GATA-3 binding protein) (140). Prijenos signala putem TCR u dvostruko pozitivnih timocita dovodi do uzhodne regulacije transkripcijskog čimbenika TOX koji održava ili povećava transkripciju gena Cd4 i diferencira dvostruko pozitivne u intermedijarne timocite. Ako je prijenos signala putem TCR ovisan o vezi s molekulom MHC-II i ako je to signal u trajanju u intermedijarnih timocita dolazi do ushodne regulacije transkripcijskih čimbenika GATA-3 i Th-POK koji potiču njihovu diferencijaciju u  $CD4^+$  limfocite T. Suprotno tome, ako je TCR na

intermedijarnom timocitu vezan za molekulu MHC-I i ako nema trajanja signala putem TCR, zakočena je aktivacija transkripcijskim čimbenika GATA-3 i Th-POK, a ushodno reguliran izražaj transkripcijskog čimbenika RUNX-3. Transkripcijski čimbenik RUNX-3 uzrokuje izražaj gena Cd8 i diferencijaciju intermedijarnih timocita u CD8<sup>+</sup> limfocite T. Smatra se da je za diferencijaciju CD8<sup>+</sup> limfocita T potrebna nazočnost IL-7 (141). Od sveukupnog broja timocita samo 5% odlazi na periferiju kao zreli limfociti T, a 95% ih umire u timusu procesom apoptoze. Nakon sazrijevanja u timusu, zreli limfociti T odlaze u cirkulaciju i periferne limfatične organe. Limfociti T koji nisu u dodiru s antigenom nazivaju se naivni ili djevičanski limfociti T, a nakon dodira s antigenom prelaze u izvršne ili memorijske stanice.

### ***1.2.2.3. Subpopulacije limfocita T***

#### ***1.2.2.3.1. Obilježja i funkcija CD4<sup>+</sup> limfocita T***

CD4<sup>+</sup> limfociti T izražavaju karakterističan fenotip TCR $\alpha\beta$ CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. Ove stanice su središnje stanice imunoloških zbivanja jer povezuju i usklađuju humoralni i stanični imunološki odgovor. CD4<sup>+</sup> limfociti T pomažu limfocitima B u stvaranju protutijela, potiču makrofage u pojačavanju njihove antimikrobne aktivnosti i pomažu u sazrijevanju CD8<sup>+</sup> limfocita T. Aktivacija CD4<sup>+</sup> limfocita T započinje prepoznavanjem tuđeg antigena u sklopu molekule MHC-II na površini APS. Međudjelovanje CD4<sup>+</sup> limfocita T i APS ostvaruje se putem receptorskih, koreceptorskih, adhezijskih i kostimulacijskih molekula s posljedičnim prenošenjem aktivacijskog signala u stanicu. Prvi signal prenosi specifični receptor limfocita T (TCR) i kompleks molekula MHC-II/antigen te koreceptorska molekula CD4, dok drugi signal posreduju kostimulacijske molekule CD28 na limfocitu T i CD80/CD86 na APS te kompleks CD40/CD40L (132,142). Aktivacijski signal dovodi do proliferacije limfocita T pod utjecajem IL-2 koje luče i same stanice T. Aktivirani CD4<sup>+</sup> limfociti T se potom diferenciraju u nekoliko subpopulacija: Th1, Th2, Th17 i regulacijske limfocite T (iTreg) (Slika 3) (142).



**Slika 3. Obilježja i funkcija CD4<sup>+</sup> limfocita T (obrazloženje u tekstu; slika prilagođena iz Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, function, and faults. Blood 2008;112:1557-69.)**

Postoje još i regulacijski CD4<sup>+</sup> limfociti T kao stanice Th3 ili TR1. Stanice Th3 su CD4<sup>+</sup> limfociti T koji proizvode i luče TGFβ i imaju značajni immunosupresivni učinak (143). Glavno obilježje stanica TR1 je lučenje IL-10. S obzirom da stanice Th1, Th2 i Th17 te Treg mogu u određenim uvjetima lučiti IL-10, smatra se da stanice TR1 nisu posebna subpopulacija CD4<sup>+</sup> limfocita T već samo stadij u diferencijaciji pojedinih CD4<sup>+</sup> limfocitnih subpopulacija (144-146).

Limfociti Th1 izlučuju IFNγ, IL-2 i TNFα, a najvažnija im je uloga aktivacija citotoksičnih limfocita i makrofaga. Nastaju iz naivnih CD4<sup>+</sup> limfocita T pod utjecajem IFNγ, IL-12 i IL-18 koji putem transkripcijskih čimbenika T-bet i Stat-4 dovode do Th1 diferencijacije (147-150). Suprotno tome, aktivacija transkripcijskih čimbenika GATA-3 i Stat-5 pod utjecajem IL-4 i IL-2 naivni CD4<sup>+</sup> limfociti T se diferenciraju u stanice Th2 koje izlučuju IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-25, a glavna im je zadaća pomaganje limfocitima B u njihovoj diferencijaciji i proizvodnji protutijela (151,152). Limfociti Th17 posebna su subpopulacija CD4<sup>+</sup> limfocita T. Za ove stanice je svojstveno da nastaju iz naivnih CD4<sup>+</sup> limfocita T pod utjecajem TGFβ, IL-6, IL-17, IL-21, IL-23, luče IL-10, IL-17α, IL-17β, IL-21, IL-22 i posreduju u imunološkom odgovoru protiv izvanstaničnih bakterija i gljivica (153). Th17 limfociti T imaju značajnu

ulogu u autoimunim bolestima. Stanice Treg izražavaju svojstven fenotip  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ . Iako aktivirani limfociti T izražavaju CD25, najveći izražaj ovog biljega je zabilježen na stanicama Treg. Transkripcijski čimbenik FoxP3 je glavni transkripcijski regulator za stanice Treg (154,155). Diferencijacija stanica Treg nastaje iz naivnih  $CD4^+$  limfocita T pod utjecajem TGF $\beta$  i IL-2, a putem transkripcijskih čimbenika FoxP3 i Stat-5. Ove stanice luče TGF $\beta$ , IL-10, IL-35, a zadaća im je održavanje imunološke tolerancije, limfocitne ravnoteže i regulacije imunološkog sustava. I limfociti Th1 i Th2 i Treg lučenjem njima svojstvenih citokina ograničavaju svoje funkcije čime se osigurava razvoj imunološke reakcije u smjeru koji će najbolje spriječiti zarazu i održati učinkovitu imunološku ravnotežu (142).

#### *1.2.2.3.2. Obilježja i funkcija $CD8^+$ limfocita T*

Fenotip svojstven  $CD8^+$  limfocita T je TCR $\alpha\beta CD3^+CD4^-CD8^+$ . Nakon dodira s antigenom koji prepoznaje u sklopu molekule MHC-I na APS  $CD8^+$  limfociti T se diferenciraju u izvršne citotoksične stanice koje u izravnom dodiru ubijaju ciljnu stanicu. Za njihovu aktivaciju potrebno je istovremeno vezivanje TCR i kompleksa antigen/MHC-I te kostimulacijskih molekula CD28 na limfocitu T i CD80 i CD86 na ciljnoj stanici. Nadalje, za aktivaciju  $CD8^+$  limfocita T potrebni su i  $CD4^+$  limfociti T koji prepoznaju antigene na istoj predočnoj stanici u sklopu molekule MHC-II i diferenciraju se u stanice Th1. Stanice Th1 potom luče IL-2 koji se veže za visoko afinitetni IL-2R na  $CD8^+$  limfocitu T. Pod utjecajem IL-2  $CD8^+$  limfocit T se umnaža i nastaju  $CD8^+$  citotoksični limfociti T. Ove stanice izravno ubijaju ciljnu stanicu lučenjem citotoksičnih posrednika iz svojih granula (perforin, granulizin, granzimi) ili pojačavanjem izražaja smrtonosnih liganada (FasL, TNF, TWEAK, TRAIL) koji se vežu za smrtonosne receptore na ciljnoj stanici (FasR, TNFR, DR3, DR4, DR5) uzrokujući smrt ciljne stanice (132).

#### *1.2.2.3.3. Obilježja i funkcija $\gamma/\delta$ limfocita T*

$\gamma/\delta$  limfociti T, kao i  $\alpha/\beta$  limfociti T, razvijaju se u timusu i potječu od zajedničkih timocita. Za razliku od  $\alpha/\beta$  limfocita T,  $\gamma/\delta$  limfociti T imaju TCR $\gamma\delta$  koji je građen od jednog  $\gamma$  i jednog  $\delta$  lanca i pokazuje manju varijabilnost nego TCR $\alpha\beta$ . Ova subpopulacija limfocita čini oko 5% svih limfocita T i najbrojnija je u sluznici probavnog trakta i epitelnom sloju kože.  $\gamma/\delta$  limfociti T nisu ovisni o prepoznavanju antigena u sklopu molekule MHC, već antigene prepoznaju izravno bez APS (132). Ove stanice uglavnom prepoznaju bakterijske glikolipide i

fospolipide, ali i proteine toplinskog stresa. Nedavno je pokazano da  $\gamma/\delta$  limfociti T mogu izravno fagocitirati antigene te ih mogu predočiti na svojoj površini u sklopu molekula MHC (156). Smatra se da je jedna od glavnih uloga  $\gamma/\delta$  limfocita T u ranoj obrani od prodiranja patogenih mikroorganizama s obzirom da im se broj jako povećava u akutnoj fazi upale. Ove stanice luče i brojne citokine koji potiču citotoksičnu aktivnost i prema patogenima, ali prema tumorskim stanicama (156).

### **1.2.3. Stanice NK-T**

Stanice NK-T su populacija limfocita T koje posjeduju neke osobine stanica NK. Za njih je svojstveno da svojim receptorom prepoznavanju glikolipidne antigene vezane s molekulom CD1d na APS. Stanice NK-T čine oko 0,2% svih limfocita T u perifernoj krvi (157). Za razliku od miša gdje su stanice NK-T nalaze u jetri (30-50%), koštanoj srži (20-30%), timusu (10-20%), u čovjeka su stanice NK-T osim u krvi nađene i jetri (4%), ali ne i u limfnim čvorovima (158).

#### ***1.2.3.1. Biljezi stanica NK-T***

Iako se naziv stanice NK-T koristiti tek odnedavno, ove stanice su prvi puta opisane još 1987. godine kao subpopulacija limfocita T koja na svojoj površini izražava biljeg NK1.1 (CD161) u miša tj. CD56 u čovjeka tj. biljeg svojstven stanicama NK. One čine most između urođene i stečene imunosti. Ta razliku od „klasičnih“  $\alpha\beta$  limfocita T koje tuđi antigen prepoznaju u sklopu vlastite molekule MHC, TCR izražen na stanicama NK-T prepoznaje glikoproteine u sklopu molekule CD1d. Uz molekule CD3, stanice NK-T mogu biti CD4<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup> ili CD8<sup>+</sup>. Aktivacijom stanice NK-T na svojoj površini izražavaju aktivacije biljege CD44 i CD69. Stanice NK-T posjeduju i druge značajke stanica NK kao što je izražavanje molekula CD16 i CD56 (158).

#### ***1.2.3.2. Sazrijevanje stanica NK-T***

Kao i „klasični“ limfociti T, stanice NK-T sazrijevaju u timusu. One nastaju iz male frakcije timocita koji na svojoj površini tijekom razvoja dobivaju TCR koji prepoznaje molekulu CD1d. Tipični TCR u stanica NK-T u miša čine međusobno povezani lanci V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18, te V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7 ili V $\beta$ 2, a u čovjeka lanci V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q i V $\beta$ 11 (159). Vezivanjem male skupine timocita s molekulom CD1d na površini dvostruko pozitivnih timocita dolazi do intertimusnog odabira i razvoja stanica NK-T. Uz molekulu CD1d koja je ključna u razvoju



stanica NK-T na njihovu diferencijaciju utječu i IL-15, IL-7, čimbenik stimulacije kolonija granulocita i monocita (GM-CSF, engl. granulocyte-monocyte-colony stimulatory factor) te transkripcijski čimbenici (Ty, NF $\kappa$ B) (160). Istraživanja su pokazala manjkavost u razvoju stanica NK-T u ljudi i životinja koji nemaju adaptorsku molekulu SLAMF7 koje je odgovorna za prijenos signala putem transkripcijskih čimbenika Ty, PKO i NF $\kappa$ B (161). Također se pokazalo da manjkavost u lučenju IL-7 i IL-15 ili GM-CSF dovodi do razvoja neučinkovitih stanica NK-T (161,162).

### **1.2.3.3. Subpopulacije i funkcija stanica NK-T**

Opisane su dvije subpopulacije stanica NK-T; tip I i tip II (158). Tip I stanica NK-T se naziva nepromjenjive (invarijabilne) stanice NK-T koje imaju nepromjenjivi TCR (TCRV $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 i V $\beta$ 8.2-7 u miša, TCR V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 i V $\beta$ 11 u čovjeka). Tip II stanica NK-T su promjenjive stanice NK-T koje izražavaju promjenjivi receptor TCR (161). Većina istraživanja se odnosi na tip I stanica NK-T. Utvrđene su i druge subpopulacije nepromjenjivih stanica NK-T: CD4<sup>+</sup> i CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> stanice NK-T. Međutim razlike u njihovoj funkciji još uvijek su predmet istraživanja (163). Senio i sur. su u svojim istraživanjima pokazali da CD4<sup>+</sup> stanice NK-T luče citokine Th1 i Th2 dok CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> stanice NK-T luče samo Th1 citokine (163). Također je pokazano da se CD4<sup>+</sup> stanice nakupljaju u plućnom tkivu bolesnika s astmom i luče IL-4 i IL-13 (164,165). Subpopulacija CD4<sup>+</sup> stanica NK-T igra ključnu ulogu u poticanju tkivne tolerancije (166).

Za stanice NK-T je svojstveno da odgovaraju na podražaj s glikolipidom  $\alpha$ -galaktoceramidom koje ove stanice prepoznaju u sklopu molekule CD1d na površini APS (hepatocita, limfocita B, makrofaga, dendritičkih stanica). Stanice NK-T mogu lučiti Th1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) i Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) citokine koji imaju imunomodulacijsko djelovanje. Za stanice NK-T je pokazano da imaju važnu ulogu u diferencijaciji CD4<sup>+</sup> limfocita T u smjeru Th1 ili Th2, održavanju tolerancije na vlastite i tuđe antigene (sprječavanje autoimunosti) te u kontroli tumorskog rasta (161). Također se smatra da stanice NK-T sudjeluju u regulaciji hemotopoeze i u obrani od infektivnih čimbenika kao što su mikobakterija, plazmodij, listerija (161).

### **1.2.4. Stanice NK**

Stanice NK su otkrivene ranih 70-tih godina prošloga stoljeća, a ime su dobile od engleskog naziva natural killer što znači prirodno ubilačku stanicu. Donedavno uvriježeno mišljenje da stanice NK pripadaju stanicama prirodne tj. nespecifične imunosti, zamijenjeno ne novim

saznanjima da NK stanice u ponovnom dodiru s ciljnim stanicama luče više i brže IFN $\gamma$ , i što dokazuje da one posreduju svojstvo imunološkog pamćenja. U najmanju ruku danas se drži dan stanice NK imaju regulacijska svojstva i nadziru funkcije limfocita T prema specifičnom antigenu (167,168). Za razliku od limfocita T, stanice NK ne izražavaju specifičan receptor za antigen i stoga ne prepoznaju antigene u sklopu molekule MHC. Stanice NK se razlikuju fenotipski od ostalih limfocita prema izražavanju adhezijske molekule CD56 i dvaju receptora koji su zajednički stanicama NK i monocita: receptor Fc $\gamma$  III (CD16) i receptor za C3b ulomak komplementa (CR3/CD11G). Smatra se da je NKp46 pravi biljeg stanica NK jer je ta molekula izražena isključivo na njihovoj površini. S limfocitima T dijele adhezijsku molekulu CD2 i biljeg CD8. Tradicionalan fenotip stanica NK u čovjeka je CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>. Dodatno stanice NK izražavaju adhezije molekule CD44, CD49a, LFA-3, ICAM, citokinske i kemokinske receptore (IL-2R, IL-1R, IL-18R, CCR7) (169).

#### ***1.2.4.1. Receptori stanica NK***

Lyngerrer i Karre su 1990. godine predložili hipotezu „missing self“ koja govori da stanice NK prepoznaju sve vlastite stanice koje ubikvitarno izražavaju molekulu MHC-I i ne ubijaju ih, ali zato ubijaju stanice koje nemaju ili imaju promijenjenu molekulu MHC-I (170). Ova je hipoteza zadnjih nekoliko godina dopunjena saznanjima da stanice NK imaju inhibicijske i aktivacijske receptore. Aktivnost inhibicijskih receptora prevladava nad aktivnosti aktivacijskih u vrijeme kada stanica miruje (171). Međutim, u određenim uvjetima kao što je infekcija ili tumorski rast aktivacijski signali prevladavaju nad inhibicijskim i aktiviraju stanice NK što u konačnici dovodi do razaranja ciljne stanice. Receptori na stanicama NK mogu imati i inhibicijski i aktivacijski učinak na stanice NK. Oni pripadaju jednoj od tri glavne superobitelji. To su receptori skupine KIR (engl. killer cell-Ig-like-receptor), zatim receptori CD94 i NKG2 koji pripadaju superobitelji C-tipu lektina te receptori ILT (engl. immunoglobulin-like transcripts) (172). Receptori iz skupine KIR pripadaju velikoj obitelji imunoglobulina koji specifično prepoznaju molekule HLA-A, B, C. Oni su kodirani genima koji su smješteni na kromosomu 19p13.4 (173). KIR receptori su jednolančani, a mogu sadržavati dvije (KIR2D) ili tri (KIR3D) imunoglobulinske domene. Oba oblika mogu imati kraće (KIR2DS, KIR3DS) ili duže (KIR2D2, KIR3D2) citoplazmatske dijelove. Dugački citoplazmatski dio KIR receptora prenosi inhibicijski signal u stanicu NK, dok kratki citoplazmatski rep djeluje aktivacijski na stanicu NK. Inhibicijski signal je rezultat nazočnosti ITIM sekvencija (engl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) koju nakon fosforilacije privlače inhibicijske tirozin fosfataze SHP1 i SHP2 (engl. SH2-domain

containing tyrosin phosphatase 1 i 2) te SHIP1 fosfataze (engl. SH2-domain containing inositol phosphate 5 phosphatase). Ove fosfataze defosforiliraju tirozinske ostatke i koče signale putove koji nastavaju aktivacijom stanica NK (174). Suprotno tome, kratki citoplazmatski dio sadržava ITAM sekvenciju (engl. immunoreceptor tyrosine-based activating motif) čijom fosforilacijom dolazi do niza lančanih signalnih zbivanja koji imaju za posljedicu aktivaciju stanica NK (173). Drugu skupinu receptora na stanicama NK čini molekula CD94 koja se kvalitativno veže s jednom od molekula iz obitelji NKG2 (NKG2A-NKG2F). Geni koji kodiraju ove molekule se nalaze na kromosomu 12p12.3-p13.1 (175). Molekule NKG2 određuju da li će receptor CD94 imati inhibicijski ili aktivacijski učinak. Jedino kompleks CD94/NKG2A prenosi inhibicijski signal u stanicu NK jer sadrži ITIM sekvenciju, dok su ostali heterodimerni aktivacijski receptori (173). Ligandi za dimere CD94/NKG2A i CD94/NKG2C su molekule HLA-A, B, C, D i dobri su pokazatelji njihove sinteze na APS. Suprotno ostalim molekulama iz obitelji NKG2, molekula NKG2D je izražena na površini stanica NK, NK-T i CD8<sup>+</sup> limfocita T kao homodimer i ne veže se s receptorom CD94 (175). NKG2D je aktivacijski receptor, a svoj učinak ostvaruje vezivanjem s adaptorskim molekulama (DAP 10, KAP 10) (176,177). S obzirom na unutarstanične domene molekule NKG2D nema signalnu sekvenciju, prijenos podražaja u stanicu ide putem molekule DAP 10. DAP 10 sadrži sekvenciju koja potiče fosfatidil-inozitol kinazu na fosforilaciju i poticanje citoskičnosti stanice NK (178). Još jedan skupina receptora je svojstvena stanicama NK. Nazivaju se receptori ILT ili LIR (engl. leukocyte immunoglobulin like receptors). Ovi receptori su kodirani genima na kromosomu 19 u blizini gena za receptore obitelji KIR. Primarno su ovi receptori izraženi na mijeloidnim stanicama, dendritičnim stanicama i limfocitima B. Receptor ILT-2 (LIR-1) je svojstven stanicama NK i veže se s molekulama HLA-I uključujući i HLA-C (179-181).

#### ***1.2.4.2. Sazrijevanje stanica NK***

Točan put sazrijevanja stanica NK do danas nije u potpunosti razjašnjen. Brojni radovi su pokazali da stanice NK nastaju u koštanoj srži iz hematopoetskih progenitorskih CD34<sup>+</sup> stanica pod utjecajem IL-15 (182-184). Caliguri i sur. podijelili su razvoj stanica NK u dvije faze (185). U ranoj fazi progenitorske CD34<sup>+</sup> stanice iz kojih će nastati stanice NK izražavaju receptore za tirozin kinazu flt-3 i c-kit, odgovaraju na njihove ligande te se diferenciraju u intermedijarne stanice pre-NK (CD34<sup>+</sup>IL-15R<sup>+</sup>). U drugoj fazi IL-15 potiče razvoj zrelih CD56<sup>+</sup>bright stanica NK. Ovi autori smatraju da se razvoj stanica NK odvija i izvan koštane srži i to u sekundarnim limfnim organima (limfni čvorovi, slezena). Na to upućuje nazočnost

stanica CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> pre-NK u sekundarnim limfnim organima (185). Smatra se da hematopoetske progenitorske stanice (CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) iz koštane srži dolaze u krv, dolaze u sekundarne limfne organe (limfni čvorovi) procesom ekstravazacije te se naseljavaju u parafolikularni prostor. Pod utjecajem APS i topljivih čimbenika (IL-15, IL-21) prelaze faze sazrijevanja do zrelih stanica CD56<sup>bright</sup> i CD56<sup>dim</sup>. Zrele stanice CD56<sup>dim</sup> odlaze u cirkulaciju eferentnim limfnim putem, dok stanice CD56<sup>bright</sup> ostaju u sekundarnim limfnim organima (186-188). Pretpostavlja se da stanice CD56<sup>dim</sup> nastaju iz stanica CD56<sup>bright</sup> (189). DiSanto i sur. pak smatraju da u čovjeka stanice CD56<sup>bright</sup>, slično kao i u miša, mogu nastati u timusu iz limfatičkih prekursora pod utjecajem aktiviranog NOTCH gena i transkripcijskih čimbenika GATA-3 i IL-7 (184). GATA-3 potiče izražavanje receptora za IL-7 ili CD127 koji je svojstven samo timičkim stanicama NK jer osigurava njihov razvoj pod utjecajem IL-7. Moguće je da timičke stanice nastaju samo u fetalno doba i da se iz timusa aktivno šire cirkulacijom u sekundarne limfatične organe (190).

#### ***1.2.4.3. Subpopulacije i funkcije stanica NK***

U čovjeka stanice NK čine oko 15% svih limfocita, a mogu se podijeliti s obzirom na gustoću molekule CD56 na njihovoj površini. Oko 90% stanica NK čine stanice CD56<sup>dim</sup> koje izražavaju visoku razinu receptora CD16, dok samo 10% stanica čine CD56<sup>bright</sup> koje ne izražavaju ili tek neznatno izražavaju molekulu CD16 (172). Poznato je da se molekula CD16 veže s protutijelima vezanim na ciljnoj stanici i posreduje u procesu stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima. Subpopulacije stanica NK međusobno se razlikuju po načinu sazrijevanja i funkcijskim obilježjima. Za stanice CD56<sup>bright</sup> je svojstveno da imaju sposobnost lučenja brojnih citokina (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-15, IL-12, IL-23, IL-13), ali pokazuju malu citotoksičnu aktivnost. Za razliku od njih, stanice CD56<sup>dim</sup> pokazuju značajnu citotoksičnost prema ciljnim stanicama, luče tek neznatnu količinu citokina i imaju malu sposobnost proliferacije (172,173). Ove dvije subpopulacije stanica NK međusobno se razlikuju u izražavanju adhezijskih molekula. Stanice CD56<sup>bright</sup> izražavaju visoku razinu biljega CD62 za koji se vjeruje da uzrokuje prijelaz stanica CD56<sup>bright</sup> u limfne čvorove i na mjesto upale gdje one započinju ili potiču imunološki odgovor (191). Stanice CD56<sup>bright</sup> konstitutivno izražavaju visoko ili intermedijarno afinitetni receptor za IL-2 te proliferiraju i na male doze IL-2 (185). Nasuprot tome, stanice CD56<sup>dim</sup> izražavaju intermedijarno afinitetni receptor za IL-2 pa su potrebne velike doze IL-2 za njihovu proliferaciju. IL-2 potaknuta aktivacija stanica CD56<sup>bright</sup> rezultira lučenjem velike količine citokina osobito IFN $\gamma$  (192). Jednom aktivirane stanice CD56<sup>bright</sup> mogu ubijati ciljne stanice jednakom učinkovitosti kao i

stanice CD56<sup>dim</sup>. Stanice CD56<sup>bright</sup> su veliki agranulirani limfociti i izražavaju visoku razinu receptora KIR (185). Suprotno, stanice CD56<sup>dim</sup> izražavaju i receptore KIR i receptore C-lektinskog tipa, granulirani su i u svojim granulama sadrže citoskične posrednike (185). Fan i sur. su u svojim istraživanjima pokazali da obje subpopulacije svježe izoliranih stanica NK malo izražavaju aktivacijske biljege CD69 i CD25 ukazujući da bi ove stanice mogle biti aktivirane *in vivo* (193). Subpopulacije stanica NK međusobno se razlikuju u broju gena i izražavaju pojedinih molekula. Genski izražaj za citotoksične molekule znatno je veći u stanica CD56<sup>dim</sup> nego li u stanica CD56<sup>bright</sup>, dok je genski izražaj za stvaranje citokina znatno jači u subpopulaciji CD56<sup>bright</sup> (192). Obje subpopulacije stanica NK svojom citoskičnom aktivnosti i lučenjem citokina reguliraju imuni odgovor na patogene mikroorganizme te imaju važnu ulogu u borbi protiv virusom inficiranih i tumorskih stanica (178).

### **1.2.5. Monociti**

Monociti su stanice koje nastaju u koštanoj srži, cirkuliraju u krvi 1 do 3 dana, a potom odlaze u tkiva gdje postaju tkivni makrofagi. Oni čine oko 3% do 8% leukocita periferne krvi. Zajedno sa srodnim stanicama retikuloendotelnog sustava i glija stanicama tvore tzv. mononuklearne fagocite. Zeigler-Heitbrock i sur. su predložili da se monociti u krvi čovjeka fenotipski obilježavaju kao CD14<sup>+</sup> stanice (194).

#### ***1.2.5.1. Biljezi monocita***

Monociti na svojoj površini izražavaju brojne biljege koji igraju važnu ulogu u procesu fagocitoze. Monociti prepoznaju antigen pomoću posebnih receptora tzv. PRR (engl. pattern recognition receptors) koji prepoznaju određene molekule na površini patogenih mikroorganizama (195). Tako se cirkulirajući bakterijski lipopolisaharid veže za bjelančevinu koje veže lipopolisaharid (LBP, engl. lipopolisacharide binding protein), a potom za molekulu CD14 na površini monocita te dolazi do aktivacije monocita i procesa fagocitoze. Jedna od skupina PRR su članovi obitelji C-lektinskog tipa koje obilježava nazočnost jedne ili više konzervirane ugljikohidratne lektinu slične domene (CTLDS, engl. C-type lectine-like domain) (196). Primarna funkcija ovih receptora je fagocitoza, ali mogu djelovati i kao izravni ili neizravni opsonini i utjecati na izražaj drugih receptora. Vrlo važna skupina PRR je obitelj TLR (engl. Toll-like receptors) koja prepoznaje široki spektar bakterijskih produkata (195). Nakon vezivanja sa specifičnim ligandom, signal putem TLR ide adaptivnim bjelančevinama MyD88 ili TRIF koje aktiviraju transkripcijski čimbenik NFκβ što ima za posljedicu lučenje proupalnih citokina.

Uz makrofage, dendritičke stanice, fibroblaste, keratinocite, monociti izražavaju i molekulu CD91 koja predstavlja receptor za  $\alpha 2$  makroglobulin, serumski glikoprotein koji istovremeno vezuje i sprječava učinke serumskih proteaza (197). Za CD91 se mogu vezati gp96, bjelančevine toplinskog stresa, HSP 70 i 90, kalretikulin čineći molekulu CD91 značajnim pokazateljem promjena u izvanstaničnom i unutarstaničnom okruženju. Naime, HSP su unutarstanične bjelančevine koje mogu izaći iz stanice nakon njezine smrti nekrozom. U ovim okolnostima izražavanje molekule CD91 predstavlja senzor nekrotične smrti stanice. Pokazano je da aktivacija molekule CD91 na predočnoj stanici rezultira povećanim izražajem molekula MHC-I i II te kostimulacijske molekule CD86, ako i lučenjem Th1 citokina (IL-12, TNF $\alpha$ , IL1b), kemokina (MIP-1, MIP-1a), te dušičnog oksida (198-201).

#### ***1.2.5.2. Razvoj monocita***

Monociti nastaju u koštanoj srži iz zajedničke mijelopoetske stanice koje se usmjerava u prastanicu mijelocitne loze. Iz usmjerene stanice promonocitne loze nastaju promonociti koji sazrijevaju u monocite i odlaze u krv. Za razvoj i sazrijevanje monocita potrebno je djelovanje GM-CSG i čimbenika poticanja monocitnih kolonija (M-CSF engl. monocyte colony stimulatory factor) (195).

#### ***1.2.5.3. Subpopulacije i funkcija monocita***

Monociti su heterogna populacija stanica i razlikuju se dvije subpopulacije monocita u perifernoj krvi čovjeka. Veću subpopulaciju čine klasični monociti koji na svojoj površini snažno izražavaju molekulu CD14, ali ne i biljeg CD16, te manja subpopulacija koju čine proupalni monociti CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (194,202). Klasični CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> monociti dodatno se mogu podijeliti na CD33<sup>dim</sup> i CD33<sup>bright</sup> monocite, te subpopulacije koje izražavaju biljeg CD56 (194). Klasični CD14<sup>++</sup> monociti imaju znatno veću fagocitnu aktivnost, veće lučenje citokina i slobodnih kisikovih radikala, veliku o porututijelima ovisnu staničnu citotoksičnost, nego li CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monociti za koje je svojstveno da luče velike količine IFN $\gamma$  i vrlo su snažne APS (194). Thomas i sur. su pokazali da su klasični CD14<sup>++</sup> monociti prethodnici dendritičkih stanica čije se sazrijevanje odvija pod utjecajem GM-CSF i IL-4 (203). Dendritičke stanice imaju važnu ulogu u obrani organizma kao vrlo učinkovite APS tijekom aktivacije i diferencijacije limfocita T (204). Za monocite je svojstveno da dolaze na mjesto upale mnogo sporije nego li neutrofil, ali se zato puno duže zadržavaju na mjestu upale. Monociti fagocitiraju stanični debris i patogene, služe kao APS, ali stvaraju i broje citokine

pojačavajući upalni odgovor. Aktivirani monociti luče IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  koji su važni u regulaciji upalnog odgovora ali i u procesu hematopoeze (195). Svoju imunomodulacijsku ulogu monociti ostvaruju putem kemokina (MIP-1 i MIP-2, engl. monocyte chemoattractant protein) koji ih privlače na mjesto upale i infekcije.

### **1.3. MEHANIZMI STANIČNE CITOTOKSIČNOSTI**

Citotoksičnost je visoko organizirani proces koji ima za posljedicu smrt ciljne stanice. Najznačajnije populacije stanice koje su nosioci stanične citotoksičnosti su CD8<sup>+</sup> limfociti T, stanice NK-T i stanice NK. Stanicama posredovana citotoksičnost može se podijeliti na citotoksičnost posredovanu molekulama koje uzrokuju nekrozu i citotoksičnost molekulama koje uzrokuju apoptozu. Jedan od najbolje proučenih mehanizama stanične citotoksičnosti je perforinom posredovana citotoksičnost.

#### **1.3.1. Stanična citotoksičnost posredovana perforinom**

Perforin (citolizin ili protein koji stvara pore) je prvi puta izoliran iz citotoksičnih limfocita T 1985. godine kao molekula sa sposobnosti stvaranja karakterističnih lezija u vidu pora na staničnoj membrani ciljne stanice (205). Zajedno s enzimima serinskih esteraza perforin se čuva u citoplazmatskim zrcima CD8<sup>+</sup> limfocita T, stanicama NK-T i stanicama NK. Strukturno, perforin je glikoprotein molekularne mase koja varira od 66 do 70 kDa ovisno o stupnju glikozilacije molekule. Perforin sadrži N-terminalnu domenu s litičkom aktivnosti i regiju koju čine 150 aminokiselinskih ostataka čija funkcija još uvijek nije u potpunosti razriješena. U sredini perforin nalazi se amfifilna (u vodi i mastima topljiva) domena u obliku  $\alpha$  uzvojnice koje je odgovorna za transmembransko umetanje i stabilizaciju molekule na membrani ciljne stanice (206). Molekula perforina sadrži i C-terminalnu domenu koja se sastoji od oko 200 aminokiselina, a čine ju dva dijela: domena slične čimbeniku epidermalnog rasta i C2 domena. C-terminalna domena je odgovorna za o kalciju ovisno vezivanje perforina za membranu ciljne stanice. Perforin se nalazi kao monomer u granulama citotoksičnih stanica i njegova biosinteza i pohranjivanje su dobro kontrolirani procesi koji čuvaju citotoksičnu stanicu od njegovog potencijalno smrtonosnog učinka. Nakon sinteze u endoplazmatskoj mrežici, perforin preko trans-Golgijevog aparata ulazi u citotoksična zrnca. Citotoksična zrnca su kisela (pH 5,1-5,4) što je potrebno za inaktivaciju perforina. Zrnca uz perforin sadrže i granzime, kalretikulini i proteoglikan serglicin za koji se veže perforin. Po aktivaciji citotoksične stanice, perforin se procesom egzocitoze izbacuje iz citotoksičnog zrnca u imunološku sinapsu, odvajajući se od serglicina i veže za membranu ciljne stanice. Na

membrani ciljne stanice perforin započinje proces polimerizacije u nazočnosti iona kalcija te se stvaraju cilindrične pore veličine od 5 do 20 nm. Nastale pore dovoljno su velike da omogućuju ulaz različitih molekula u ciljnu stanicu što ima za posljedicu koloidno-osmotsku lizu, odnosno smrt ciljne stanice procesom nekroze. Kroz pore na membrani mogu u ciljnu stanicu ući i granzimi te granulizini koji mogu dovesti do smrti ciljne stanice procesom apoptoze, tj. do razgradnje DNK, kondenzacije kromatina, bubrenja jezgrine membrane (207-209). Iako je ova hipoteza učinka perforina široko prihvaćena još uvijek nema dovoljno dokaza koji je potvrđuju. Motyke i sur. su u svojim istraživanjima pokazali da u odsutnosti perforina, granzim B ulazi u ciljnu stanicu stvarajući kompleks s receptorom manozna-6-fosfat koji se internalizira u stanicu procesom endocitoze, te započinje slijed događanja koji za posljedicu imaju apoptozu ciljne stanice (210). Međutim, Trapani i sur. su pokazali da manozni receptor nije neophodan za ulazak granzima u ciljnu stanicu (211). Keafe i sur. su pokazali da se granzimi vežu za površinu ciljne stanice te se uz pomoć perforinskih pora, koje omogućuju ulazak kalcija u stanicu, internaliziraju u ciljnu stanicu te potiču apoptozu (212). Bez obzira na mehanizam djelovanja, perforin je neophodan za započinjanje apoptoze ciljne stanice. Iako dokazi upućuju da perforin nije nužno potreban za ulazak proteaza u ciljnu stanicu, sigurno je neophodno potreban za citolizu. Koncentracija perforina koja se oslobađa u imunološku sinapsu još uvijek nije utvrđena, iako se zna da perforin u velikim koncentracijama uzrokuje nekrozu ciljne stanice, dok male koncentracije nisu dovoljne za oslobađanje granzima (209). Perforin je nestabilna molekula, i vrlo brzo nestaje iz imunološke sinapse (209,212). Perforin pozitivne stanice se rijetko nađu u normalnome tkivu, ali su utvrđene u područjima inficiranim virusima, autoimunim bolestima te u decidui miša i čovjeka (208,209). Perforin se izražava konstitutivno u različitim limfocitnim subpopulacijama koji pokazuju citotoksičnu (stanice NK, CD8<sup>+</sup> limfociti T,  $\gamma/\delta$  limfociti T) ili regulacijsku (stanice NK-T, stanice Treg) funkciju. Funkcija perforin je mnogostruka. Važnost perforina je utvrđena na modelima perforin deficijentnih životinja te u ljudi koji boluju od različitih bolesti koje su praćene mutacijom gena za perforin. Perforin deficijentni miševi spontano razvijaju limfome, a zbog kompromitirane stanične citotoksičnosti vrlo su podložni razvoju infekcija (213). U bolesnika s obiteljskom hematofagocitnom limfohistiocitozom koju obilježava mutacija gena za perforin, znatno je smanjen imunološki odgovor na infekciju unutarstaničnim mikroorganizmima (214). S obzirom da Treg izražavaju perforin i granzime B, brojni radovi su pokazali da perforin ima važnu ulogu u citotoksičnoj aktivnosti Treg prema autolognim aktiviranim CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocima T, monocitima,



nezrelim i zrelim dendritičkim stanicama ukazujući da je perforin jedan od mehanizama putem kojeg Treg kontroliraju imunološki odgovor i mogući razvoj autoimunosti (215-217) Izražavanje perforina pod utjecajem je brojnim čimbenika, među kojima citokini zauzimaju značajno mjesto. Uzhodna regulacija perforina u stanicama NK, CD8<sup>+</sup> i  $\gamma/\delta$  limfocitima T zabilježena je pod djelovanjem IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 i IL-21 (218-222).

## **1.4. CITOKINI**

Citokini su regulacijske bjelančevine, peptidi ili glikoproteini koje teorijski može proizvesti svaka stanica s jezgrom. Oni ostvaruju regulacijske učinke na stanice endokrinog, hematopoetskog, živčanog i drugih sustava na autokrini ili parakrini način. Vezujući se za receptor citokini dovode do prijenosa unutarstaničnog signala, a isto tako mogu biti izlučeni u cirkulaciju i djelovati kao endokrinološki posrednici (223). Iako postoji nekoliko razrabi, citokini se najčešće dijele s obzirom na svoju funkciju na proupalne ili Th1 citokine i protuupalne ili Th2 citokine.

### **1.4.1. Interleukin-4**

Interleukin-4 je prvi puta opisan u miša 1982. godine kao čimbenik rasta limfocita B (224). Četiri godine poslije izolirana je nukleotidna sekvencija ljudskog IL-4 koja je pokazivala homologiju s mišjim IL-4. Interleukin-4 je glikoprotein molekularne mase oko 15 do 19 kDa ovisno o stupnju glikozilacije. Gen koji kodira IL-4 se nalazi na kromosomu 11<sup>15</sup> u miša i dugom kraku ljudskog kromosoma 5 (5q23.3-31.2) i povezan je s genom za IL-15. U blizini gena za IL-4 i IL-15 nalaze se i geni za IL-13 i GM-CSF. Gen koji kodira IL-4 se sastoji od četiri eksona. Glavni izvori IL-4 su aktivirani limfociti T (Th2) i mastociti iako ga mogu lučiti i ostale stanice. Nakon sinteze IL-4 ostvaruje svoje učinke vezivanjem za svoj receptor koji se nalazi na limfocitima T i B, makrofagima, te različitim staničnim populacijama (limfoidne stanice, mast stanice, hematopoetske stanice, fibroblasti, stromalne stanice). Razlikuju se dva tipa receptora za IL-4. Tip I receptor za IL-4 se sastoji od lanca IL4R $\alpha$  i IL-2R $\gamma_c$ , a tip II od lanca IL-4R $\alpha$  i IL-13R $\alpha_1$  (225). Kada se IL-4 veže za svoj receptor dolazi do fosforilacije citoplazamskog C-terminalnog repa tirozin kinaze i do aktivacije signalnog prijenosnika Stat6. Fosforilacija Stat6 aktivira transkripcijske čimbenike GATA-3, c-Maf koji su ključni u diferencijaciji naivnih CD4<sup>+</sup> limfocita T u stanice Th2 te nizhodnoj regulaciji stanica Th1 (226). Najvažniji učinci IL-4 su poticaj za stvaranje stanica Th2, gensko prekapčanje na

sintezu IgG i IgE, aktivacija i rast limfocita B te inhibicija proizvodnje proupalnih citokina (225).

#### **1.4.2. Interferon-gama**

Interferon-gama je interferon tipa I ili tzv. imuni interfeferon. Kada je prvi puta otkriven vjerovalo se da ga luče CD4<sup>+</sup> limfociti T (limfociti Th1), CD8<sup>+</sup> limfociti T i stanice NK. Međutim, dokazalo se da ga proizvode i luče druge stanice kao što su limfociti B, stanice NK-T i APS (monociti, makrofagi, dendritičke stanice) (227). Interferon-gama koji luče stanice NK i APS ima važnu ulogu u ranoj fazi obrane organizma od patogena, dok IFN $\gamma$  koje stvaraju limfociti T zauzima značajno mjesto u adoptivnom imunološkom odgovoru (228,229). Proizvodnja IFN $\gamma$  je pod utjecajem IL-12 i IL-18 koji dominantno luče APS. Prepoznavanje i fagocitoza brojnih patogena od strane makrofaga dovodi do lučenje brojnih citokina (IL-12) i kemokina (MIP-1). Kemokini privlače stanice NK na mjesto upale, a IL-12 potiče lučenje IFN $\gamma$  u stanicama NK. Interleukin-12 i IL-18 djeluju na makrofage, stanice NK i limfocite T da dodatno luče IFN $\gamma$ . Suprotno tome, IL-4, IL-10, TGF $\beta$  i glukokortikoidi smanjuju upalni odgovor i lučenje IFN $\gamma$ . Da bi ostvario svoje učinke IFN $\gamma$  se veže za svoj funkcionalni receptor koji se sastoji od dva lanca IFNGR1 (engl. interferon gamma receptor 1) koji veže ligand i koji je udružen s dva lanca IFNGR2 koji su povezani sa signalnim molekulama i prenose unutarstanični signal. Unutarstanično signaliranje koje nastaje vezivanjem IFN $\gamma$  za svoj receptor ide putem signalnih molekula JAK (engl. JANS tyrosine kinase) i Stat1. Najvažnije funkcije IFN $\gamma$  su aktivacija makrofaga, aktivacija stanica NK, pojačavanje izražavanja molekula MHC-I i MHC-II te poticanje stanica imunološkog odgovora prema Th1 fenotipu. Interferon gama potiče specifičnu staničnu citotoksičnost neposrednim putem na način da sprječava diferencijaciju naivnih stanica CD4<sup>+</sup> prema stanicama Th2 i na način do koči humoralnu imunost, dok posredno IFN $\gamma$  potiče naivne stanica CD4<sup>+</sup> na diferencijaciji u Th1 fenotip. Interferon gama i IL-2 se smatraju glavnim citokinima koji usmjeravaju rani imunološki odgovor prema Th1 fenotipu, dok IL-4 usmjeruje njihovu diferencijaciju prema stanicama Th2 fenotipa. Snažan poticaj za lučenje IFN $\gamma$  je endotoksin lipopolisaharid (LPS) koji se oslobađa iz zida gram negativnih bakterija i aktivira makrofage putem molekule CD14 i TLR što ima za posljedicu lučenje brojnih proupalnih citokina, osobito IFN $\gamma$ . Interferon gama povećava o porutijelima posredovanu staničnu citotoksičnost, ushodno regulira lučenje brojnih kemokina (npr. MIP-1 $\alpha$ , RANTES - engl. regulated upon activation, normal T cell and secreted) i adhezijskih molekula (npr. ICAM-1,

VCAM-1) koje privlače brojne imunokompetentne stanice na mjesto upale (227). Interferon gama ima i protu-proliferacijsko djelovanje, koči replikaciju brojnih virusa i sprječava rast nekih tumorskih stanica, a potiče i lučenje drugih citokina (230).

### **1.4.3. Čimbenik tumorske nekroze alfa**

Čimbenik tumorske nekroze alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ), kaheksin, je otkriven 1975. godine i opisan kao snažan citoskični čimbenik kojeg luče monociti/makrofagi (231). Čimbenik tumorske nekroze alfa je citokin koji ima važnu ulogu u sustavnom upalnom odgovoru i član je grupe citokina koji potiču aktivnu upalnu reakciju. Prvenstveno ga luče aktivirani monociti/makrofagi, ali ga mogu stvarati i druge stanice kao što su limfociti, endotelne stanice, srčane stanice, masne stanice, fibroblasti i živčane stanice. Gen koji kodira  $\text{TNF}\alpha$  se nalazi na kromosomu 6 u čovjeka, a na kromosomu 17 u miša (232). Čimbenik tumorske nekroze alfa je bjelančevina koja se sintetizira kao 212-aminokiselina duga transmembranska molekula tipa II. Djelovanjem metaloproteinaze-konvertirajućeg enzima  $\text{TNF}\alpha$  na transmembranski oblik  $\text{TNF}\alpha$  oslobađa se 51 kDa teška molekula topljivog citokina  $\text{TNF}\alpha$  (s $\text{TNF}\alpha$ ). Čimbenik tumorske nekroze alfa svoje učinke ostvaruje vezivanjem za receptore obitelji TNF (TNFR, engl. tumor necrosis factor receptors). Razlikuju se TNFR1 (CD120a, p55/60) i TNFR2 (CD120b, p75/80). Kada se  $\text{TNF}\alpha$  veže za svoj receptor dolazi do stvaranja trimera. Citoplazmatski dijelovi receptora se vežu za adaptorske molekule putem tzv. domene smrti. Adaptorske molekule aktiviraju proteolitički enzim kaspazu 8 ili kaspazu 10 koje u kaskadnoj reakciji aktiviraju drugi enzim CAD (engl. caspase-activated DNAase) na način da uklanjaju protein koji inhibira CAD (I-CAD), a CAD u konačnici razgrađuje DNK i uzrokuje smrt stanice procesom apoptoze. Receptor za  $\text{TNF}\alpha$  može se vezati i za adaptorske molekule koje nemaju domenu smrti već aktiviraju citoplazmatske transkripcijske čimbenike kao što su  $\text{NF}\kappa\text{B}$  na način da ga odvaja od bjelančevine inhibitor  $\kappa\text{B}$  ( $\text{i}\kappa\text{B}$ ), ili AP-1 koji potom difundiraju u jezgru i aktiviraju različite gene za proupalne citokine i različite posrednike upale (233). Najvažniji učinak  $\text{TNF}\alpha$  je poticanje proupalnog imunološkog odgovora. Čimbenik tumorske nekroze alfa aktivira endotelne stanice u upalnom području koje pojačano izražavaju adhezijske molekule. Pojačano izražavanje adhezijskih molekula na endotelnim stanicama, ali i leukocitima pojačava njihov ulazak u upalno područje gdje pojačavaju upalni odgovor. Čimbenik tumorske nekroze alfa snažno djeluje na makrofage pojačavajući njihovu fagocitozu, proizvodnju IL-1 i prostagladina E2. Osim snažnog proupalnog djelovanja,  $\text{TNF}\alpha$  ima i protuupalni učinak najvjerojatnije posredovan njegovim

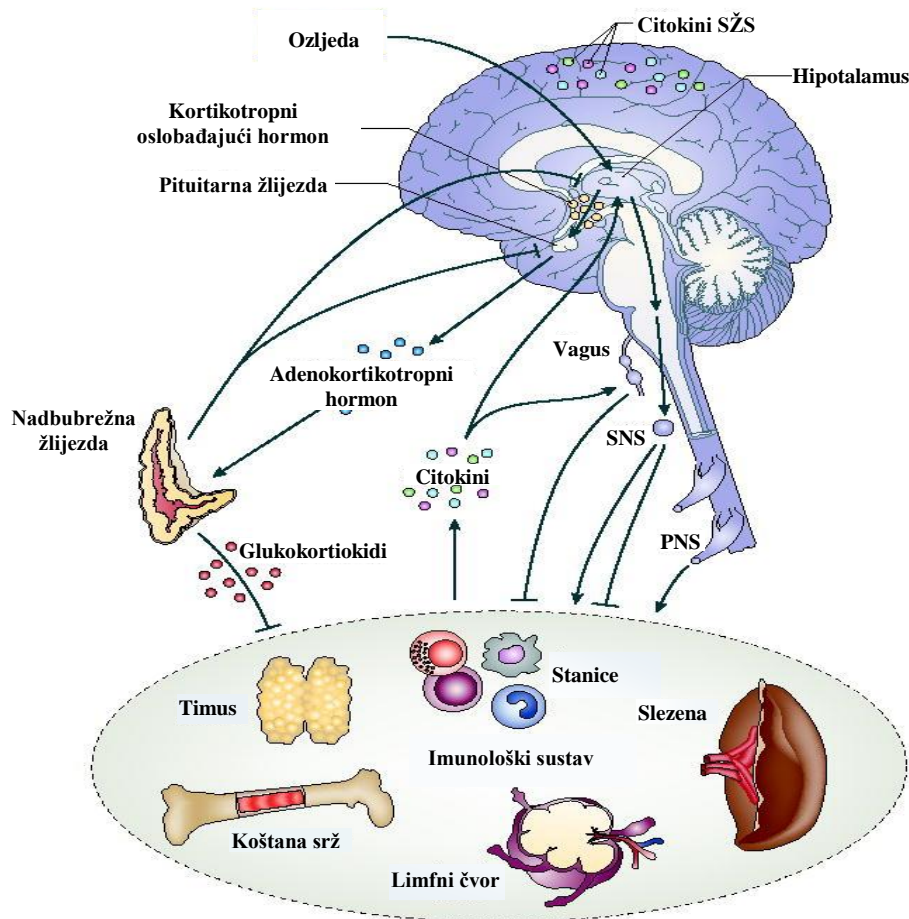
imunomodulacijskim, a manje citoskičnim djelovanjem. Značajno je da  $TNF\alpha$  pojačava izražavanje molekule MHC-II na endotelnim stanicama i receptor za IL-2 na limfocitima, te potiče citotoksične limfocite na pojačano lučenje drugih proupalnih citokina. Čimbenik tumorske nekroze alfa ima i brojne neželjene učinke. On sprječava sintezu lipoprotein-lipaze što uzrokuje lipemiju, anoreksiju i kahekciju pri jakim infekcijama i zloćudnim tumorima. U velikim dozama  $TNF\alpha$  sprječava rast mijelopoetskih i limfatičnih kolonija (230).

#### **1.4.4. Interleukin-15**

Interleukin-15 je otkriven 1994. godine kao citokin koji pripada skupini citokina s četiri alfa uzvojnice u koju spadaju IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 i IL-9 (234). Interleukin-15 pokazuje mnoge biološke sličnosti i citokinima iz ove skupine, a posebno s IL-2. To se može objasniti time što ovi citokini dijele dvije podjedinice svojih receptora. Interleukin-15 ostvaruje svoje učinke vezujući se za heterodimerički receptor koji ima iste podjedinice  $\beta$  i  $\gamma$  kao i IL-2. Međutim,  $\alpha$  podjedinica za IL-2 i IL-15 su različite, te o njima ovisi specifičnost receptora. Udružena  $\alpha$  podjedinica s  $\beta$  i  $\gamma$  lancima čini receptor visokog afiniteta za IL-2, odnosno IL-15.  $\alpha$  podjedinica za IL-15 pripada tipu I transmembranskih bjelančevina koja se sastoji od signalnog peptida od 32 aminokiseline, izvanstanične domene koju čine 173 aminokiseline i citoplazmatskog repa od 37 aminokiselina. Unutarstanični prijenos signala koji nastaje vezivanjem IL-15 za svoj receptor ide putem tirozin kinaze Jans kinaze (JAK1 i JAK3) i bjelančevina Stat3 i Stat5 te putem tirozin kinaze src, indukcije Bcl-2 i stimulacije Ras/Raf/MAPK koji dovode do aktivacije transkripcijskih čimbenika fos/jun i  $NF\kappa B$ . Geni koji kodiraju IL-15 nalaze se na kromosomu 8 u miša i kromosomu 4 u čovjeka (235). Interleukin-15 je ubikvitarno izražen u mnogim tkivima i stanicama. Tako je mRNK za IL-15 nađena u posteljici, skeletnim mišićima, stanicama bubrega, srca, monocitima i makrofagima (236). Interleukin-15 proizvode i luče stromalne stanice, stanice koštane srži, epitelne timusne stanice, fetalne ednotelne intestinalne stanice, epitelne stanice bubrega, epidermalne stanice kože i keratinociti, epitelne stanice mrežnice, astrociti i glija stanice (237-241). Bjelančevina za IL-15R $\alpha$  je izražena na aktiviranim makrofagima, limfocitima T i B, stanicama NK, stanicama iz timusa i koštane srži i decidualnim limfocitima (242,243). Ovakva raspodjela IL-15 i njegovog receptora ukazuje na široki utjecaj IL-15 na brojne imunološke funkcije. Interleukin-15 je najsnažniji i najvažniji citokin u poticanju progenitorskih stanica koštane srži u zrele stanice NK i jedini je čimbenik koji potiče stanice CD34<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup> i stanice iz krvi pupčanog tračka na diferencijaciju u stanice NK (244). Interleukin-15 ima značajnu ulogu u

preživljavanju stanica NK *in vivo*. Pokazalo se da dodan u kulturu ljudskih leukocita dovodi do osmodnevnog preživljavanja stanica NK uz dodatak seruma (245). Smatra se da je ovaj učinak IL-15 posljedica njegovog antiapoptotičnog djelovanja. Interleukin-15 potiče proliferaciju CD56<sup>bright</sup> stanica NK na doza ovisan način te pojačava o protutijelima ovisnu staničnu citotoksičnost u obje subpopulacije stanica NK (235). U sinergizmu s IL-2, IL-15 pojačava proizvodnju IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF u stanicama NK i to u CD56<sup>bright</sup> više nego li u CD56<sup>dim</sup> (246). Stanice NK stimulirane s IL-15 proizvode i kemokine kao što su MIP-1 $\alpha$  i MIP-1 $\beta$ , IL-8, a njihovo lučenje se može povećati dodatkom IL-2. S obzirom da ovi kemokini privlače stanice NK, lučenje ovih kemokina stimulacijom s IL-15 i/ili IL-2 dodatno povećava prijelaz stanica NK na mjesto upale (235). Utvrđeno je da je IL-15 čimbenik aktivacije Th1 subpopulacije limfocita T, ali i proizvodnje Th2 citokina iz limfocita T (247). Slično IL-2, IL-15 je citokin koji snažno potiče sazrijevanje i diferencijaciju limfocita periferne krvi (limfocita T i B, stanica NK). Dodatno, IL-15 snažno povećava citotoksičnu aktivnost limfocita T i stanica NK, te ushodno regulira izražavanje posrednika citotoksičnosti kao što je perforin, serinske esteraze i FasL (248).

## 1.5. MEĐUDJELOVANJE SREDIŠNJEG ŽIVČANOG I IMUNOLOŠKOG SUSTAVA



**Slika 4. Međudjelovanje središnjeg živčanog i imunološkog sustava (objašnjenje u tekstu; slika prilagođena iz Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. Nat Rev Immunol 2006;6:318-28.)**

Središnji živčani i imunološki sustav su međusobno povezani i svojom komunikacijom održavaju cjelovitost čitavog organizma. Teorija o neovisnom djelovanju i regulaciji imunološkog sustava opovrgnuta je 70-tih i 80-tih godina prošloga stoljeća otkrićem povezanosti središnjeg živčanog s endokrinološkim i imunološkim sustavom (249-251). Poslije su uslijedila brojna istraživanja koja su pokazala anatomske i funkcionalne veze među ovim sustavima. Bez obzira na različitost u njihovoj građi, središnji živčani i imunološki sustav posjeduju sposobnost primanja, prenošenja i reagiranja na različite podražaje, stvaranja pamćenja i djelovanja na druge stanice, tkiva ili organe (252). Središnji živčani,

endokrinološki i imunološki sustavi dijele brojne zajedničke posrednike kao što su neurotransmiteri, neuropeptidi, hormoni i citokini. Komunikacija između središnjeg živčanog i imunološkog sustava ostvaruje se trima glavnim putevima: simpatički i parasimpatički živčani sustav, osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (Slika 5) (253,254). Simpatičke i parasimpatičke živčane stanice inerviraju primarne limfatične organe utječući na diferencijaciju krvotvornih stanica te sekundarne limfatične organe (slezena, timus, limfni čvorovi, tonzile, sluznica gastrointestinalnog sustava) regulirajući njihovu funkciju. Aktivacijom simpatičkog živčanog sustava oslobađaju se katekolamini (adrenalin i noradrenalin) iz simpatičkih živčanih završetaka i srži nadbubrežne žlijezde. Oslobođeni katekolamini ostvaruju svoje učinke vezivanjem za svoje adrenergične receptore (AR) koji su, među ostalim, izraženi i na stanicama imunološkog sustava. Razlikuju se dvije glavne vrste AR:  $\alpha$ -AR i  $\beta$ -AR.  $\alpha$ -adrenergični receptori se dalje dijele na  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ -AR,  $\beta$ -AR na  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$ -AR (254).  $\beta$ -adrenergični receptori su, u načelu, izraženi na svim leukocitima, ali s različitom gustoćom i jačinom izražaja. Maisel i sur. su pokazali da stanice NK znatno jače izražavaju  $\beta_2$ -AR nego li  $CD8^+$  limfociti T, limfociti B i monociti, dok je najmanji izražaj  $\beta_2$ -AR nađen u populaciji  $CD4^+$  limfocita T (255). Suprotno  $\beta$ -AR,  $\alpha$ -AR nisu izraženi na leukocitima periferne krvi u čovjeka, ali se pokazalo da mogu biti izraženi na makrofagima i hematopoetskim stanicama tijekom njihove diferencijacije ili u određenim patološkim stanjima (254). Kada se katekolamini vežu za svoje receptore unutarstanični signal se prenosi putem G bjelančevine koja aktivira adenilat-ciklazu i fosfolipazu C koje potiču stvaranje drugih glasnika kao što je ciklički adenzin-monofosfat (cAMP) ili inozitol-1,4,5-trifosfat, diaciglicerol i kalcijevi ioni što ima za posljedicu brojne biološke učinke. Tako je pokazano da katekolamini potiču brzi, ali prolazni porast broja limfocita i granulocita u krvi na način da mobiliziraju leukocite iz perifernih skladišta kao što su slezena ili pluća (256). Međutim, dugotrajna izloženost katekolaminima smanjuje broj cirkulirajućih limfocita, osobito stanica NK (255). Katekolamini sprječavaju funkciju stanica Th1, potiču Th2 imunološki odgovor. Pokazalo se da katekolamini sprječavaju lučenje proupalnih citokina  $IFN\gamma$ , IL-2, IL-12, a povećavaju lučenje IL-4 (254). Katekolamini potiskuju sposobnost predočnih stanica da potiču Th1 imunološki odgovor i aktivacijom  $\beta_2$ -AR sprječavaju diferencijaciju  $CD4^+$  limfocita u stanice Th1 (257). Nekoliko istraživanja je pokazalo da katekolamini smanjuju lučenje  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-12 iz LPS stimuliranih monocita i dendritičkih stanica (257-259). Katekolamini na doza ovisan način smanjuju citoskičnu aktivnost stanica NK što se objašnjava visokim izražajem  $\beta_2$ -AR na stanicama NK (254). Suprotno, katekolamini

pojačavaju stvaranje protutijela djelujući na limfocite B te potiču lučenje IL-10 iz nestimuliranih monocita (260). Osim putem simpatičkog živčanog sustava, središnji živčani sustav djeluje na imunološki putem parasimpatikusa. Lučenjem acetilkolina, glavnog neurotransmitera parasimpatičkog živčanog sustava, dolazi do njegovog vezivanja za nikotinske receptore koji su nađeni na aktiviranih makrofagima, a što ima za posljedicu smanjeno lučenje proupalnih citokina kao što su  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-18 (261). Uz simpatički i parasimpatički živčani sustav, središnji živčani sustav i imunološki sustav međusobno komuniciraju putem osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Pod utjecajem brojnih čimbenika iz hipotalamusa se luči hormon koji oslobađa kortikotropin (CRH, engl. corticotropin releasing hormone) koji potiče sintezu adenokortikotropnog hormona (ACTH, engl. adnocoritotropine hormone) iz hipofize koji se luči i putem krvi dolazi do kore nadbubrežne žlijezde gdje pobuđuje sintezu i oslobađanje steroidnih hormona. Krajnji proizvod su hormoni glukokortikoidi poznati po svojem protu-upalnom i imunosupresivnom učinku. Oni potiskuju upalu na način da sprječavaju lučenje proupalnih citokina (IL-1 $\beta$ ,  $TNF\alpha$ ), kemokina (IL-8), prostagladina i dušikovog oksida, a potiču lučenje protu-upalnih posrednika (IL-10, TGF $\beta$ ) (262). Glukokortikoidi pokazuju snažno protu-proliferacijsko djelovanje. Oni smanjuju izražaj molekule MHC-II na površini APS, sprječavaju diferencijaciju naivnih CD4<sup>+</sup> limfocita T u stanice Th1, a potiču diferencijaciju u Th2 stanice (263,264). Središnji živčani i imunološki sustav svoju komunikaciju ostvaruju i putem drugih posrednika kao što su neuropeptidi (tvar P, neuropeptid P, vazoaktivni intestinalni paptid), neurotransmiteri (serotonin, dopamin, gama-amino-maslačna kiselina, aspartat, glutamat), opioidi koji se vežu za svoje specifične receptore (262). S druge strane, citokini (IL-1 $\beta$ , IL-6,  $TNF\alpha$ ) koje na periferiji luče aktivirane stanice imunološkog sustava dolaze u središnji živčani sustav izravno difuzijom iz izvanstaničnog prostora u cerebeospinalnu tekućinu ili neizravno putem krvnog optjecaja i ostvaruju brojne učinke. Citokni mogu u mozgu aktivirati endotelne stanice moždanih krvnih žila i potaknuti lučenje prostagladina, a mogu utjecati na stanice moždanog tkiva (astrocite, glija satnice, oligodendrocite) na lučenje brojnih citokina (IL-1, IL-6,  $TNF\alpha$ , IL-18) i kemokina (IL-8) (25).



## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Iako postoje radovi koji opisuju promjene imunološkog sustava u bolesnika s ozljedom središnjeg živčanog sustava, mehanizam njihovog nastanka, te brojne promjene imunokompetentnih stanica još uvijek nisu u potpunosti poznate. U literaturi je tek neznatan broj radova o zastupljenosti citotoksičnih medijatora i ulozi citolitičkog potencijala limfocitnih subpopulacija u bolesnika s teškom ozljedom mozga.

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su istražiti:

- zastupljenost pojedinih leukocitnih subpopulacija u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga
- stupanj aktivacije pojedinih leukocitnih subpopulacijama u bolesnika s teškom ozljedom mozga
- izražavanje citolitičke molekule perforina u pojedinim limfocitnim subpopulacijama bolesnika s teškom ozljedom mozga
- stupanj citotoksične aktivnosti stanica NK
- izražavanje pojedinih citokina (IL-4, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-15) u različitim imunokompetentnim stanicama krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga
- vrstu i učestalost infekcija i njihovih uzročnika u bolesnika s teškom ozljedom mozga
- usporediti vrijednosti navedenih imunoloških parametara s kontrolnom skupinom
- usporediti vrijednosti navedenih kliničkih i imunoloških parametara između inficirane i neinficirane skupine bolesnika s teškom ozljedom mozga.

### **3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE**

### 3.1. ISPITANICI

Ovo istraživanje je uključilo 40 bolesnika s teškom ozljedom mozga definiranih kao GCS jednaka ili manja od 9 koji su bili liječeni u Jedinici intenzivnog liječenja (lokalitet Sušak) Klinike za anesteziologiju i intenzivno liječenje, Kliničkog bolničkog centra (KBC) Rijeka. Iz studije su bile isključene osobe mlađe od 18 godina i starije od 75 godina, osobe s verificiranom ozljedom drugih organa i organskih sustava, osobito ozljedom prsnog koša i/ili pluća, oni kod kojih je postojao heteroanamnestički podatak o bilo kakvoj drugoj imunološkoj bolesti ili liječenju koje može utjecati na imunološki odgovor, te oni koji su tijekom liječenja dobili transfuziju krvi. U studiju je bilo uključeno 40 zdravih dobrovoljnih davaoci krvi kao kontrolna skupina ispitanika.

Po prijemu u Jedinicu intenzivnog liječenja (lokalitet Sušak) Klinike za anesteziologiju i intenzivno liječenje, KBC Rijeka bolesnici s teškom ozljedom mozga liječili su se prema uobičajenom protokolu za tešku ozljedu mozga. Svi bolesnici s teškom ozljedom mozga su bili orotrahealno intubirani i protektivno strojno ventilirani na način da im se parcijalni tlak ugljik-dioksida ( $\text{PaCO}_2$ ) održavao na vrijednosti od 4,2 do 5 kPa, saturacija periferne arterijske krvi ( $\text{SaO}_2$ ) veća od 95% uz udahnutu frakciju kisika ( $\text{F}_i\text{O}_2$ ) od 0.4 ili višom. Protektivna ventilacija se održavala strojevima za umjetnu ventilaciju (Evita, Dräger, Labeck, Njemačka) koji su bili podešeni tako da je udahnuti volumen bio od 6 do 8 ml/kg prediktivne tjelesne težine bolesnika, pozitivan tlak na kraju izdisaja (PEEP, engl. positive end expiratory pressure) +4 kPa i više do razine potrebne za primjerenu oksigenaciju, inspiracijski plato od oko 0,2 sekunde, vršni tlak u dišnim putovima manji od 30 cmH<sub>2</sub>O, odnos udisaja i izdisaja 1:2. Svim bolesnicima s teškom ozljedom mozga održavana je hemodinamska stabilnost, normovolemija, volumskom nadoknadom kristaloidnim i koloidnim otopinama. Centralni venski tlak se održavao u vrijednostima od 8 do 12 mmHg, srednji arterijski tlak od 85 do 110 mmHg, a diureza od 0,5 ml/kg/sat. Svi bolesnici su bili sedirani intravenskom primjenom beznodijazepinima (midazolam, Hoffman LaRoche Ltd, Basel, Švicarska; u koncentraciji od 2-5 mg/kg/h). Analgezija je postignuta kontinuiranom intravenskom primjenom opioida sufentanila (Torrex Chiesi Pharma, Beč, Austrija) u koncentraciji od 0,2 do 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{sat}$ . Stalan 24-nadzor vitalnih funkcija uključivao je praćenje centralnog venskog tlaka, invazivno mjerenje arterijskog tlaka, mjerenje tjelesne temperature, stalno praćenje ICP. Povećanje ICP iznad 15 mmHg liječeno je konvencionalnim metodama kao što su dodatna sedacija, blaga hiperventilacije te drenaža cerebrospinale tekućine. Svi bolesnici s teškom ozljedom mozga dobili su gastroprotektivnu terapiju inhibitorima protonske pumpe (pantoprazol, 40 mg intravenski, Nycomed, Konstanz, Njemačka). Svim bolesnicima s teškom ozljedom mozga je

postavljena orogastrična ili nazogastrična sonda, a glava im je bila podignuta za 30 stupnjeva. Svi su bolesnici enteralno hranjeni 24 sata nakon prijema u Jedinicu intenzivnog liječenja.

### **3.1.1. Kliničke značajke bolesnika**

Standardiziranim protokolom utvrdili su se opći podaci o ispitaniku – matični broj, dob, spol. Svakom bolesniku pratili su se slijedeći klinički parametri: GCS, vrijednosti srednjeg arterijskog tlaka (mmHg), vrijednosti intrakranijalnog tlaka (mmHg), vrijednosti centralnog perfuzijskog tlaka (mmHg), tjelesna temperatura (°C).

Rendgenološkom obradom svakom su se bolesniku utvrdila pojava infiltrata u plućnome parenhimu.

Svakom bolesniku se je utvrdila duljina strojne ventilacije, duljina liječenja u Jedinici intenzivnog liječenja te ishod liječenja.

### **3.1.2. Etičnost istraživanja i informirani pristanak**

Prije uključivanja u studiju član obitelji ili skrbnik bili su upoznati s protokolom istraživanja i s time su medicinski podaci ispitanika biti korišteni isključivo za navedeno istraživanje. Pristanak za sudjelovanje ispitanika u istraživanju potvrđeno je potpisivanjem informirane suglasnosti od strane člana obitelji ili skrbnika. Informirana suglasnost je odobrena od strane Etičkog povjerenstva KBC Rijeka i Povjerenstva za etička pitanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Ovim istraživanjem bilo je osigurano poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa – osobni integritet, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost za ispitanika. U prikupljanju i prikazivanju podataka očuvani su privatnost ispitanika i zaštićen je njihov identitet.

## **3.2. MATERIJAL**

### **3.2.1. Biološki materijal**

Svakom bolesniku uključenom u studiju uzimalo se 2 ml urina, 1-2 ml endotrahnog aspirata, i 5 ml periferne venske krvi prvog, četvrtog, sedmog i desetog dana boravka te su se uzorci slali na mikrobiološku analizu Mikrobiološkog laboratorija Zavoda za javno zdravstvo Primorsko goranske županije i Mikrobiološki laboratorij KBC Rijeka. Prvog, četvrtog i sedmog dana boravka svakom bolesniku uzimalo se po 20 ml heparinizirane periferne venske krvi koja se je slala na Zavod za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci gdje su se radile imunološke analize.

### 3.2.2. Stanične linije

K-562, stanična linija humane eritroleukemije.

### 3.2.3. Kemikalije

Aceton, Kemika, Zagreb Hrvatska

Goveđi serumski albumin (BSA, engl. bovine serum albumine), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka

Diaminobenzidin (DAB), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka

Ethilen-daimin-tetra-acetat (EDTA), Merck, Darmstadt, Njemačka

Fetalni teleći serum (FSC, engl. fetal calf serum), Gibco, Carlsbad, SAD

Gelatin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka

Gentamicin sulfat, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka

Glukoza, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Glicerin, Alkaloid, Skopje, Makedonija

Hematoksilin, Merck, Darmstadt, Njemačka

Hepes, Serva, Heidelberg, Njemačka

Ionicin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka

Kalcij-klorid ( $\text{CaCl}_2$ ), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Kalij-dihydrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Kalij-klorid (KCl), Kemika, Zagreb, Hrvatska

L-glutamin, Merck, Darmstadt, Njemačka

Lipopolisaharid (LPS), Fluka BioChemica, Buch, Švicarska

Limfoprep, Nycomed Pharma, Oslo, Norveška

Magnezij-klorid-6-hidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Monenzim, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka

Natrij-azid ( $\text{NaN}_3$ ), Difco, Detroit, SAD

Natrij-hidrogenfosfat-2-heksahidrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska

Natrij-hidroksid, NaOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Natrij-klorid, NaCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Nikal-sulfat-heksahidrat,  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska

Octena kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Paraformaldehid, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Penicilin, Grunenthal, Stolberg, Njemačka

Phorbol-miristate-acetate (PMA), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka

Propidium iodid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka  
Saponin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka  
Streptomycin sulfat, Merck, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka  
Tripano modri (Tripan blue), Serva, Heidelberg, Njemačka  
Türkova otopina, Kemika, Zagreb, Hrvatska  
Tris base, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka  
Tween 20, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka  
Vodikov peroksid, Kemika, Zagreb, Hrvatska  
Ksilol, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka

### 3.2.4. Mediji i puferi

#### 1. *Puferirana fiziološka otopina (PBS)*

Natrij-klorid (NaCl) 140 mM, Kalij-klorid (KCl) 2,7 mM, Natrij-hidrogenfosfat-2-heksahidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) 6,5 mM, Kalij-dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1,5 mM, Kalcij-klorid (CaCl) 0,7 mM, Magnezij-klorid-6-hidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ) 0,7 mM.

#### 2. *Medij za kulturu tkiva*

RPMI 1640 (GIBCO), L-glutamin 2 mM, Hepes (pH 7,2), 10 mM, Penicilin  $1 \times 10^5$  i.j/l, Streptomycin sulfat 0,1 g/l, Gentamycin sulfat 0,05 g/l, Serum govedeg fetusa (FCS) 10%.

#### 3. *Medij za protočni citometar*

PBS 1 l, EDTA 10 mM, Hepes (pH 7,2) 20 mM, Serum govedeg fetusa 2%, natrij-azid ( $\text{NaN}_3$ ) 0,1%.

#### 4. *4% Paraformaldehid (pH 7,4)*

Paraformaldehid 40 g/l, Natrij-hidrogenfosfat-2-heksahidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) 16,83 g/l, Natrij-hidroksid (NaOH) 3,85 g/l, Glukoza 5,4 g/l.

#### 5. *Saponinski pufer*

PBS, Saponin 0,1%, Serum govedeg fetusa 2%, EDTA 1 mM.

#### 6. *Otopina za magnetsku separaciju*

PBS pH 7,2, 0,5% BSA, EDTA 2mM.

#### 7. *LSAB-HRPO Kit za imuocitokemiju, DAKO, Glostrup, Danska*

##### 7.1. Otopina za blokiranje:

PBS koji sadržava nosač bjelančevina, Natrij-azid 15 mM.

##### 7.2. Otopina sekundarnih protutijela:

Biotinilirana protu-zečja i protu-mišja protutijela, PBS koji sadržava nosač bjelančevina, Natrij-azid 15 mM.

7.3. Otopina za razrjeđivanje streptavidina:

Tris-HCl pufer

7.4. Koncentrat streptavidina:

Streptavidin konjugirani s horseradish peroksidazom u Tris-HCl puferu, Natrij-azid 15 mM.

8. *Acetatni pufer*

21 ml otpine A + 79 ml otpine B

Otopina A

Octena kiselina 96% 5,75 ml, destilirana voda 1000 ml

Otopina B

Natrij-acetat-trihidrat 13,61 g, destilirana voda 1000 ml

9. *Otopina trisma base pH 7,5 (TB)*

Destilirana voda 1 l, trisma base 6 g/l, podesiti na pH 7,5 s HCl (5 M).

10. *Puferirana otopina trisma base (TBS)*

Otopina trisma base 900 ml, NaCl 8,1 g.

10. *Radna otopina diaminobenzidina (DAB)*

Otopina trisma base, pH 7,5, 25 ml, DAB 5 mg, nikal-sulfat-heksahidrat 14 mg, vodikov peroksid 30% 2 µl.

11. *Glicerolna želatina*

Destilirana voda 40 ml, glicerol 50 ml, želatina 7 g.

12. *Kit za određivanje citotoksičnosti protočnim citometrom (PKH-26 Red Fluorescent Cell Linker Kit), Sigma Bioscience, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka*

PKH-26 lipofilna boja

Diluent C

### 3.2.5. Protutijela

Tablica 4. Korištena protutijela

PROTUTIJELO	KLON/IZOTIP	SPECIFIČNOST	PROIZVOĐAČ
<b>Protutijela korištena u izravnoj i neizravnoj imunofluorescenciji</b>			
Protu-humano protu-CD3 protutijelo FITC <sup>1</sup>	UCHT1/mišji IgG1	Biljeg CD3	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-CD3 protutijelo PE <sup>2</sup>	SP34-2/mišji IgG1	Biljeg CD3	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-CD3 protutijelo Cy-PE5 <sup>3</sup>	UCHT1/mišji IgG1	Biljeg CD3	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-	RPA-T4/mišji IgG1	Biljeg CD4	BD Pharmingen, San



CD4 protutijelo PE <sup>2</sup>			Jose, SAD
Protu-humano protu-CD8 protutijelo PE <sup>2</sup>	RPA-T8/mišji IgG1	Biljeg CD8	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-CD14 protutijelo FITC <sup>1</sup>	M5E2/mišji IgG1	Biljeg CD14	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-CD16 protutijelo PE <sup>2</sup>	3G8/mišji IgG1	Biljeg CD16	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-CD25 protutijelo PE <sup>2</sup>	M-A251/mišji IgG1	Biljeg CD25	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-CD56 protutijelo FITC <sup>1</sup>	NCAM 16.2/mišji IgG1	Biljeg CD56	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-CD56 protutijelo PE <sup>2</sup>	B159/mišji IgG1	Biljeg CD56	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-humano protu-CD56 protutijelo Cy-PE5 <sup>3</sup>	B156/mišji IgG1	Biljeg CD56	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-CD69 protutijelo PE <sup>2</sup>	FN50/mišji IgG1	Biljeg CD69	BD Pharmingen San Jose, SAD
Protu-humano protu-CD80 protutijelo PE <sup>2</sup>	L307.4/mišji IgG1	Biljeg CD80	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-CD86 protutijelo PE <sup>2</sup>	IT2.2/mišji IgG2b	Biljeg CD86	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-CD91 protutijelo PE <sup>2</sup>	A2MR-β1/mišji IgG1	Biljeg CD91	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-HLA-DR protutijelo PE <sup>2</sup>	L234/štakorski IgG2a	Biljeg HLA-DR	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu CD5/CD19 protutijelo	L17F12/SJ25CJ mišji IgG2a/IgG1	Biljezi CD5 i CD19	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-IL-4 protutijelo PE <sup>2</sup>	8D4-8/mišji IgG1	IL-4	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-IFNγ protutijelo PE <sup>2</sup>	B27/mišji IgG1	IFNγ	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-TNFα protutijelo PE <sup>2</sup>	Mab11/mišji IgG1	TNFα	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-IL-15 protutijelo PE <sup>2</sup>	34559/mišji IgG1	IL-15	R&D Systems, Minneapolis, SAD
Protu-humano protu-perforinsko protutijelo	δG9/mišji IgG2b	Humani perforin	Dobiveno iz ascitesa miša Balb/c, Zavod za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Miamiu, Miami, SAD

Mišji IgG1 FITC <sup>1</sup>	MOPC-21/mišji IgG1	Specifično proutijelo istog podrazreda	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Mišji IgG1 PE <sup>2</sup>	MOPC-21/mišji IgG1	Specifično proutijelo istog podrazreda	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Mišji IgG1 Cy-PE5 <sup>3</sup>	MOPC-21/mišji IgG1	Specifično proutijelo istog podrazreda	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Mišji IgG2a PE <sup>2</sup>	G-155-178/mišji IgG2a	Specifično proutijelo istog podrazreda	BD Pharmingen San Jose, SAD
Mišji IgG2b PE <sup>2</sup>	MPC-11/mišji IgG2b	Specifično proutijelo istog podrazreda	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Štakorski IgG2a PE <sup>2</sup>	R35-95/štakorski IgG2a	Specifično proutijelo istog podrazreda	BD Pharmingen San Jose, SAD
Simultest Control, mišji IgG2a FITC/IgG1 PE <sup>2</sup>	X39/X49 mišji IgG2a/IgG1	Specifično proutijelo istog podrazreda	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Supernatant IgG2b	MA-215/mišji IgG2b	Specifično proutijelo istog podrazreda	Dobiveno iz ascitesa miša Balb/c, Zavod za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Sveučilište u Rijeci, Rijeka, Hrvatska
Kozje protu-mišje IgG FITC <sup>1</sup>	Polilkonsko/mišji IgG	Sekundrano protutijelo obilježeno fluorescein-izotijocijanatom	BD Pharmingen, San Jose, SAD
<b>Protutijela korištena u magnetskoj separaciji stanica NK</b>			
Koktel bitonom konjugiranih monoklonalnih mišjih protu-humanih protu-CD3, protu-CD4, protu-CD14, protu-CD15, protu-CD19, protu-CD36, protu-CD123, protu-glikoforin A Magnetskim kuglicama obilježena mišja protu-biotin protutijela	Bio3-18E7.2/mišji IgG1	Kit za izolaciju stanica NK	Miltenyil Biotec, Auburn, SAD
Magnetskim kuglicama obilježena mišja protu-humana protu-CD56 protutijela	Bio3-18E7.2/mišji IgG1	Pozitivna selekcija stanica NK	Miltenyil Biotec, Auburn, SAD
<b>Protutijela korištena u imunocitokemiji</b>			
Protu-humano protu-IL-15 protutijelo	34559/mišji IgG1	IL-15	R&D Systems, Minneapolis, SAD
Protu-humano protu-	δG9/mišji gG2b	Humani perforin	Dobiveno iz ascitesa

perforinsko protutijelo			miša Balb/c, Zavod za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Miamiu, Miami, SAD
Mišji IgG1	X40/mišji IgG1	Specifično protutijelo istog podrazreda	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Mišji IgG2b	MA-215/mišji IgG2b	Specifično protutijelo istog podrazreda	Dobiveno iz ascitesa miša Balb/c, Zavod za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska

<sup>1</sup>FITC – engl. fluoresceine-isothiocyanate

<sup>2</sup>PE – engl. phycoerythryn

<sup>3</sup>Cy-PE5 – engl. Cy-Chrome Phycoerythryn

### 3.2.6. Laboratorijski materijal

Filter 30 mm, Mylteni Biotec, Auburn, SAD

Epruvete, Eppendorf, TPP, Hambourg, Njemačka

Kolumne za magnetsku separaciju, MS i LS, Mylteni Biotec, Auburn, SAD

Kromogeni hranjivi agar, Becton Dickinson, Heidelberg, Njemačka

Krvni agar, Becton Dickinson, Heidelberg, Njemačka

Neubauerova komorica za brojenje stanica

Pasteurova pipeta, Kartell, Noviglio, Italija

Plastični nastavci za pipete, 0-1000 µl, Kartell, Noviglio, Italija

Plastična kušalica sa zatvaračem, 50 ml, Falcon, Lawrence, SAD

Plastične kušalice za protočni citometar 12 x 70 mm, Falcon, Lawrence, SAD

Plastične pipete, Greiner, Taufkirchen, Njemačka

Predmetno i pokrovno stakalce, Tlos, Zagreb, Hrvatska

Tekući hranjivi bujon, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska

### 3.2.7. Uređaji

Automatski analizator za određivanje biokemijskih sastojaka u serumu, Olympus, Tokyo, Japan

BacT/Alert 3D uređaj za mikrobiološku analizu, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska

Centrifuga, Juan, Sorvall, Bohemia, SAD

Citospin centrifuga, Shandon, Pittsburg, SAD  
Elektronički brojač Technicom H-1 system, Technicom, San Jose, SAD  
FACScan, FACS Calibur, protočni citometar, Becton Dickinson, Heidelberg, Njemačka  
Fluorescentni mikroskop, Olympus, Tokyo, Japan  
Hladnjak -80, Snijders Scientific, Tilburg, Nizozemska  
Inkubator, Shel Lab, Cornelius, SAD  
Komora za rad u sterilnim uvjetima, Elhert, Gutersloh, Njemačka  
Mikroskop, Olympus, Tokyo, Japan  
Mješalica, Asid, Massachussets, SAD  
Pipete, Eppendorf, Hambourg, Njemačka  
Vaga, Mettler, Zagreb, Hrvatska  
VarioMACS magnetski separator, Mylteni Biotec, Auburn, SAD  
Vodena kupelj, Koettermann, Uetze/Hänigsen, Njemačka

### **3.3. METODE**

#### **3.3.1. Metode određivanja biokemijskih sastojaka u serumu**

Analiza laboratorijskih nalaza iz periferne krvi je obavljena u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Vrijednosti hemoglobina, hematokrita, određivan je na elektroničkom brojaču Technicom H-1 system, metodom heoglobincijanidom, a broj leukocita optičkim principom tamnih boja. Vrijednosti natrija, kalija, glukoze u krvi, acidobazni status, te vrijednost C reaktivnog proteina su se određivane na automatskom analizatoru Olympus metodom po principu ion-selektivnih elektroda.

#### **3.3.2. Metode bakteriološke analize**

Mikrobiološka analiza trahealnog aspirata, urina i krvi izvedena je u Mikrobiološkom laboratoriju Zavoda za javno zdravstvo Primorsko goranske županije i Mikrobiološkom laboratoriju Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Mikrobiološka hranilišta i uvjeti rasta za različite sojeve bakterija uključivali su nasađivanje uzoraka trahealnog aspirata i urina na kromogeni hranjivi i krvni agar te krvi na tekući hranjivi bujon uz aerobnu inkubaciju na temperaturi od 37°C tijekom 24 ili 48 sati. Izolati su identificirani uobičajenim kvantitativnim bakteriološkim tehnikama te kvalitativnim metodama korištenjem aparata BacT/Alert 3D.

### **3.3.3. Imunološke metode**

#### ***3.3.3.1. Izdvajanje mononuklearnih stanica***

Svakom ispitaniku uzimao se uzorak od 20 ml heparinizirane periferne venske krvi i naslojavao na jednaki volumen gradijenta gustoće, a potom centrifugirao 20 minuta na 600 g. Prsten mononuklearnih stanica smo pokupili Pasteurovom pipetom, stanice isprali dva puta u RPMI 1640 mediju, a potom resuspendirali u RPMI mediju za kulturu tkiva. Stanice smo brojali u Neubauerovoj komorici korištenjem Türkove otopine za mikroskopiju leukocita. Dobivene mononuklearne stanice smo odmah koristili u daljnjim pokusima. Vijabilnost stanica smo određivali korištenjem tripanskog modrila i/ili propidium jodidna u koncentraciji od 0,5 µg/ml/10<sup>6</sup> stanica uz očitavanje na protočnom citometru.

#### ***3.3.3.2. Višestruko obilježavanje površinskih biljega metodom imunofluorescencije***

Izdvojene mononuklearne stanice podesili smo na koncentraciju od 3 x 10<sup>5</sup> stanica po uzorku u plastičnoj kušalici s okruglim dnom te korištenjem metode direktne imunofluorescencije višestruko obilježavali površinske biljege pomoću protutijela navedenim u Tablici 2. Stanice smo najprije isprali u mediju za protočni citometar 5 minuta brzinom 350 g. Nespecifično vezivanje protutijela spriječili smo inkubacijom uzoraka s 1% humanim serumom krvne grupe AB tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Potom smo stanice inkubirali s pojedinim protutijelom ili specifičnim mišjim protutijelom istog podrazreda 30 minuta na temperaturi od 4°C i dva puta isprali u mediju za protočnu citometriju da bi uklonili nevezana protutijela. Nakon centrifugiranja, u svaki uzorak smo dodali 400 µl FACS 2% paraformaldehida. Obilježene stanice smo pohranjivali na 4°C do očitavanja na protočnome citometru.

#### ***3.3.3.3. Istovremeno obilježavanje površinskih i unutarstaničnih biljega u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima***

##### ***3.3.3.3.1. Istovremeno obilježavanje površinskih biljega i unutarstanične molekule perforina u različitim limfocitnim subpopulacijama***

Za postupak unutarstaničnog obilježavanja perforina izdvojene mononuklearne stanice periferne krvi podesili smo na koncentraciju od 3 x 10<sup>5</sup> stanica po uzorku i centrifugirali u mediju za protočnu citometriju (5 min/350 g). Talog stanica smo fiksirali 4% otopinom paraformaldehida (100 µl) tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom smo stanice isprali dva puta u mediju za protočnu citometriju i resuspendirali u 100 µl saponinskog pufera zbog permeabilizacije stanične membrane. Po isteku inkubacije od 20 minuta na sobnoj

temperaturi dodana su protu-perforinska antitijela (3  $\mu$ l po uzorku razrijeđena u 100  $\mu$ l saponinskog pufera) te su uzorci inkubirani 30 minuta na 4°C. Nakon isteka inkubacije stanice su dva puta isprane u saponinskom puferu da bi se uklonila nevezana primarna protutijela. Zatim smo na talog dodali sekundarno protutijelo GAM-FITC (engl. Goat-Anti-Mouse) obilježeno fluorescentnom bojom fluorescein-izotiocijanat (1  $\mu$ l po uzorku razrijeđeno u 100  $\mu$ l saponinskog pufera) te inkubirali 30 minuta na 4°C. Nakon isteka inkubacije uzorke smo ponovno dva puta isprali u saponinskom puferu. Zatim smo na talog dodali 500  $\mu$ l medija za protočnu citometriju koji ima zadaću zatvoriti saponinom permeabiliziranu staničnu membranu. Nakon zatvaranja stanične membrane, nespecifično vezivanje protutijela spriječili smo inkubacijom uzoraka s 1% humanim serumom krvne grupe AB tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u mediju za protočnu citometriju stanice smo dvostruko obilježavali kombinacijom izravno konjugiranim protutijelima za površinske biljege u koncentraciji 6 $\mu$ l/uzorku (FITC ili Cy-PE5 konjugirano protu-CD3 protutijelo, PE konjugirano protu-CD4 protutijelo, PE konjugirano protu-CD8 protutijelo, PE protu-CD16 protutijelo, FITC ili Cy-Pe5 konjugirano protu-CD56 protutijelo) i inkubirali tijekom 30 minuta na 4°C. Izravno konjugirana specifična protutijela istog podrazreda koristili smo kao negativne kontrole. Po isteku inkubacije, stanice smo dva puta isprali u mediju za protočnu citometriju, na talog dodali 400  $\mu$ l 2% paraformaldehida, te smo ih pohranjivali na 4°C do očitavanja na protočnome citometru.

#### *3.3.3.3.2. Istovremeno obilježavanje površinskih biljega i unutarstaničnih citokina u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima*

Mononuklearne stanice periferne krvi, podešene u koncentraciji  $3 \times 10^5$  po uzorku, stimulirane su u sterilnim uvjetima na 37°C i atmosferi 5% CO<sub>2</sub> uz dodatak PMA (6  $\mu$ M), ionomicina (1  $\mu$ M) i monenzima (3  $\mu$ M) tijekom 4 sata. Po isteku inkubacije nespecifično vezanje je spriječeno inkubacijom uzoraka s 1% humanim serumom krvne grupe AB tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim smo stanice dvostruko isprali u mediju za protočnu citometriju, obilježili izravno konjugiranim protutijelima protiv površinskih biljega (Cy-PE5 konjugirano protu-CD3 protutijelo, FITC konjugirano protu-CD56 protutijelo ili FITC konjugirano protu-CD14 protutijelo) tijekom 30 minuta na 4°C. Izravno konjugirana specifična protutijela istog podrazreda smo koristili kao negativne kontrole. Potom smo stanice dva puta isprali u mediju za protočnu citometriju i fiksirali 4% otopinom paraformaldehida. Nakon dvostrukog ispiranja u mediju za protočnu citometriju, stanice su

resuspendirane u 100 µl saponinskog pufera. Nakon 20 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi dodana su PE direktno konjugirana protu-IL-4, protu-IFN $\gamma$ , protu-TNF $\alpha$  i protu-IL-15 protutijela, te su stanice inkubirane 30 minuta na 4°C. Po isteku inkubacije uzorke smo dva puta isprali u saponinskom puferu da bi se uklonio višak nevezanih protutijela, a stanična membrana je zatvorena dodatkom 500 µl medija za protočnu citometriju. Do očitavanja na protočnom citometru, u uzorke smo dodali 400 µl 2% paraformaldehida i čuvali ih u hladnjaku na 4°C.

#### *3.3.3.3.3. Stimulacija monocita s lipopolisaharidom i unutarstanično obilježavanje IFN $\gamma$*

U našim istraživanjima smo analizirali unutarstaničnu koncentraciju IFN $\gamma$  u monocitima periferne krvi nakon stimulacije s LPS u različitim koncentracijama. Pokus je izveden tako da smo mononuklearne stanice periferne krvi podesili na koncentraciju od  $3 \times 10^5$  po uzorku te ih kultivirali u sterilnim uvjetima na 37°C i atmosferi 5% CO $_2$  tijekom 4 sata:

- same tj. samo stanice resuspendirane u mediju,
- uz dodatak LPS u koncentraciji od 1 ng/ml,
- uz dodatak LPS u koncentraciji od 10 ng/ml,
- uz dodatak LPS u koncentraciji od 100 ng/ml.

Nakon 4 sata inkubacije u svaki uzorak je dodat PMA (6 µM), ionomicin (1 µM) i monenzim (3 µM) tijekom slijedećih 5 sati. Po isteku inkubacije, stanice su isprane u mediju za protočnu citometriju, a nespecifično vezivanje je spriječeno inkubacijom uzoraka serumom krvne grupe AB tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u mediju za protočnu citometriju, stanice su površinski obilježavane FITC konjugiranim protu-CD14 biljekom ili specifičnim protutijelima istog podrazreda tijekom 30 minuta na 4°C. Po isteku inkubacije, uzorci su dva puta isprani u mediju za protočnu citometriju, fiksirani 4% otopinom paraformaldehida i resuspendirani u 100 µl saponinskog pufera. Nakon inkubacije od 20 minuta na sobnoj temperaturi u svaki uzorak su dodana PE konjugirana protu-IFN $\gamma$  protutijela. Po isteku inkubacije od 30 minuta na 4°C, stanice su dva puta isprane u saponinskom puferu i inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi u 500 µl medija za protočnu citometriju. Po isteku inkubacije stanice su centrifugirane, a na talog smo dodali 400 µl 2% paraformaldehida, te uzorke čuvali na 4°C do očitavanja na protočnom citometru.

### **3.3.3.4. Magnetska separacija stanica NK**

#### *3.3.3.4.1. Izdvajanje stanica iz suspenzije mononuklearnih stanica periferne krvi pomoću magnetskih kuglica*

Stanice NK su iz suspenzije mononuklearnih stanica periferne krvi izdvojene negativnom i pozitivnom separacijom. Negativnu separaciju smo izveli uz pomoć Kita za izolaciju humanih stanica NK, prema uputama proizvođača. Ukratko, nakon izdvajanja i određivanja broja mononuklearnih stanica periferne krvi, na talog smo dodali 40 µl hladnog medija za magnetsku separaciju na svakih  $10^7$  stanica. Zatim smo na svakih  $10^7$  stanica dodali 10 µl koktela biotiniziranih protutijela i stanice inkubirali 10 minuta na 4°C. Nakon inkubacije dodali smo dodatnih 30 µl hladnog medija za magnetsku separaciju i 20 µl koktela magnetskih kuglica za separaciju stanica NK na svakih  $10^7$  stanica. Suspenziju smo nježno promiješali i inkubirali daljnjih 15 minuta na 4°C. Po isteku inkubacije stanice smo isprali u hladnom mediju za magnetsku separaciju čiji je volumen bio dvadeset puta veći od volumena korištenog pri obilježavanju stanica. Suspenziju stanica smo centrifugirali 10 minuta na 350 g, odlili supernatant i na talog dodali 1 ml hladnog medija. Potom smo stanice brojili i podesili u slijedećem volumenu: ako je u suspenziji bilo manje od  $10^7$  stanica dodali smo 500 µl medija, a ako je bio više od  $10^8$ , a manje od  $5 \times 10^8$  stanica dodali smo 500 do 1000 µl medija. Pozitivnu selekciju stanica NK samo napravili korištenjem magnetskih kuglica konjugiranim s monoklonskim protu-CD56 protutijelima. Na talog izoliranih mononuklearnih stanica periferne krvi smo dodali 20 µl CD56 magnetskih kuglica, pomiješali i inkubirali tijekom 15 minuta na 4°C. Nakon isteka inkubacije suspenziju stanica smo isprali u hladnom mediju za magnetsku separaciju i podesili u gore navedenom volumenu.

#### *3.3.3.4.2. Negativna i pozitivna magnetska selekcija stanica NK*

Za odvajanje stanica NK iz suspenzije mononuklearnih stanica periferne krvi koristili smo magnetski separator VarioMACS te LS (za izdvajanje do  $10^8$  stanica) ili MS kolumne (za izdvajanje  $10^7$  stanica). Prvo smo kolumne stavili u magnetsko polje VarioMACS separatora. LS kolumne smo isprali s 3 ml, a MS kolumne s 500 µl hladnoga medija za separaciju. Potom smo u kolumne stavili prethodno magnetskim kuglicama obojane stanice u odgovarajućem volumenu (500 do 1000 µl) i pustili da negativne stanice tj. one stanice koje nisu obilježene protutijelima vezanim na magnetske kuglice, „prođu“ kroz kolumnu u kušalicu. LS kolumnu samo nakon toga isprali tri puta s 5 ml, a MS kolumnu tri puta s 1 ml hladnoga medija. Stanice koje su „prošle“ kolumnu kao i stanice koje smo isprali iz kolumne smo centrifugirali,



dva puta isprali u mediju za separaciju stanica, izbrojili i odredili čistoću tj. postotak CD56 pozitivnih stanica protočnom citometrijom. Ovako dobivene stanice NK dalje smo koristili u testu citotoksičnosti prema NK osjetljivoj staničnoj liniji K-562.

### 3.3.3.5. Test citotoksičnosti stanica NK

Magnetskom separacijom dobivene stanice NK smo izbrojili, odredili njihovu vijabilnost te podesili na koncentraciju  $5 \times 10^6$ /ml RPMI medija za kulturu. Ovako podešene stanice smo čuvali na ledu do postavljanja u izravni kontakt s stanicama K-562.

Priprema stanica K-562 započinje ispiranjem stanica u RPMI koji nije obogaćen serumom. Stanice K-562 smo isprali tri puta, te njihov broj podesili na  $2,5 \times 10^6$ /ml. Potom smo 1,5  $\mu$ l PKH-26 boje otopili u 250  $\mu$ l diluenta C. Na talog stanica K-562 samo dodali 250  $\mu$ l diluenta C te pomiješali s prethodno pripremljenom bojom. Pažljivo smo miješali stanice i boju u trajanju od 4 minute, a reakciju smo zaustavili dodavanjem 500  $\mu$ l FCS tijekom 1 minute. Obojene stanice smo potom isprali tri puta u mediju za kulturu tkiva. Nakon zadnjeg ispiranja stanice smo pobrojili i njihov broj podesili na  $1 \times 10^5$ /ml medija za kulturu tkiva. Čitav postupak smo izvodili na ledu. U prethodno označene epruvete stavljali smo obojene stanice NK, ciljne stanice K-562 i medij na način prikazan u Tablici 4.

**Tablica 5. Protokol postavljanja izvršnih i ciljnih stanica te medija za kulturu tkiva u test citotoksičnosti**

Epruveta	Medij za kulturu tkiva	Stanice NK ( $5 \times 10^6$ /ml)	Stanice K-562 ( $1 \times 10^5$ /ml)
1	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	
2	100 $\mu$ l		100 $\mu$ l
3		100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
4	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
5	75 $\mu$ l	25 $\mu$ l	100 $\mu$ l
6	88 $\mu$ l	12 $\mu$ l	100 $\mu$ l

Nakon postavljanja testa citotoksičnosti, epruvete smo lagano centrifugirali da bi postigli bolji kontakt među stanicama. Potom smo epruvete stavili u inkubator na 37°C tijekom 2 sata. Po isteku inkubacije stanice smo istaložili centrifugiranjem, na talog dodali 300  $\mu$ l medija za

protočnu citometriju i 200 µl propidium jodida koncentracije 10 µg/ml. Ovako pripremljene stanice smo očitavali na protočnome citometru.

#### ***3.3.3.6. Očitavanje na protočnome citometru i analiza rezultata***

Protočnom citometrijom smo očitavali prethodno obilježene mononuklearne stanice periferne krvi metodama izravne i neizravne imunofluorescencije te postotak ubijenih stanica K-562 u testu citotoksičnosti. Koristili smo aparat FACSCalibur i Cell Quest računalni program protočnog citometra (Becton Dickinson, Heidelberg, Njemačka) uz standardne parametre za FCS (parametar veličine stanica, engl. forward scatter), SSC (parametar složenosti stanice, engl. side scatter), FL1 (intenzitet zelene fluorescencije), FL2 (intenzitet narančaste fluorescencije) i FL3 (intenzitet crvene fluorescencije). FITC boja se uočava na FL1 fluorescenciji, PE u FL2 fluorescenciji, a CyPE5 u FL3 fluorescenciji. U testu citotoksičnosti ciljane stanice obojene PKH-26 bojom se uočavaju u FL2 fluorescenciji, dok se izvršne stanice ne bojaju. Propidij jodid ulazi samo u mrtve stanice, boji ih crveno te se one vide u FL3 fluorescenciji. Postotak mrtvih ciljnih stanica se vidi kao vrijednost dvostruko pozitivnih FL2 i FL3.

Nakon očitavanja na protočnome citometru rezultate smo analizirali korištenjem računalnog programa WinMDI version 2.9.

#### ***3.3.3.7. Imunocitokemija***

Izdvojene mononuklearne stanice periferne krvi smo isprali u PBS otopini i podesili na koncentraciju  $1 \times 10^6$ /ml. Uzorak od 100 µl suspenzije stanica smo nanijeli na predmetno stakalce i centrifugirali u citospin centrifugi brzinom od 500 okretaja/minuti tijekom 5 minuta. Ovako dobivene preparate smo sušili na sobnoj temperaturi dva sata i fiksirali u hladnom acetonu 10 minuta te pohranili u hladnjak na -20°C do obilježavanja. Prije postupka obilježavanja, preparate smo isprali u TBS otopini tri puta po tri minute. Zatim smo preparate isprali u destiliranoj vodi tri puta po tri minute i uronili ih u TBS otopinu uz dodatak 0,5% Tween 20 tijekom tri minute. Za obilježavanja perforina i IL-15 koristili smo LSAB-HRP kit. Nespecifično bojanje smo spriječili otopinom za blokiranje iz navedenog kita tijekom 5 minuta u tamnoj i vlažnoj komori na sobnoj temperaturi. Sve daljnje inkubacije smo izvodili u istim uvjetima. Nakon inkubacije preparate smo isprali u TBS 0,5% Tween 20 otopini i inkubirali primarnim protutijelima te njihovim specifičnim protutijelima istog podrazreda tijekom 30 minuta, a zatim isprali u TBS 0,5% Tween 20 otopini. Nadalje smo preparate inkubirali sa sekundarnim protutijelima obilježenim biotinom tijekom daljnjim 30 minuta.

Ponovno smo preparate isprali 3 puta po 3 minute u TBS 0,5% Tween 20 otopini. Potom smo dodali kompleks streptavidin horseradish peroksidaze. Reakciju specifičnog vezanja smo razvili s DAB-om tijekom četiri minute. Reakciju smo zaustavili ispiranjem preparata u destiliranoj vodi. Jezgre stanica smo obojili inkubacijom s hematoksilinom tijekom dvije minute. Zatim smo preparate isprali kratko u destiliranoj vodi, te nastavili ispirati u mlakoj tekućoj vodi tijekom 15 minuta. Na kraju smo preparate osušili pritiskom na staničevinu, prekrili sredstvom za ukapanje ili glicerol želatinom i pokrili pokrovnim stakalcem. Ovako pripremljene preparate smo analizirali na fluorescentnom mikroskopu.

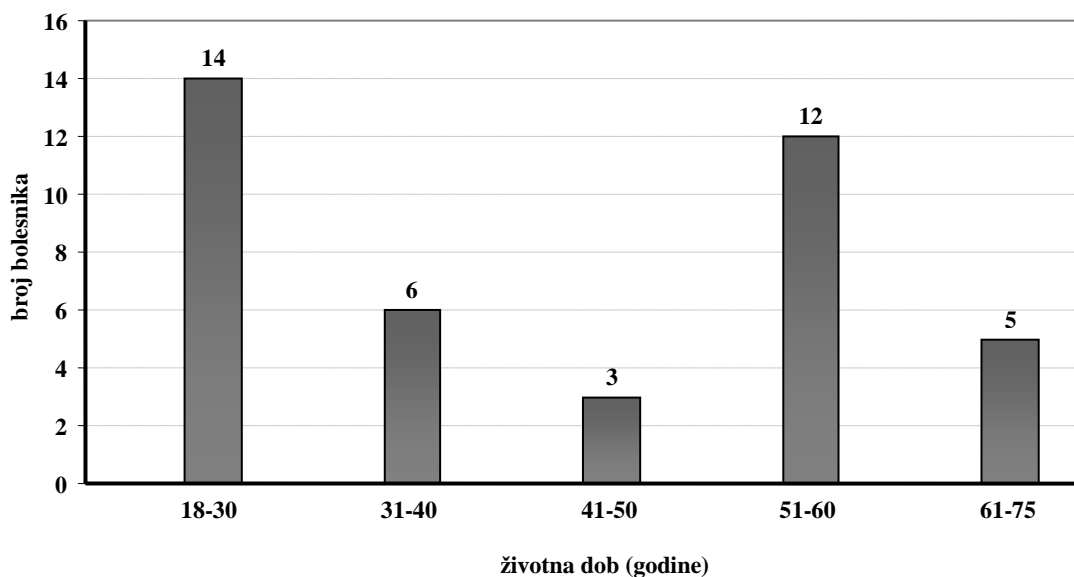
#### **3.3.4. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada podataka rađena je u računalnom programu Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD). Pri izračunavanju razlika između eksperimentalnih skupina koristili smo Kruskal Wallis ANOVA neparametrijski test za male nezavisne uzorke. Promjene su se smatrane statistički značajnim uz  $p < 0,05$ . Mann-Whitney U test koristio se naknadno da bismo utvrdili između kojih dviju od više međusobno uspoređivanih skupina postoji statistička značajnost. Statistička značajnost se je izračunavala prema broju međusobnih usporedbi. Korelacija između pojedinih parametara je izračunavana korištenjem Spearmanovog koeficijenta korelacije ranga. Slikovni i tabelarni prikazi rezultata napravljeni su u računalnom programu Microsoft Excel i Statistica 8.0.

## **4. REZULTATI**

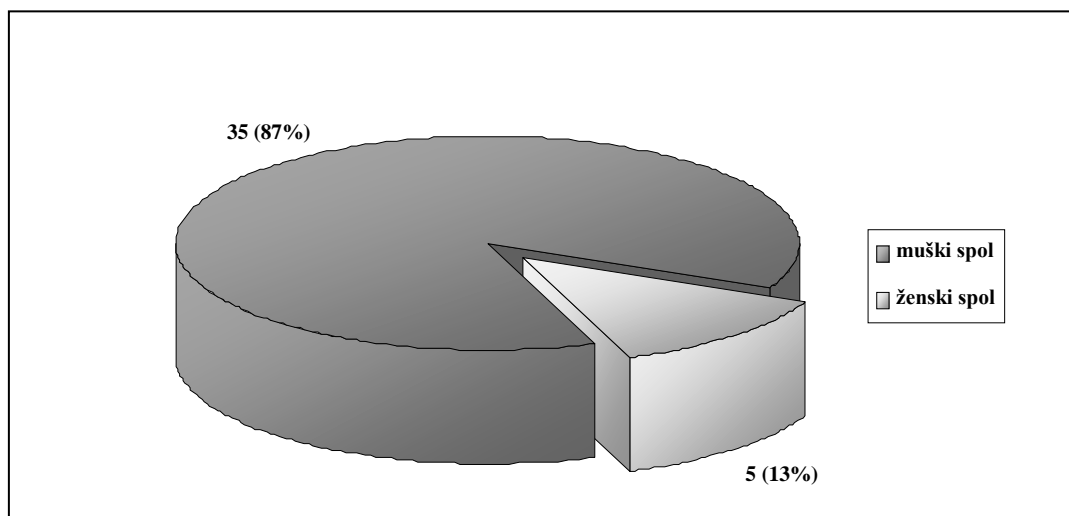
#### 4.1. Kliničke značajke i ishod liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga

Istraživanjem je uključeno 40 bolesnika s teškom ozljedom mozga koji su liječeni u Jedinici intenzivnog liječenja (lokalitet Sušak) Klinike za anesteziologiju i intenzivno liječenje, KBC Rijeka. Četrnaest bolesnika s teškom ozljedom mozga bilo je životnoj dobi od 18 – 30 godina, 12 u dobi od 51 – 60 godina, 6 bolesnika u dobi od 31 – 40, 5 u dobi od 61 – 75, a 3 u dobi od 41 – 50 godina život (Slika 5).



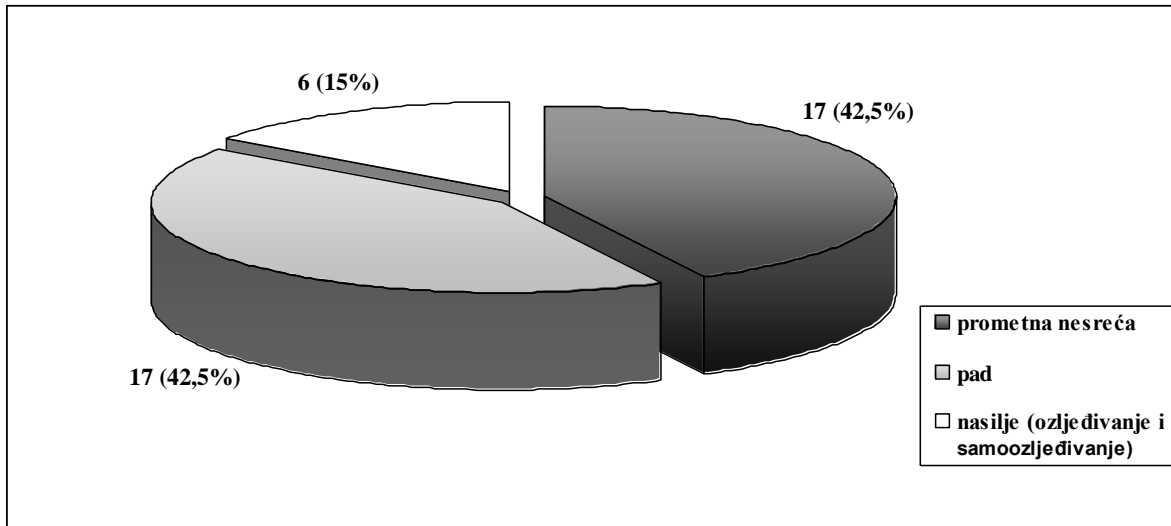
Slika 5. Raspodjela bolesnika s teškom ozljedom mozga prema životnoj dobi

Od ukupno 40 bolesnika s teškom ozljedom mozga 35 (87%) su bili muškarci, a 5 (13%) žene (Slika 6). Statistički je bilo mnogo više bolesnika muškog spola ( $p < 0,0001$ ).



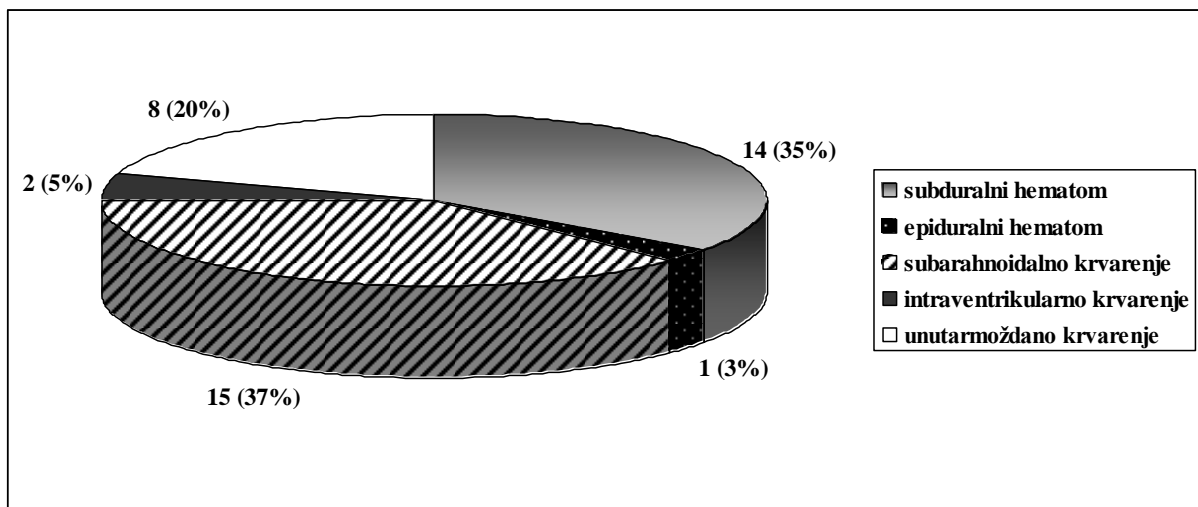
Slika 6. Raspodjela bolesnika s teškom ozljedom mozga prema spolu

U 17 (42,5%) bolesnika s teškom ozljedom mozga došlo je do stradavanja u prometnoj nesreći. U istog broja bolesnika (17; 42,5%) teška ozljeda mozga bila je posljedica pada, dok je u 6 bolesnika (15%) teška ozljeda mozga nastala uslijed nasilja (ozljeđivanja ili samoozljeđivanja vatrenim oružjem) (Slika 7).



**Slika 7. Način nastanka teške ozljede mozga**

Na osnovu rendgenološke (CT) dijagnostike u 15 (37%) bolesnika dijagnosticirano je subarahnoidalno krvarenje, u 14 (35%) bolesnika subduralni hematom, u 8 (20) bolesnika unutar moždano krvarenje, a u 2 (5%) bolesnika epiduralni hematom (Slika 8).



**Slika 8. Učestalost pojedinog tipa teške ozljede mozga na osnovu neuropatološke razradbe**

U Tablici 6. prikazani su ispitivani klinički parametri (GCS, MAP, ICP, CPP, tjelesna temperatura) u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1., 4. i 7. dana boravka. Za razliku od vrijednosti MAP, ICP, CPP koji se nisu statistički značajno mijenjale u bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim vremenskim razdobljima, vrijednosti GCS su bile znatno više 4. i 7. dana nakon ozljede u odnosu na 1. dan ( $p < 0,001$ ). Tjelesna temperatura je bila statistički značajno viša u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. i 7. dana boravka u odnosu na 1. dan, te 7. dana u odnosu na 4. dan intenzivnog liječenja.

**Tablica 6. Ispitivani klinički parametri**

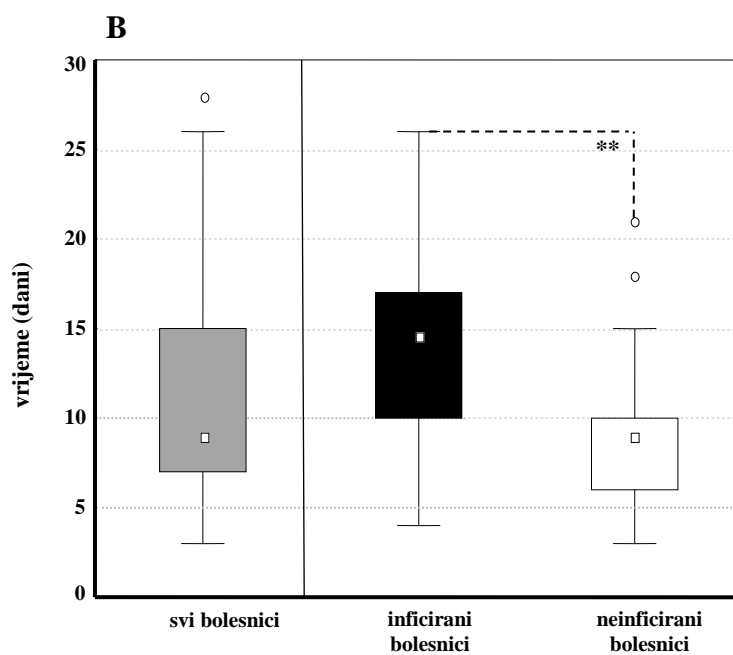
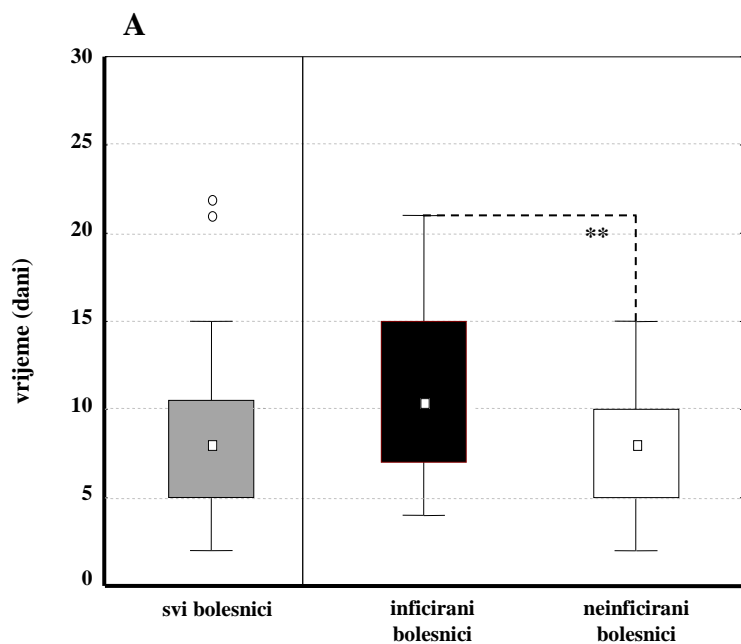
ispitivana vrijednost	1. dan	4. dan	7. dan	p vrijednost
<b>GCS</b>	6 (4-8)	7 (4-10)	10 (3-15)	<sup>b,c</sup> $p < 0,001$
<b>MAP (mmHg)</b>	82 (72-89)	84 (78-95)	87 (75-99)	$p = 0,76$
<b>ICP (mmHg)</b>	14 (9-19)	15 (10-20)	10 (7-14)	$p = 0,09$
<b>CPP (mmHg)</b>	70 (63-86)	67 (61-72)	65 (59-80)	$p = 0,49$
<b>tjelesna temperatura (°C)</b>	36,6 (36,3-37,3)	37,7 (37,0-38,5)	38,5 (37,7-38,9)	<sup>a,b,c</sup> $p < 0,001$

GCS-Glasgov koma ljestvica; MAP-srednji arterijski tlak; ICP- unutrašnji tlak; CPP-središnji perfuzijski tlak

Rezultati su prikazani kao median (25. – 75. percentila)

p vrijednost pokazuje razliku između bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. i 4 dana (a), između 4. i 7. dana (b), između 1. i 7. dana (c)

Svi bolesnici s teškom ozljedom mozga su liječeni prema suvremenim smjernicama za liječenje teške ozljede mozga, koje, između ostalog uključuju, analgesiaciju i strojnu ventilaciju bolesnika. Prosječna duljina trajanja strojne ventilacije u svih ispitivanih bolesnika s teškom ozljedom mozga je iznosila 8 (2-22) dana [medijan (25. – 75. percentila)] (Slika 9A). U bolesnika s teškom ozljedom mozga u kojih je došlo do razvoja infekcije trajanje strojne ventilacije bilo je statistički dulje nego u bolesnika u kojih infekcija nije dijagnosticirana ( $p < 0,001$ ) (Slika 9A). Prosječna duljina liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga bila je 9 (7 – 15) dana, s time da su inficirani bolesnici s teškom ozljedom mozga statistički značajno duže liječeni u Jedinici intenzivnog liječenja od neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga ( $p < 0,001$ ) (Slika 9B).

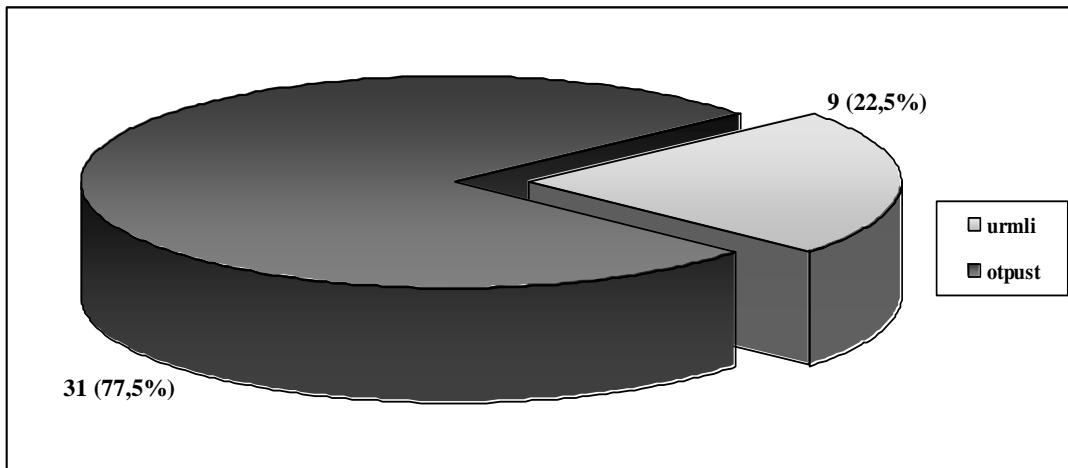


\*\*p<0,001

**Slika 9. Duljina trajanja strojne ventilacije (A) i duljina liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga u jedinici intenzivnog liječenja (B)**

Od ukupno 40 bolesnika s teškom ozljedom mozga 9 (22,5%) bolesnika je umrlo tijekom liječenja u Jedinici intenzivnog liječenja, dok ih je 31 (77,5%) otpušteno na Kliniku za neurokirurgiju na daljnje liječenje (Slika 10).





**Slika 10. Ishod liječenja bolesnika s teškom ozljedom mozga**

#### **4.2. Praćenje promjena laboratorijskih parametara u bolesnika s teškom ozljedom mozga**

Tijekom istraživanja u svih bolesnika s teškom ozljedom mozga te u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi pratili smo i međusobno uspoređivali promjene laboratorijskih parametara koji su prikazani u Tablici 7. Vrijednosti hemoglobina i hematokrita u bolesnika s teškom ozljedom mozga su se postepeno snižavale, dok su se vrijednosti CRP postupno povećavale tijekom istraživanog razdoblja. Apsolutni broj leukocita u bolesnika s teškom ozljedom mozga je bio iznad referentnih vrijednosti. U svih bolesnika s teškom ozljedom mozga vrijednosti elektrolita ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) su se održavale u granicama normalnog raspona kao i koncentracija glukoze u krvi čije su se povišene vrijednosti korigirane tijekom liječenja. Niti u jednog bolesnika s teškom ozljedom mozga nije došlo do razvoja akutnog bubrežnog zatajenja što je vidljivo iz vrijednosti ureje i kreatinina u serumu. Svi bolesnici s teškom ozljedom mozga su prema nalazima acido-baznog statusa imali metaboličku acidozu koja se tijekom liječenja uspješno korigirala.

**Tablica 7. Laboratorijski parametri u bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi**

laboratorijski parametar	kontrolna skupina	Bolesnici s teškom ozljedom mozga			p vrijednost
		1. dan	4. dan	7. dan	
<b>Hb (g/L)</b>	141 (137-148)	114,5 (104,5-121,5)	100 (98-105)	99 (92-102)	a,b,c,d,e,f p<0,001
<b>Htc (L/L)</b>	0,43 (0,40-0,48)	0,34 (0,32-0,39)	0,30 (0,29-0,32)	0,29 (0,26-0,31)	a,c,d,e,f p<0,001
<b>L (x10<sup>9</sup>/L)</b>	6,3 (5,1-7,2)	9,3 (7,6-11,8)	10,9 (8,3-13,6)	9,1 (7,8-12,2)	d,e,f p<0,001
<b>CRP (mg/L)</b>	2,3 (1-3,2)	12,3 (8,9-27,7)	103 (80,4-164,6)	110,3 (52-170)	a,c,d,e,f p<0,001
<b>GUK (mmol/L)</b>	5,5 (5-6,1)	7,25 (5,95-9,05)	6,2 (5,5-7,8)	6,45 (5,6-7,05)	c,d,e,f p=0,02
<b>Na<sup>+</sup> (mmol/L)</b>	142 (139-146)	138 (136-145)	143 (140-149)	138 (135-144)	p=0,051
<b>K<sup>+</sup> (mmol/L)</b>	4,2 (3,9-4,5)	3,9 (3,6-4,3)	3,8 (3,4-4,2)	3,8 (3,5-4,3)	p=0,20
<b>urea (mmol/L)</b>	3,7 (3,2-4,7)	4,4 (3,4-5,2)	3,2 (2,3-4,5)	5,1 (4,5-6,7)	p=0,053
<b>kreatinin (mmol/L)</b>	100 (92-111)	73 (60-97)	72 (55-86)	60,5 (48-76)	c,d,e,f p<0,001
<b>pH</b>	7,40 (7,35-7,45)	7,32 (7,30-7,39)	7,36 (7,32-7,40)	7,40 (7,36-7,42)	b,c,d,e p<0,001
<b>PaCO<sub>2</sub> (kPa)</b>	5,7 (5,1-6,1)	5,2 (4,9-5,5)	4,8 (4,5-5,7)	4,9 (4,3-5,4)	p=0,06
<b>PaO<sub>2</sub> (kPa)</b>	10,3 (9,4-12,0)	17,8 (14,8-22,2)	17,7 (12,1-21,1)	14,9 (12,4-18,0)	c,d,e,f p<0,001
<b>HCO<sub>3</sub> (mmol/L)</b>	20 (19-22)	21,5 (18-23)	23 (20-25)	23 (22-26)	a,b,c,e,f p<0,001
<b>uCO<sub>2</sub> (mmol/L)</b>	26 (25-28)	22 (19-24)	24 (21-27)	26 (23-27)	a,c,d p<0,01
<b>BE</b>	0,6 (-0,7-1,6)	-2,9 (-5,2- -1)	0,2 (-2,8-1)	1 (-1-2,5)	a,c,d p<0,001
<b>sO<sub>2</sub> (%)</b>	98 (97-99)	97 (94-98)	98 (98-99)	97 (97-98)	p=0,55

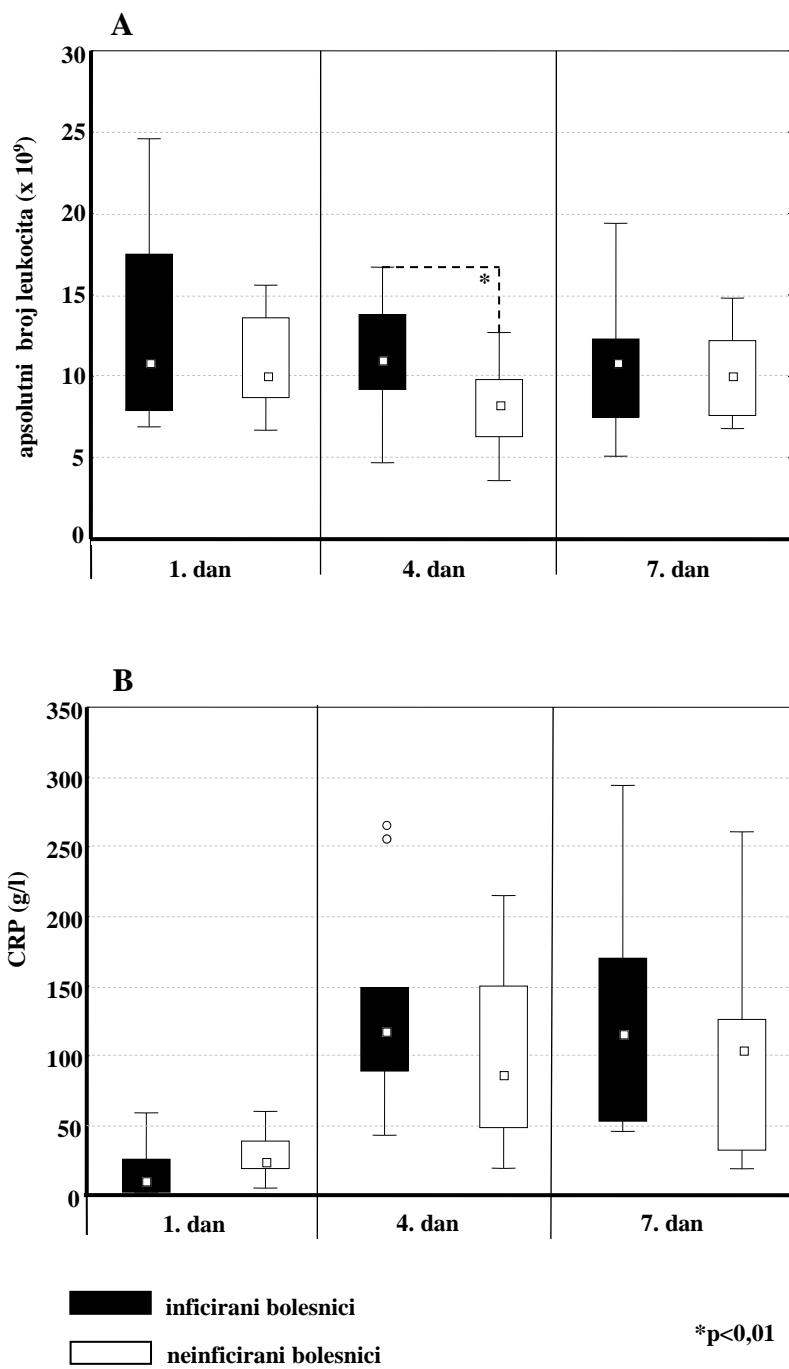
Hb-vrijednost hemoglobina (normalni raspon: 138-158 g/L); Htc-vrijednost hematokrita (normalni raspon: 0,415-0,53 g/L); L-broj leukocita (normalni raspon: 3,4-9,7 x 10<sup>9</sup>/L); CRP-vrijednost C-reaktivnog proteina (normalni raspon: 0-5 mg/L); GUK-koncentracija glukoze u krvi (normalni raspon: 4,4-6,4 mmol/L); Na<sup>+</sup>-vrijednost natrija (normalni raspon: 137-146 mmol/L); K<sup>+</sup>-vrijednost kalija (normalni raspon: 3,9-5,1 mmol/L); urea-vrijednost ureje u krvi (normalni raspon: 2,8-8,3 mmol/L); kreatinin-vrijednost kreatinina u krvi (normalni raspon: 79-125 μmol/L); pH-vrijednost pH arterijske krvi (normalni raspon: 7,35-7,45); PaCO<sub>2</sub>-vrijednost parcijalnog tlaka ugljikovog-dioksida u arterijskoj krvi (normalni raspon: 4,7-6,4 kPa); PaO<sub>2</sub>-vrijednost parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi (normalni raspon: 7,2-12,6 kPa); HCO<sub>3</sub>-vrijednost bikarbonatnih iona (normalni raspon: 18-23 mmol/L); uCO<sub>2</sub>-vrijednost

ukupnog tlaka ugljikovog-dioksida u arterijskoj krvi (normalni raspon: 23-31 mmol/L); BE-pomak baza (normalni raspon: -2-3 mmol/L); sO<sub>2</sub>-saturacija arterijske krvi kisikom (normalni raspon: 94-95%).

Rezultati su prikazani kao median (25. – 75. percentila)

p vrijednost pokazuje statistički značajnu razliku između bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. i 4. dana (a), 4. i 7. dana (b), 1. i 7. dana (c), kontrolne skupine i bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dana (d), kontrolne skupine i bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana (e), kontrolne skupine i bolesnika s teškom ozljedom mozga 7. dana (f)

Uspoređujući apsolutni broj leukocita i vrijednosti CRP u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga uočili smo statistički značajni porast apsolutnog broja leukocita u inficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede (Slika 11A), dok se vrijednosti CRP nisu statistički razlikovale između inficirane i neinficirane grupe bolesnika u ispitivanih danima (Slika 11B).



**Slika 11. Apsolutni broj leukocita (A) i vrijednost CRP (B) u inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima**

### 4.3. Rezultati mikrobiološke analize

Svakom bolesniku s teškom ozljedom mozga 1., 4., 7. i 10. dana nakon ozljede uzimali smo uzorak trahealnog aspirata, uzorak urina i uzorak periferne venske krvi te slali na mikrobiološku analizu. Učestalost pojavljivanja pojedinih bakterija u trahelanom aspiratu, urinu i krvi 1., 4., 7., i 10. nakon ozljede mozga prikazuju Tablice 8., 9. i 10.

**Tablica 8. Pregled sojeva bakterija izoliranih iz trahealnog aspirata bolesnika s teškom ozljedom mozga po danima**

vrsta bakterije	1. dan	4. dan	7. dan	10. dan
<i>Acinetobacter baumannii</i>		1	2	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>		1	1	
<i>Escherichia coli</i>	1	4		1
<i>Haemophilus influenzae</i>		2		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		1	3	4
<i>Proteus mirabilis</i>		2	1	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	8	8	4
<i>Serratia liquefaciens</i>		1		
<i>Serratia marscescens</i>	1	2	3	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	9	4	3
<i>Staphylococcus capitis</i>		1		
<i>Streptococcus constelans</i>		2		
<i>Streptococcus mitis</i>	1			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		2		
<b>Ukupno</b>	<b>5</b>	<b>36</b>	<b>22</b>	<b>18</b>

**Tablica 9. Pregled sojeva bakterija izoliranih iz urina bolesnika s teškom ozljedom mozga po danima**

vrsta bakterije	1. dan	4. dan	7. dan	10. dan
<i>Enterococcus faecalis</i>		2	1	1
<i>Escherichia coli</i>		1	1	
<i>Proteus mirabilis</i>		1	1	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1		
<i>Staphylococcus capitis</i>				1
<b>Ukupno</b>		<b>5</b>		
vrsta gljivice	1. dan	4. dan	7. dan	10. dan
<i>Candida albicans</i>		1	1	1
<b>Ukupno</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

**Tablica 10. Pregled sojeva bakterija izoliranih iz krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga po danima**

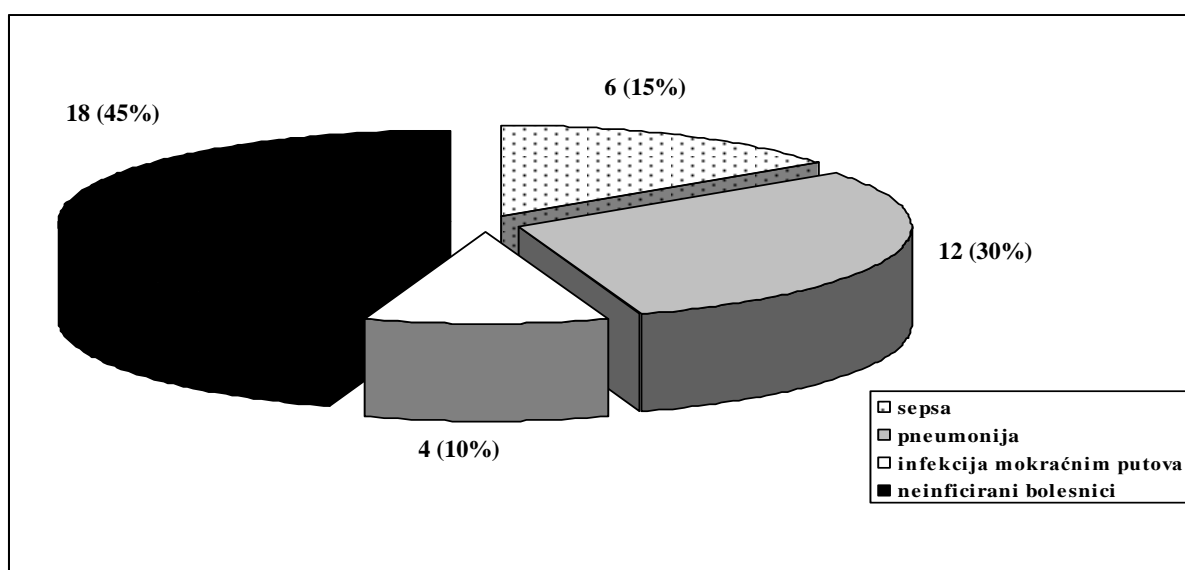
vrsta bakterije	1. dan	4. dan	7. dan	10. dan
<i>Escherichia coli</i>		1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			1	
<i>Staphylococcus aureus</i>		2		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1	1	
<b>Ukupno</b>		<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

Prvog dana nakon ozljede izolirano je 5 sojeva bakterija iz trahealnog aspirata, dok iz uzorka urina i krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga nije izolirana niti jedna bakterija ili gljivica. Četvrtog dana boravka izolirano je u trahealnom aspiratu 36 bakterija redom učestalosti: 9 *Staphylococcus aureus*, 8 *Pseudomonas aeruginosa*, 4 *Escherichia coli*, po dvije izolirane bakterije *Haemophilus influenzae* i *Proteus mirabilis*, *Serratia marscescens*, *Streptococcus constelans*, *Streptococcus pneumoniae*, te po jedan izolat *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus capitis*. Četvrtog dana iz urina bolesnika s teškom ozljedom mozga izolirano je 5 bakterija (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus capitis*) i jedna gljivica (*Candida albicans*), a u krvi 4 bakterije (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*). Sedmog dana boravka izolirano je 22 bakterije iz trahealnog aspirata bolesnika s teškom ozljedom mozga, 3 bakterije i jedna gljivica iz urina te dvije bakterije iz krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga. Desetog dana u bolesnika s teškom ozljedom mozga mikrobiološkom analizom izolirano je 18 bakterija iz trahealnog aspirata, dvije bakterije i jedna gljivica iz urina, dok su nalazi hemokulture bili sterilni.

#### **4.4. Učestalost infekcija u bolesnika s teškom ozljedom mozga**

Na osnovu kliničkih, laboratorijskih i mikrobioloških pokazatelja u bolesnika s teškom ozljedom mozga utvrđivali smo i učestalost pojedinih vrsta infekcije. U dijagnostici pneumonije uzrokovane strojnom ventilacijom primijenili smo slijedeće kriterije: pojava novog ili progresija postojećeg infiltrata vidljivog na rendgenološkoj snimci pluća, tjelesna temperatura viša od 38°C, leukocitoza u krvi, pojava gnojnog sekreta u dišnim putevima, te bakteriološki pozitivan nalaz trahealnog aspirata i bronhoalveolarnog lavata (265). Za dijagnozu sepse primjenjivali smo slijedeće kriterije: tjelesna temperatura viša od 38°C ili niža od 36°C, frekvencija pulsa viša od 90 u minuti, povećanje apsolutnog broja leukocita u krvi ( $> 12 \times 10^9$  u litri) i dokaz bakterijemije u hemokulturi (266). Infekcija mokraćnih putova

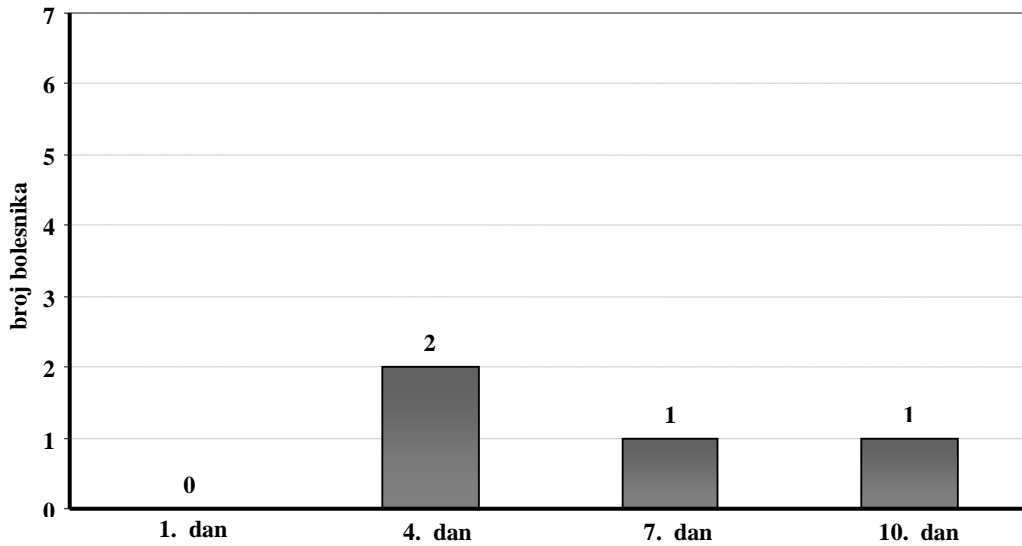
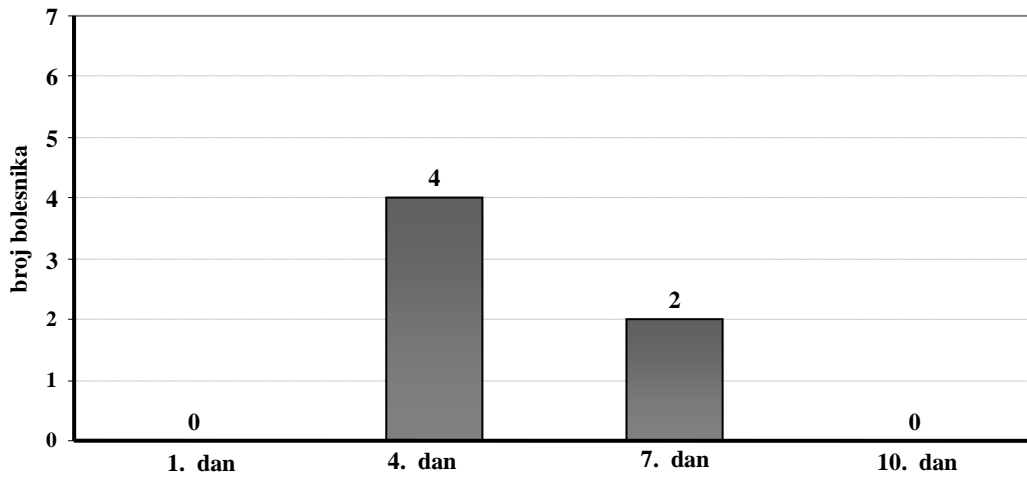
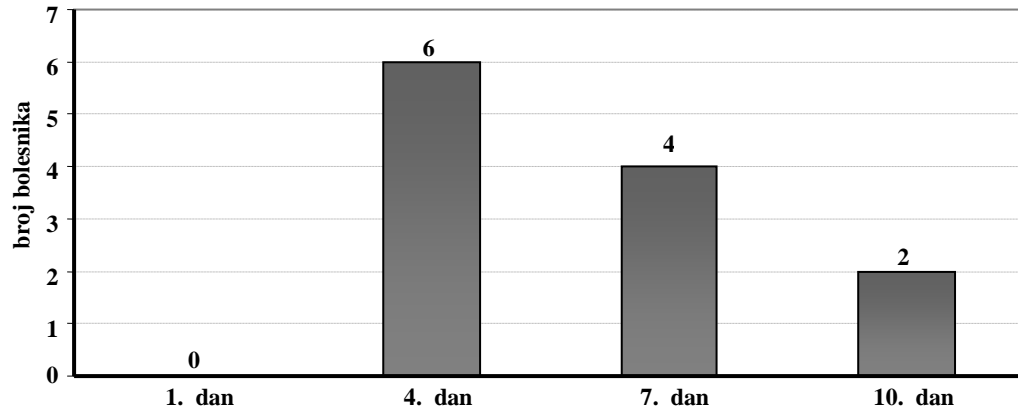
je dijagnosticirana u bolesnika u koji su imali povišenu tjelesnu temperaturu i povećani apsolutni broj leukocita u krvi, porast bakterije u urinu više od  $10^5$  bakterija u 1 ml mokraće (267). Na osnovu navedenih kriterija u 12 (30%) bolesnika s teškom ozljedom mozga dijagnosticirana je pneumonija uzorkovana strojnom ventilacijom, u 6 (15%) bolesnika se je razvila sepsa, dok su 4 (10%) bolesnika s teškom ozljedom mozga imali infekciju mokraćnih putova (Slika 12).



**Slika 12. Učestalost infekcija u bolesnika s teškom ozljedom mozga**

Najčešći izolirani uzročnici pneumonije bili su redom *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*. U bolesnika kod kojih je došlo do razvoja sepse najčešće izolirana bakterija bila je *Staphylococcus aureus*, dok je najčešći uzročnik infekcije mokraćnih putova bila bakterija *Enterococcus faecalis* i *Escherichia coli*, te gljivca *Candida albicans*.

S obzirom na razdoblje pojave pojedine vrste infekcije u bolesnika s teškom ozljedom mozga, najveća učestalost bilježi se 4. dana boravka. U 6 bolesnika s teškom ozljedom mozga došlo je do razvoja pneumonije (Slika 13A), u 4 bolesnika do razvoja sepse (Slika 13 B), dok je u 2 bolesnika dijagnosticirana infekcija mokraćnih putova (Slika 13C) 4. dana nakon ozljede. Za razliku od 1. dana boravka kada niti u jednog bolesnika nije utvrđena infekcija, 7. i 10. dana nakon ozljede utvrđen je manji broj pojave pneumonije, infekcije mokraćnih putova i sepse u odnosu na 4. dan (Slika 13).



**Slika 13. Razdoblje pojave pneumonije (A), sepse (B) i infekcije mokraćnih putova (C) u bolesnika s teškom ozljedom mozga**

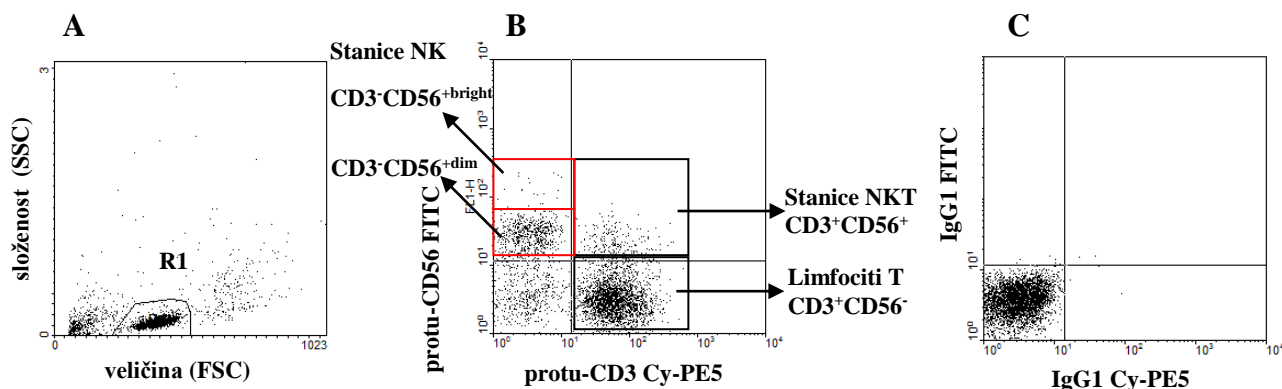


## 4.5. Rezultati imunoloških istraživanja

### 4.5.1. Zastupljenost, promjene učestalosti i stupanj aktivacije mononuklearnih stanica periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga

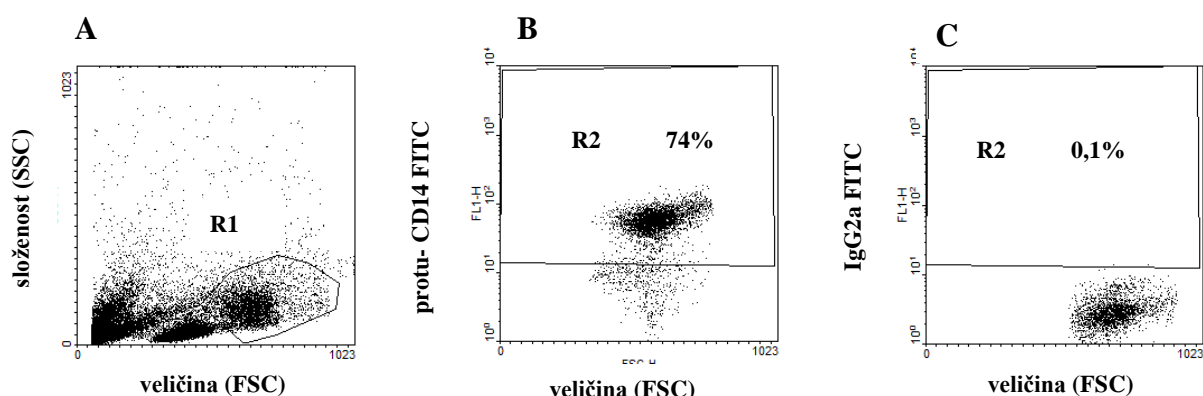
Svakom bolesniku s teškom ozljedom mozga uključenom u istraživanje uzimali smo 1., 4. i 7. dana nakon ozljede 20 ml heparinizirane periferne krvi, naslojavali na gradijent gustoće te obilježavali monoklonskim protutijelima koji su se vezali za biljege na površini ili u unutrašnjosti stanica koje su bile od interesa u ovom istraživanju. Zdravi dobrovoljni davaoci krvi predstavljali su kontrolnu skupinu.

Slika 14. pokazuje reprezentativni uzorak limfocita analiziranih na protočnome citometru. Elektronička ograda R1 postavljali smo na kontrolne, neobilježene stanice koje su veličinom i granuliranošću odgovarali limfocitima (Slika 14A). Stanice koje ulaze u elektroničku ogradu R1 zatim su prikazivane na dijagramu fluorescencije FL1 (FITC) i FL-3 (Cy-PE5) (Slika 14B). Za površinsko obilježavanje molekule CD3 koristili smo protu-CD3 protutijelo, a za obilježavanje molekule CD56 protu-CD56 protutijelo koji su bili izravno konjugirani s fluorescencijom FITC ili Cy-PE5. Ukoliko je protu-CD3 protutijelom bilo konjugirano s FITC fluorescencijom tada smo molekulu CD56 bilježili protu-CD56 protutijelom izravno konjugiranim s Cy-PE5 fluorescencijom i obrnuto. Analizom na protočnome citometru limfocite T smo fenotipizirali kao CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> stanice, stanice NK kao CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, a stanice NK-T kao CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stanice. Unutar stanica NK razlikovali smo i dvoje subpopulacije CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+dim</sup> i CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+bright</sup> stanice s obzirom na prosječan broj molekule CD56 na površini stanice. Postavljanjem elektroničke ograde (R2 ili R3) na pojedinim subpopulacijama limfocita pratili smo promjene njihovog udjela te izražavanje pojedinih biljega na njihovoj površini ili unutar stanice. Specifična protutijela istog podrazreda koristila su se kao negativna kontrola (Slika 14 C).



**Slika 14. Primjer analize protočnim citometrom limfocita periferne krvi prikazanih unutar ograde R1 (A) obilježenih monoklonskim protutijelima (B). Specifična protutijela istog podrazreda koristila su se kao negativna kontrola (C).**

Monocyte periferne krvi analizirali smo na protočnome citometru na način da smo elektroničku ogradu R1 postavili na stanice koje su veće i složenije građe od limfocita procjenjeno temeljem vrijednosti FSC i SSC parametara (Slika 15A). Stanice koje su ušle u R1 ogradu zatim smo prikazali na točkastom grafu s parametrima veličine i fluorescencije FL-1 (FITC) (Slika 15B). Postavljanjem elektroničke ograde R2 na stanice obilježene protu-CD14 konjugiranim FITC protutijelima označavao je udio CD14<sup>+</sup> monocita koji je u prikazanom primjeru iznosio 74% (Slika 15B). Daljnja analiza uključivala je samo CD14<sup>+</sup> stanice na čijoj smo površini i unutar stanice pratili izražavanje pojedinih biljega. Specifična protutijela istog podrazreda koristili smo kao negativnu kontrolu (Slika 15C).

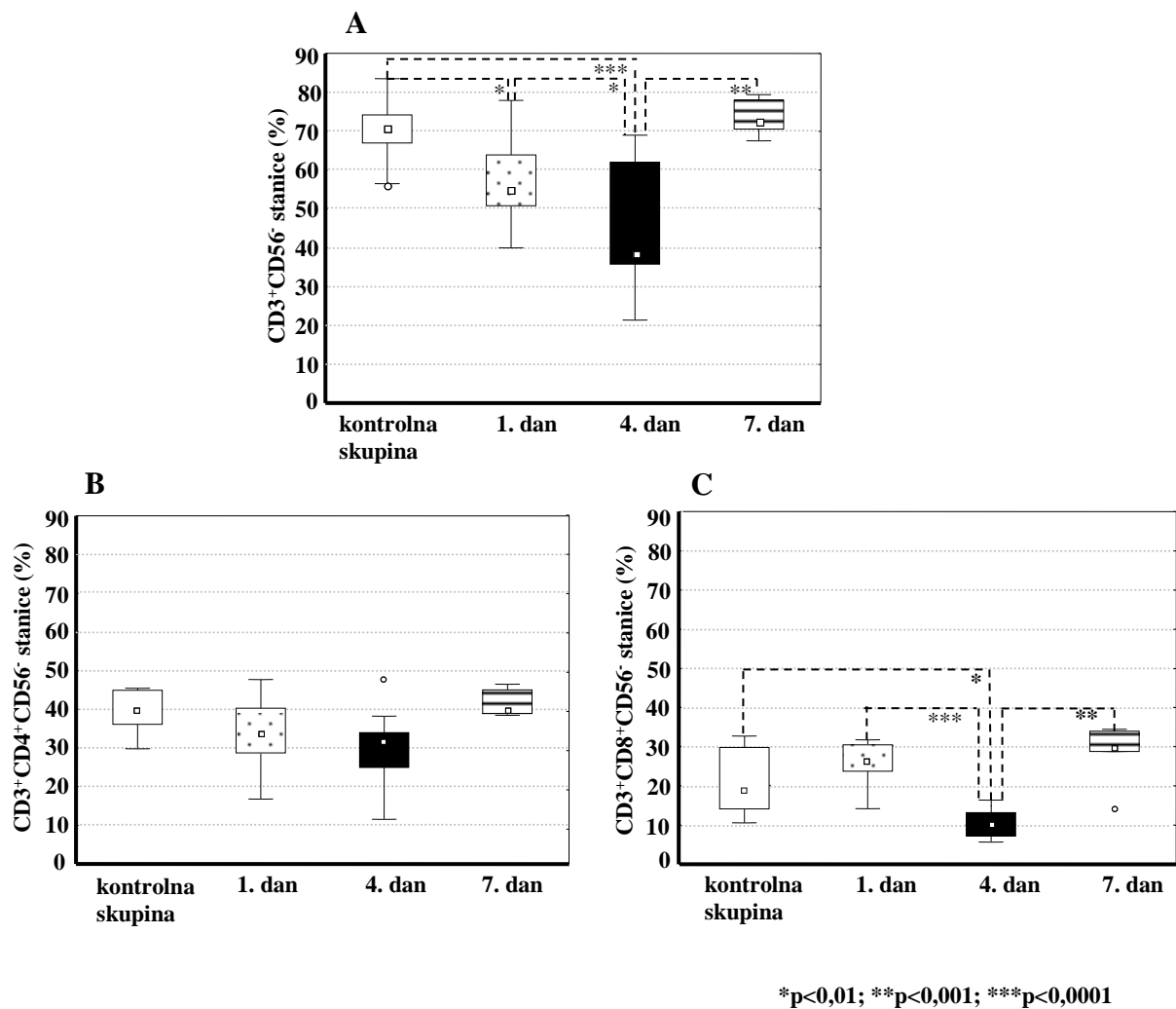


**Slika 15. Primjer analize protočnim citometrom monocita periferne krvi zdrave osobe prikazanih unutar ograde R1 (A) i obilježenih protu-CD14 FITC monoklonskim protutijelom unutar ograde R2 (B). Specifična protutijela istog podrazreda koristila su se kao negativna kontrola (C).**

#### ***4.5.1.1. Zastupljenost, promjene učestalosti i stupanj aktivacije limfocita T i njihovih subpopulacija u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga***

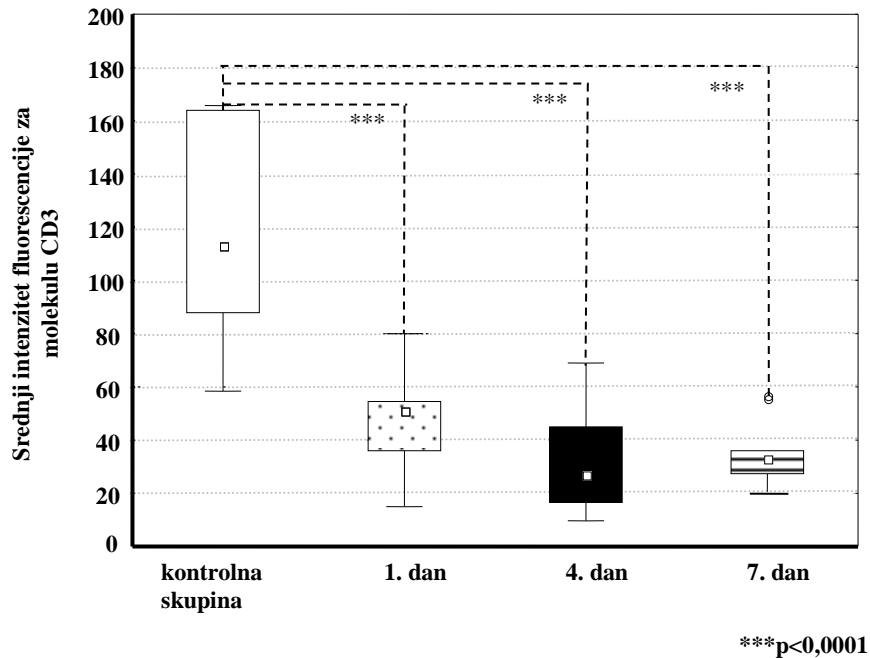
U slikama koje slijede rezultati su prikazani kao medijan (◻), 25. – 75. percentila (◻), rezultati koji su unutar raspona (I), rezultati koji su izvan raspona (◊) i ekstremni rezultati (▪).

Udio CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T u perifernoj krvi zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina) bio je 70,8% (66,96% - 74,15%) (Slika 16A). Progresivno smanjenje postotka limfocita T nađen je u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. ( $p < 0,01$ ) i 4. ( $p < 0,0001$ ) dana nakon ozljede u usporedbi s kontrolnom skupinom. Sedam dana nakon ozljede postotak CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga je porastao do razine kontrolne skupine (Slika 16A). Slične promjene u postotku CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T zabilježene su među CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> stanicama (Slika 16C), dok se postotak CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T u bolesnika s teškom ozljedom mozga nije značajno mijenjao 1., 4. i 7. dana nakon ozljede (Slika 16B).



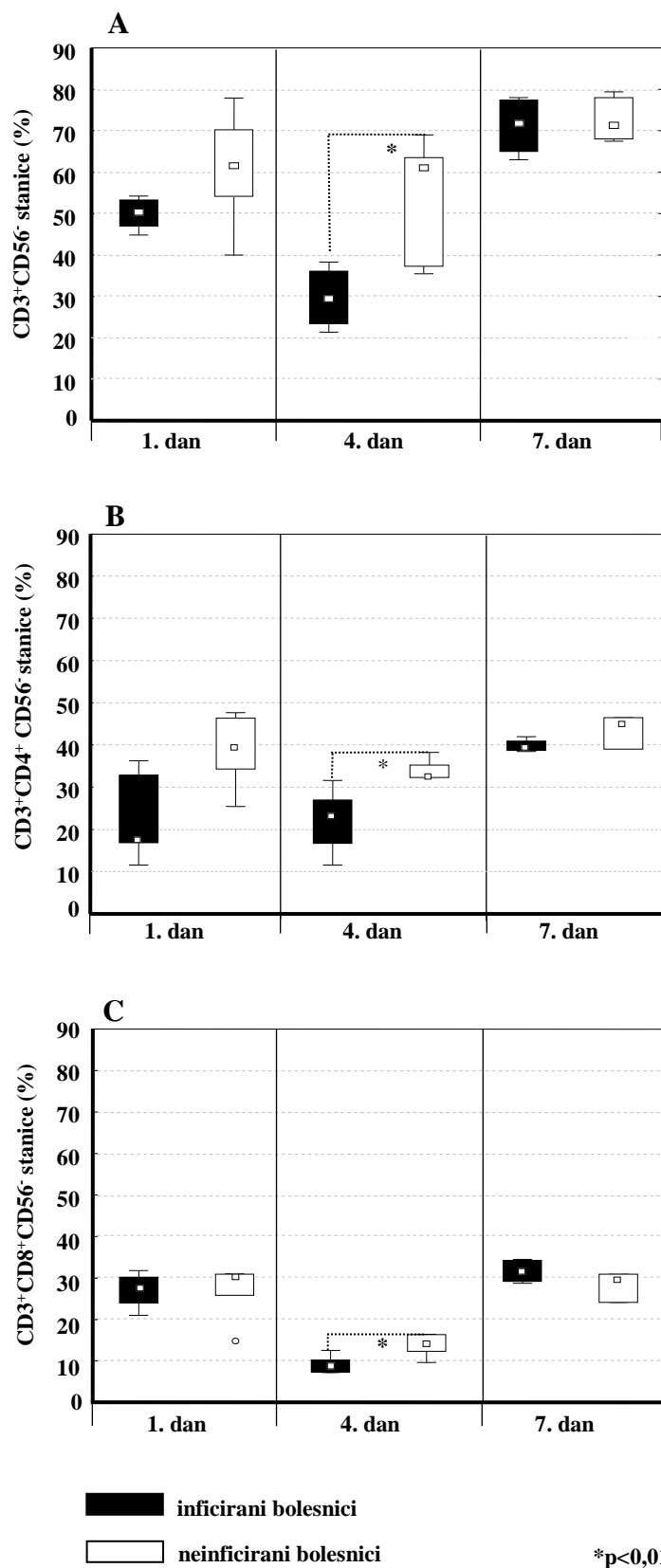
**Slika 16. Promjene učestalosti CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T (A) te njihovih CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (B) i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (C) subpopulacija u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**

Srednji intenzitet fluorescencije za molekulu CD3 na površini limfocita T u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. 4. i 7. dan nakon ozljede bio je statistički značajno niži u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,0001$ ) (Slika 17).



**Slika 17. Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za molekulu CD3 na površini limfocita T periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**

Uspoređujući promjene  $CD3^+CD56^-$  limfocita T (Slika 18A) i njihovih  $CD3^+CD4^+CD56^-$  (Slika 18B) i  $CD3^+CD8^+CD56^-$  (Slika 18C) subpopulacija između inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga utvrdili smo da je u inficiranih bolesnika postotak limfocita T (Slika 18A) te njihovih  $CD3^+CD4^+CD56^-$  (Slika 18B) i  $CD3^+CD8^+CD56^-$  (Slika 18C) subpopulacija statistički značajno niži u odnosu na neinficirane bolesnike samo 4. dana nakon ozljede ( $p < 0,01$ ).

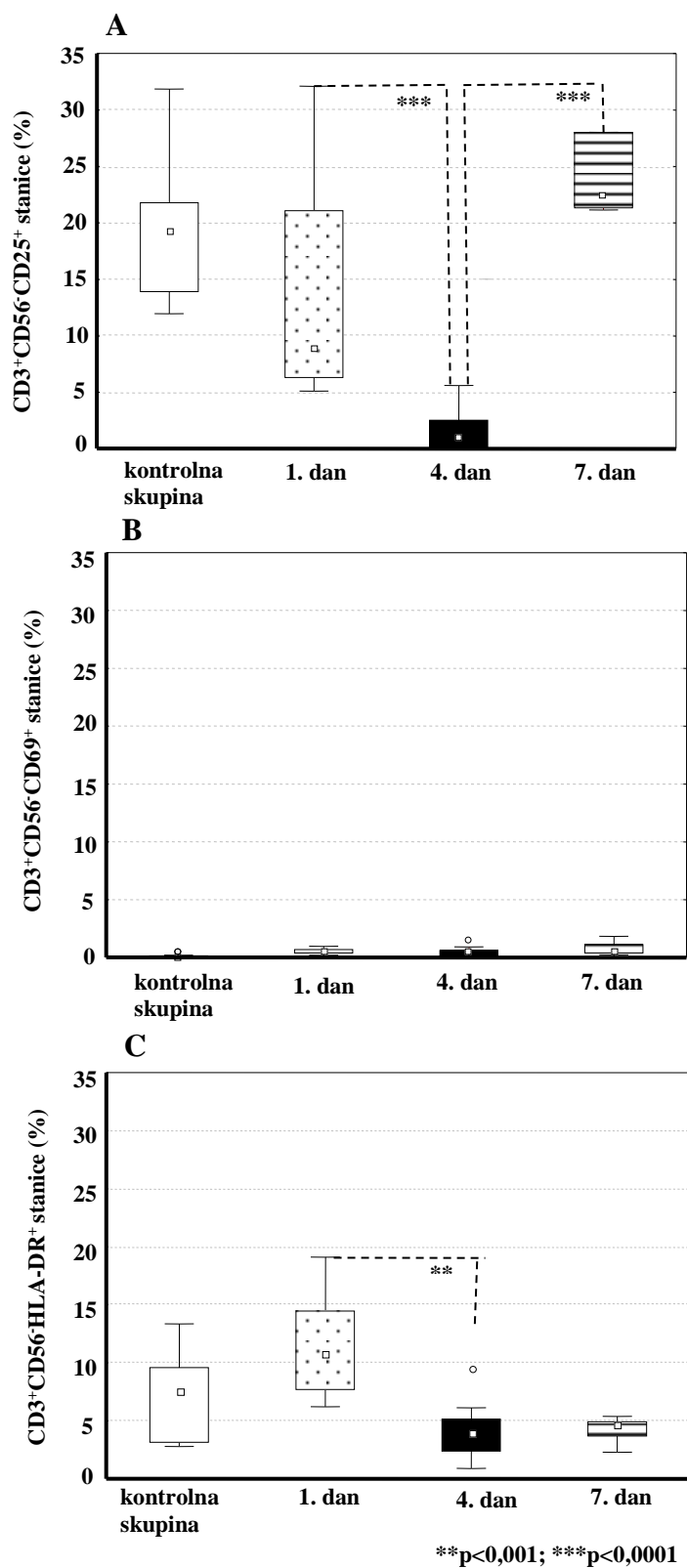


**Slika 18. Promjene učestalosti CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T (A) te njihovih CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (B) i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (C) subpopulacija u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima**

U daljnjim pokusima ispitivali smo izražavanje udjela limfocita T koji izražavaju na staničnoj membrani aktivacijske biljege CD25, CD69, HLA-DR i utvrdili statistički značajno smanjenje udjela CD25<sup>+</sup> (slika 19A) i HLA-DR<sup>+</sup> (Slika 19C) limfocita T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede u odnosu na 1. dan. Udio CD25<sup>+</sup> limfocita T (Slika 19A), ali ne i HLA-DR<sup>+</sup> limfocita T (Slika 19C) u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga statistički je značajno porastao 7. dana u odnosu na 4. dan nakon ozljede. Udio CD69<sup>+</sup> limfocita T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga nije se značajno mijenjao tijekom ispitivanog razdoblja (Slika 19B).

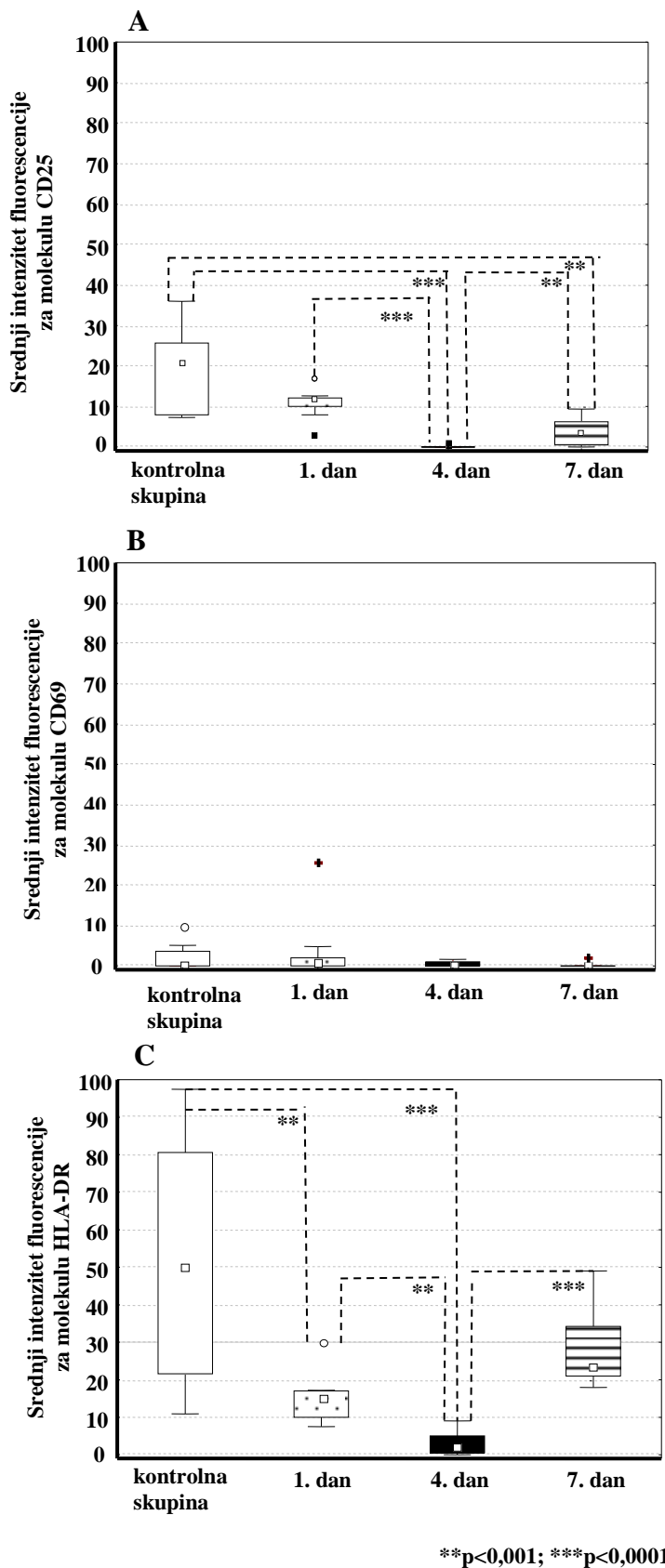
Srednji intenzitet fluorescencije pojedinog biljega analiziranog protočnim citometrom je mjera za prosječan broj molekula biljega po pojedinoj stanici. Srednji intenzitet fluorescencije za molekule CD25 i HLA-DR na površini limfocita T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga se statistički značajno smanjio 4. dana nakon ozljede u odnosu na 1. dan i kontrolnu skupinu, ali je i porastao 7. dana u odnosu na 4. dan (Slika 20A i C). Srednji intenzitet fluorescencije za molekulu CD69 na površini limfocita T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga nije se značajno mijenjao u ispitivanim danima (Slika 20B).

Kada smo usporedili udjele limfocita T koji izražavaju molekule CD25 (Slika 21A), CD69 (Slika 21B) i HLA-DR (Slika 21C) u inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga utvrdili smo statistički značajno smanjenje udjela CD25<sup>+</sup> limfocita T u neinficiranih bolesnika u odnosu na inficirane bolesnike samo 4. dana nakon ozljede mozga (Slika 21A), dok su se udjeli CD69<sup>+</sup> i HLA-DR<sup>+</sup> limfocita T nisu bitnije mijenjali (Slika 21B i C).

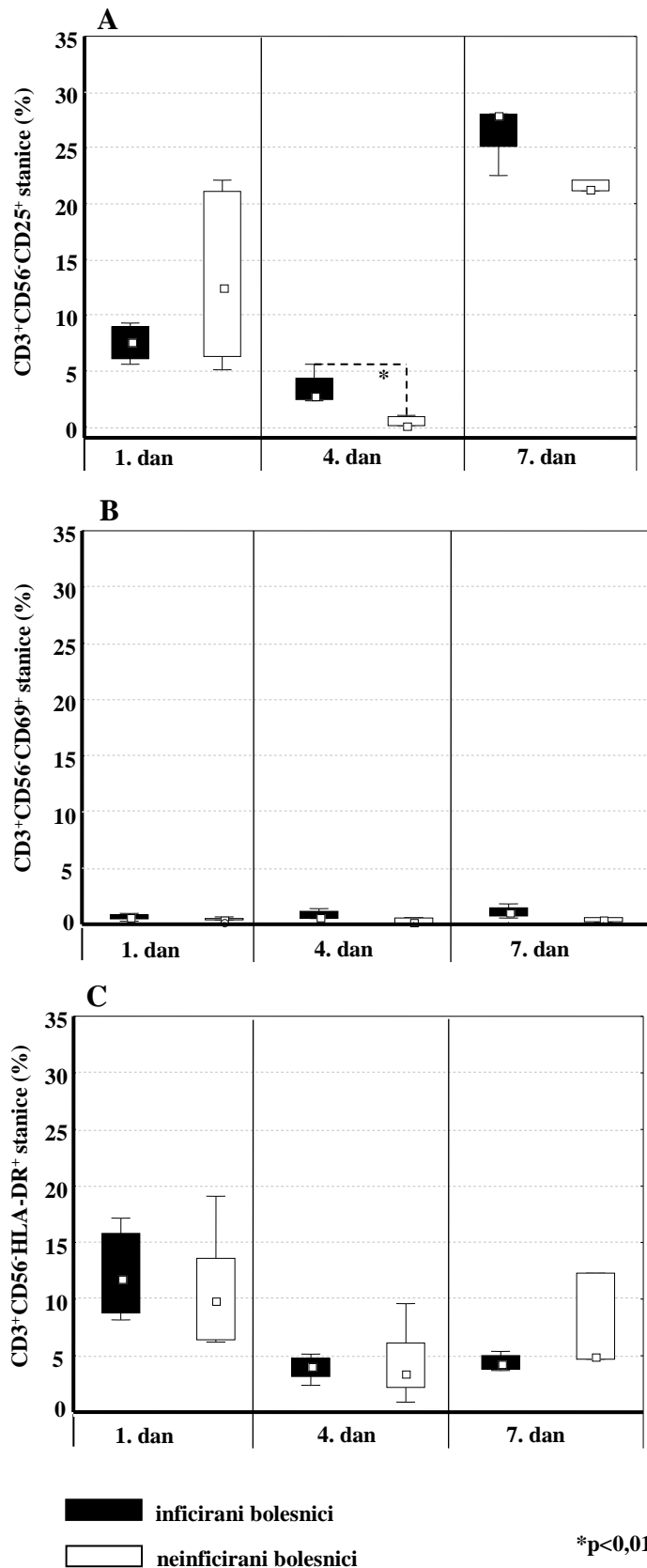


**Slika 19. Udio limfocita T koji izražavaju aktivacijske biljege CD25 (A), CD69 (B) i HLA-DR (C) u cjelokupnoj populaciji limfocita periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**





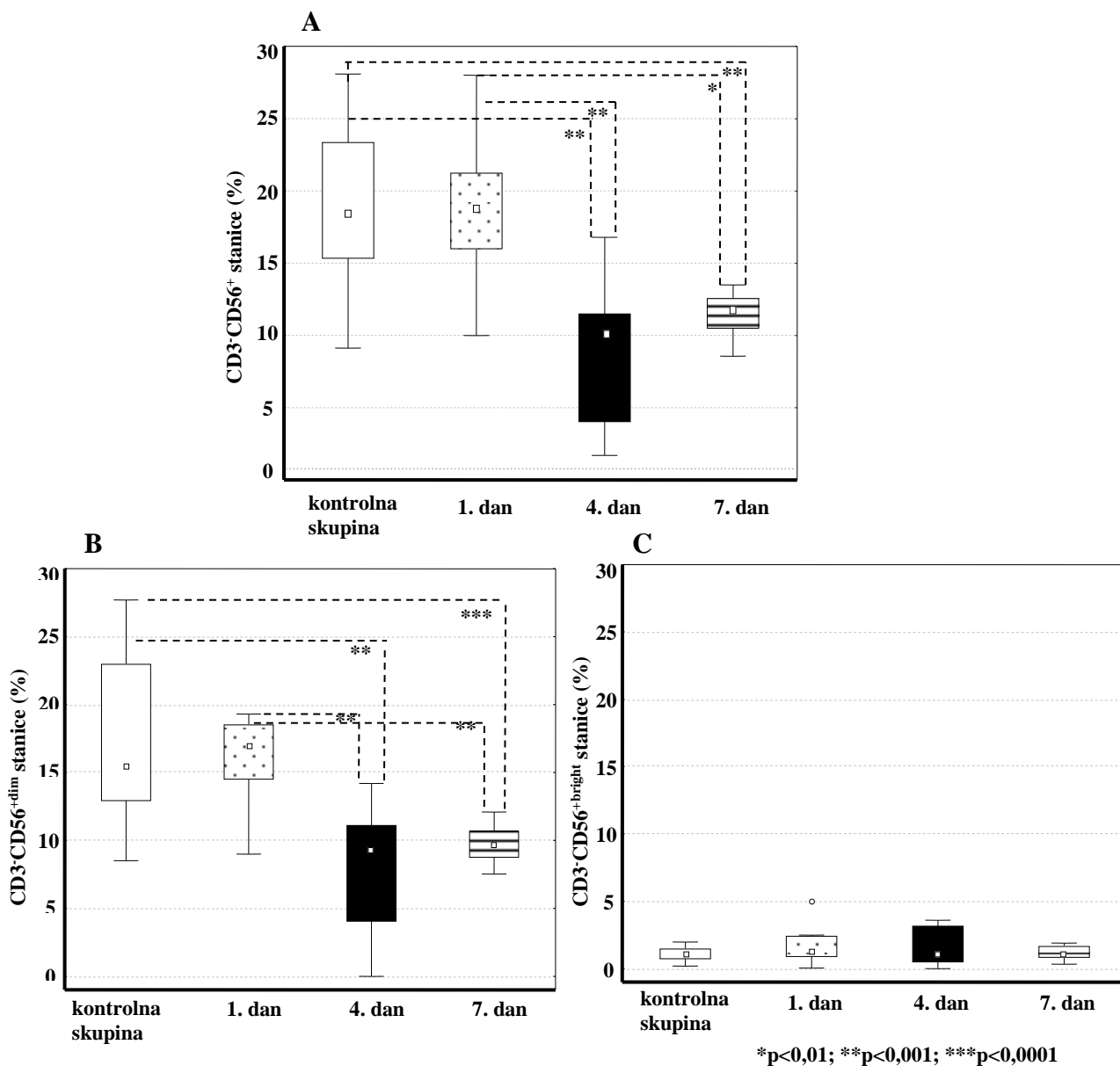
Slika 20. Srednji intenzitet fluorescencije za molekule CD25 (A), CD69 (B) i HLA-DR (C) na površini limfocita T periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)



**Slika 21. Usporedba udjela limfocita T koji izražavaju aktivacijske biljege CD25 (A), CD69 (B) i HLA-DR (C) u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima**

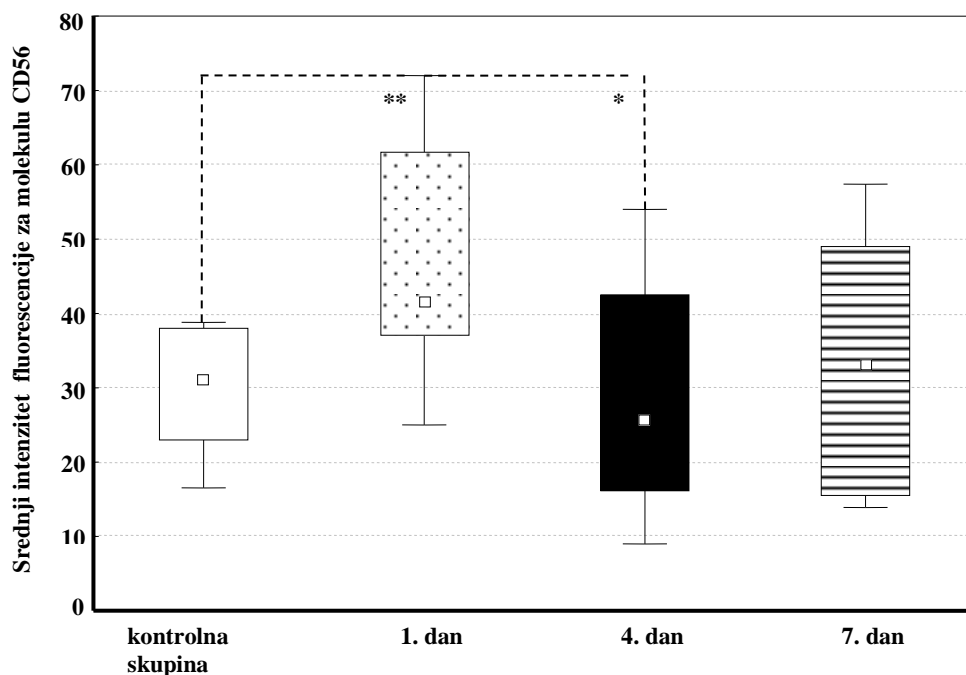
#### ***4.5.1.2. Zastupljenost, promjene učestalosti i stupanj aktivacije stanica NK i njihovih subpopulacija u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga***

Stanice NK smo definirani kao CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> stanice. Njihov prosječni udio u perifernoj krvi kontrolne skupine i bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dana nakon ozljede bio je oko 20% (Slika 22A). Četvrtog dana nakon ozljede bilježi se statistički značajno smanjenje postotka stanica NK u odnosu na 1. dan nakon ozljede i kontrolnu skupinu ( $p < 0,001$ ) (Slika 22A). Sedmog dana nakon ozljede postotak stanica NK u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga nije se vratio na postotak zabilježen u kontrolnoj skupini i 1. dana nakon ozljede. Čini se da su ove promjene u udjelu stanica NK u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga posljedica promjena postotaka CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim+</sup> subpopulacije koje su pokazale istu dinamiku promjena (Slika 22B). Udio CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright+</sup> stanica NK nije se značajno mijenjao u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima (Slika 22C).



**Slika 22. Promjene učestalosti CD3-CD56<sup>+</sup> stanica NK (A) te njihovih CD3-CD56<sup>+</sup>dim (B) i CD3-CD56<sup>+</sup>bright (C) subpopulacija u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**

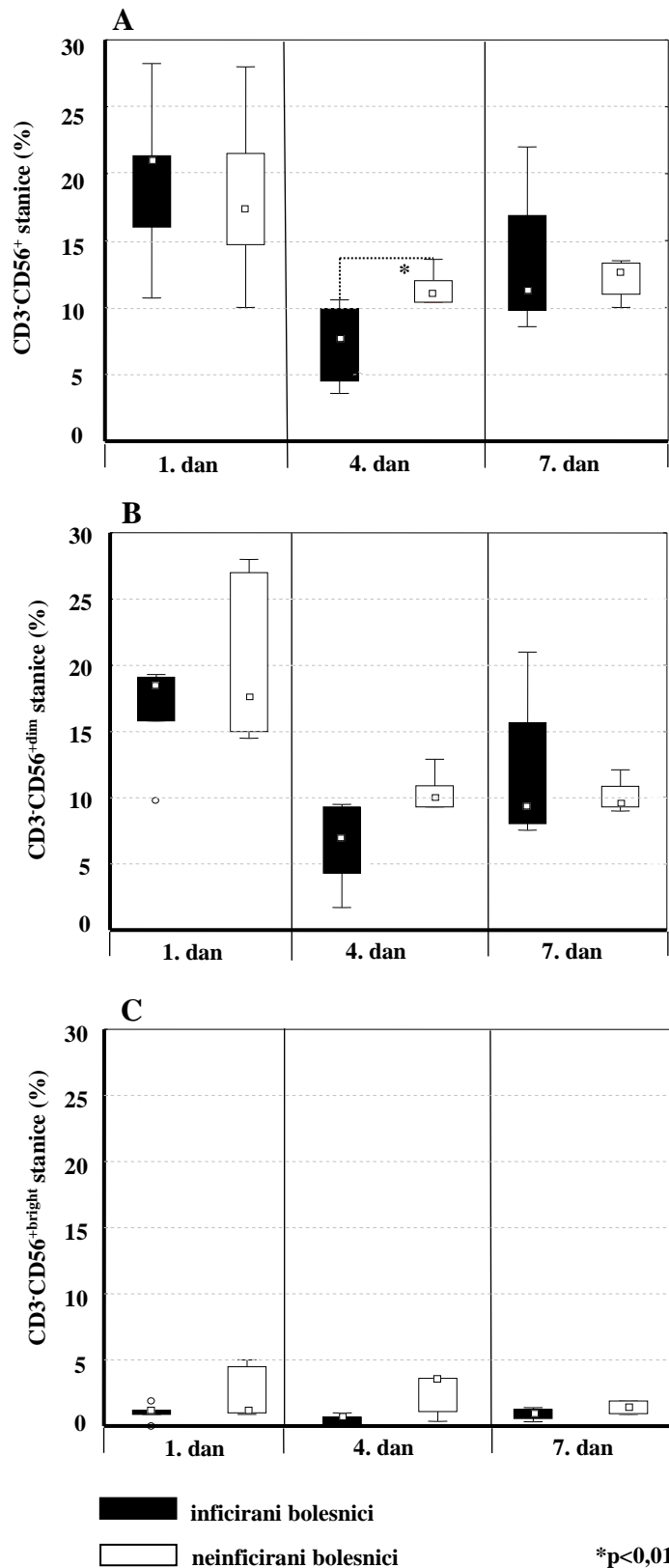
Analizirajući srednji intenzitet fluorescencije za molekulu CD56 na površini stanica NK u bolesnika s teškom ozljedom mozga i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi, utvrdili smo statistički značajno veće vrijednosti u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dana nakon ozljede u odnosu na 4. dan nakon ozljede i kontrolnu skupinu (Slika 23).



\*p<0,01; \*\*p<0,001

**Slika 23. Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za molekulu CD56 na površini stanica NK periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**

Uspoređujući udio stanica NK u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga uočili smo značajano smanjenje udjela CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> stanica NK u inficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede u odnosu na neinficiranu skupinu (Slika 24A). Značajne razlike između udjela CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+dim</sup> (Slika 24B) CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+bright</sup> (Slika 24C) subpopulacija stanica NK nisu uočene između inficirane i neinficirane skupine bolesnika s teškom ozljedom mozga.

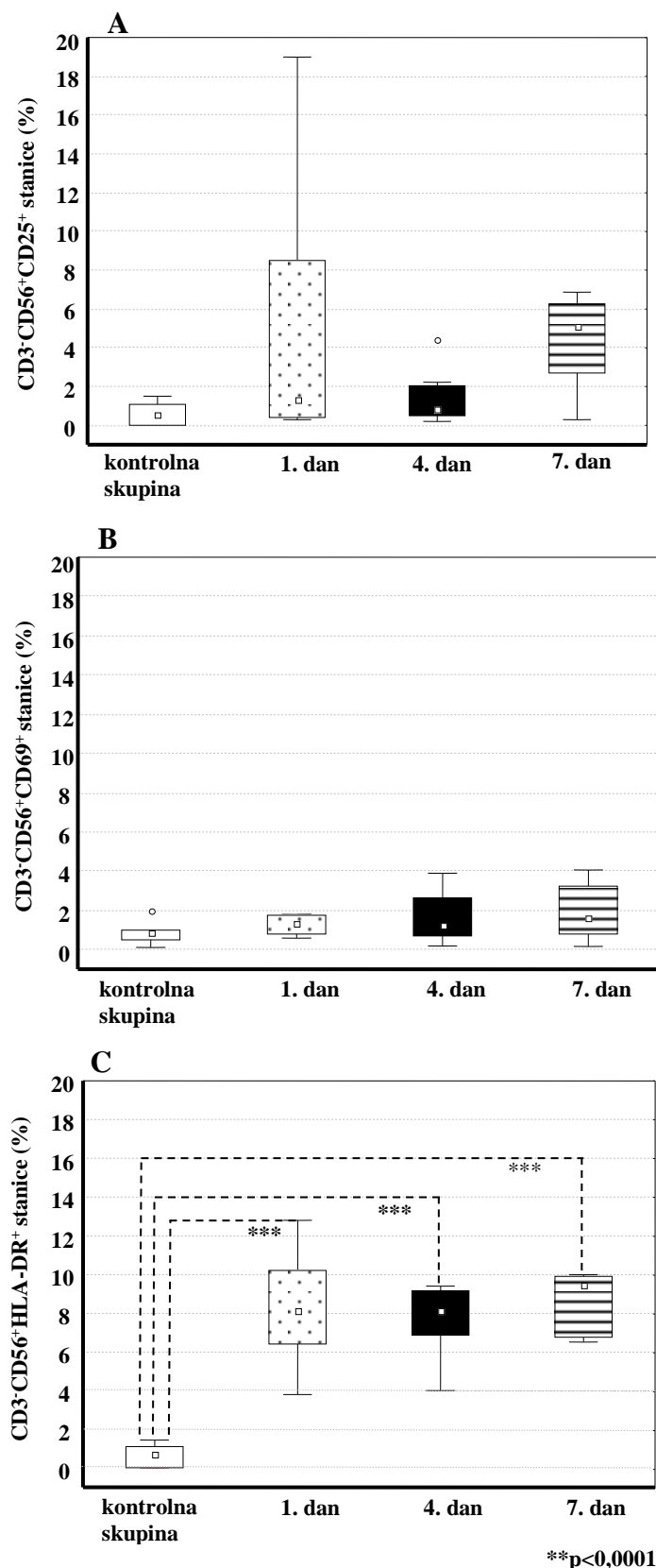


Slika 24. Promjene učestalosti CD3-CD56<sup>+</sup> stanica NK (A) te njihovih CD3-CD56<sup>dim</sup> (B) i CD3-CD56<sup>bright</sup> (C) subpopulacija u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima

U pokusima u kojima smo pratili promjene udjela CD25<sup>+</sup> (Slika 25A), CD69<sup>+</sup> (Slika 25B) i HLA-DR<sup>+</sup> (Slika 25C) stanica NK zabilježili smo statistički značajan porast udjela HLA-DR<sup>+</sup> stanica NK u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 1., 4. i 7. dan nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,0001$ ) (Slika 25C), dok se udio CD25<sup>+</sup> stanica (Slika 25A) i udio CD69<sup>+</sup> stanica NK (Slika 25B) nije bitnije mijenjao.

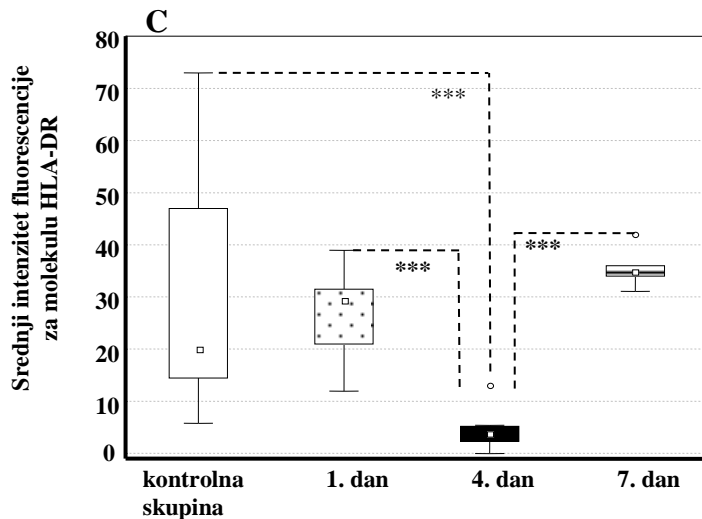
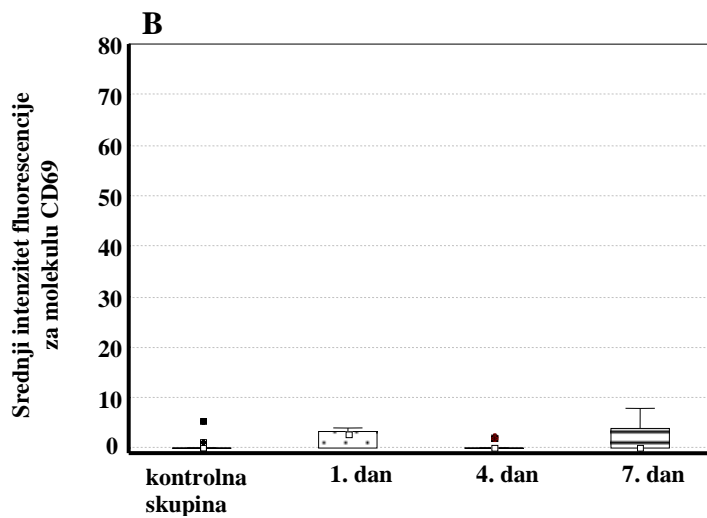
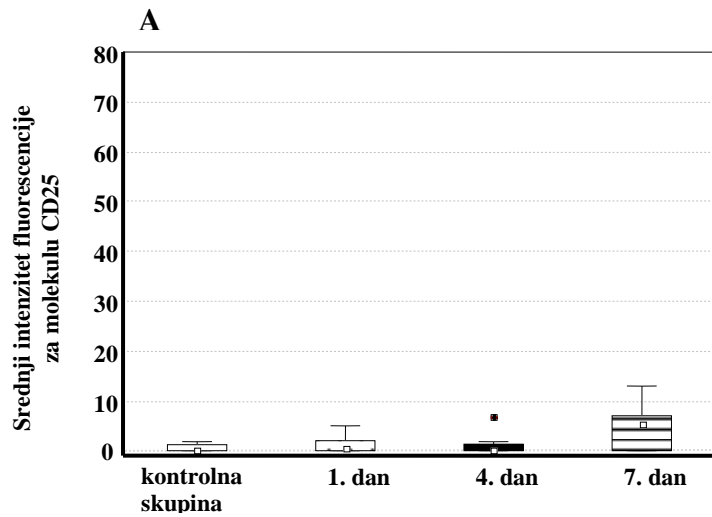
Srednji intenzitet fluorescencije za molekule CD25 (Slika 26A) i CD69 (Slika 26B) na površini stanica NK nije se statistički značajno mijenjao u bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima. Suprotno tome, srednji intenzitet fluorescencije za molekulu HLA-DR na površini stanica NK bio je statistički značajno niži u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dan nakon ozljede u odnosu na 1. dan i kontrolnu skupinu ( $p < 0,0001$ ) i pokazao statistički značajni porast 7. dana nakon ozljede u odnosu na 4. dan (Slika 26C).

Udio CD25<sup>+</sup> stanica NK u neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga bio je statistički značajno niži u odnosu na inficirane bolesnike 4. dana nakon ozljede (Slika 27A), dok se promjene ostalih aktivacijskih biljega nisu razlikovale između inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima (Slika 27 B i C).



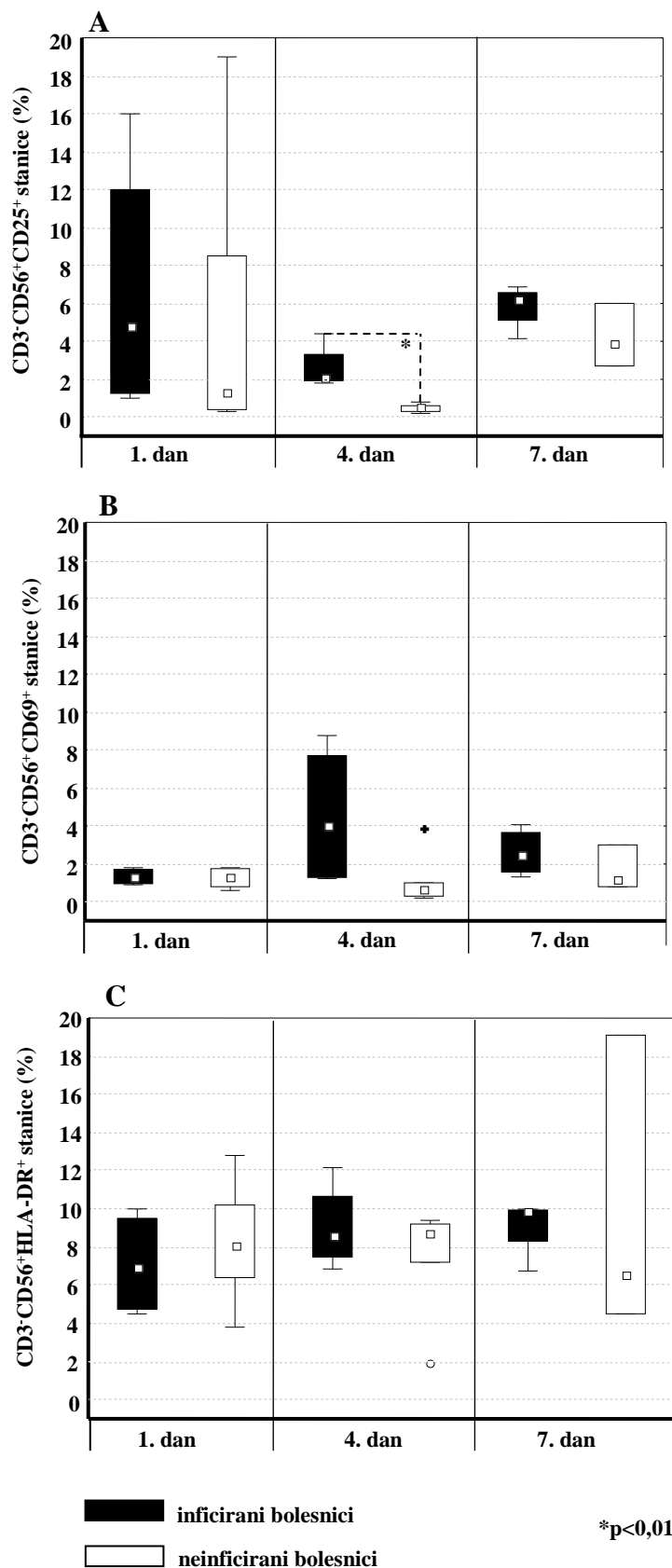
**Slika 25.** Udio stanica NK koje izražavaju aktivacijske biljege CD25 (A), CD69 (B) i HLA-DR (C) cjelokupnoj populaciji stanica NK periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)





\*\*\*p<0,0001

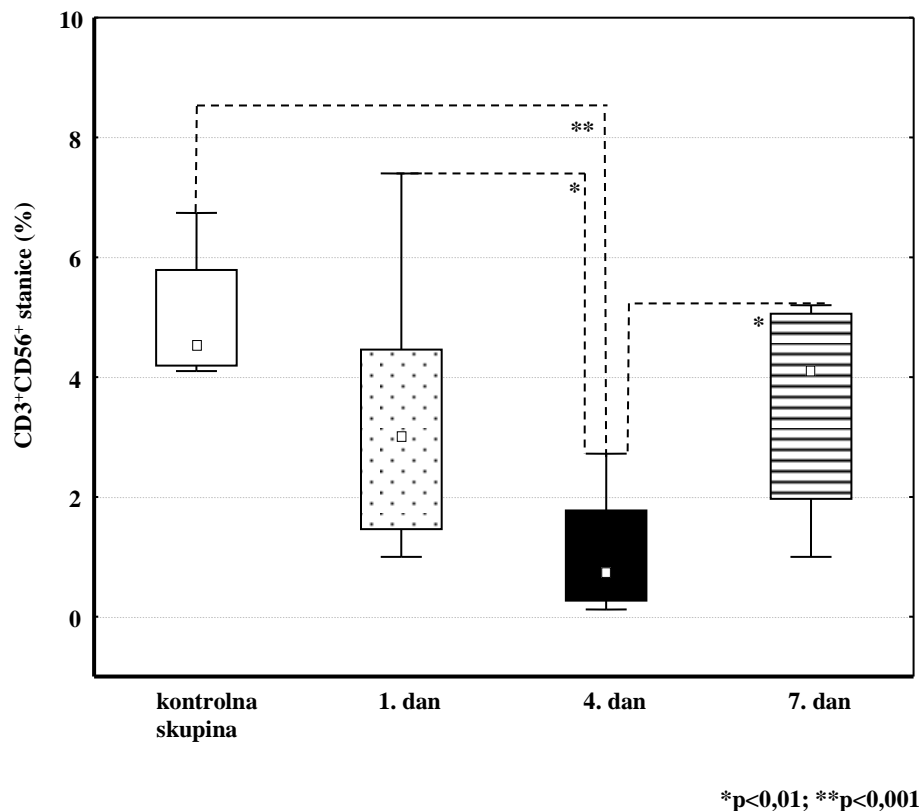
**Slika 26. Srednji intenzitet fluorescencije za molekule CD25 (A), CD69 (B) i HLA-DR (C) na površini stanica NK periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



Slika 27. Usporedba udjela stanica NK koje izražavaju aktivacijske biljege CD25 (A), CD69 (B) i HLA-DR (C) u ukupnoj populaciji stanica NK periferne krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima

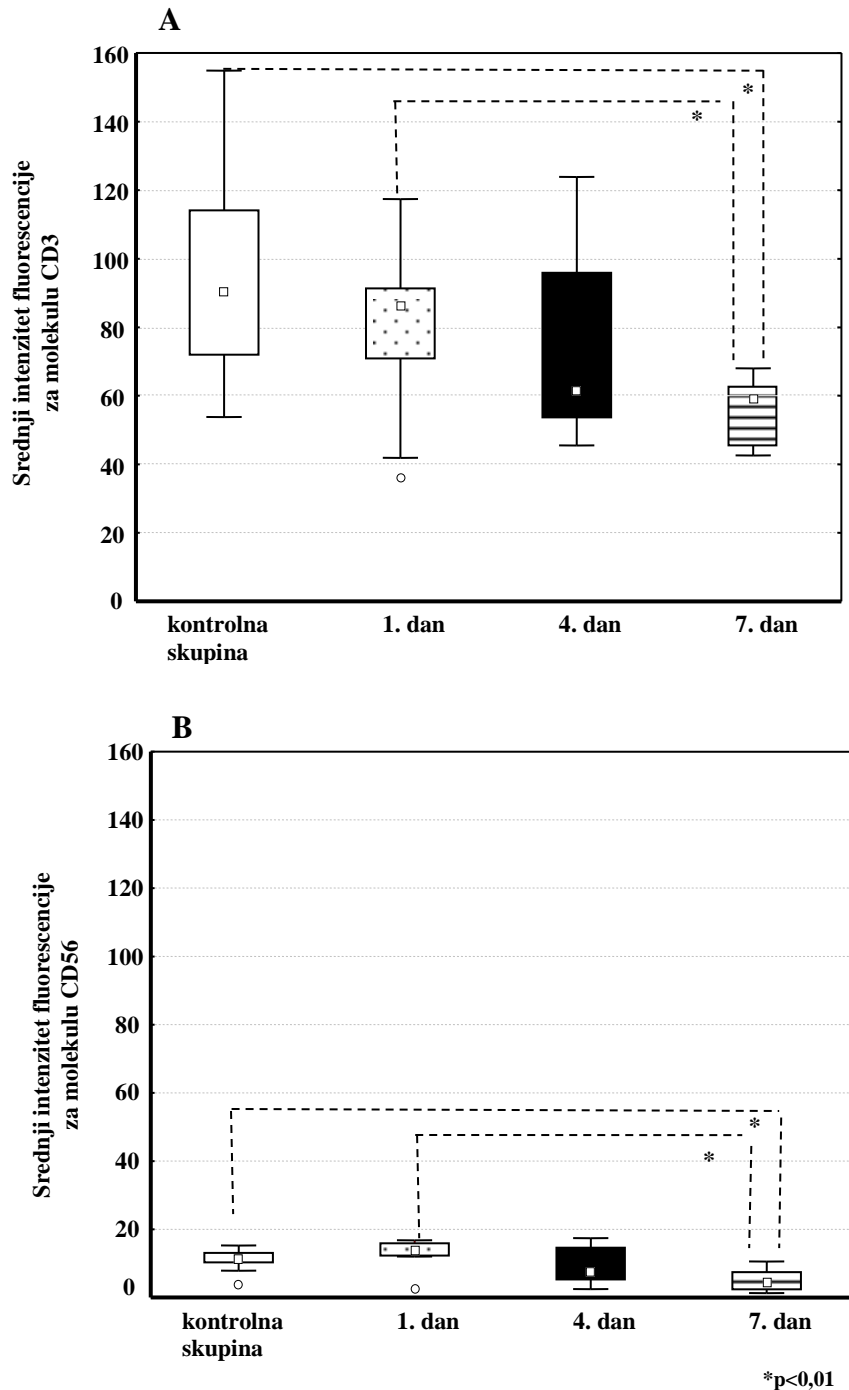
#### 4.5.1.3. Zastupljenost, promjene učestalosti i stupanj aktivacije stanica NK-T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga

Stanice NK-T smo definirali kao dvostruko pozitivne, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stanice. Promjene udjela stanica NK-T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi pokazali smo na Slici 28. Postotak stanica NK-T statistički se značajno smanjuje u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede u odnosu na 1. dan i kontrolnu skupinu. Sedmog dana nakon ozljede udio stanica NK-T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga statistički je značajno veći u odnosu na 4. dan i vraća se na vrijednost 1. dana (p<0,01).



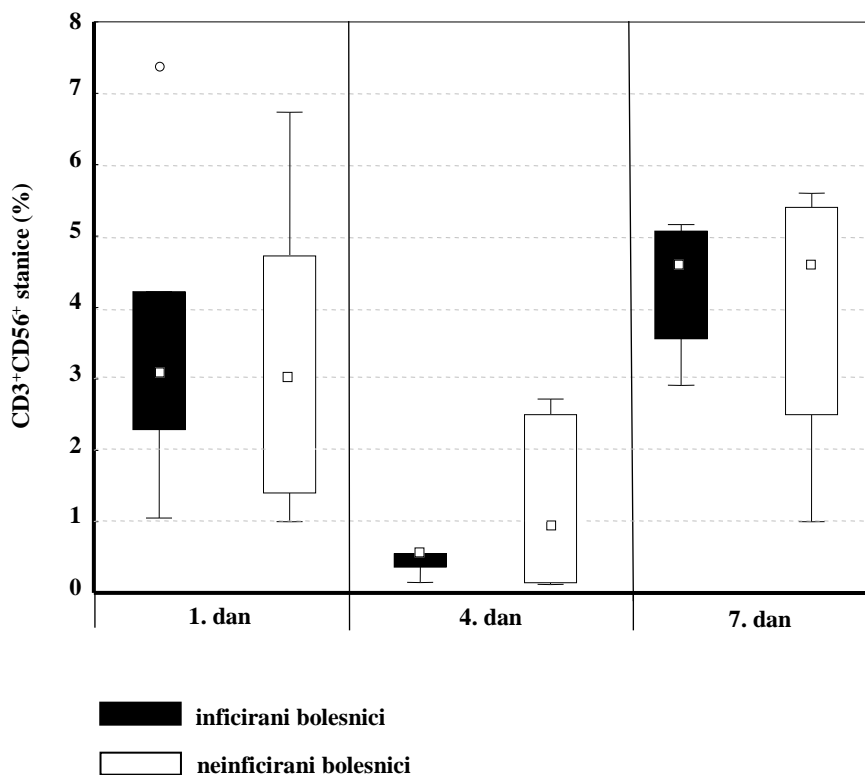
**Slika 28. Promjene učestalosti stanica NK-T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**

Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za molekule CD3 i CD56 na površini stanica NK-T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 7. dana nakon ozljede statistički se značajno smanjuju u odnosu na 1. dan i kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ) (Slika 29 A i B).



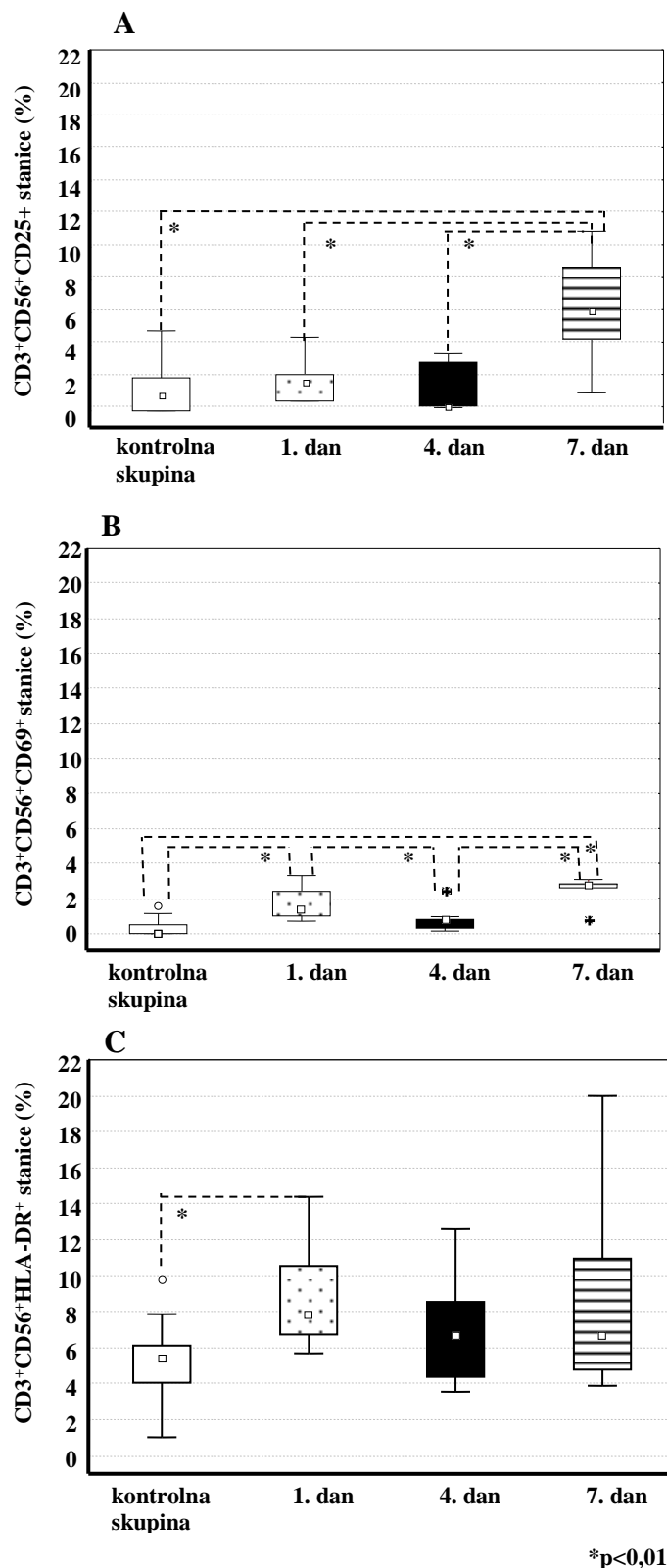
**Slika 29. Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za molekule CD3 (A) i CD56 (B) na površini stanica NK-T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**

Uspoređujući udio stanica NK-T u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga nismo našli statistički značajnu razliku (Slika 30).



**Slika 30. Usporedba promjena učestalosti stanica NK-T u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima**

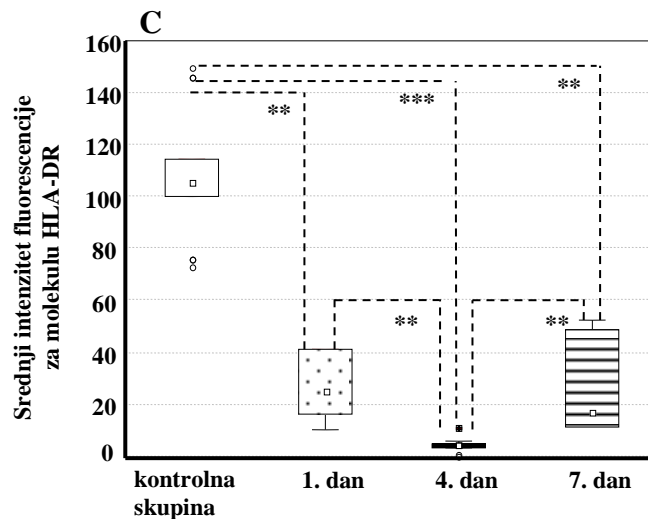
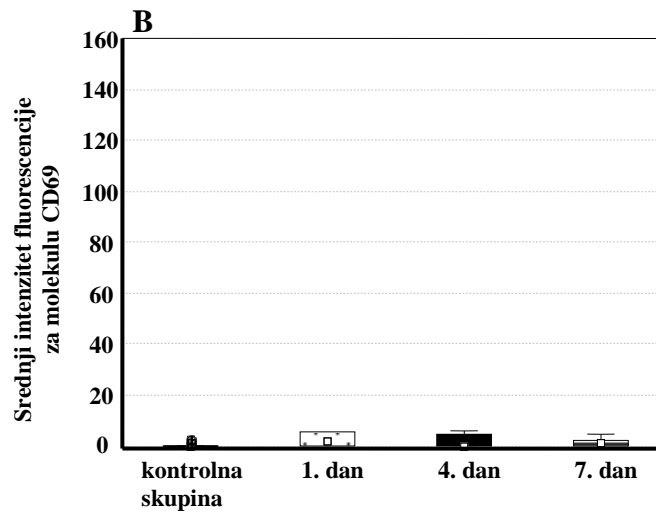
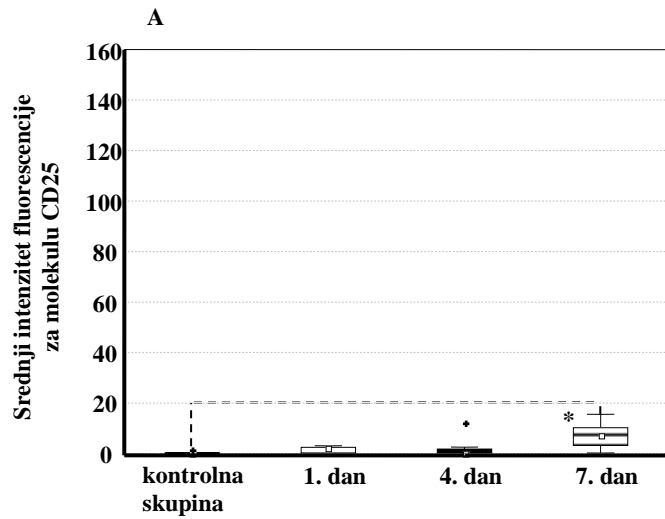
Analizirajući udio stanica NK-T koje izražavaju aktivacijske biljege CD25, CD69 i HLA-DR u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga uočili smo statistički značajni porast izražaja molekule CD25 7. dana nakon ozljede u odnosu na 1. i 4. dan te kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ) (Slika 31A). Udio CD69<sup>+</sup> stanica NK-T bio je statistički značajno veći u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. i 7. dana nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je 4. dana pokazao statistički značajno nižu vrijednost u odnosu na 1. i 7. dan (Slika 31B). Udio HLA-DR<sup>+</sup> stanica NK-T bio je statistički značajno viši u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dan nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ) (Slika 31C).



**Slika 31. Udio stanica NK-T koje izražavaju aktivacijske biljege CD25 (A), CD69 (B) i HLA-DR (C) u ukupnoj populaciji stanica NK-T periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**

Srednji intenzitet fluorescencije za molekulu CD25 na površini stanica NK-T bio je statistički značajno viši u bolesnika s teškom ozljedom mozga 7. dana nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 32A). Srednji intenzitet fluorescencije za molekulu CD69 na površini stanica NK-T nije se mijenjao u bolesnika s teškom ozljedom mozga istraživanim danima (Slika 32B). Srednji intenzitet fluorescencije za molekulu HLA-DR na površini stanica NK-T bio je statistički značajno niži u bolesnika s teškom ozljedom mozga u odnosu na kontrolnu skupinu 1., 4. i 7. dana nakon ozljede (Slika 32C). najniža vrijednost uočena je 4. dana nakon ozljede kao dodatno smanjenje u odnosu na 1. i 7. dan nakon ozljede mozga (Slika 32C).

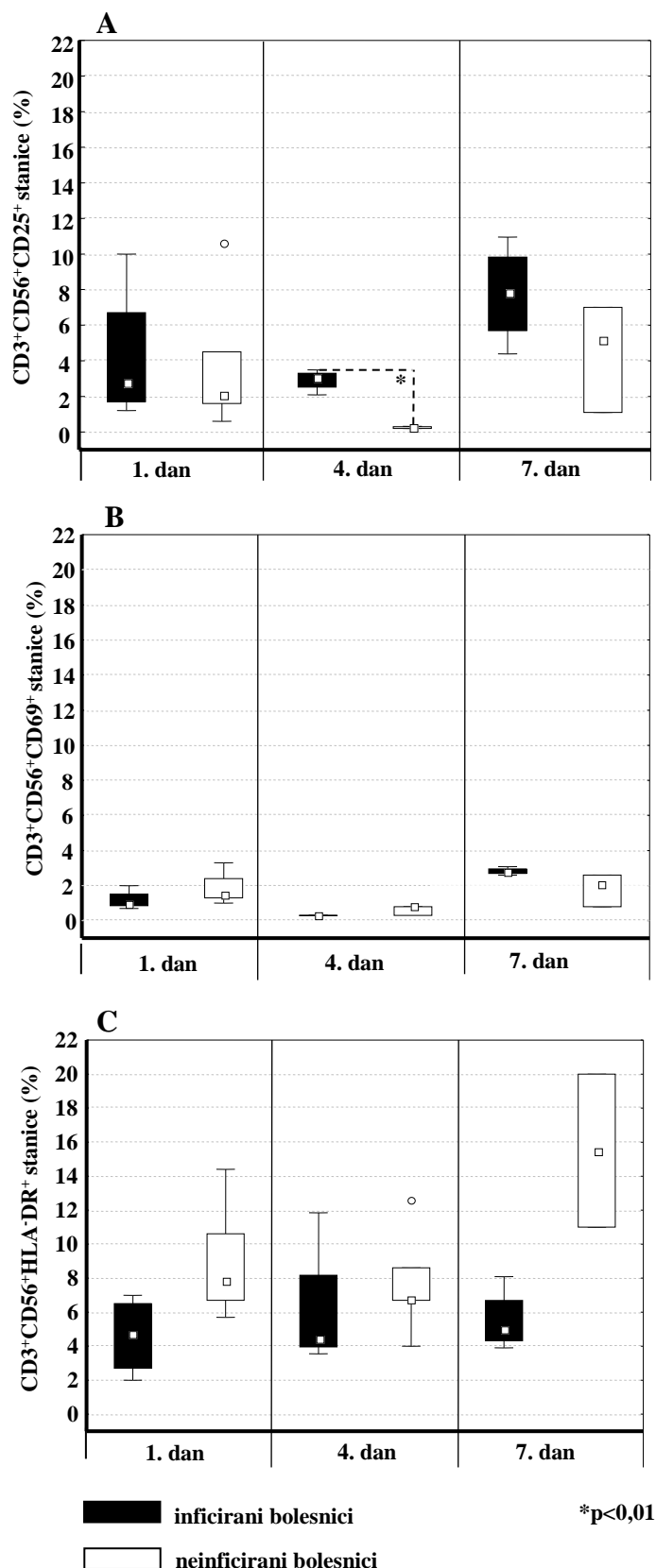
Uspoređujući prosječan broj aktivacijskih biljega CD25 (Slika 33A), CD69 (Slika 33B) i HLA-DR (Slika 33C) na površini pojedine stanice NK-T u inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga uočili smo statistički značajan porast udjela molekule CD25 u inficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede ( $p < 0,05$ ).



\*p<0,01; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

**Slika 32. Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za molekule CD25 (A), CD69 (B) i HLA-DR (C) na površini stanica NK-T periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



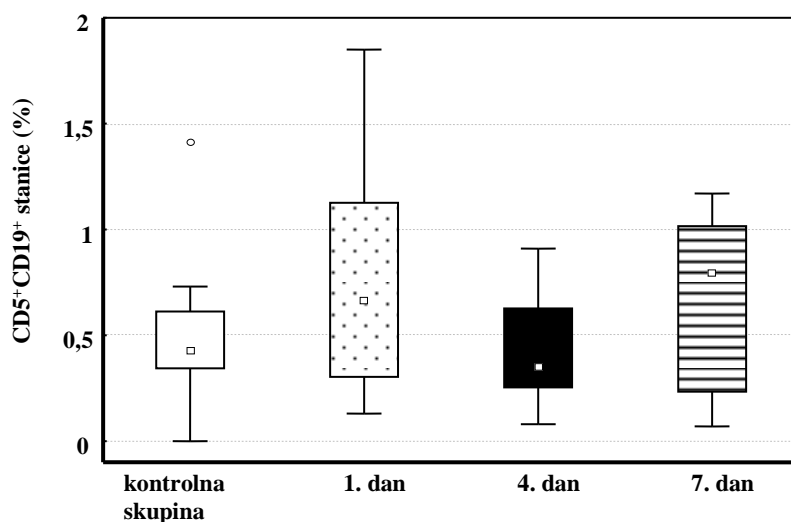


Slika 33. Usporedba udjela stanica NK-T koje izražavaju aktivacijske biljege CD25 (A), CD69 (B) i HLA-DR (C) u ukupnoj populaciji stanica NK-T periferne krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima

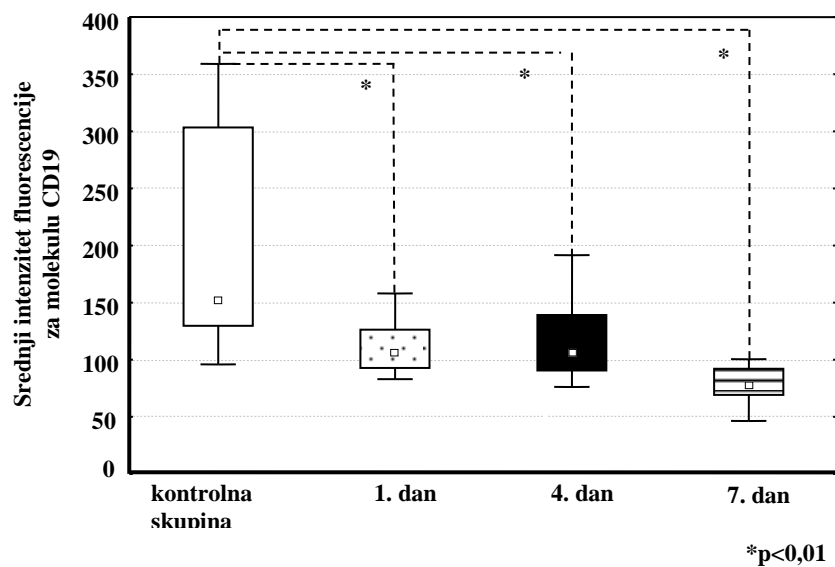
#### 4.5.1.4. Zastupljenost i dinamičke promjene limfocita B u bolesnika s teškom ozljedom mozga

Analizom učestalosti CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> limfocita B u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga nismo uočili značajne promjene u ispitivanim danima, kao niti značajna odstupanja u odnosu na vrijednosti u kontrolnoj skupini (Slika 34). Suprotno tome, srednji intenzitet fluorescencije za molekulu CD19 na površini limfocita B pokazao je statistički značajno smanjenje 1., 4. i 7. dana nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 35).

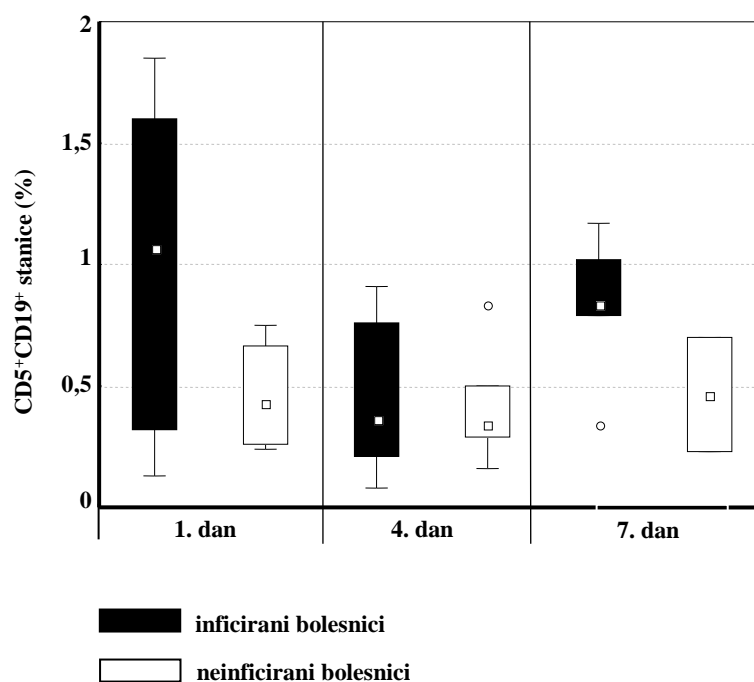
I u inficiranih i u neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga nije došlo do statistički značajnih odstupanja udjela limfocita B u ispitivanim danima (Slika 36).



**Slika 34. Promjene učestalosti limfocita B u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



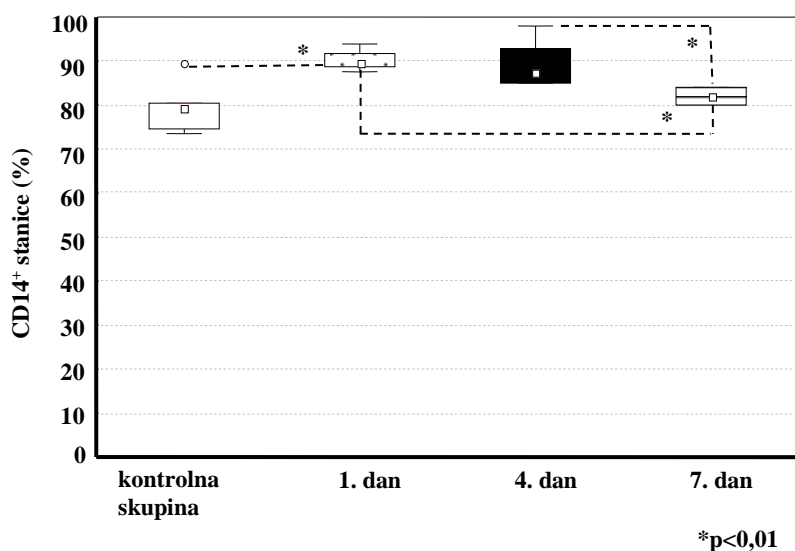
**Slika 35. Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za molekulu CD19 na površini limfocita B u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



**Slika 36. Usporedba promjene učestalosti limfocita B u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima**

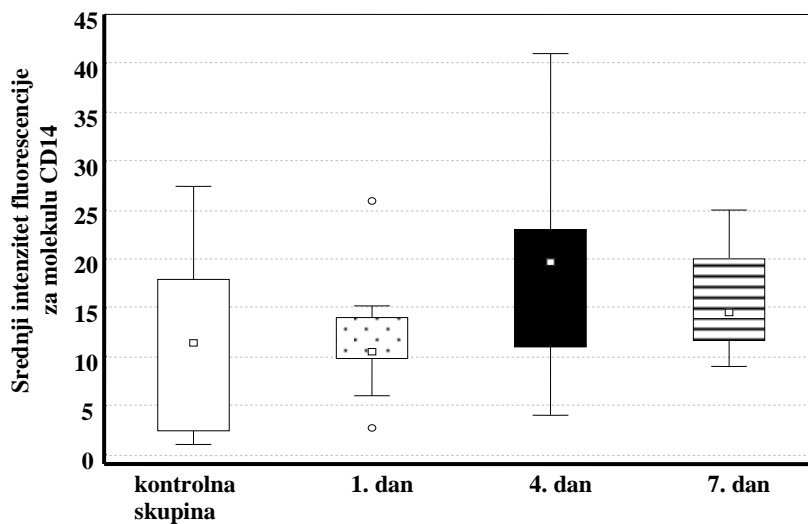
#### 4.5.1.5. Zastupljenost, promjene učestalosti i stupanj aktivacije monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga

Postavljajući elektroničku ogradu pri analizi stanica protočnim citometrom na stanice koje veličinom i granuliranošću odgovaraju monocitama te njihovim obilježavanjem s protu-CD14 protutijelom uočili smo da se njihov postotak mijenja u bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima. Naime, 1. dana nakon ozljede postotak monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga bio je veći u odnosu na kontrolnu skupinu i 7. dan nakon ozljede (Slika 37). Učestalost CD14<sup>+</sup> stanica 7. dana nakon ozljede bila je niža nego li 4. dana (Slika 37).

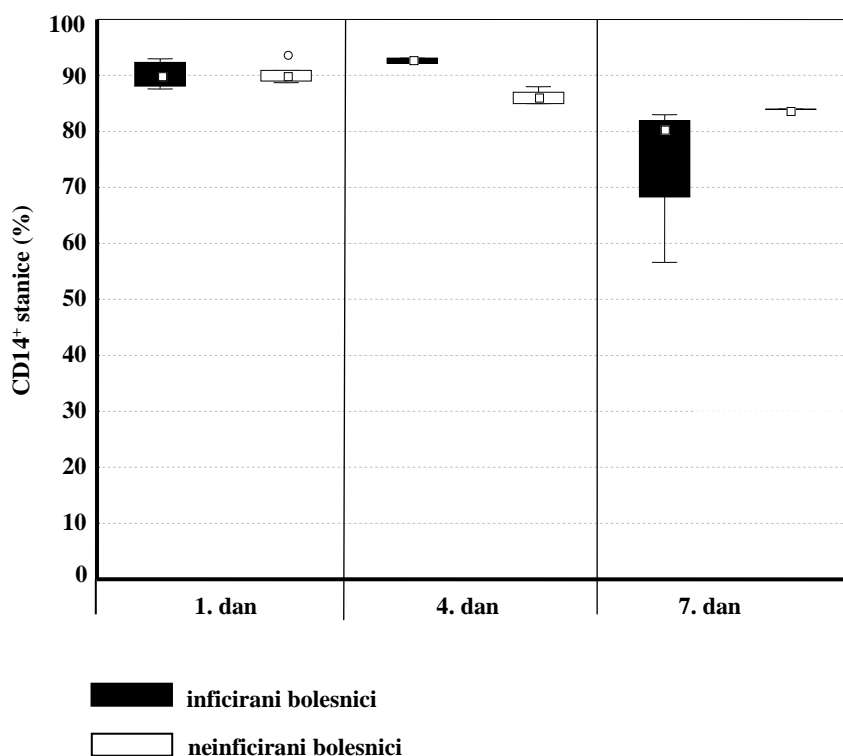


**Slika 37. Promjene učestalosti monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**

Srednji intenzitet fluorescencije za molekulu CD14 na površini monocita nije se statistički značajnije mijenjao (Slika 38). Statistički značajne promjene postotka monocita u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga nisu uočene u ispitivanim danima (Slika 39).



**Slika 38. Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za molekulu CD14 na površini monocita u bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**

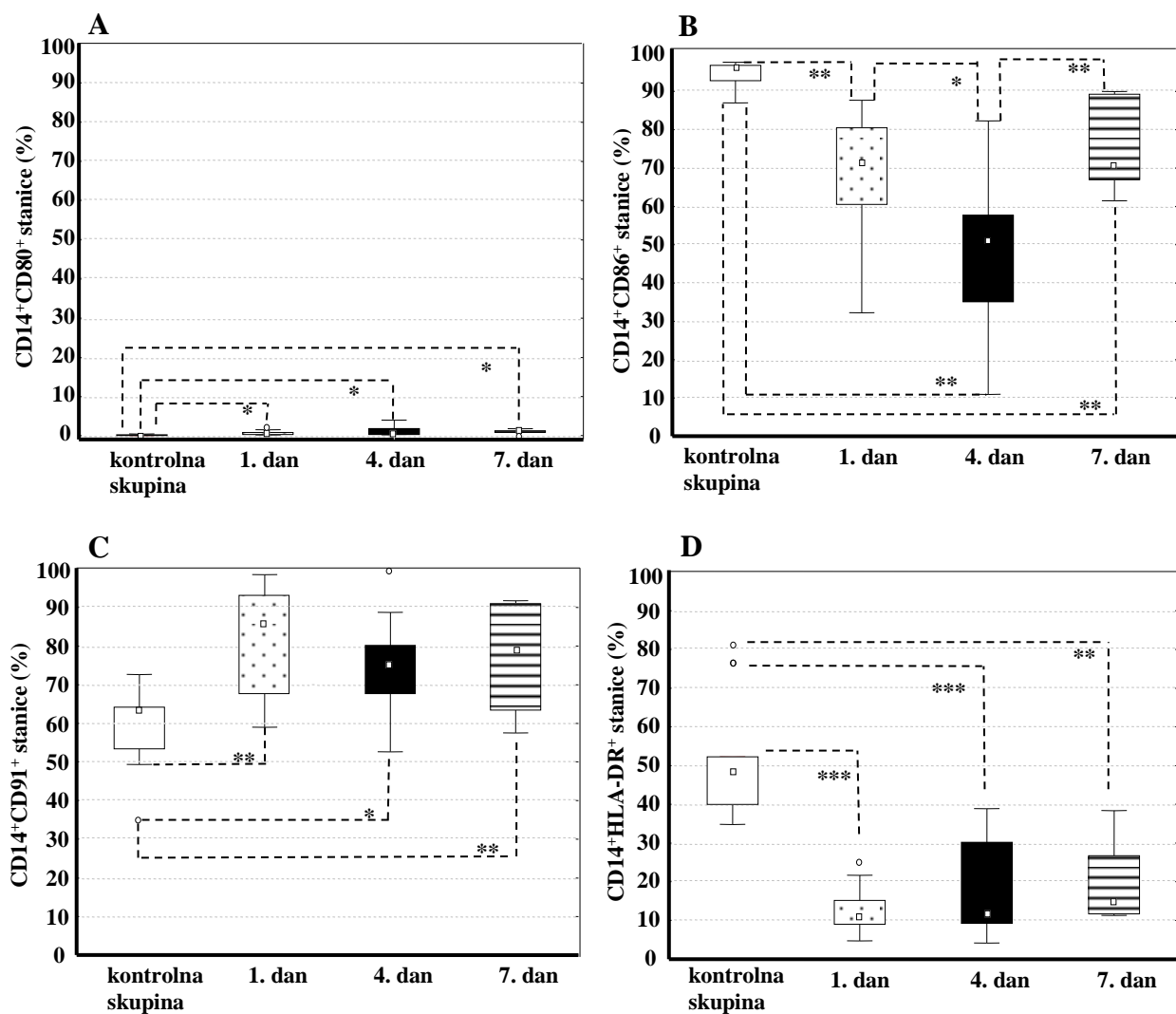


**Slika 39. Usporedba promjena učestalosti monocita u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima**

Poznato je da je aktivacija monocita praćena ushodnim izražajem aktivacijskih biljega, molekule MHC razreda II (HLA-DR), kostimulacijskih molekula (CD80, CD86) i drugih biljega (CD91). Proućavajući izražaj aktivacijskih biljega na površini monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga uočili smo statistički znaćajni porast udjela CD80<sup>+</sup> (Slika 40A) i CD91<sup>+</sup> monocita (Slika 40C) 1., 4. i 7. dana nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu. Udio CD86<sup>+</sup> monocita (Slika 40B) i HLA-DR<sup>+</sup> monocita (Slika 40D) znaćajno se smanjio u odnosu na kontrolnu skupinu. Dodatno sniženje udjela CD86<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> stanica zabilježili smo 4. dana nakon ozljede u odnosu na 1. i 7. dan (Slika 40B).

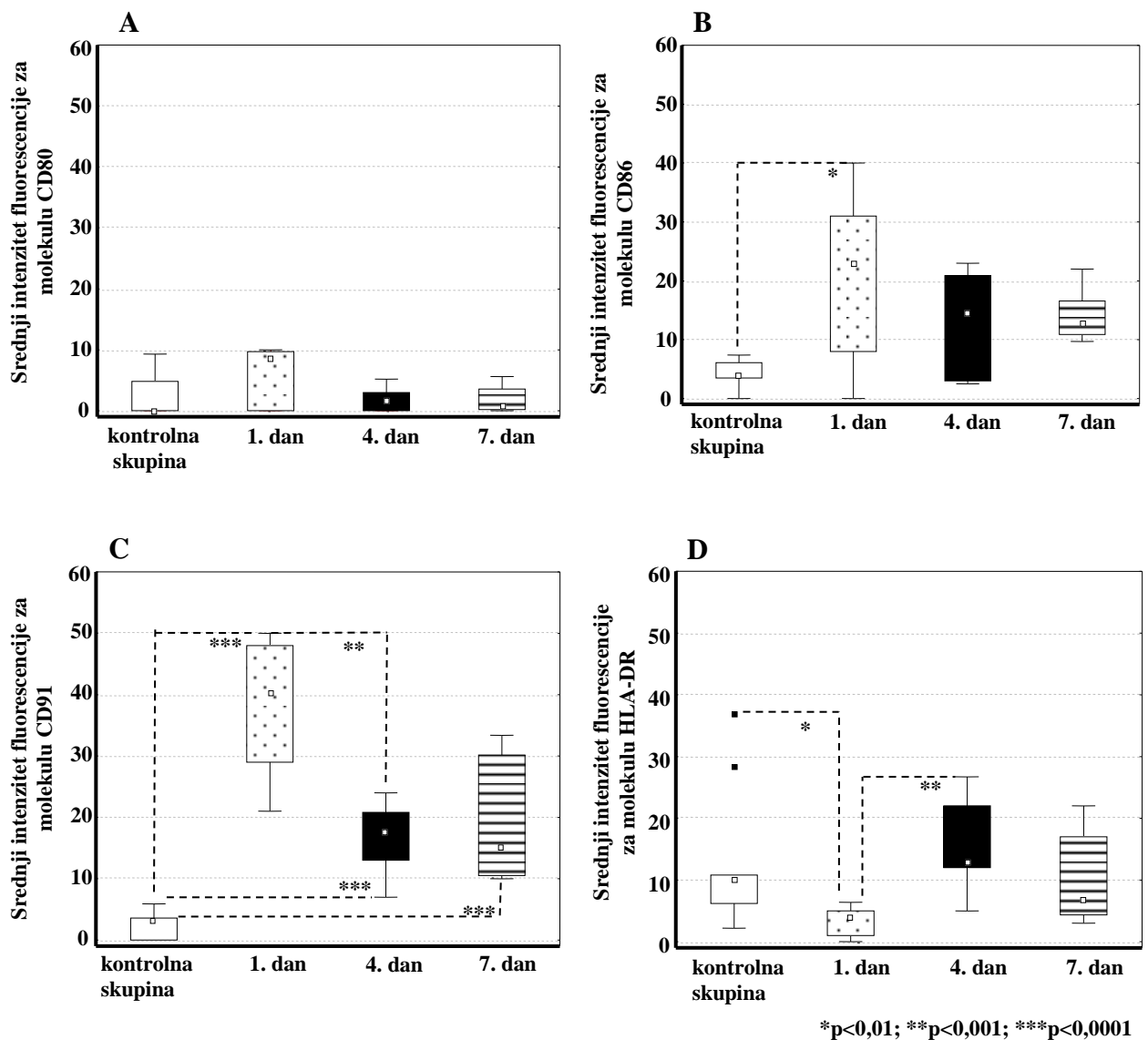
Srednji intenzitet fluorescencije za molekulu CD80 na površini monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga nije se statistički znaćajnije mijenjao (Slika 41A). Srednji intenzitet fluorescencije za molekulu CD86 na površini monocita statistički je bio znaćajno viši u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dan nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 41B), a statistički znaćajno niži za molekulu HLA-DR istoga dana (Slika 41D). Srednji intenzitet fluorescencije za molekulu CD91 na površini monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga bio je statistički znaćajno viši u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 41C).

Analizom udjela aktivacijskih biljega CD80 (Slika 42A), CD86 (Slika 42B), CD91 (Slika 42C) i HLA-DR (Slika 42D) na površini monocita u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga statistički znaćajni porast u inficiranih bolesnika uočili smo za molekulu CD80 (Slika 42A) i HLA-DR (Slika 42D) 4. dana nakon ozljede.



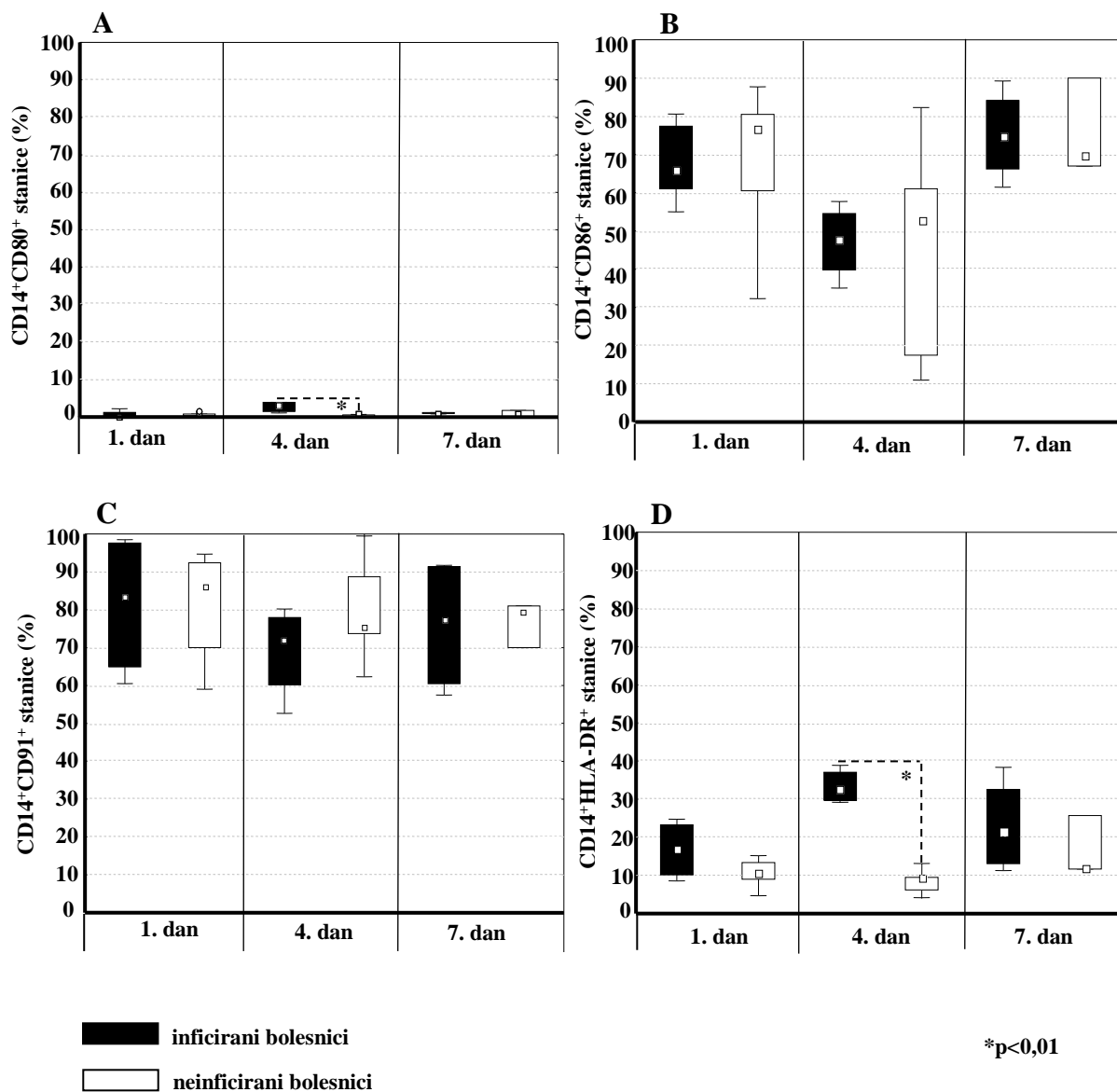
\*p<0,01; \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,0001

Slika 40. Udio monocita koji izražavaju aktivacijske biljege CD80 (A), CD86 (B), CD91 (C) i HLA-DR (D) u ukupnoj populaciji monocita periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)



**Slika 41. Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za molekule CD80 (A), CD86 (B), CD91 (C) i HLA-DR (D) na površini monocita u bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**





**Slika 42.** Usporedba udijela monocita koji izražavaju aktivacijske biljege CD80 (A), CD86 (B), CD91 (C) i HLA-DR (D) u ukupnoj populaciji monocita periferne krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima

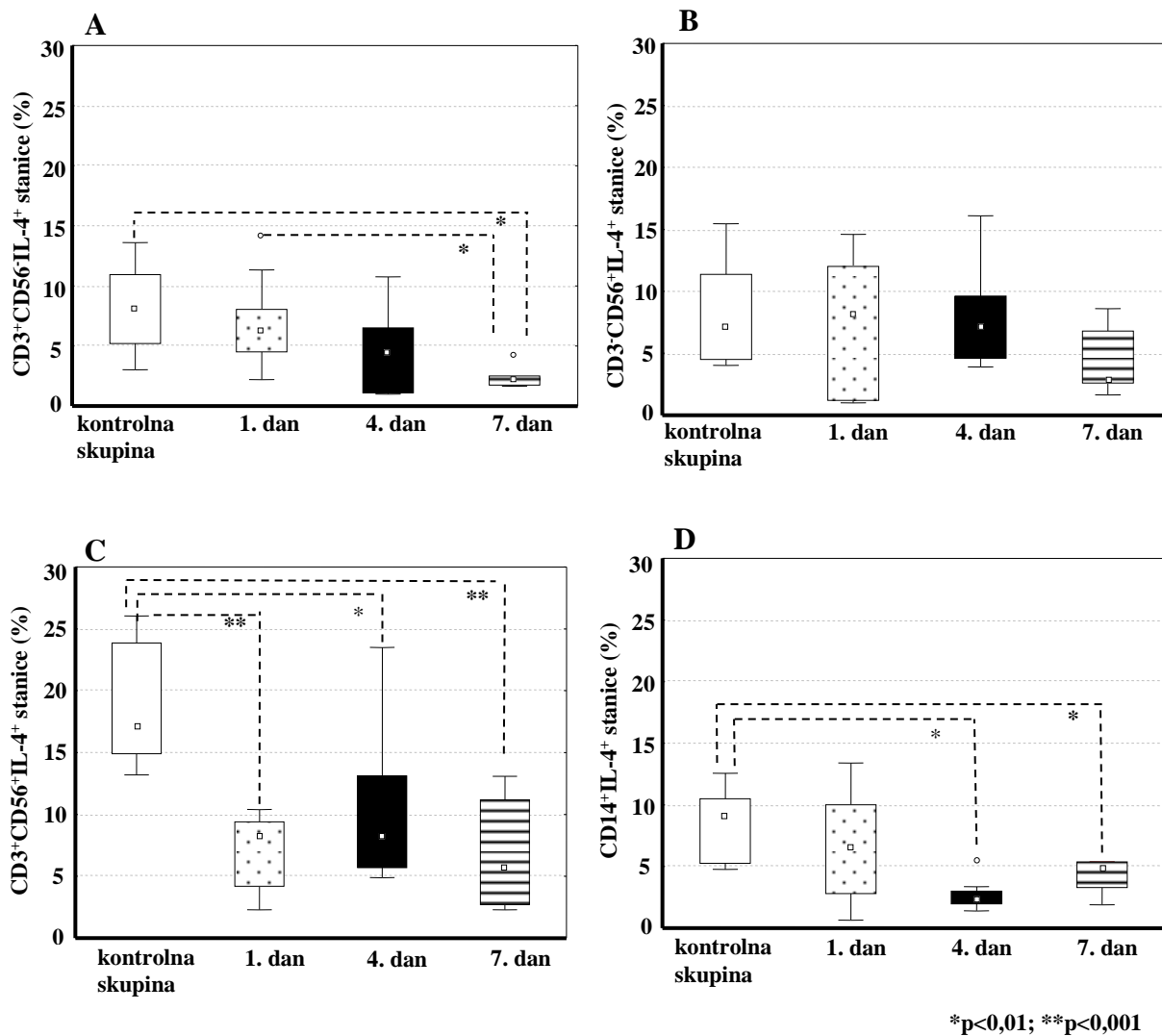
## **4.5.2. Izražavanje citokina u pojedinim limfocitnim subpopulacijama i monocitama periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga**

### ***4.5.2.1. Izražavanje IL-4 u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga***

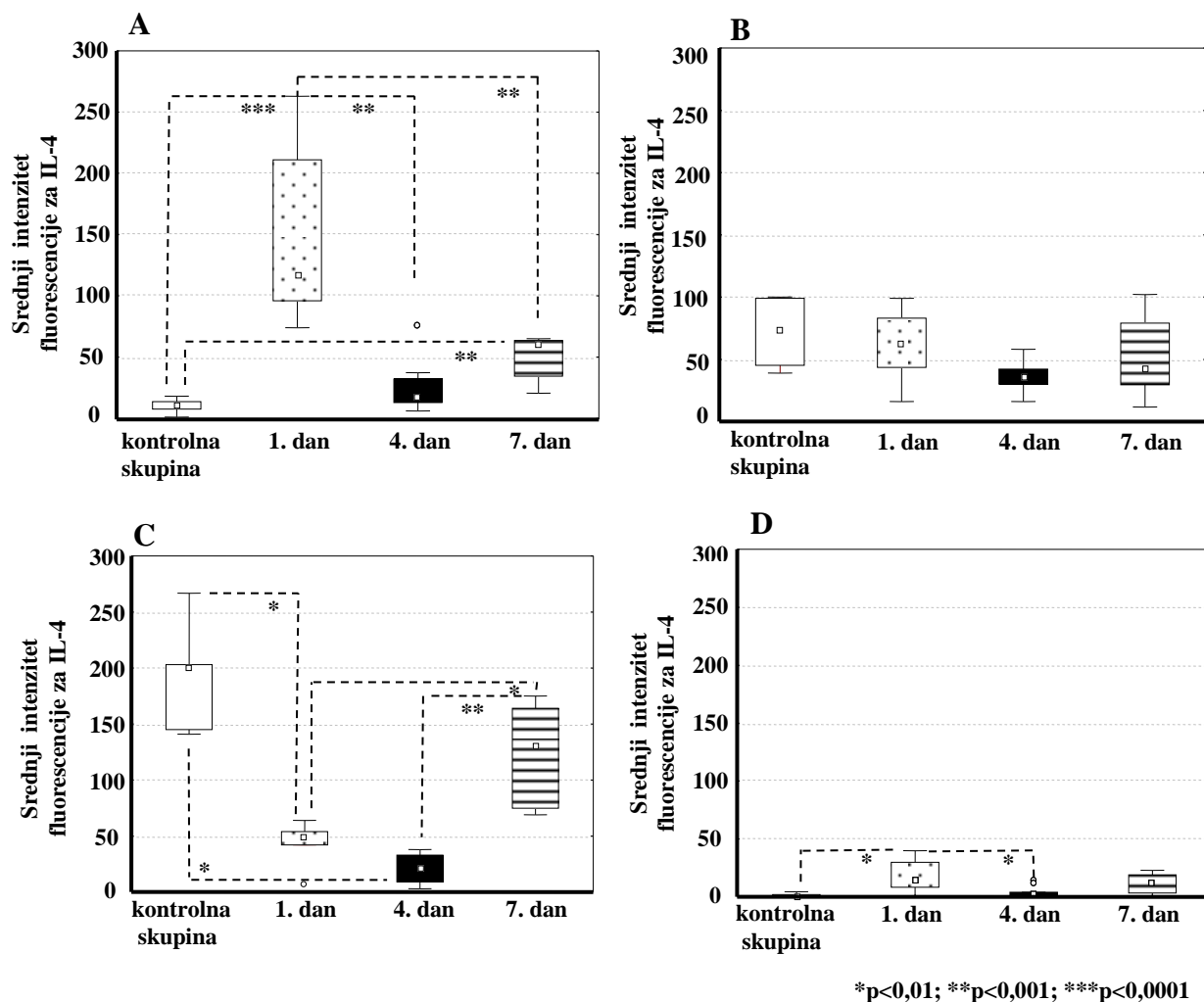
Interleukin-4 protuupalni imunološki odgovor i usmjeruje stanice k lučenju Th2 citokina, te nas je u našem istraživanju zanimalo izražaj ovog citokina u pojedinim limfocitnim subpopulacijama i monocitima u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga. Proučavajući izražaj IL-4 u navedenim staničnim subpopulacijama uočili smo statistički značajno manji izražaj IL-4 u CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> limfocitima T (Slika 43A), CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stanicama NK (Slika 43C) i monocitima (Slika 43D) u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u odnosu na kontrolnu skupinu. Dodatni smanjeni izražaj IL-4 bilježi se u bolesnika s teškom ozljedom mozga 7. dana nakon ozljede u limfocitima T u odnosu na 1. dan (Slika 43A), dok značajne promjene izražaja IL-4 nisu zabilježene na populaciji CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> stanica NK (Slika 43B).

Srednji intenzitet fluorescencije za IL-4 u limfocitima T je bio viši u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dana nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 44A i D). I u limfocitima T (Slika 44A) i monocitima (Slika 44D) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga uočljiv je statistički značajno smanjenje srednjeg intenziteta fluorescencije u odnosu na 1. dan. Za razliku od srednjeg intenziteta fluorescencije za IL-4 u stanicama NK (Slika 44B) gdje nisu uočene nikakve promjene, srednji intenzitet fluorescencije za IL-4 u stanicama NK-T pokazao je statistički značajno smanjenje u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. i 4. dana u odnosu na kontrolnu skupinu, te povećanje izražaja 7. dana u usporedbi s 1. i 4. danom (Slika 44C).

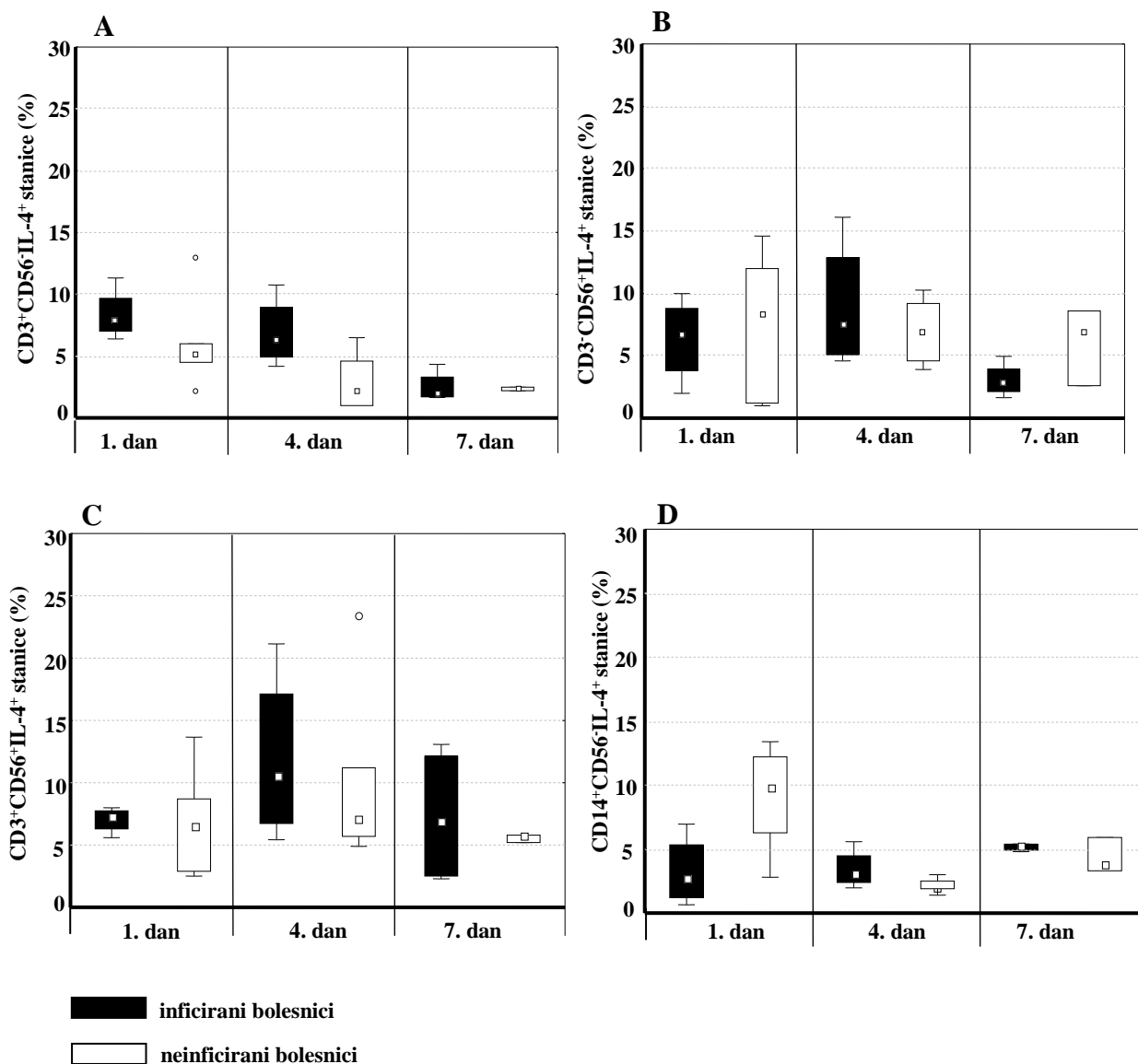
Značajne promjene udjela IL-4 između inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga nisu nađene niti u jednoj od ispitivanih staničnih populacija u ispitivanim danima (Slika 45).



**Slika 43. Dinamičke promjene udjela IL-4<sup>+</sup> stanica u limfocitima T (A), stanicama NK (B), stanicama NK-T (C) i monocitima (D) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



**Slika 44. Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za IL-4 u limfocitima T (A), stanicama NK (B), stanicama NK-T (C) i monocitima (D) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



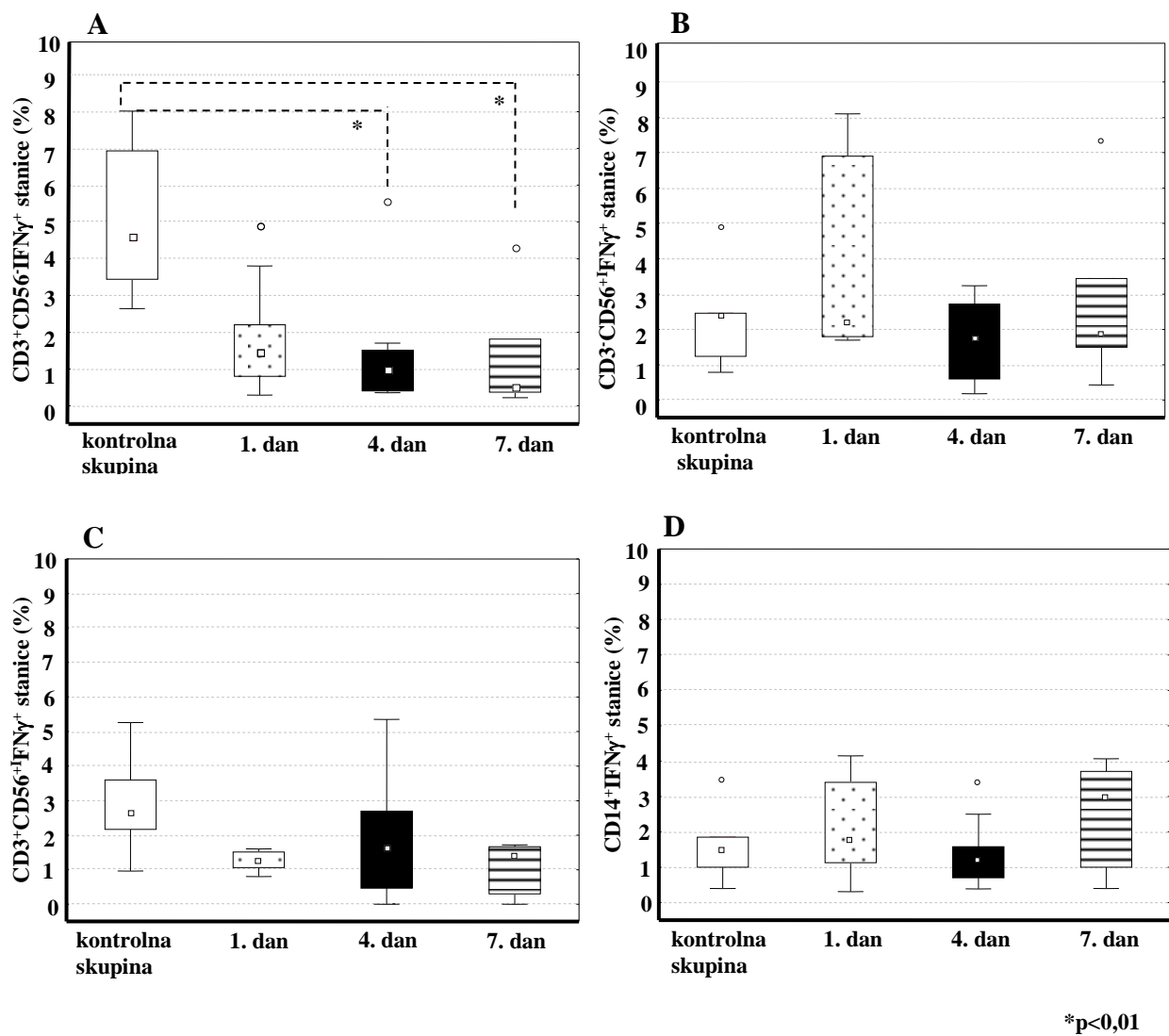
**Slika 45. Usporedba udjela IL-4<sup>+</sup> limfocita T (A), stanica NK (B), stanica NK-T (C) i monocita (D) periferne krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima**

#### ***4.5.2.2. Izražavanje IFN $\gamma$ u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga***

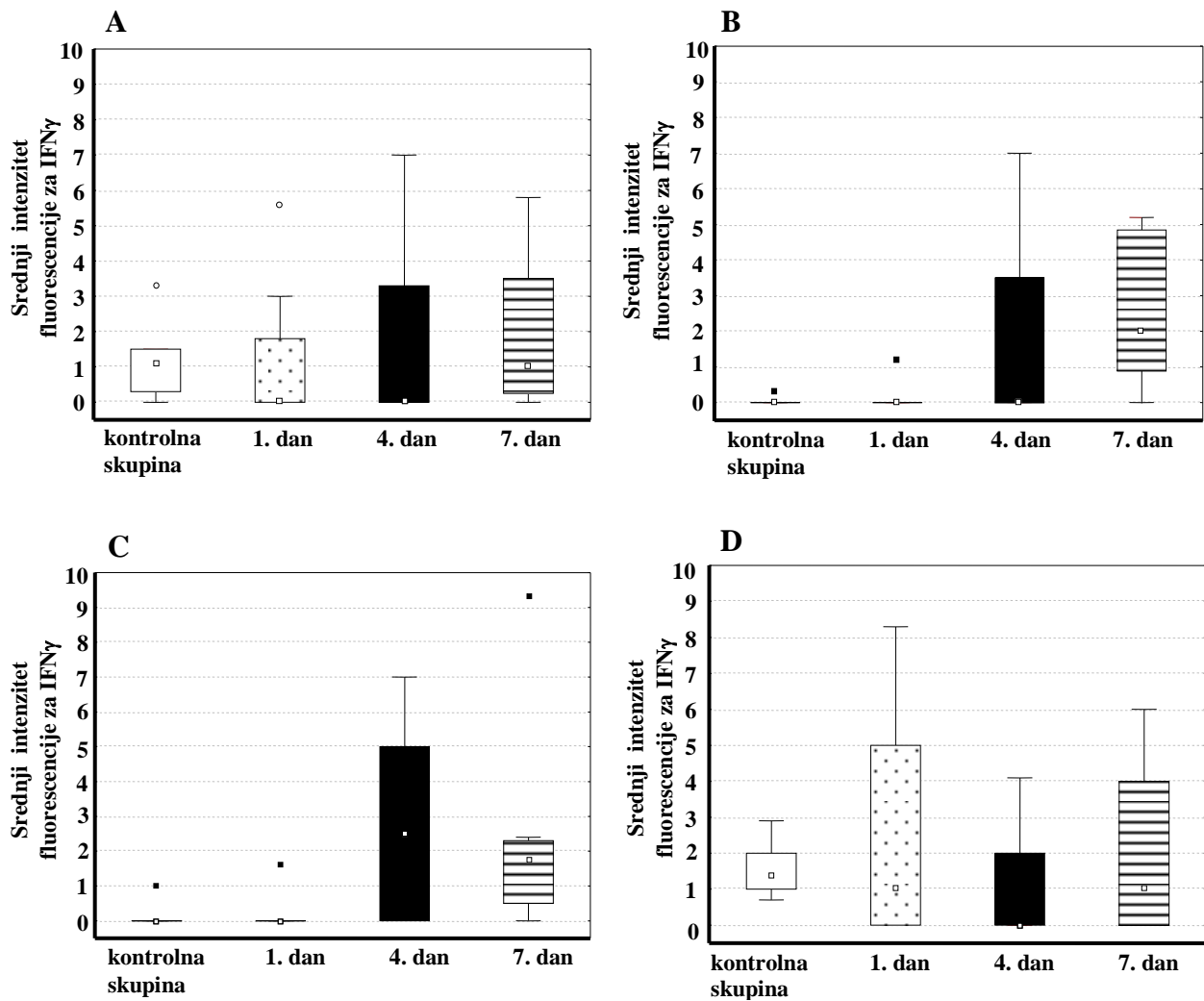
Za IFN $\gamma$  je svojstveno poticanje i održavanje upalnog odgovora, stoga nas je zanimao njegov izražaj u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga. Analizirajući unutarstanični izražaj IFN $\gamma$ , utdili smo da se udio IFN $\gamma$  u stanicama NK (Slika 46B), stanicama NK-T (Slika 46C) i monocitima (Slika 46D) u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga statistički značajno ne mijenja. Međutim, u limfocitima T izražaj IFN $\gamma$  statistički je značajno niži u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. i 7. dana nakon ozljede mozga u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ) (Slika 46A).

Srednji intenzitet fluorescencije za IFN $\gamma$  u limfocitima T (Slika 47A), stanicama NK (Slika 47B), stanicama NK-T (Slika 47C) i monocitima (Slika 47D) nije se statistički značajno mijenjao u bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima.

Značajnije promjene udjela IFN $\gamma^+$  stanica u populaciji limfocita T (Slika 48A), stanica NK (Slika 48B), stanica NK-T (Slika 48C) i monocita (Slika 48D) nisu uočene između inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima.

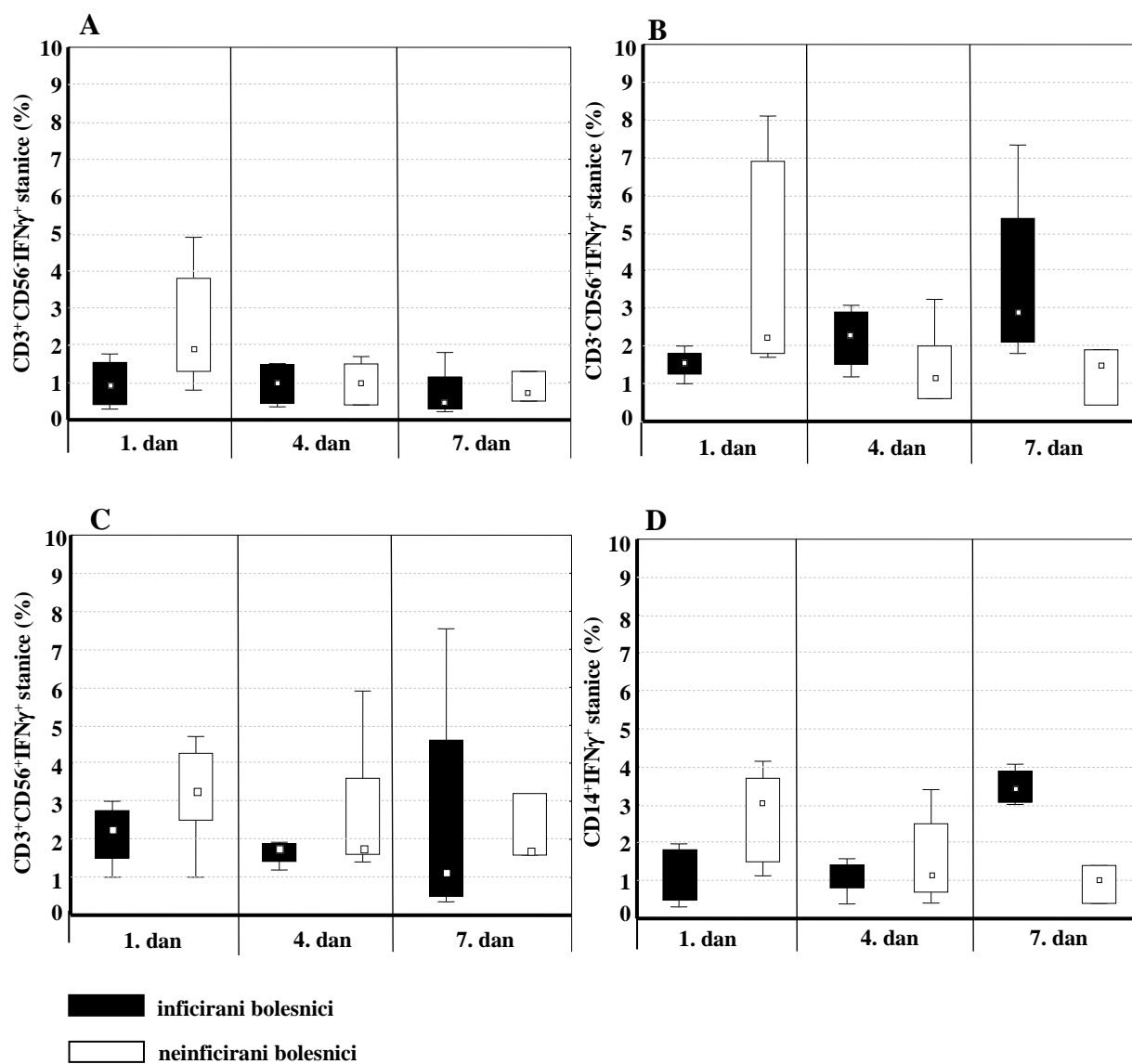


**Slika 46.** Dinamičke promjene udjela IFN $\gamma$ <sup>+</sup> stanica u populaciji limfocita T (A), stanica NK (B), stanica NK-T (C) i monocita (D) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)



**Slika 47. Srednji intenzitet fluorescencije za IFN $\gamma$  u limfocitima T (A), stanicama NK (B), stanicama NK-T (C) i monocitima (D) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



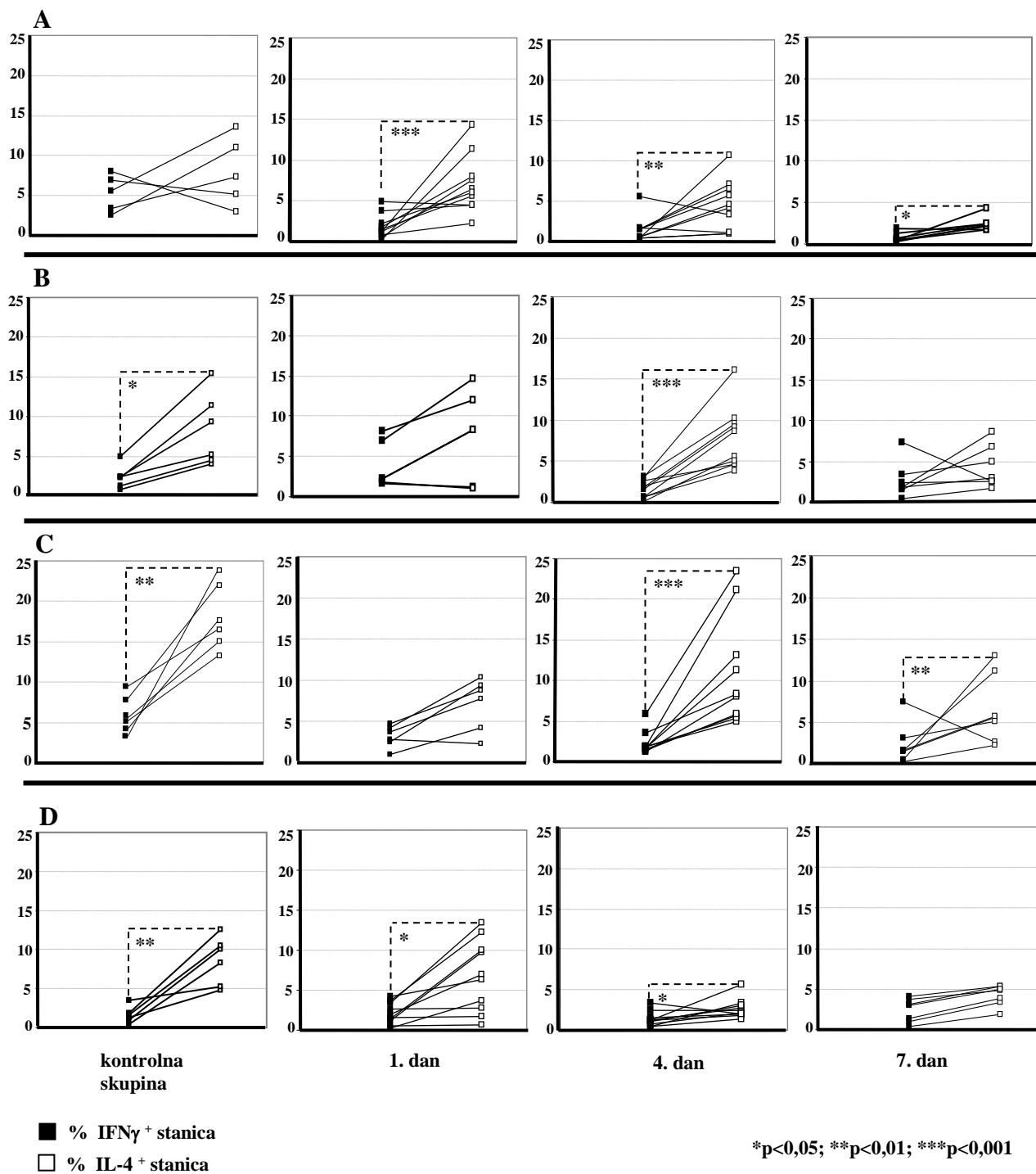


Slika 48. Usporedba udjela IFN $\gamma$ <sup>+</sup> stanica u populaciji limfocita T (A), stanica NK (B), stanica NK-T (C) i monocita (D) periferne krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima

#### ***4.5.2.3. Odnos IL-4 i IFN $\gamma$ u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga***

S obzirom da se IL-4 i IFN $\gamma$  smatraju glavnim citokinima u polarizaciji staničnog odgovora ispitali smo odnos IL-4 i IFN $\gamma$  u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga te zdravih dobrovoljnih davaoca krvi, a rezultate prikazali na Slici 49A-D.

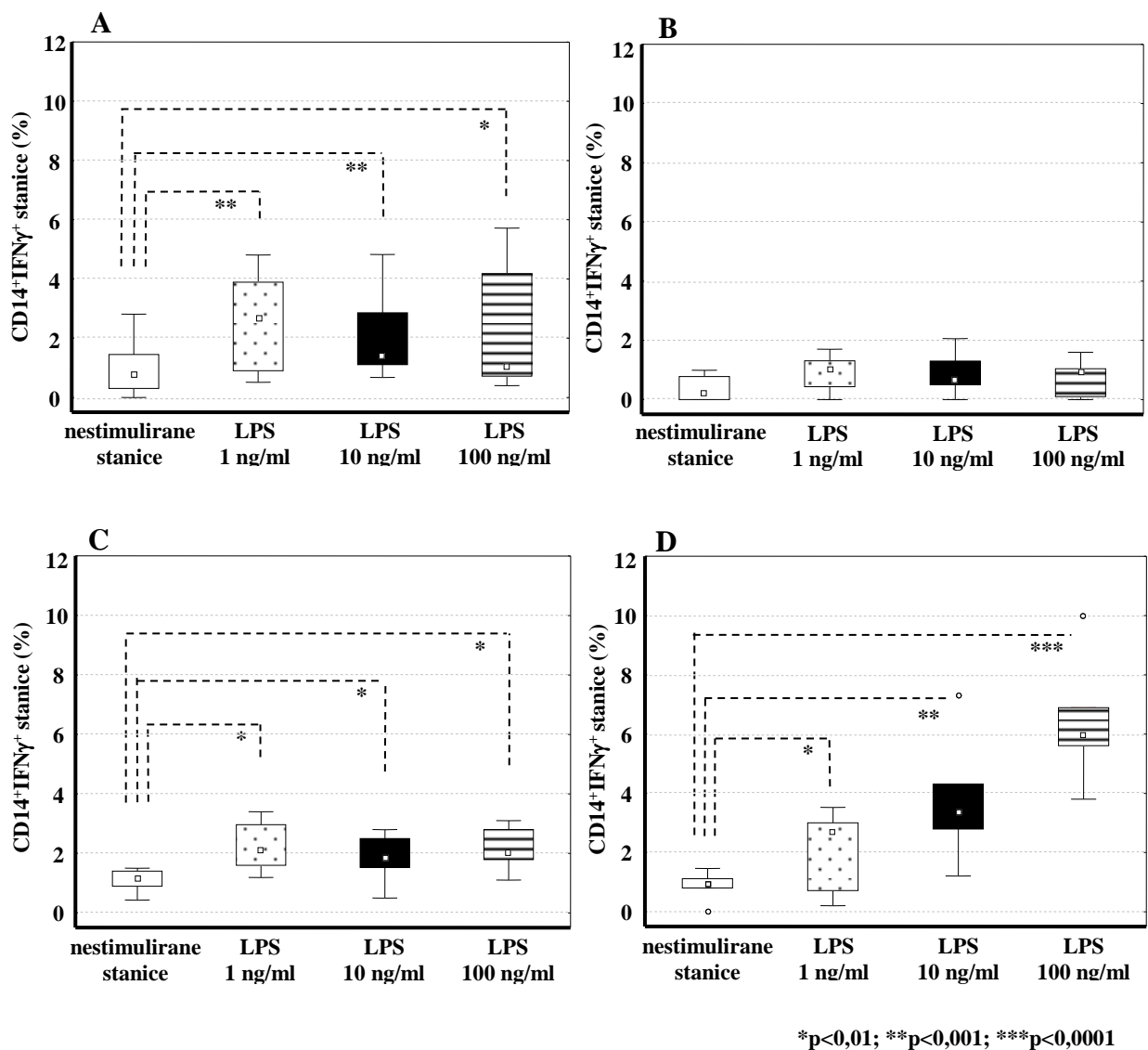
Za razliku od limfocita T u perifernoj krvi zdravih dobrovoljnih davaoca krvi, gdje ne postoji prevlast jednog nad drugim citokinom, u limfocitima T bolesnika s teškom ozljedom mozga statistički je značajno veća učestalost IL-4 nego li IFN $\gamma$  1., 4. i 7. dana nakon ozljede (Slika 49A). Učestalost IL-4 znatno je veća nego li IFN $\gamma$  u stanicama NK i stanicama NK-T te monocitima zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (Slika 49B-D). Četvrtog dana poslije ozljede prevlast IL-4 nad IFN $\gamma$  uočljiva je i u stanicama NK i stanicama NK-T i monocitima bolesnika s teškom ozljedom mozga. Ista prevlast IL-4 uočljiva je još u monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga, te 7. dana u stanicama NK ovih bolesnika (Slika 49B i D).



**Slika 49. Odnos IL-4 i IFN $\gamma$  u limfocitima T (A), stanicama NK (B), stanicama NK-T (C) i monocitima (D) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**

#### ***4.5.2.4. Stvaranje IFN $\gamma$ u monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga na stimulaciju s LPS***

Lipopolisaharid je sastavni dio vanjskog lipidnog dvosloja gram-negativnih bakterija i potiče aktivaciju monocita/makrofaga i lučenje proupalnih citokina, osobito IFN $\gamma$ . U našem istraživanju ispitali smo da li i u kojoj mjeri monociti periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga luče IFN $\gamma$  kao odgovor na LPS u različitim koncentracijama (1, 10 i 100 ng/ml). U zdravih dobrovoljnih davaoca krvi monociti stimulirani s različitim koncentracijama LPS povećavaju udio IFN $\gamma$  na doza ovisan način (Slika 50D). U bolesnika s teškom ozljedom mozga stimulacija monocita s LPS povećava udio IFN $\gamma$ , ali ne na doza ovisan način i to 1. i 7 dana nakon ozljede (Slika 50 A i C). Suprotno tome, 4. dana nakon ozljede stimulacija monocita periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga ne utječe na stvaranje IFN $\gamma$  (Slika 50B).



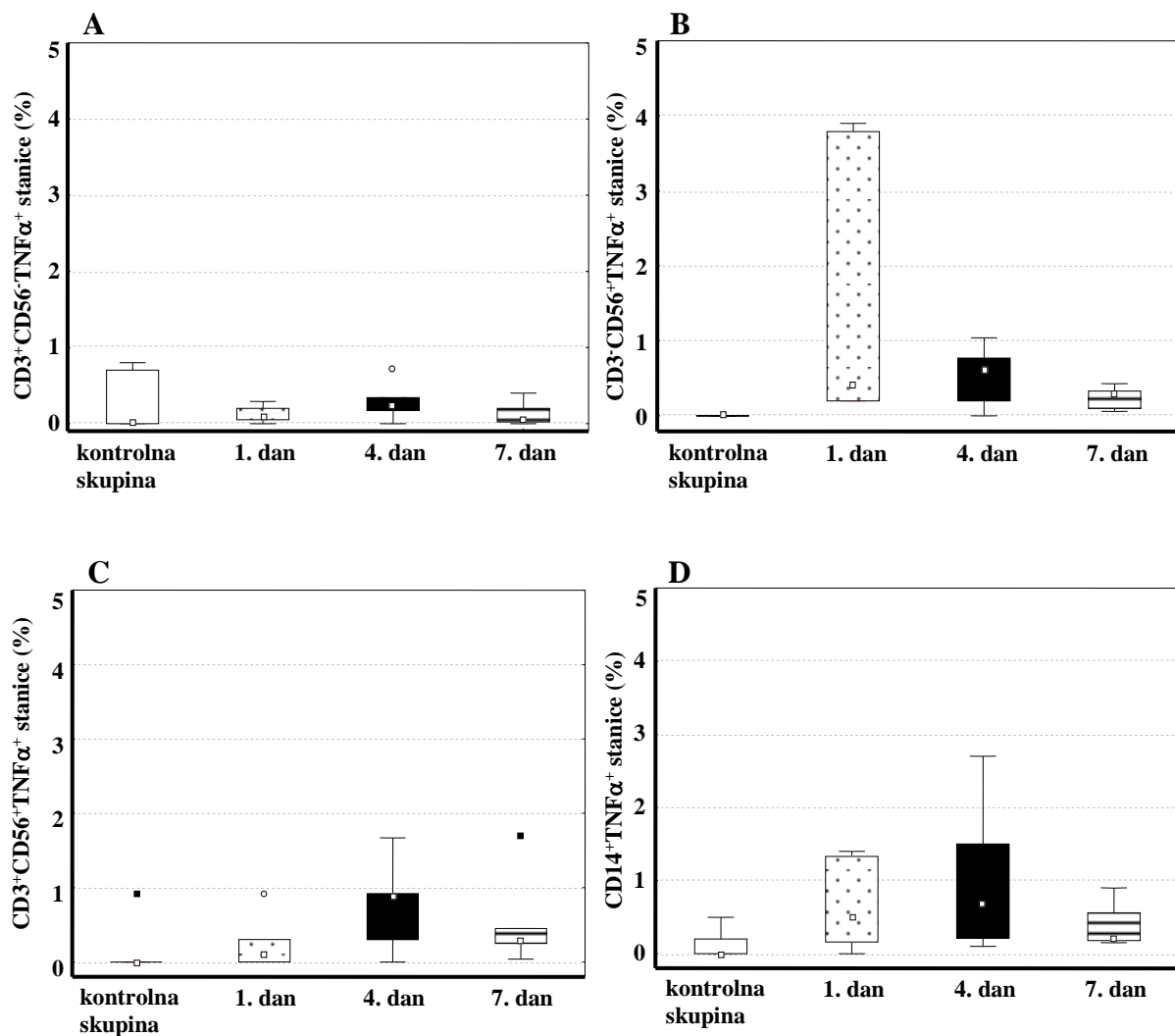
**Slika 50.** Udio IFN $\gamma$  u monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga na različite koncentracije LPS prvog (A), četvrtog (B) i sedmog (C) dana poslije ozljede te u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (D) (kontrolna skupina)

#### ***4.5.2.5. Izražavanje TNF $\alpha$ u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga***

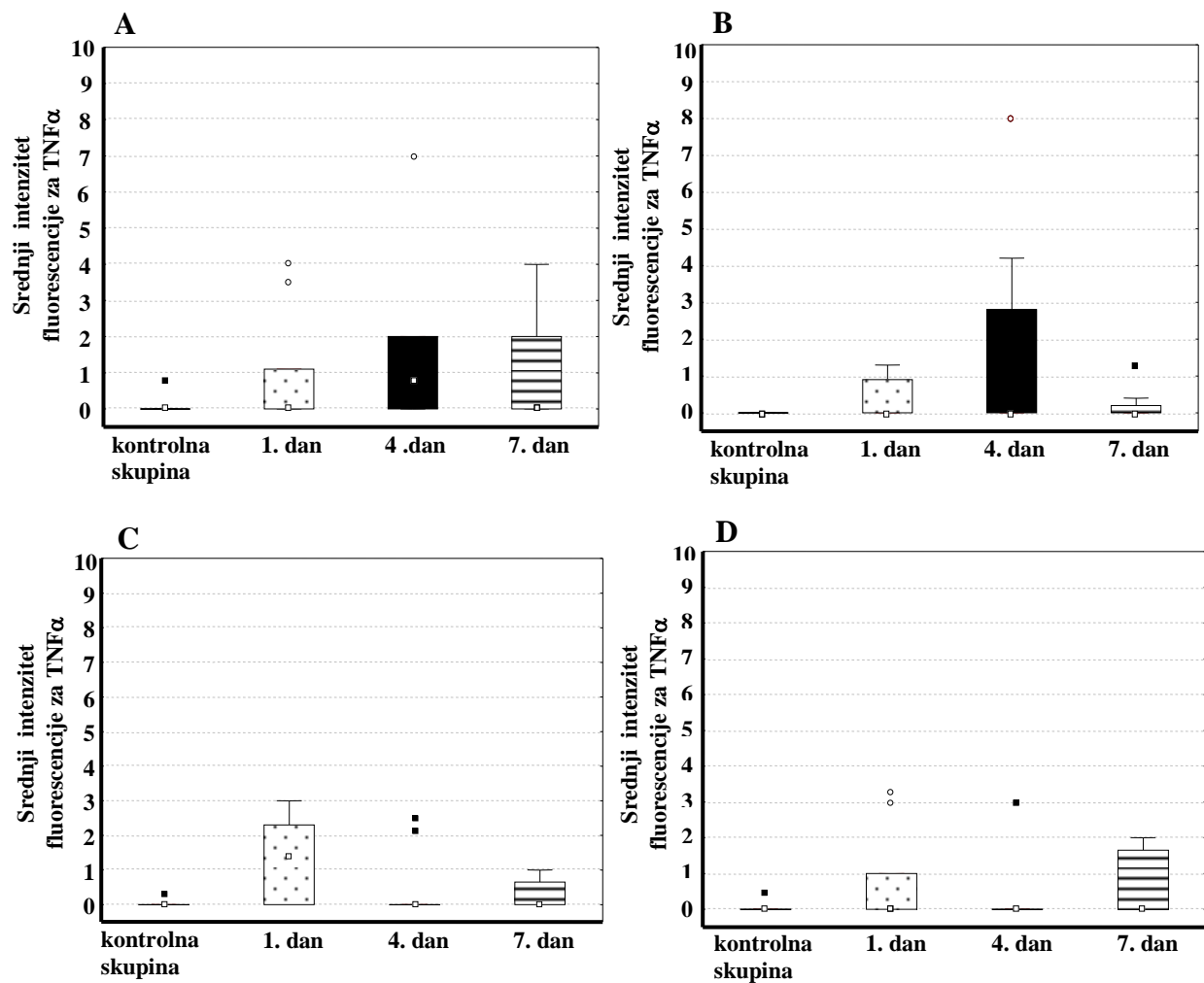
Čimbenik tumorske nekroze (TNF $\alpha$ ) je vrlo snažan proupalni citokin te smo u našim istraživanjima ispitali njegov izražaj u pojedinim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga. Analizom unutarstaničnog izražaja TNF $\alpha$  pokazali smo da je udio TNF $\alpha$ <sup>+</sup> stanica u ispitivanim staničnim populacijama u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga vrlo nizak i ne mijenja se u ispitivanim danima (Slika 51A-D).

Srednji intenzitet fluorescencije za TNF $\alpha$  nije pokazivao značajnije promjene niti u jednoj ispitivanoj staničnoj populaciji (Slika 52 A-D).

Uspoređujući postotak TNF $\alpha$  u limfocitima T (Slika 53A), stanicama NK (Slika 53B), stanicama NK-T (Slika 53C) i monocitima (Slika 53D) periferne krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga nismo našli statistički značajne razlike 1. 4. i 7. dana nakon ozljede.

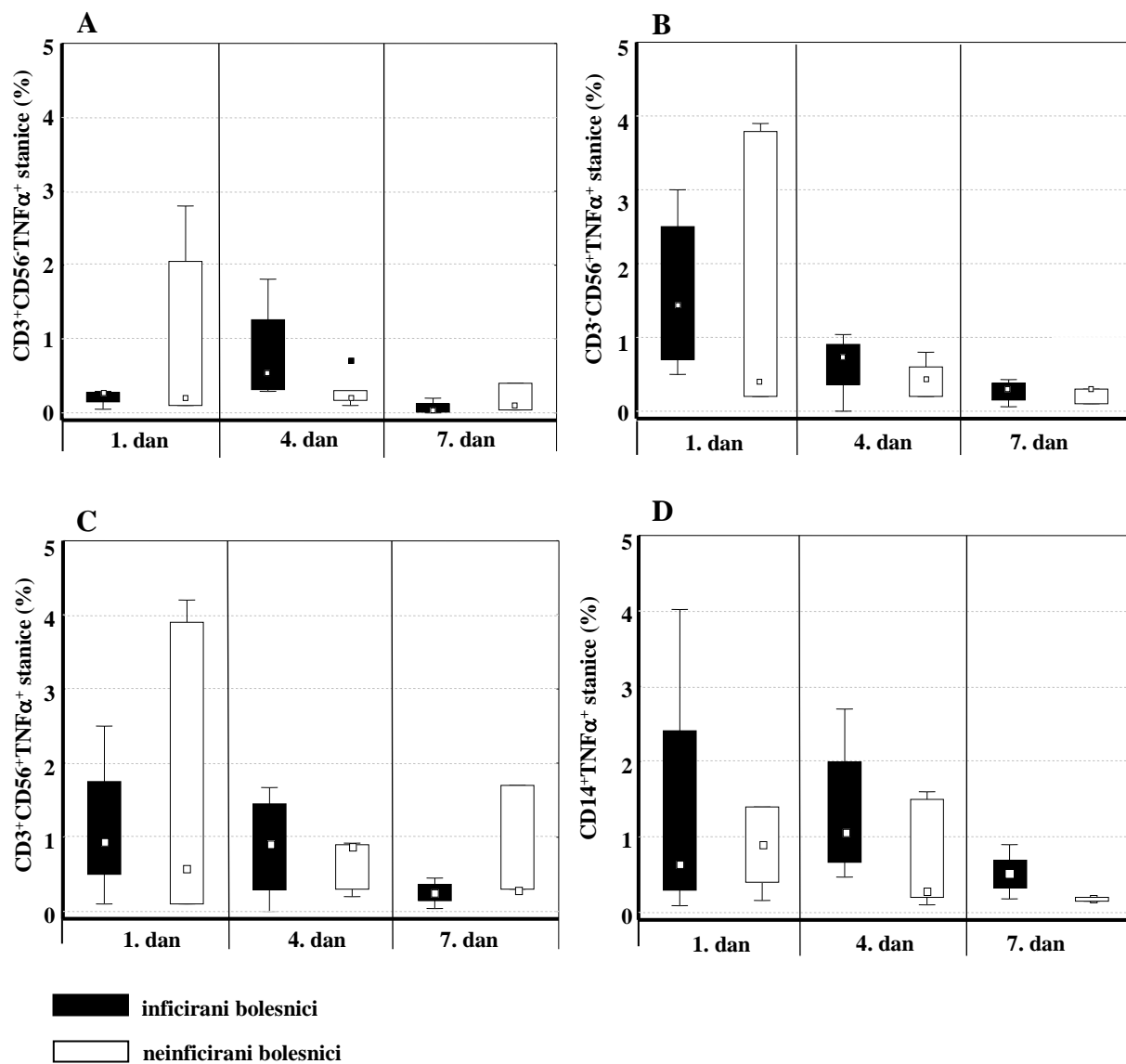


**Slika 51. Dinamičke promjene udjela  $TNF\alpha^+$  stanica u populaciji limfocita T (A), stanica NK (B), stanica NK-T (C) i monocita (D) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



**Slika 52. Srednji intenzitet fluorescencije za TNF $\alpha$  u limfocitima T (A), stanicama NK (B), stanicama NK-T (C) i monocitima (D) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**





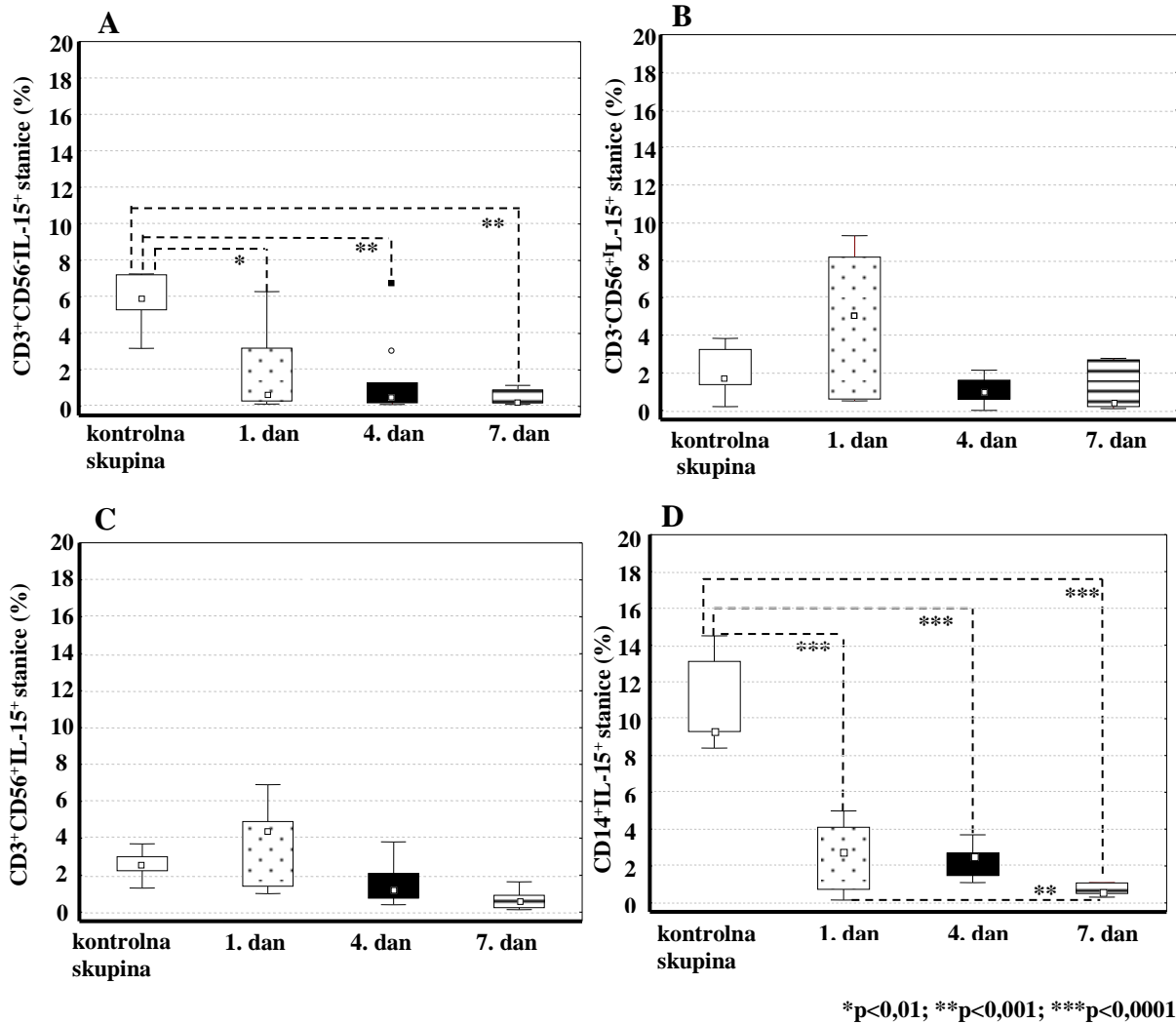
**Slika 53. Usporedba udjela TNF $\alpha$ <sup>+</sup> stanica u populaciji limfocita T (A), stanica NK (B), stanica NK-T (C) i monocita (D) periferne krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima**

#### ***4.5.2.6. Izražavanje IL-15 u različitim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga***

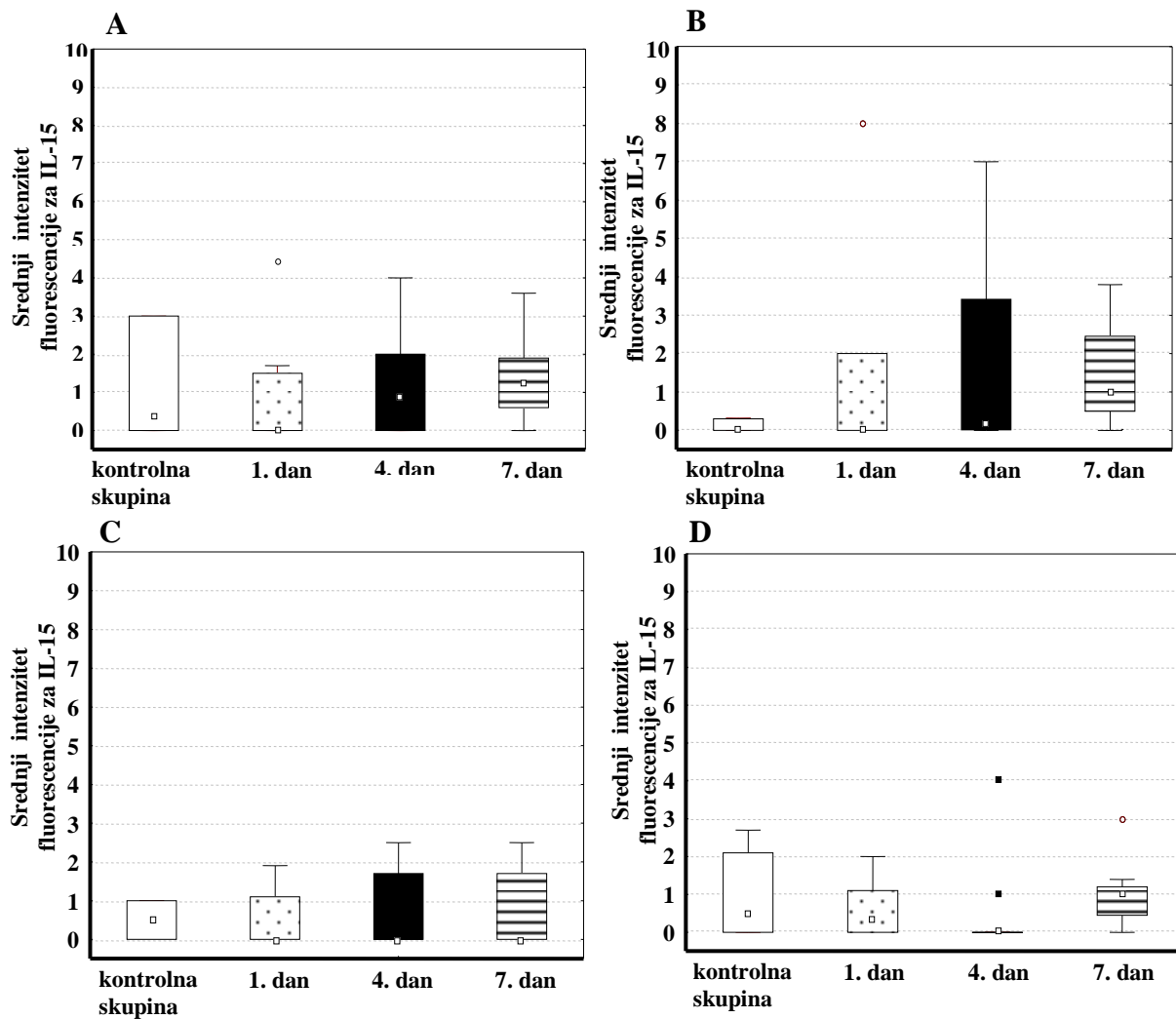
Interleukin-15 ima važnu ulogu u proliferaciji stanica NK i izražen učinak na reakcije urođene imunosti. Zanimao nas je njegov izražaj u limfocitima T, stanicama NK, stanicama NK-T i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga. Na Slici 54. pokazali smo dinamičke promjene udjela IL-15<sup>+</sup> stanica i utvrdili statistički značajni pad udjela IL-15<sup>+</sup> stanica u populaciji limfocita T (Slika 54A) i monocita (Slika 54 D) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 1., 4. i 7. dana nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu. Udio IL-15<sup>+</sup> stanica u populaciji stanica NK i NK-T nije se značajno mijenjao (Slika 54 B i C).

Značajnije promjene nismo utvrdili za srednji intenzitet fluorescencije za IL-15 u limfocitima T (Slika 55A), stanicama NK (Slika 55B), stanicama NK-T (Slika 55C) i monocitima (Slika 55D) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. 4. i 7. dana nakon ozljede kao ni u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi.

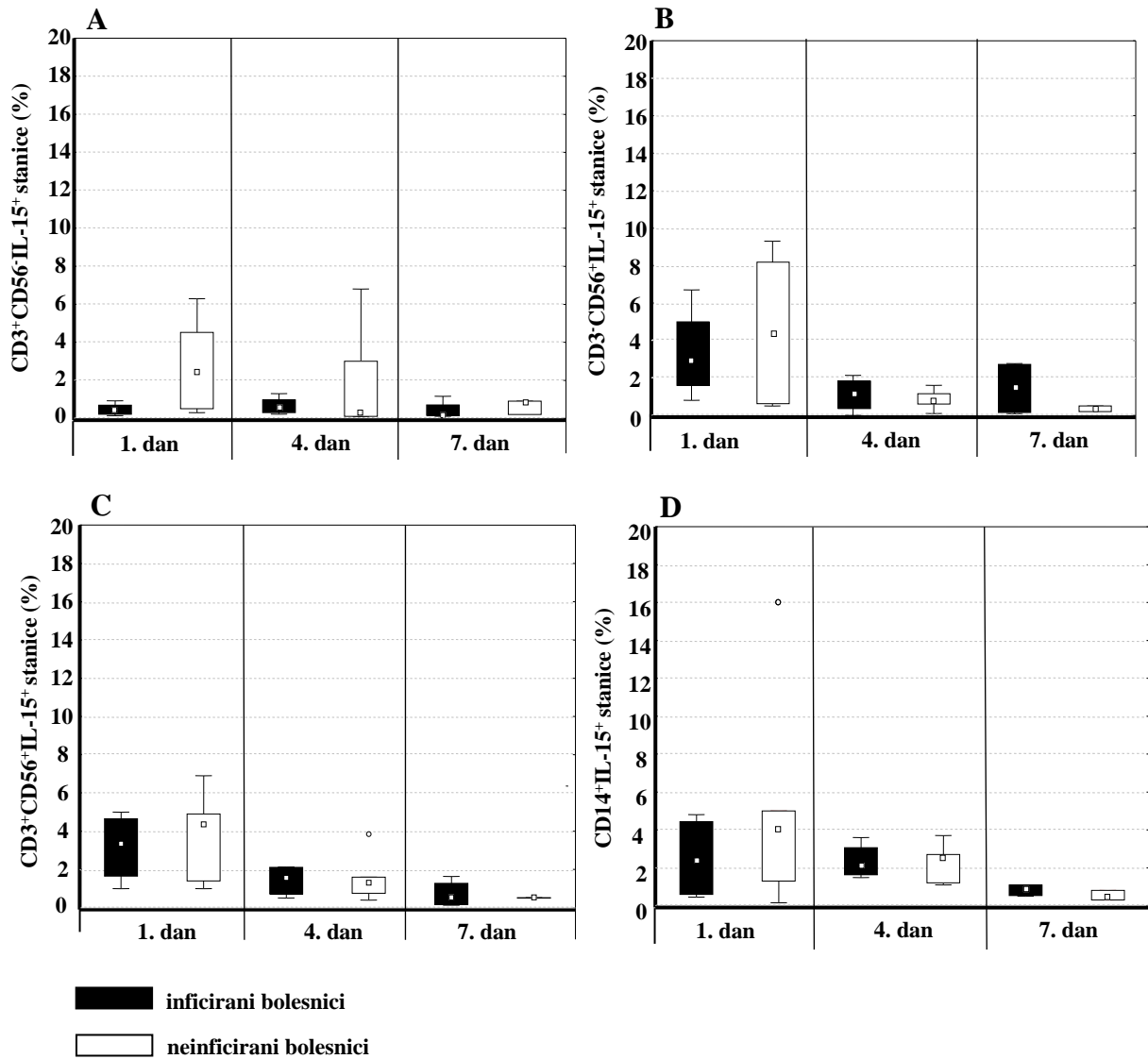
Usporedbom izražaja IL-15 u limfocitima T (Slika 56A), stanicama NK (Slika 56B), stanicama NK-T (Slika 56C) i monocitima (Slika 56D) u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga 1., 4. i 7. dana nakon ozljede nismo našli statistički značajne razlike u izražaju IL-15.



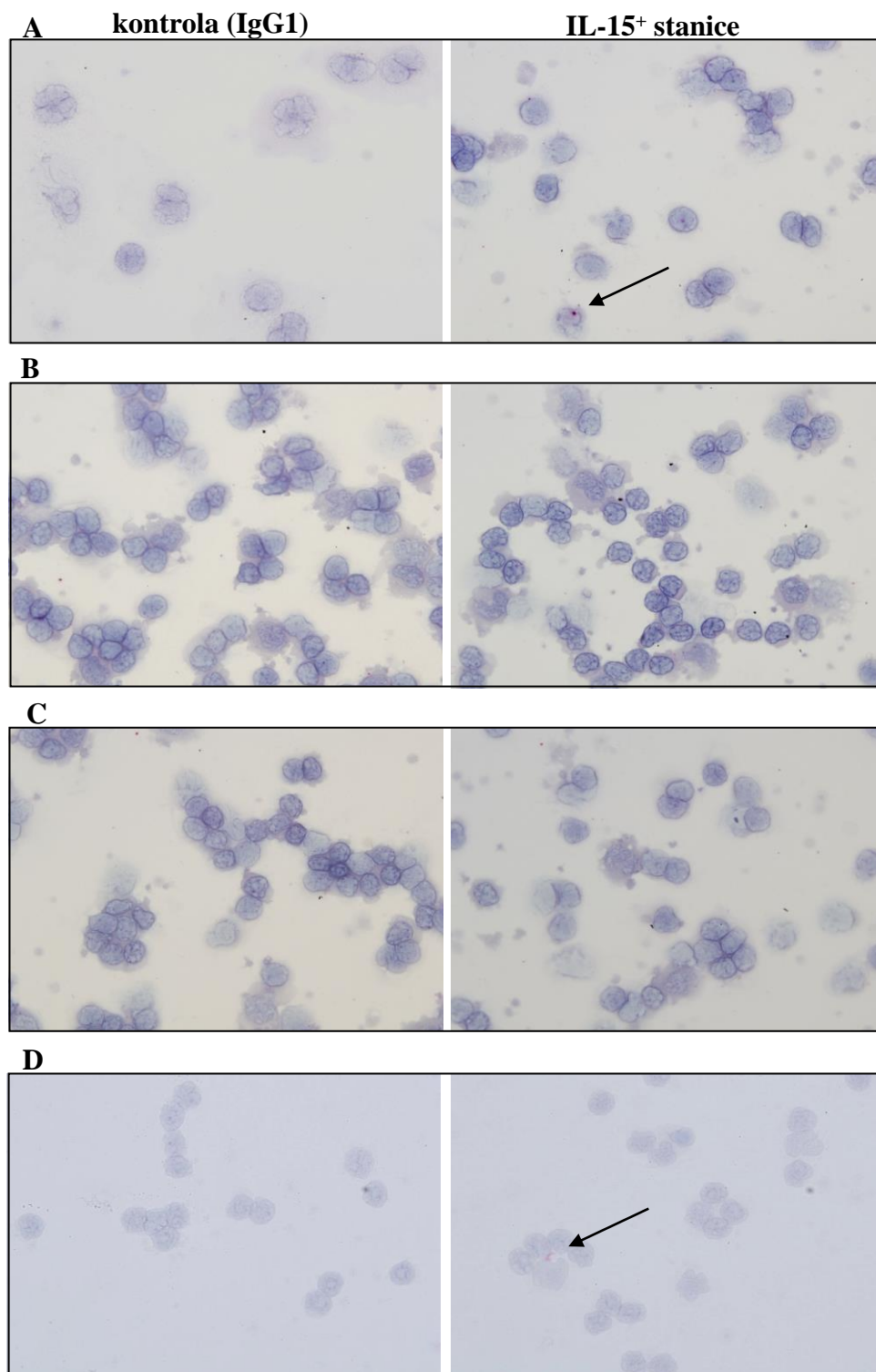
**Slika 54.** Dinamičke promjene udjela IL-15<sup>+</sup> stanica u populaciji limfocita T (A), stanica NK (B), stanica NK-T (C) i monocita (D) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)



**Slika 55. Srednji intenzitet fluorescencije za IL-15 u limfocitima T (A), stanicama NK (B), stanicama NK-T (C) i monocitima (D) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



Slika 56. Usporedba udjela IL-15<sup>+</sup> stanica u populaciji limfocita T (A), stanica NK (B), stanica NK-T (C) i monocita (D) periferne krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima



**Slika 57. Imunocitokemijsko unutarstanično obilježavanje IL-15 u limfocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga prvog (A), četvrtog (B) i sedmog (C) dana poslije ozljede te u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (D) (kontrolna skupina) protu IL-15 protutijelima (desni stupac) i specifičnim protutijelima istog podrazreda (lijevi stupac). Strelice pokazuju citoplazmatska zrnca obilježena protu -IL-15 protutijelima (povećanje 1000x)**

### **4.5.3. Izražavanje perforina u pojedinim limfocitnim subpopulacijama bolesnika s teškom ozljedom mozga**

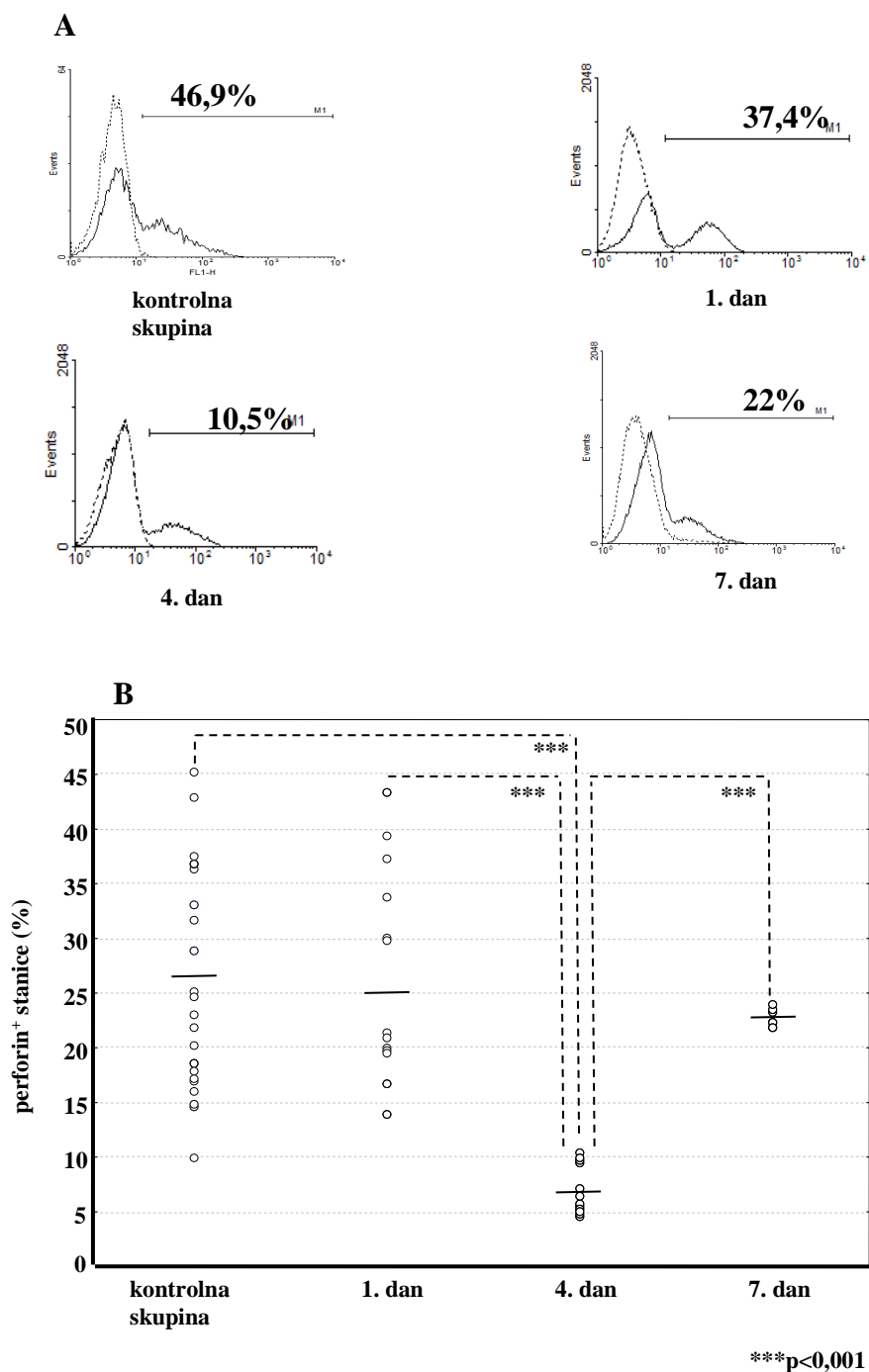
S obzirom da postoji vrlo malo podataka o mehanizmima stanicama posredovane citotoksičnosti u bolesnika s teškom ozljedom mozga u nizu pokusa istraživali samo izražavanje citotoksične molekule perforina u različitim limfocitnim subpopulacijama periferne krvi ovih bolesnika.

Slika 58A pokazuje reprezentativni primjer analize protočnim citometrom postotak perforin pozitivnih stanica u perifernoj krvi kontrolne skupine i u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1., 4. i 7 dana nakon ozljede. Na Slici 58B uočava se statistički značajno smanjenje perforin pozitivnih stanica u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede u odnosu na 1. i 7. dan te u odnosu prema zdravim dobrovoljnim davaocima krvi (kontrolna skupina) ( $p < 0,0001$ ).

Srednji intenzitet fluorescencije za perforin u limfocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga bio je statistički značajno viši 1. dana nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ) (Slika 59). Četvrtog dana nakon ozljede srednji intenzitet fluorescencije za perforin u limfocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga pokazuje statistički značajno smanjenje u odnosu na 1. i 7. dan nakon ozljede (Slika 59). Sedmog dana nakon ozljede postotak perforin pozitivnih stanica je statistički značajno niži 7. dana u odnosu na 1. dan, ali se bitno ne razlikuje od kontrolne skupine (Slika 59).

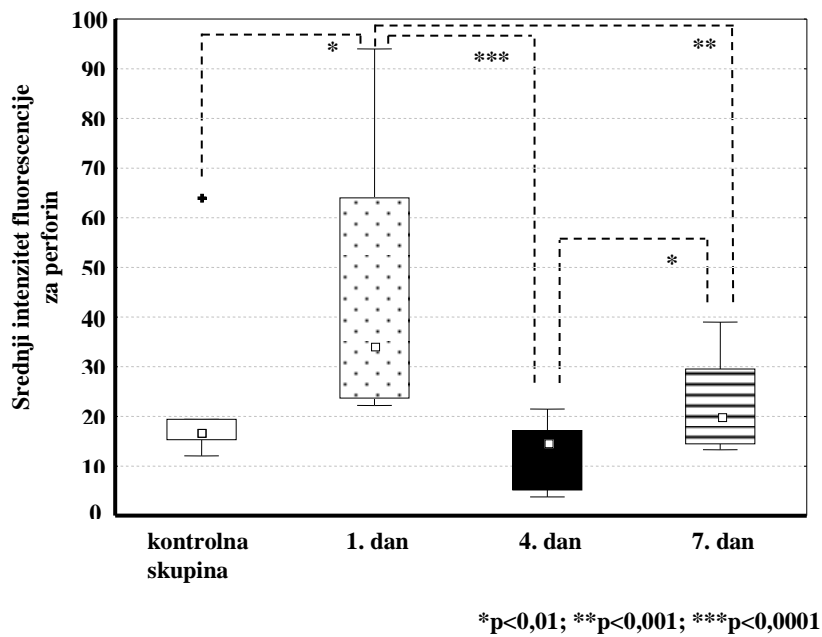
Statistički značajne razlike u postotku perforin pozitivnih stanica u perifernoj krvi nismo našli između inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga 1., 4. i 7. dana nakon ozljede (Slika 60).

Rezultate dinamičkih promjena izražaja perforina u limfocitima periferne krvi dobivene analizom na protočnim citometrom pokazali smo i imunocitokemijskim unutarstaničnim obilježavanjem perforina u limfocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dana (Slika 61A), 4. dana (Slika 61B), 7. dana (Slika 61D) nakon ozljede i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (Slika 61D). Perforin se pokazuje kao crveno obilježena zrnca unutar citoplazme (prikazano strelicom).

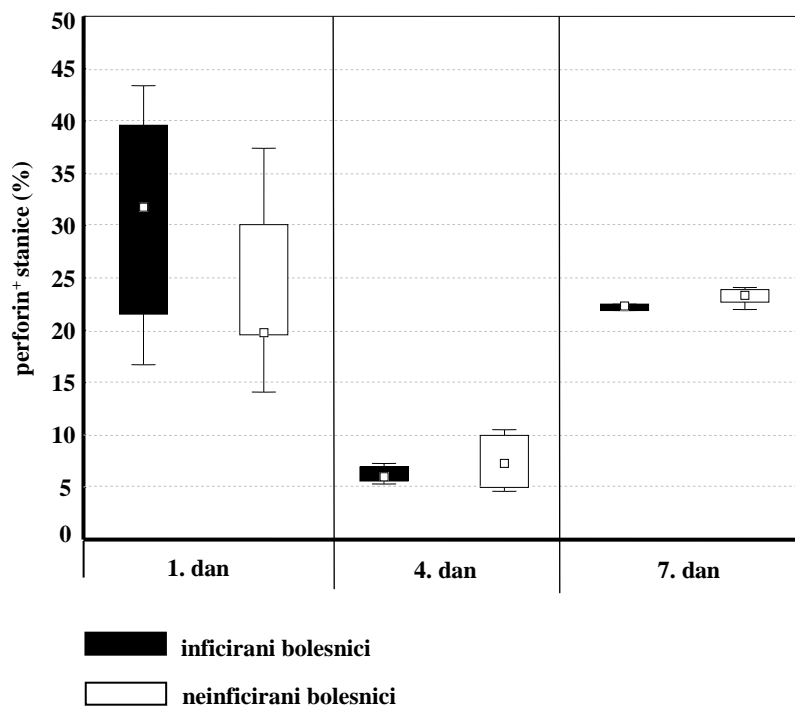


Slika 58. Reprezentativni primjer analize protočnim citometrom (A) i grafički prikaz (B) dinamičkih promjena perforin pozitivnih stanica u perifernoj krvi u bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)

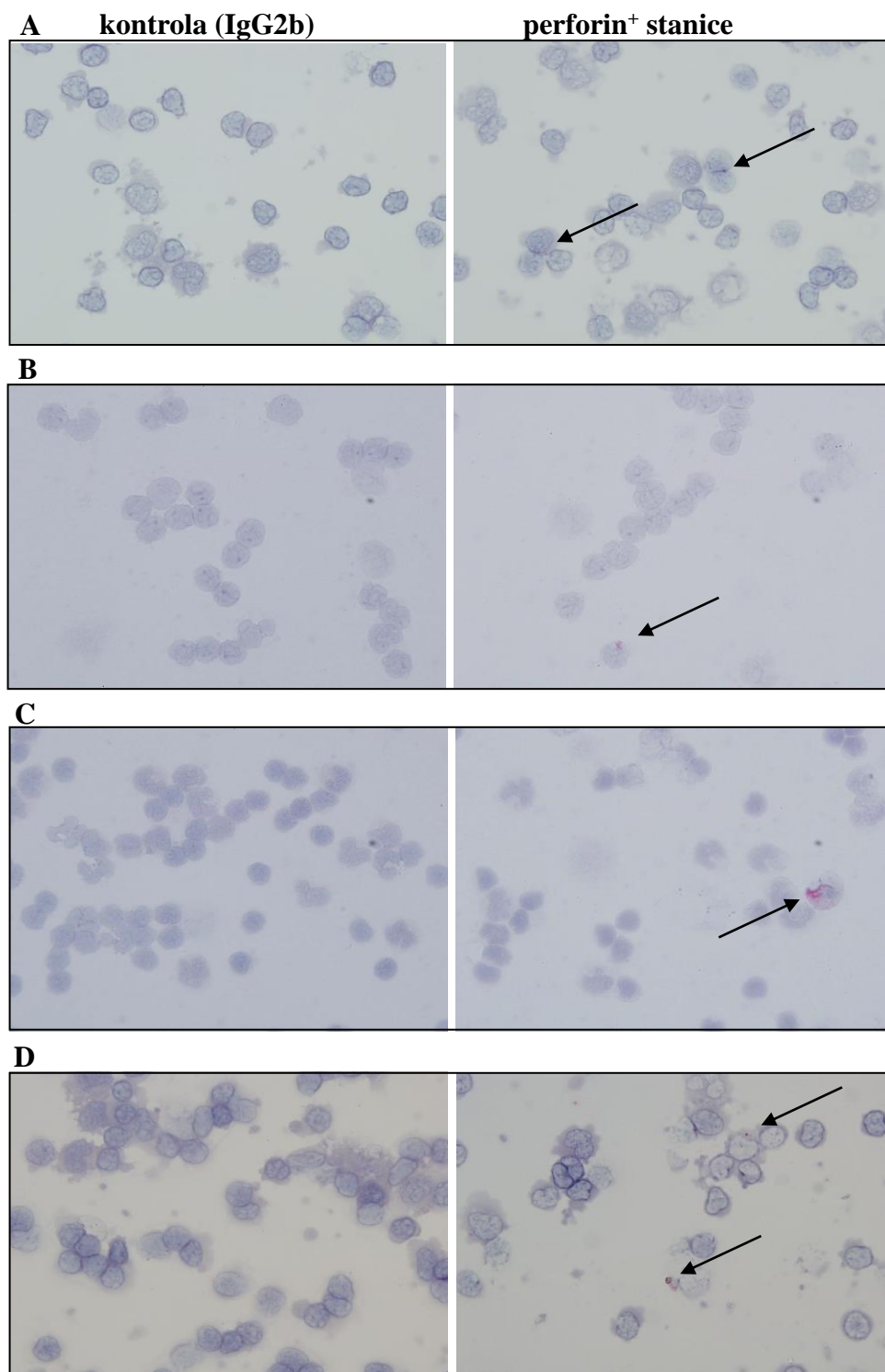




**Slika 59. Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za perforin u limfocitima periferne krvi u bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



**Slika 60. Usporedba promjene učestalosti perforin pozitivnih stanica u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima**



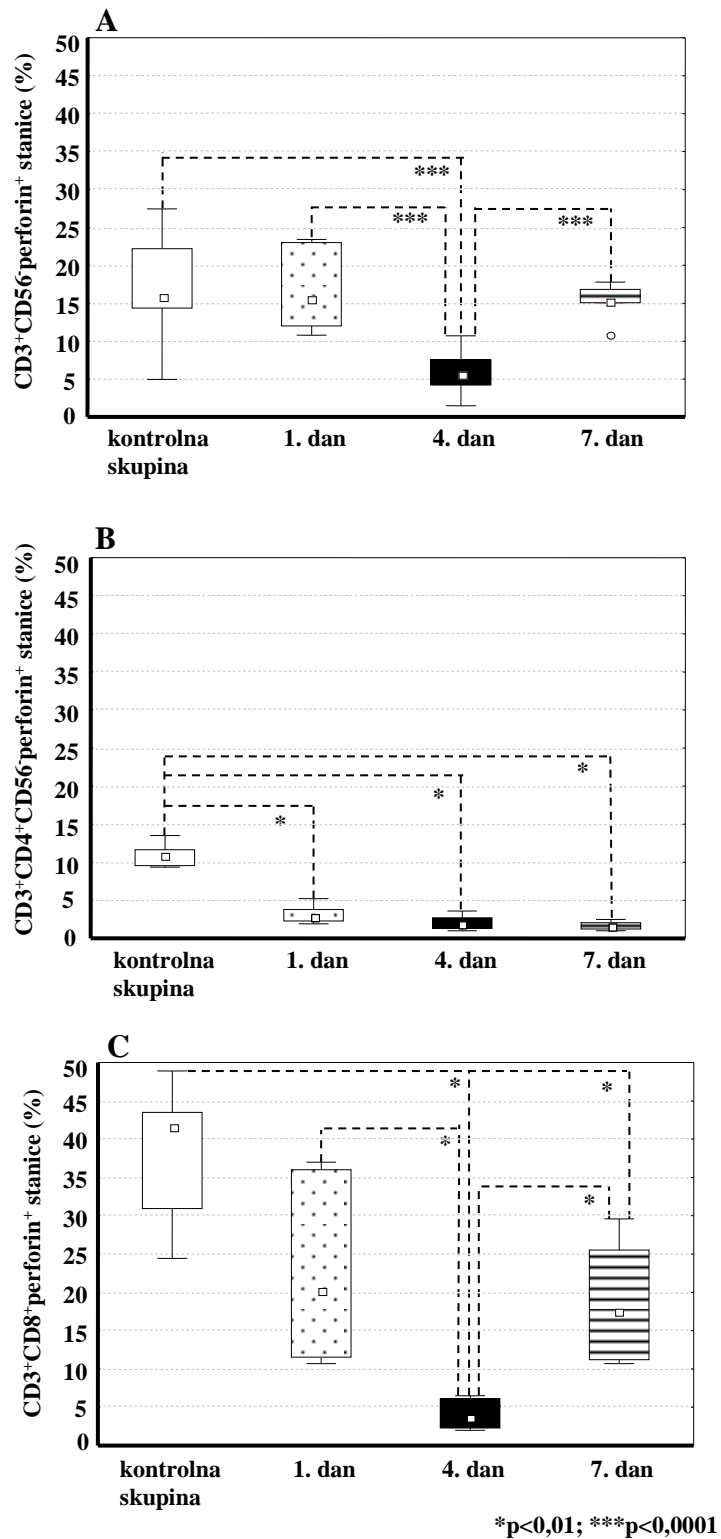
**Slika 61. Imunocitokemijsko unutarstanično obilježavanje perforina u limfocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga prvog (A), četvrtog (B) i sedmog (C) dana poslije ozljede te u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (D) (kontrolna skupina) protu-perforinskim protutijelima (desni stupac) i specifičnim protutijelima istog podrazreda (lijevi stupac). Strelice pokazuju citoplazmatska zrnca obilježena protu-perforinskim protutijelima (povećanje 1000x)**

#### ***4.5.3.1. Izražavanje perforina u limfocitima T i njihovim subpopulacijama u bolesnika s teškom ozljedom mozga***

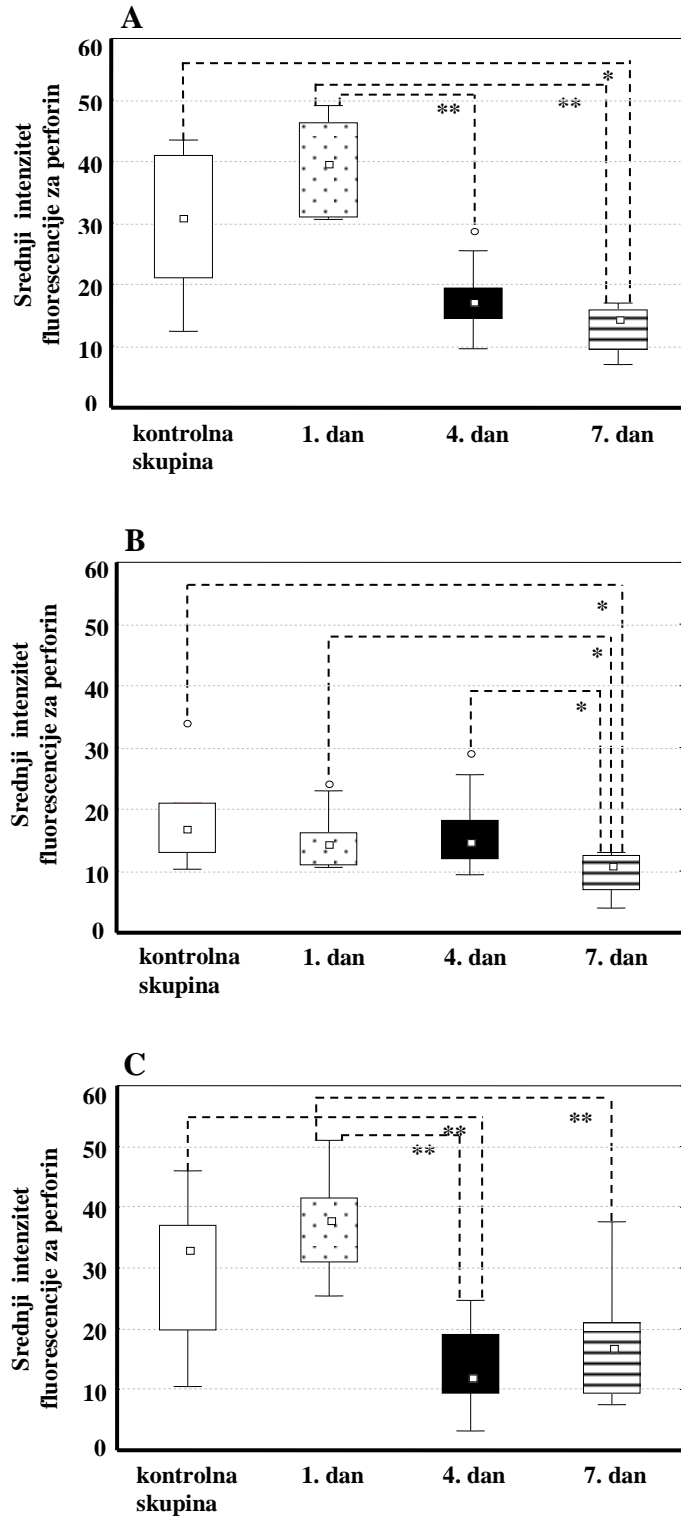
Slika 62 pokazuje promjene udjela perforina u CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocitima T (Slika 62A) i njihovim CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (Slika 62B) i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (Slika 62C) subpopulacijama u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. 4. i 7. dana nakon ozljede te u kontrolnoj skupini. Postotak perforina u limfocitima T u perifernoj krvi statistički značajno pada u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede u odnosu na 1. i 7. dan te kontrolnu skupinu ( $p < 0,0001$ ) (Slika 62A). Vrlo sličan obrazac promjena udjela perforina zabilježen je u CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> subpopulaciji limfocita T (Slika 62C). Statistički značajno manji postotak perforina unutar CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> stanica u bolesnika s teškom ozljedom mozga uočen je 4. dana nakon ozljede u odnosu na 1. i 7. dan te kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ) (Slika 62C). Sedmog dana nakon ozljede udio perforina unutar CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T bio je statistički značajno veći u odnosu na 4. dan, ali nije dosegao razinu uočenu u kontrolnoj skupini. Postotak perforina u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocitima T periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 1., 4. i 7. dana nakon ozljede bio je pet puta niži od perforin pozitivnih CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> stanica u kontrolnoj skupini ( $p < 0,01$ ) (Slika 62B).

Srednji intenzitet fluorescencije za perforin unutar cjelokupne populacije CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T bio je statistički značajno niži u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. i 7. dana nakon ozljede u odnosu na 1. dan, te 7. dana u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 63A). Sedmoga dana nakon ozljede zabilježen je značajan pad srednjeg intenziteta fluorescencije za perforin unutar CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> subpopulacije limfocita T u odnosu na 1. i 4. dan te kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ) (Slika 63B). Srednji intenzitet fluorescencije za perforin unutar CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T bio je statistički značajno niži u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana u odnosu na kontrolnu skupinu i 1. dan, te 7. dana u odnosu na 1. dana nakon ozljede ( $p < 0,0001$ ) (Slika 63C).

Uspoređujući postotak perforin pozitivnih stanica u CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocitima T (Slika 64A), i njegovim CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (Slika 64B) i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (Slika 64C) subpopulacijama u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga nismo našli statistički značajne razlike 1. 4. i 7. dana nakon ozljede.

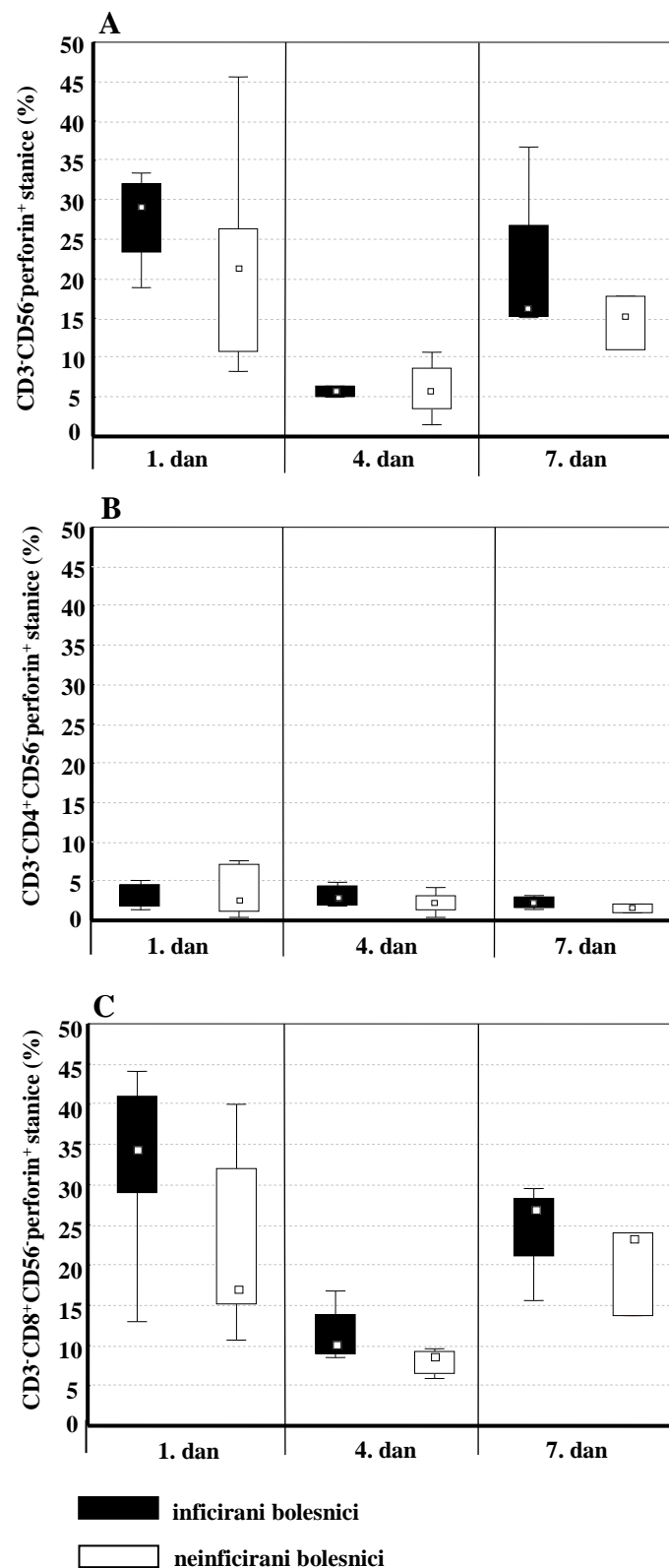


**Slika 62. Promjene učestalosti perforin pozitivnih stanica u CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> stanicama (A) te njihovim CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (B) i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (C) subpopulacijama u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



\* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$

**Slika 63.** Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za perforin unutar cjelokupne populacije  $CD3^+CD56^-$  stanica (A) te njihovim  $CD3^+CD4^+CD56^-$  (B) i  $CD3^+CD8^+CD56^-$  (C) subpopulacijama u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)



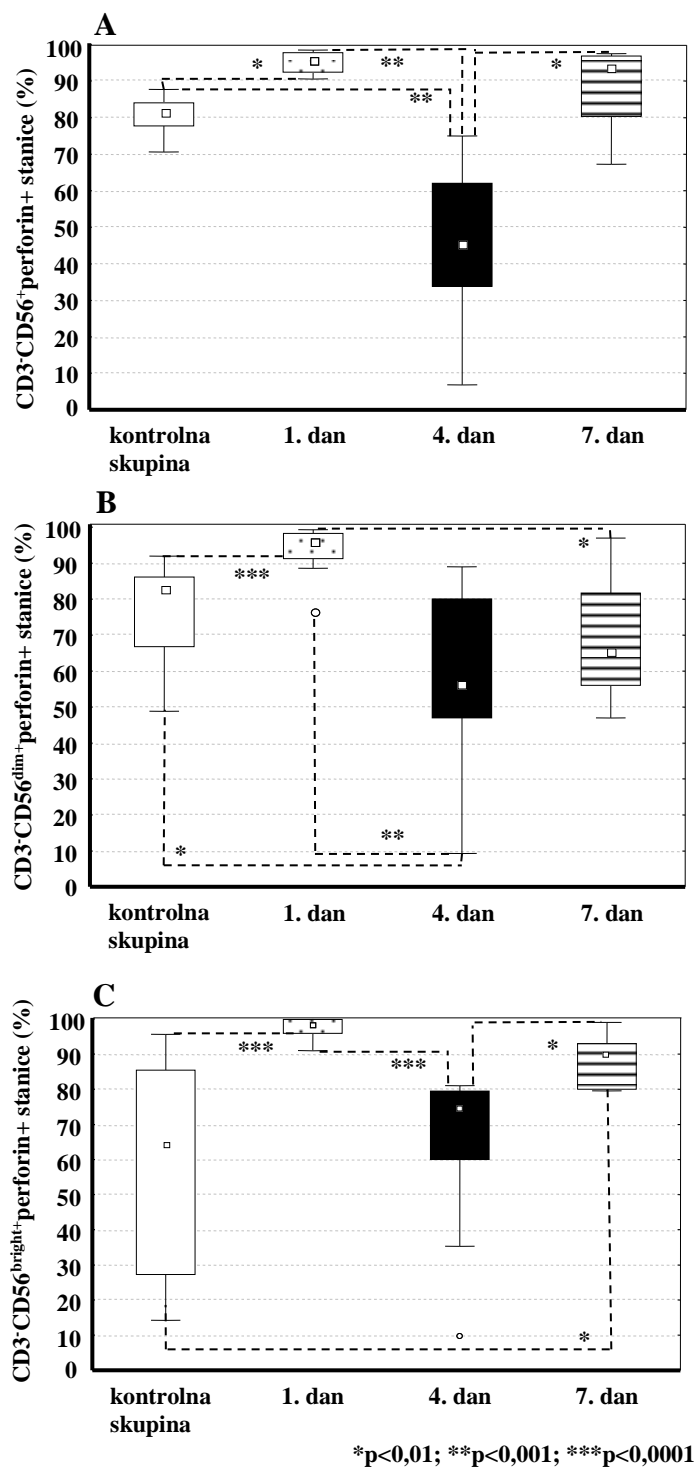
**Slika 64. Usporedba promjena učestalosti perforin pozitivnih stanica u  $CD3^+CD56^-$  stanicama (A) te njihovim  $CD3^+CD4^+CD56^-$  (B) i  $CD3^+CD8^+CD56^-$  (C) subpopulacijama u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima**

#### ***4.5.3.2. Izražavanje perforina u stanicama NK i njihovim subpopulacijama u bolesnika s teškom ozljedom mozga***

Slika 65 pokazuje promjene u postotku perforin pozitivnih stanica u CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> stanicama NK (Slika 65A) i njihovim CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim+</sup> (Slika 65B) i CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright+</sup> (Slika 65C) subpopulacijama u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1., 4., i 7. dana nakon ozljede te u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina). Udio perforina u stanicama NK i njihovim CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim+</sup> i CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright+</sup> subpopulacijama statistički je značajno viši u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dana nakon ozljede nego li u kontrolnoj skupini. Ovaj postotak perforin pozitivnih stanica unutar cjelokupne populacije stanica NK (Slika 65A), te CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim+</sup> (Slika 65B) i CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright+</sup> (Slika 65C) subpopulacije statistički značajno pada u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede. Ovaj pad perforin pozitivnih stanica povećava se 7. dana nakon ozljede u bolesnika s teškom ozljedom mozga i to unutar CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> stanica NK (Slika 65A) i CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright+</sup> subpopulacija (Slika 65C), ali ne i CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim+</sup> stanica (Slika 65B).

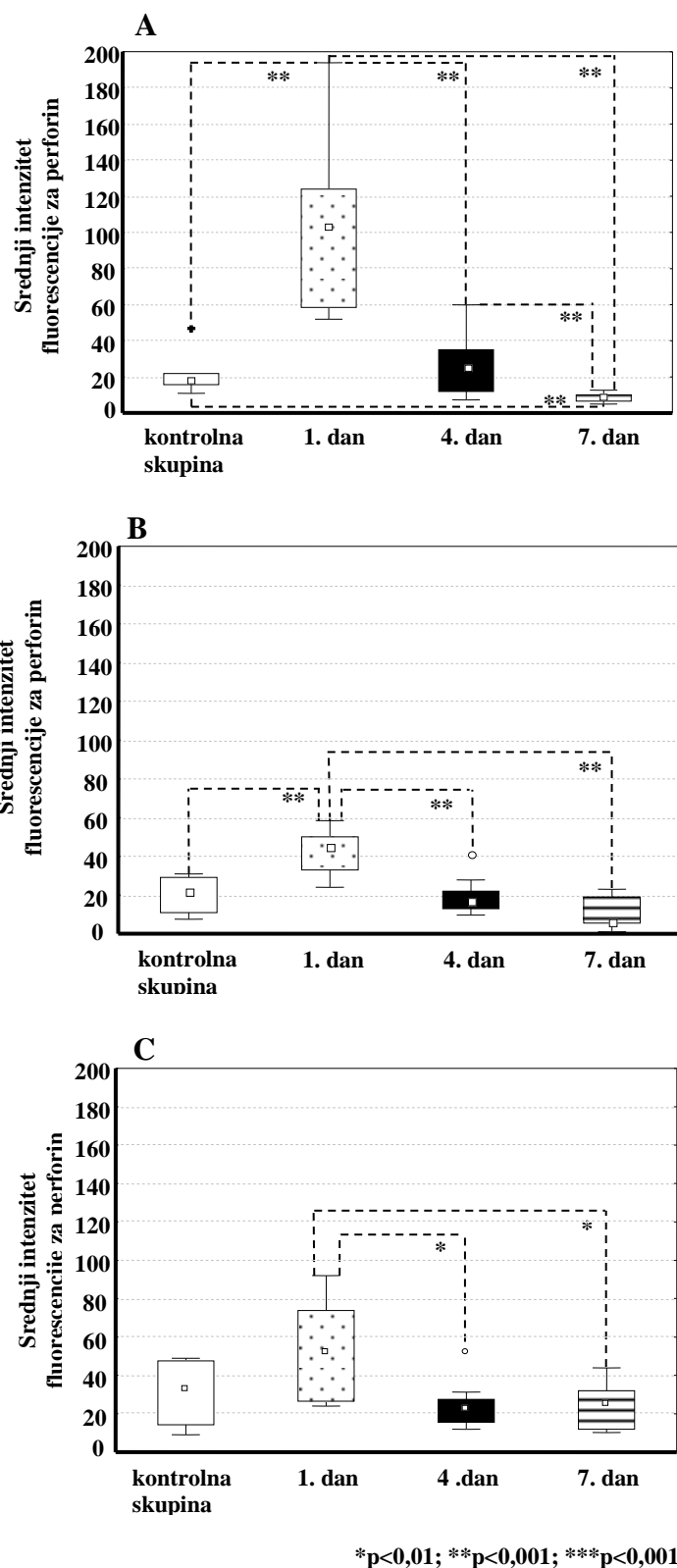
Srednji intenzitet fluorescencije za perforin unutar cjelokupne populacije stanica NK znatno je viši u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dana nakon ozljede nego li u kontrolnoj skupini, i 7. dana je niži u odnosu na 1. dan i kontrolnu skupinu (Slika 66A). Sličan obrazac promjena srednjeg intenziteta fluorescencije za perforin uočen je unutar CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim+</sup> stanica (Slika 66B). Srednji intenzitet fluorescencije za perforin unutar CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright+</sup> stanica statistički značajno pada u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. i 7. dana nakon ozljede u odnosu na 1. dan (Slika 66C).

Uspoređujući promjene postotaka perforin pozitivnih stanica unutar CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> stanica NK (Slika 67A) i njihovim CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim+</sup> (Slika 67B) i CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright+</sup> (Slika 67C) subpopulacijama između inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga utvrdili smo statistički značajno niži udio perforina u CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> stanicama NK ( $p < 0,01$ ) (Slika 67A) i CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim+</sup> stanicama (Slika 67B) inficiranih nego li u neinficiranih bolesnika.

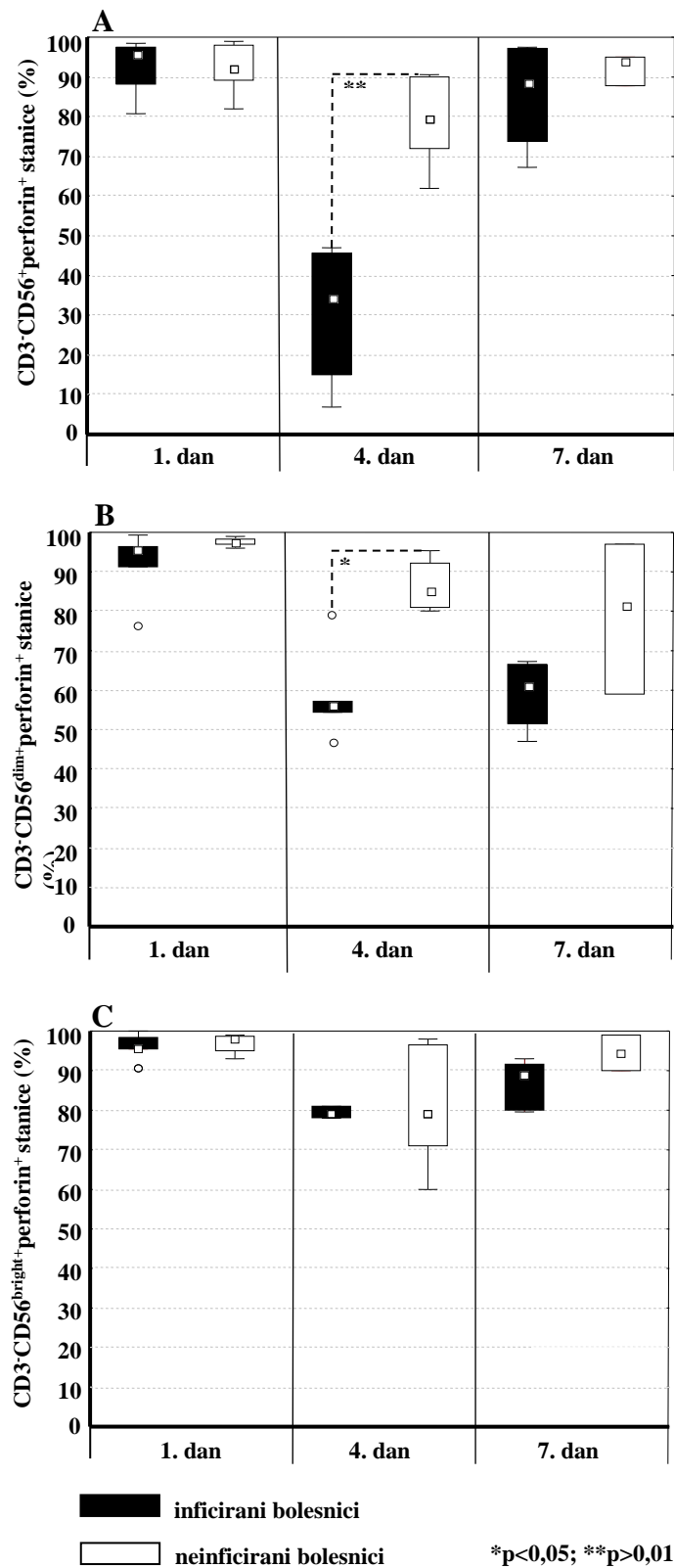


Slika 65. Promjene udjela perforin pozitivnih stanica u CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stanicama (A) te njihovim CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> (B) i CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> (C) subpopulacijama u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)





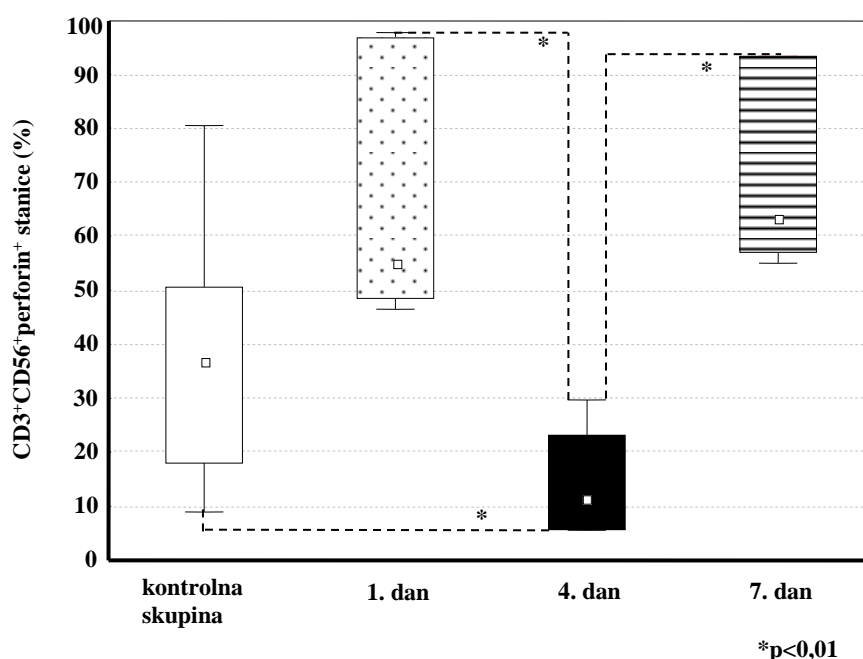
**Slika 66. Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za perforin unutar cjelokupne populacije CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stanica (A) te njihovim CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> (B) i CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> (C) subpopulacijama u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



**Slika 67. Usporedba promjena udjela perforin pozitivnih stanica u CD3-CD56<sup>+</sup> stanicama (A) te njihovim CD3-CD56<sup>dim</sup> (B) i CD3-CD56<sup>bright</sup> (C) subpopulacijama u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima**

#### 4.5.3.3. Izražavanje perforina u stanicama NK-T u bolesnika s teškom ozljedom mozga

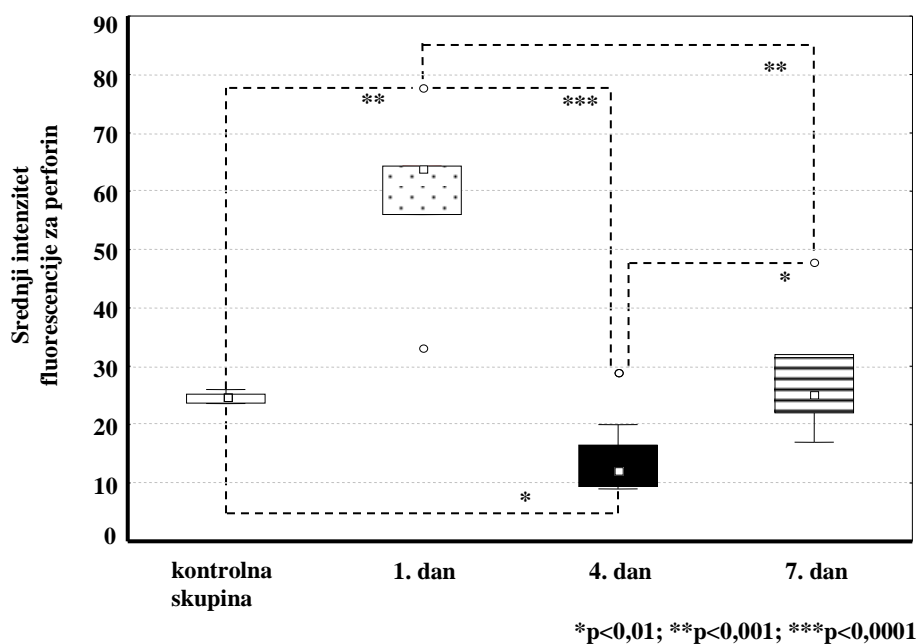
Dinamičke promjene izražavanja perforina istraživali smo i unutar stanica NK-T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga i zdravih dobrovoljnih davaoca krvi. Slično promjenama udjela perforina u limfocitima T, najniži postotak perforina unutar stanica NK-T utvrdili smo u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede koja je iznosila 11,23% (5,7%-23,18%) i statistički se značajno razlikovao od udjela perforin pozitivnih stanica NK 1. i 7. dana nakon ozljede te u kontrolnoj skupini ( $p < 0,01$ ) (Slika 68).



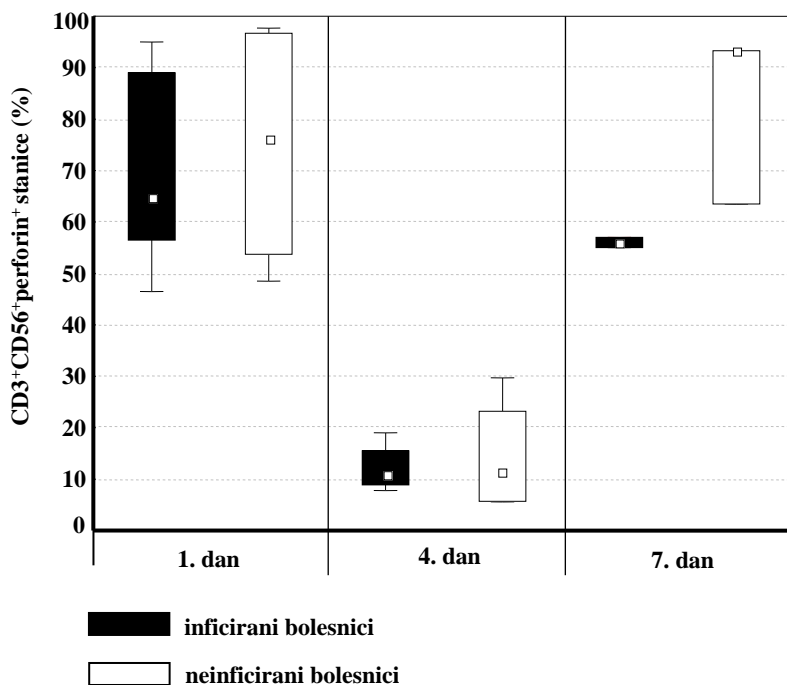
**Slika 68. Promjene udjela perforin pozitivnih stanica unutar  $CD3^+CD56^+$  stanica NK-T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**

Analizirajući srednji intenzitet fluorescencije za perforin unutar stanica NK-T utvrdili smo njegov statistički značajan porast u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dana nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu, smanjenje 4. dana nakon ozljede i ponovni porast 7. dana u odnosu na 4. dan, ali i statistički značajno manju vrijednost u odnosu na 1. dan nakon ozljede (Slika 69).

Statistički značajne razlike nismo našli u udjelu perforina unutar stanica NK-T u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. 4. i 7. dana nakon ozljede (Slika 70).



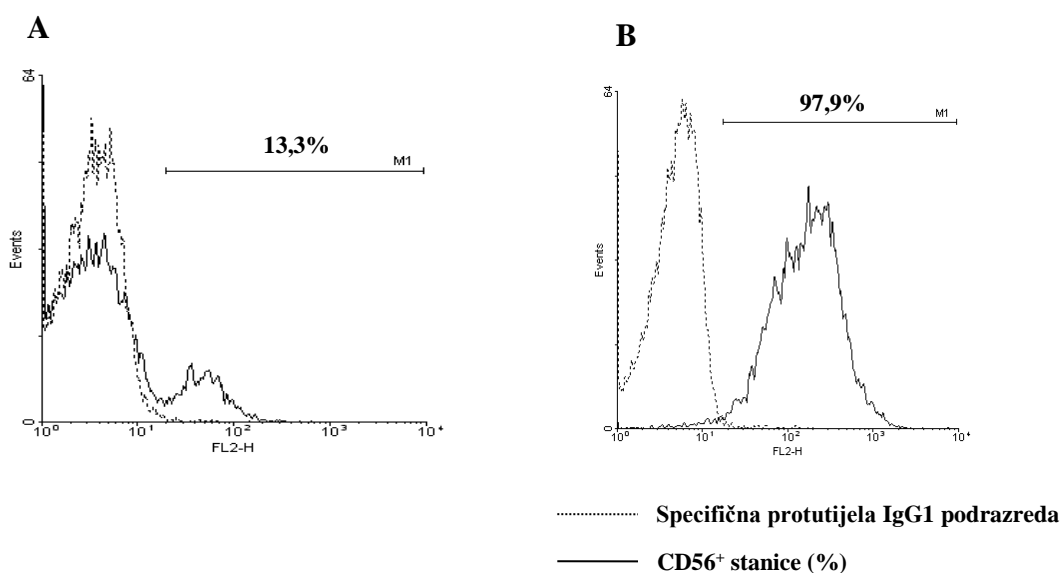
**Slika 69. Promjene srednjeg intenziteta fluorescencije za perforin unutar stanica NK-T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**



**Slika 70. Usporedba promjena udjela perforin pozitivnih stanica u populaciji CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stanica NK-T periferne krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima**

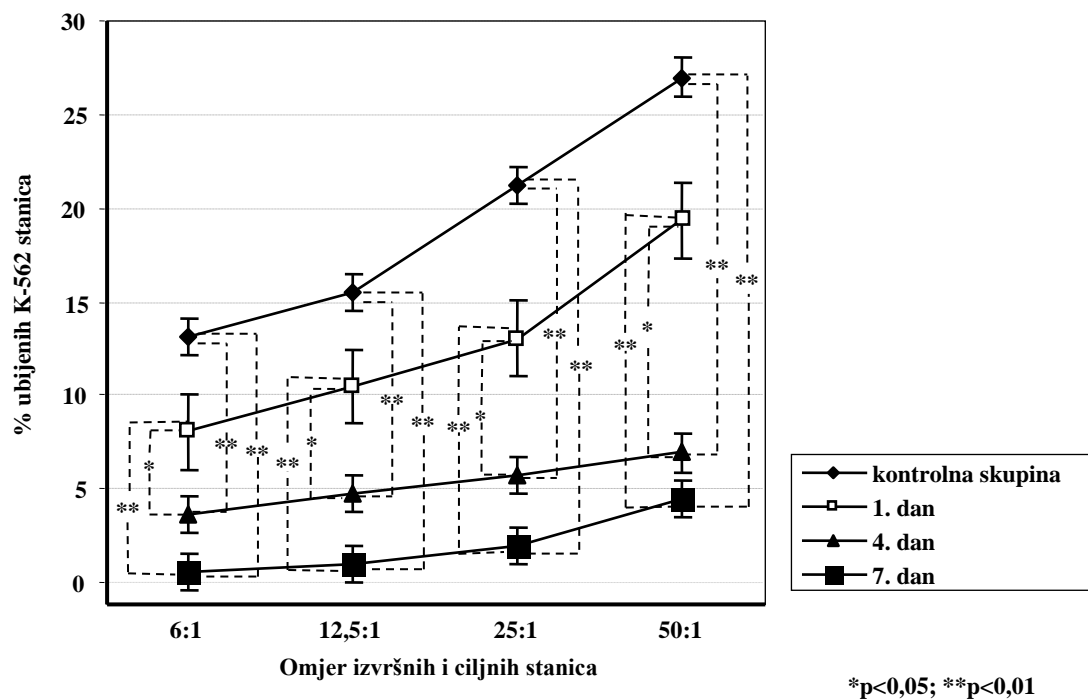
#### 4.5.4. Citotoksična aktivnost stanica NK u bolesnika s teškom ozljedom mozga

Stanice NK su vrlo važne za regulaciju imunoreakcije u infekcijama i pri tome ostvaruju svoj citotoksični učinak. Svoju citotoksičnu aktivnost ostvaruju na nekoliko načina, a među ostalim i oslobađanjem citotoksične molekule perforina iz svojih zrnaca. U nizu pokusa koje smo izveli ispitali smo funkcijsku sposobnost stanica NK periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga i usporedili s citotoksičnim učinkom stanica NK zdravih dobrovoljnih davaoca krvi. Najprije smo izolirali mononuklearne stanice iz periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. 4. i 7. dana nakon ozljede i zdravih pojedinaca, te smo metodom pozitivne magnetske separacije prema protokolu izdvojili CD56<sup>+</sup> stanice. Uspješnost pročišćavanja provjeravali smo prije i poslije magnetske separacije i to metodom izravne fluorescencije, tj. obilježavanjem površinskih biljega CD3 i CD56 s protutijelima specifičnim za navedene biljege i izravno konjugiranim s fluorescentnim bojama (FITC, PE). Na protočnome citometru smo analizirani udio CD56<sup>+</sup> stanica prije (Slika 71A) i poslije (Slika 71B) magnetske separacije. Prema našim rezultatima udio CD56<sup>+</sup> stanica prije magnetske separacije bio je od 5% do 17% što pokazuje Slika 71A s udjelom stanica NK od 13,3%. Poslije magnetske separacije udio stanica NK bio je od 83% do 98% što pokazuje Slika 71B s udjelom stanica NK od 97,9%.. Kao kontrolu smo koristili izravno konjugirana specifična protutijela IgG1 podrazreda (Slika 71 A i B).



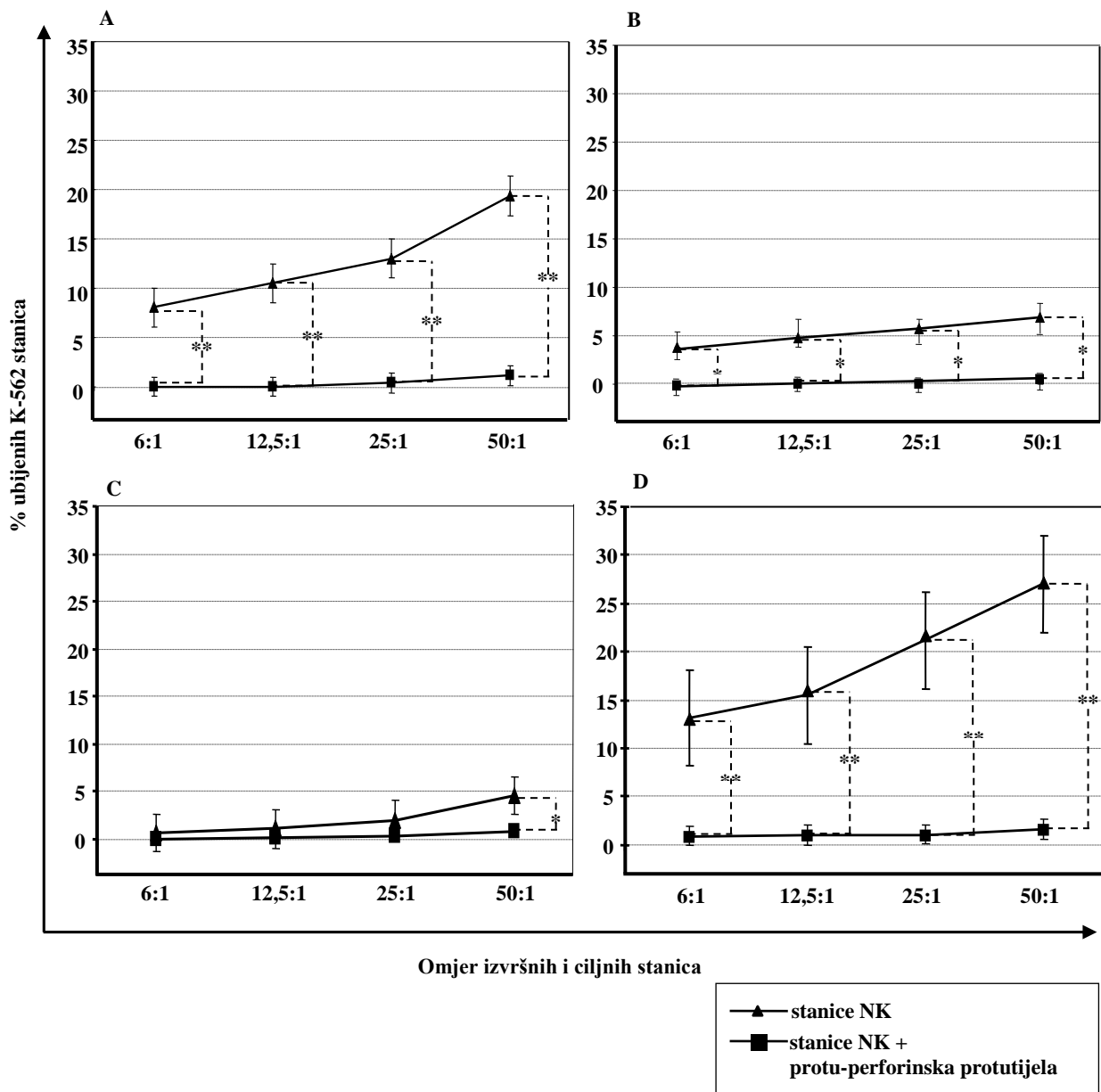
**Slika 71. Analiza protočnim citometrom CD56<sup>+</sup> stanica iz suspenzije mononuklearnih stanica periferne krvi prije (A) i poslije (B) magnetske separacije**

Stanice NK izdvojene nakon magnetske separacije stavili smo u dvosatni test citotoksičnosti prema K-562 humanoj eritroleukemijskoj liniji. Nakon isteka testa citotoksičnosti postotak ubijenih K-562 stanica smo određivali na protočnom citometru. Rezultate smo prikazali grafički na način da smo na apscisu nanijeli omjer izvršnih (CD56<sup>+</sup>) i ciljnih (K-562) stanica 6:1, 12,5:1, 25:1 i 50:1, a na ordinatu postotak ubijenih K-562 stanica. Statističkom obradom podataka vidjeli smo da CD56<sup>+</sup> stanice periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. i 7. dana nakon ozljede imaju statistički značajno manju citotoksičnu aktivnost u odnosu na citotoksičnu aktivnost CD56<sup>+</sup> stanica bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dana nakon ozljede i zdravih dobrovoljnih davaoca krvi u svim omjerima izvršnih i ciljnih stanica ( $p < 0,01$ ) (Slika 72).



**Slika 72. Citotoksičnost stanica NK periferne krvi prema K-562 staničnoj liniji u dvosatnom testu citotoksičnosti u bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima i u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina)**

Da bi utvrdili da li stanice NK ubijaju K-562 staničnu liniju putem perforina, prije izvođenja testa citotoksičnosti u suspenziju izvršnih i ciljnih stanica smo dodali protu-perforinska protutijela i vidjeli da dodatak protu-perforinskih protutijela smanjuje citotoksičnu aktivnost stanica NK periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. (Slika 73A) 4. (Slika 73B) i 7. (Slika 73C) dana te zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (Slika 73D) u svim omjerima izvršnih i ciljnih stanica.



**Slika 73. Citotoksičnost stanica NK prema K-562 staničnoj liniji u dvosatnom testu citotoksičnosti uz dodatak protu-perforinskih protutijela u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. (A), 4. (B) i 7. (C) dana nakon ozljede te u zdravih dobrovoljnih davaoca krvi (kontrolna skupina) (D)**

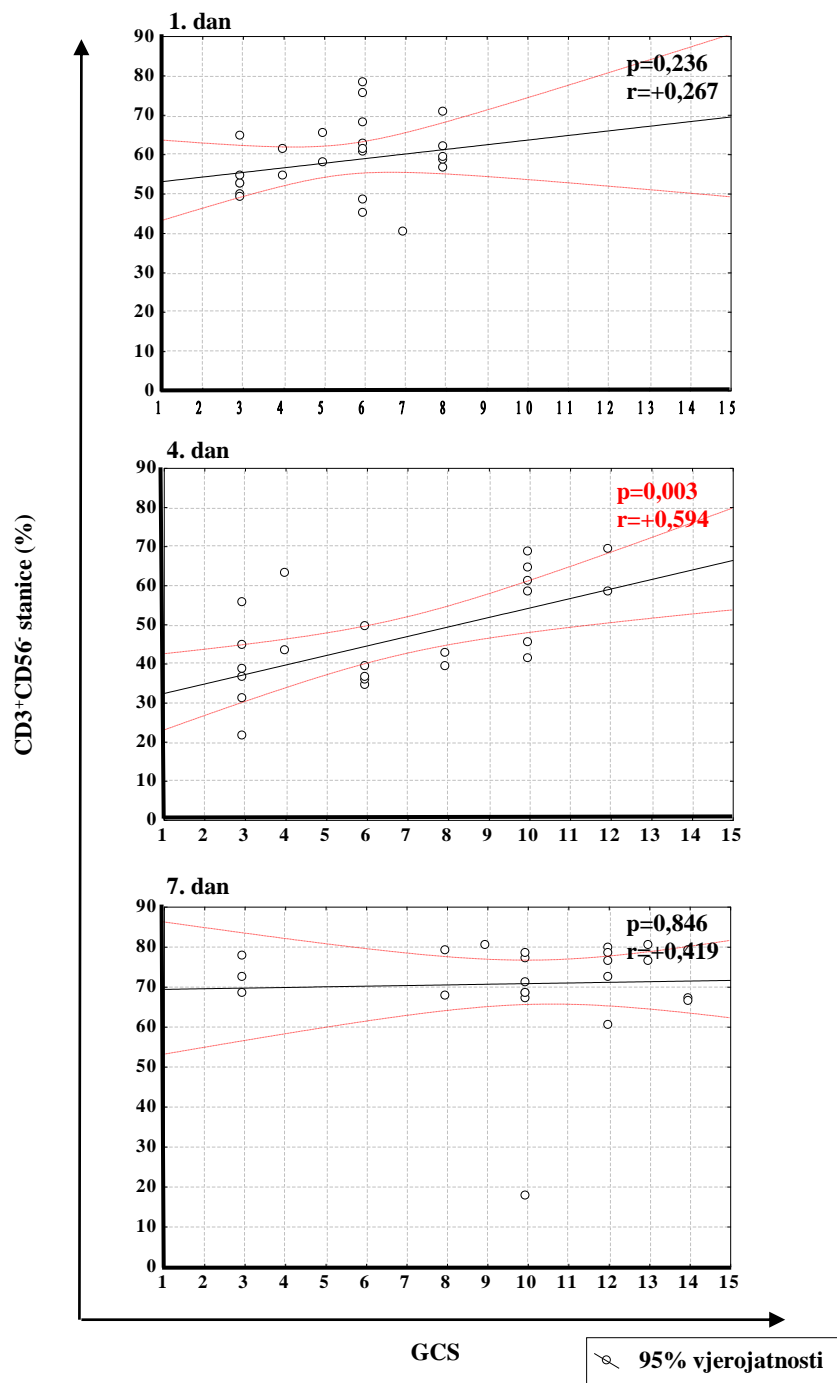
#### **4.5.5. Korelacija između težina ozljede mozga i imunoloških parametara**

##### ***4.5.5.1. Korelacija između težine ozljede mozga i postotka pojedinih limfocitnih subpopulacija***

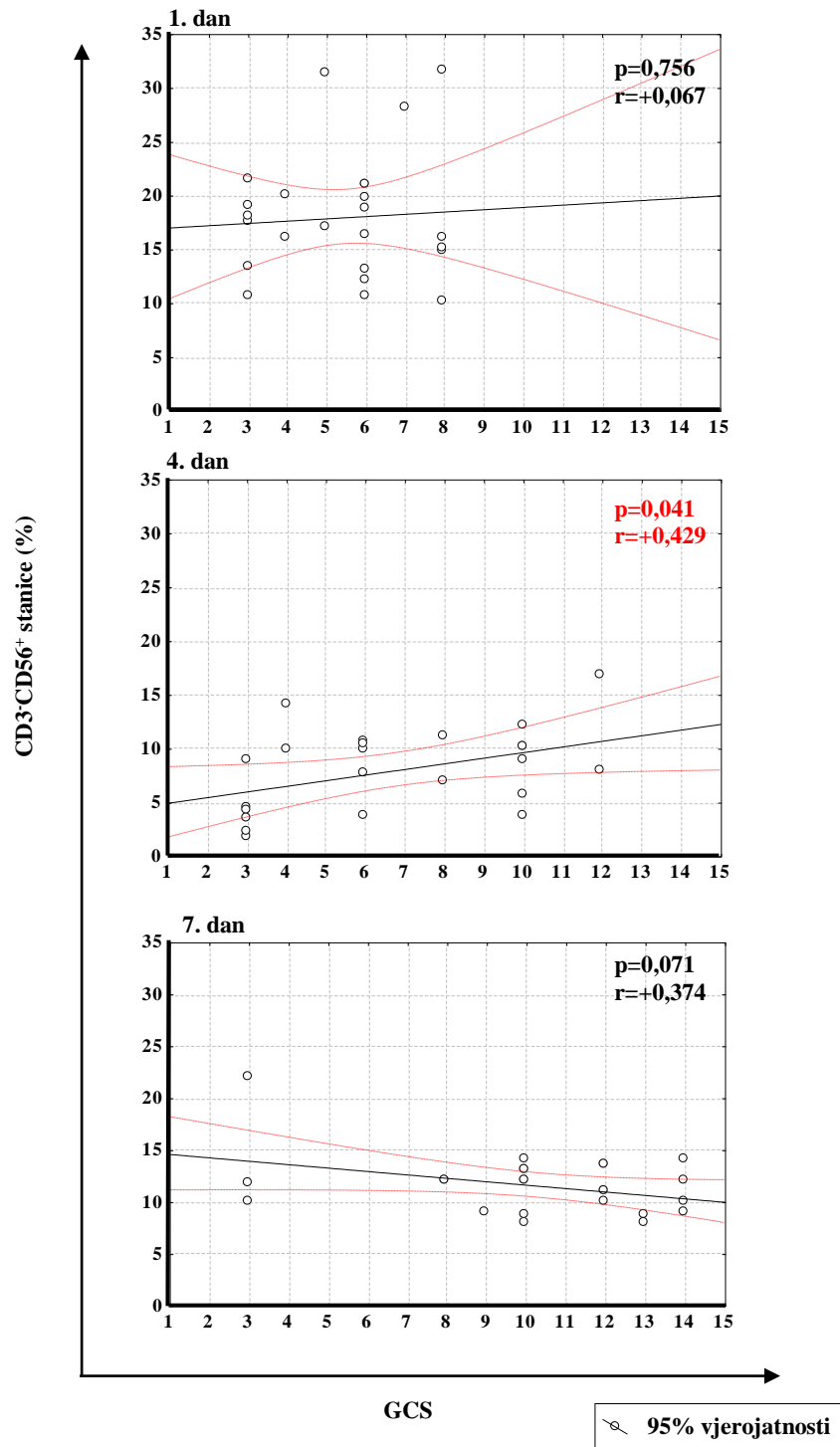
S obzirom da smo tijekom našeg istraživanja uočili značajnu nishodnu regulaciju postotaka imunokompetentnih stanica u bolesnika s teškom ozljedom mozga, osobito 4. dana nakon ozljede, ispitivali smo da li postoji korelacija između težine ozljede mozga i postotka pojedinih limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 1., 4. i 7. dana nakon ozljede. Kao pokazatelj težine ozljede mozga pratili smo vrijednost GCS i pokazali da postoji pozitivna korelacija između GCS i postotka  $CD3^+CD56^-$  limfocita T ( $p=0,003$ ,  $r=+0,594$ ) (Slika 74) te GCS i postotka  $CD3^-CD56^+$  stanica NK ( $p=0,041$ ,  $r=+0,429$ ) (Slika 75) u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede. Statistički značajnu korelaciju nismo utvrdili između vrijednosti GCS i postotka  $CD3^+CD56^+$  stanica NK-T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ispitivanim danima (Slika 76).

S obzirom da je perforin jedan od najvažnijih posrednika brzog mehanizma citotoksičnosti, važnog u održavanju imunološke hemostaze, nastojali smo utvrditi da li postoji korelacija između težine ozljede mozga i postotka perforin pozitivnih stanica u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga. Statističkom analizom smo utvrdili da postoji pozitivna korelacija između vrijednosti GCS i postotka perforin pozitivnih stanica u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede ( $p=0,0001$ ,  $r=+0,86$ ) (Slika 77). Ova pozitivna korelacija između vrijednosti GCS i perforin pozitivnih stanica utvrđena je u  $CD3^+$  ( $p=0,002$ ,  $r=+0,64$ ) (Slika 78) i  $CD56^+$  stanicama ( $p=0,0001$ ,  $r=+0,86$ ) (Slika 79) periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede. Prvog i 7. dana nakon ozljede nismo našli korelaciju između GCS i učestalosti limfocitnih subpopulacija, ako niti postotak perforin pozitivnih stanica.

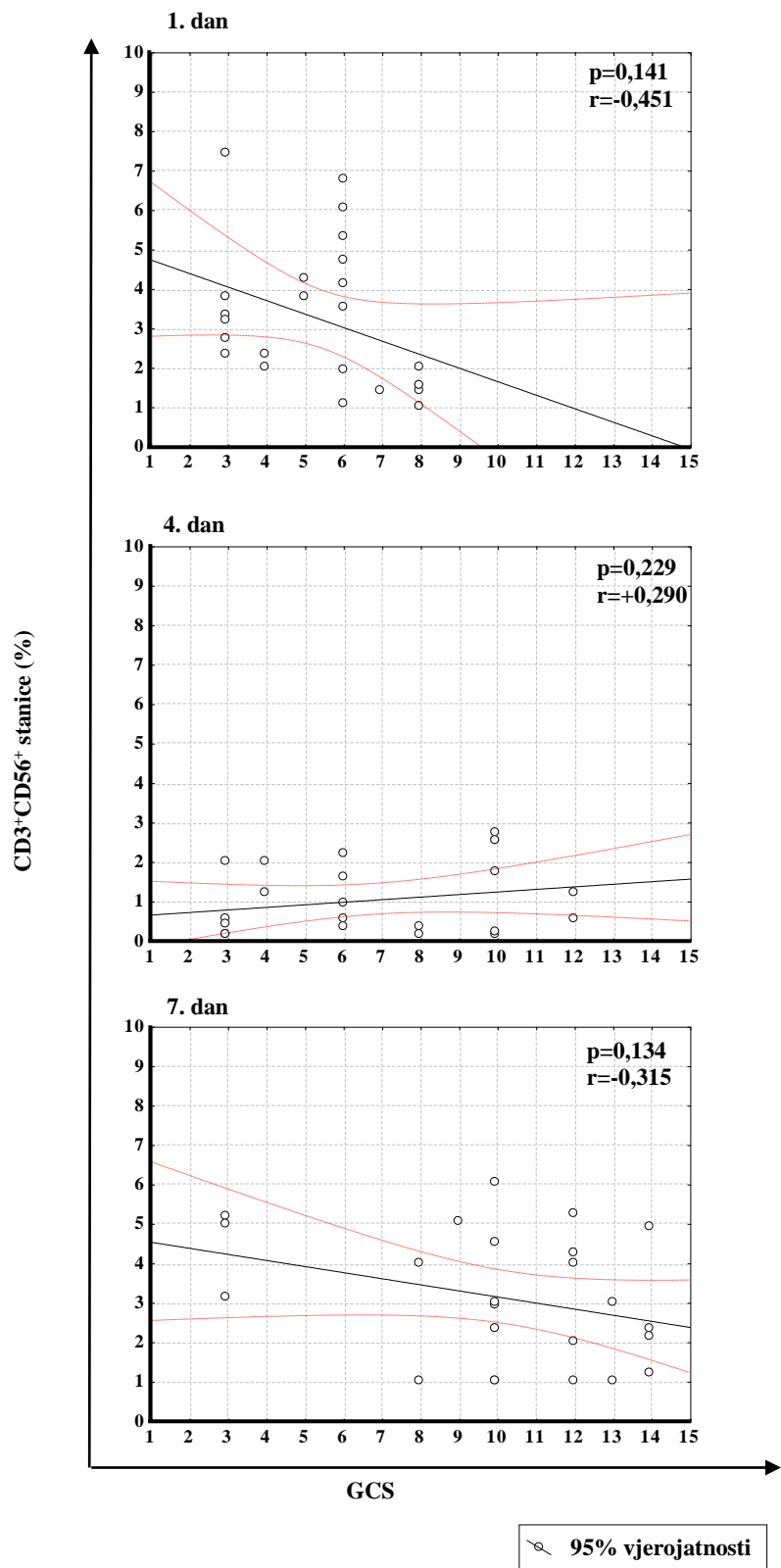




Slika 74. Korelacija između CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stanica i GCS kao mjere težine ozljede mozga u ispitivanim danima

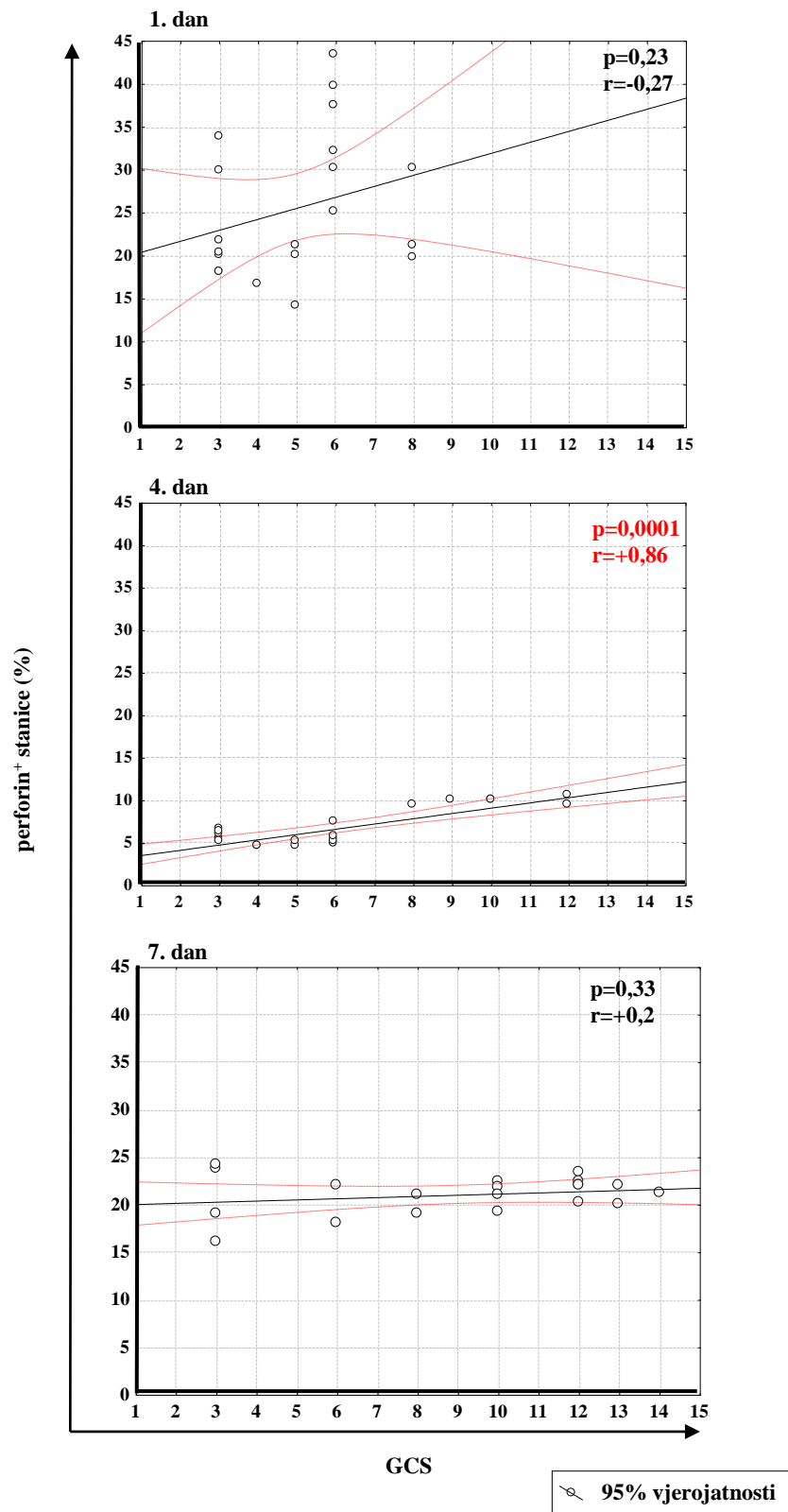


**Slika 75. Korelacija između CD3-CD56<sup>+</sup> stanica i GCS kao mjere težine ozljede mozga u ispitivanim danima**

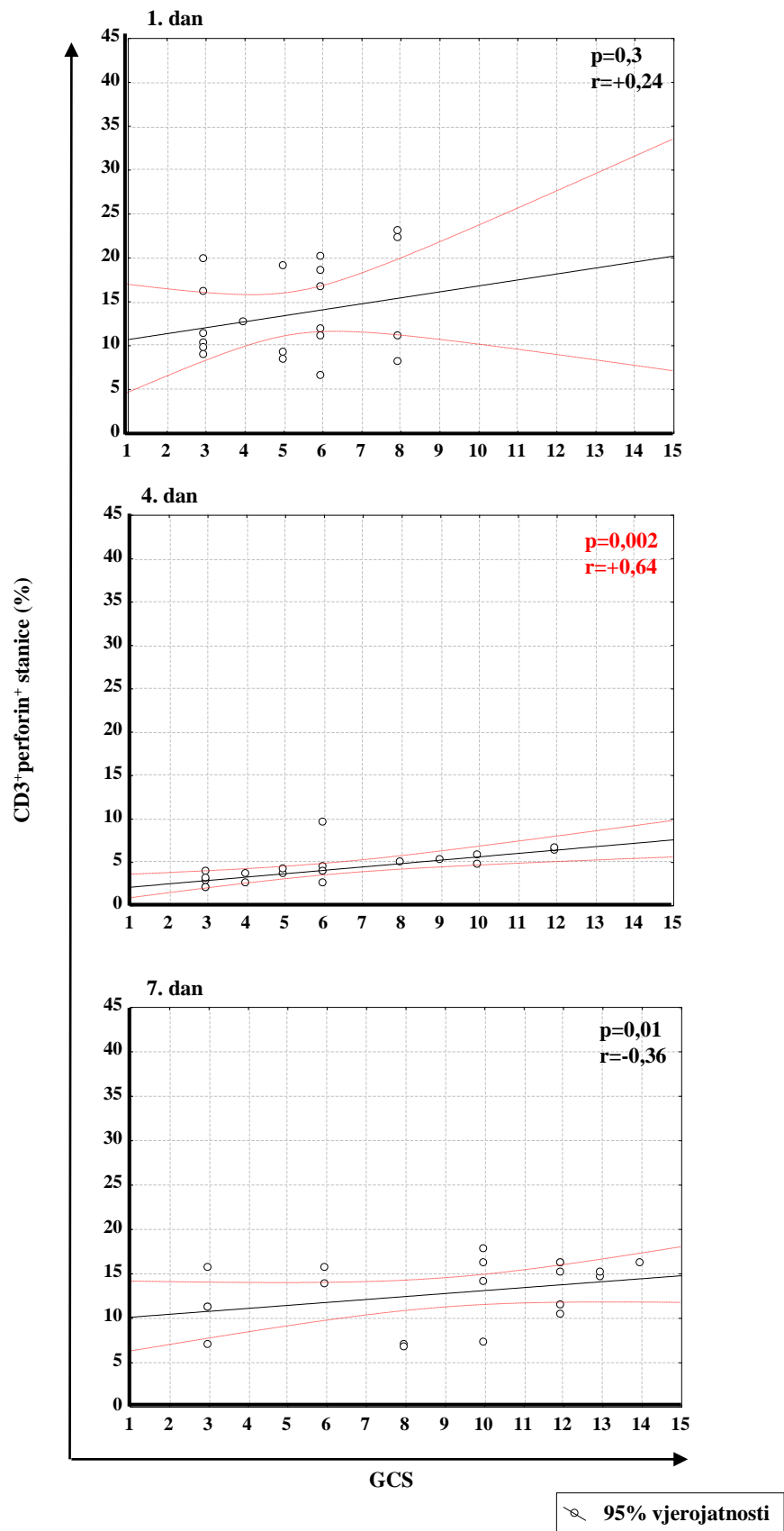


**Slika 76. Korelacija između CD3+CD56+ stanica i GCS kao mjere težine ozljede mozga u ispitivanim danima**

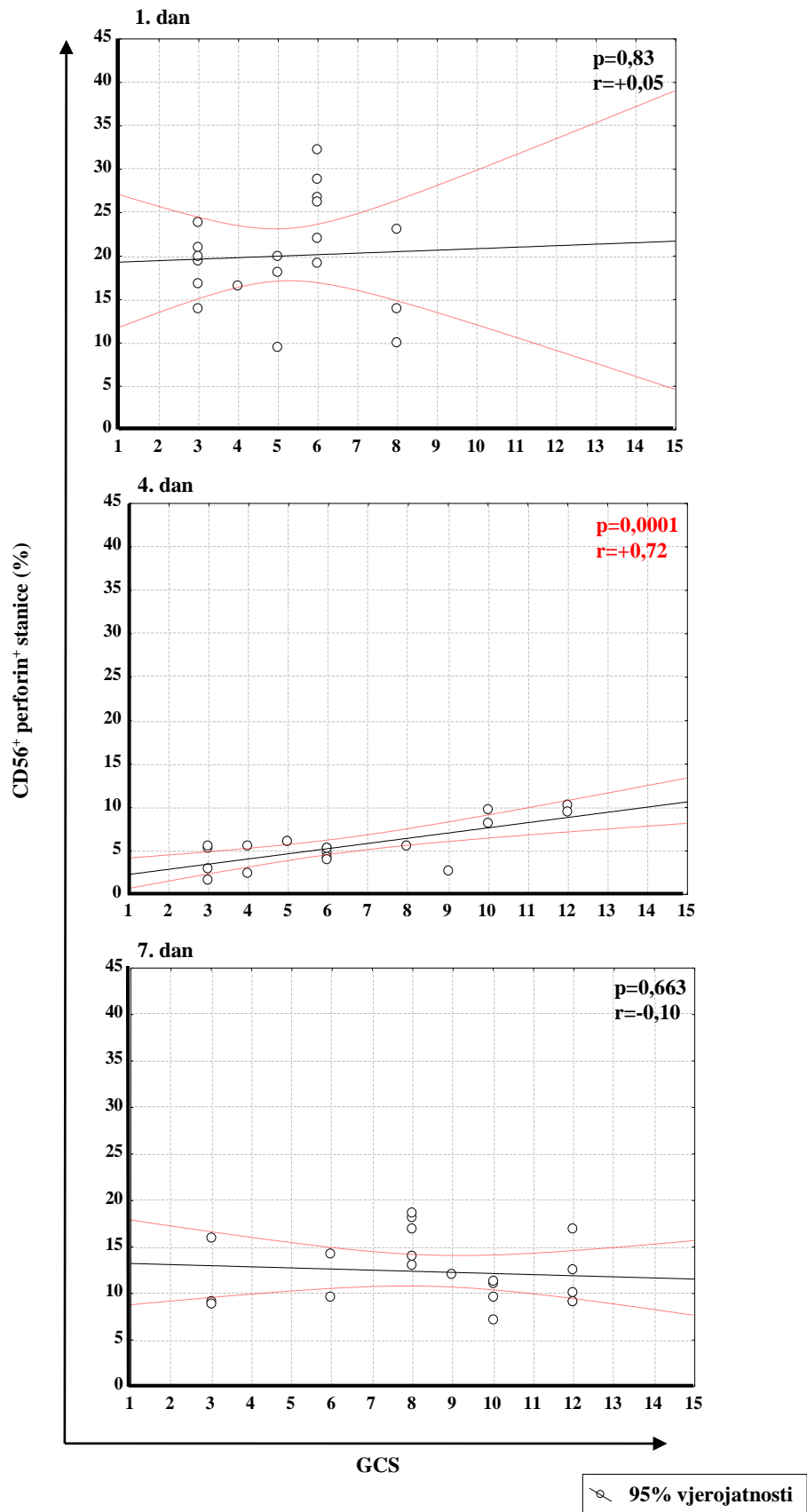
#### 4.5.5.2. Korelacija između težine ozljede mozga i postotka perforin pozitivnih stanica



Slika 77. Korelacija između perforin pozitivnih stanica i GCS kao mjere težine ozljede mozga u ispitivanim danima



Slika 78. Korelacija između CD3<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> stanica i GCS kao mjere težine ozljede mozga u ispitivanim danima



**Slika 79. Korelacija između CD56<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> stanica i GCS kao mjere težine ozljede mozga u ispitivanim danima**

## **5. RASPRAVA**

Bolesnici s teškom ozljedom mozga predstavljaju veliki zdravstveni, socijalni i ekonomski problem zbog visoke stope smrtnosti i trajne invalidnosti. Uglavnom se radi o mladim ljudima u dobi između 18. i 45. godine (25) što smo pokazali i u našem istraživanju (Slika 5).

Bruns i sur. su u svojoj epidemiološkoj analizi ozljede mozga utvrdili vrlo visoku stopu učestalosti ozljede mozga u SAD, čak 180 do 250 na 100 000 stanovnika godišnje (54). Ova stopa učestalosti bolesnika s teškom ozljedom mozga još je veća u Južnoj Africi, Australiji i Europi (54,55). Od ukupnog broja bolesnika s ozljedom mozga čak 10% su bolesnici s teškom ozljedom mozga (52).

Učestalost teške ozljede mozga znatno je veća u muškoj nego li u ženskoj populaciji (56). I u našem istraživanju čak 87% bolesnika s teškom ozljedom mozga su bili muškarci, tek 13% žene (odnos muškarci:žene=7:1) (Slika 6). Mogući razlog ovako velike razlike između raspodjele bolesnika s teškom ozljedom mozga s obzirom na spol je i način nastanka ozljede. Najčešći način nastanka ozljede mozga u industrijaliziranim zemljama su prometne nesreće. Procjenjuje se da u 34-50% bolesnika teška ozljeda mozga nastaje zbog stradanja u prometu. I doista, čak 42,5% bolesnika s teškom ozljedom mozga uključenim u naše istraživanje je stradalo u prometnoj nesreći. Teška ozljeda mozga čak u 10% bolesnika posljedica je pada, a u 9-39% bolesnika ranjavanja hladnim ili vatrenim oružjem (56). U našem istraživanju u čak 42,5% bolesnika teška ozljeda mozga bila je posljedica pada, a u 15% bolesnika je nastala kao rezultat ranjavanja vatrenim oružjem (Slika 7).

Teška ozljeda mozga je posljedica primarnog izravnog oštećenja moždanog tkiva i unutar moždanih vaskularnih struktura djelovanjem vanjske sile, te sekundarnog moždanog oštećenja koje je posljedica razvoja moždane hipoperfuzije, ishemije i upale (20).

Težina ozljede mozga procjenjuje se brojnim razradbama. Najčešće upotrebljavana klinička razradba procjene težine ozljede mozga je GCS (5,6). Rendgenološka dijagnostika, osobito CT i NMR, detaljnije opisuju patoanatomske abnormalnosti ozljede moždanog tkiva. Na osnovu rendgenološke (CT) dijagnostike razlikuju se fokalne i difuzne ozljede mozga, te unutar- (unutar moždano krvarenje) i izvan- (epiduralni hematoma, subduralni hematoma, subarahnoidalno krvarenje, intraventrikularno krvarenje) aksijalne ozljede mozga (9-13). U našem istraživanju najučestalije teške ozljede mozga, razrađene na osnovu neuropatološke razradbe, bile su subarahnoidalno krvarenje koje je utvrđeno u čak 37% bolesnika, potom subduralni hematoma (35%), unutar moždano krvarenje (20%), intraventrikularno krvarenje (5%) te epiduralni hematoma koji je dijagnosticiran u samo 1 (3%) bolesnika (Slika 8). Sličnu raspodjelu učestalosti teške ozljede mozga pokazali su, među ostalima, i Mrlić i sur. u svojim radovima (268).



S obzirom na težinu ozljede mozga, stopa smrtnosti u bolesnika s teškom ozljedom mozga je vrlo visoka. Čak 9 (22,5%) od ukupno 40 bolesnika s teškom ozljedom mozga uključenim u naše istraživanje je umrlo (Slika 10).

Unatoč značajnom napretku u početnom zbrinjavanju i intenzivnom liječenju bolesnika s teškom ozljedom mozga, a koje uključuje primjenu suvremenih smjernica u liječenju teške ozljede mozga (62), ovi bolesnici pokazuju veliku sklonost k razvoju infekcija, osobito pneumonije, sepse i infekcije mokraćnih putova.

S obzirom da bolesnici s teškom ozljedom mozga vrlo često zahtijevaju dugotrajnu strojnu ventilaciju, učestalost pneumonije uzrokovane strojnom ventilacijom u ovih bolesnika se povećava i do 60% (130). U populaciji ostalih bolesnika liječenih u jedinicama intenzivnog liječenja koji su na strojnoj potpori zabilježena je učestalost pneumonije uzrokovane strojnom ventilacijom u 8-28% (269-271).

Uzroci infekcija u bolesnika s teškom ozljedom mozga su mnogostruki. Primjena invazivnih medicinskih postupaka, ako što su strojna ventilacija, invazivno mjerenje krvnog tlaka, postavljanje sustava za mjerenje unutartrbušnog tlaka, postavljanje centralnog venskog katetera, potom disfagije, aspiracija, disfunkcija mokraćnog mjehura dugo su poznati kao mehanizmi u razvoju infekcije u bolesnika s teškom ozljedom mozga (272). Pojava infekcije u bolesnika s teškom ozljedom mozga dodatno produžuje trajanje strojne ventilacije, duljinu boravka u jedinicama intenzivnog liječenja, povećava troškove liječenja i smrtnost (273,274). U našem smo istraživanju pokazali da inficirani bolesnici s teškom ozljedom mozga statistički značajno imaju dulje trajanje strojne ventilacije i boravak u jedinicama intenzivnog liječenja (Slika 9).

Praćenjem kliničkih i laboratorijskih parametara utvrdili smo povećanje tjelesne temperature, apsolutnog broja leukocita i CRP u bolesnika s teškom ozljedom mozga u svim ispitivanim danima (Tablice 6 i 7). Dodatno povećanje apsolutnog broja leukocita zabilježili smo u inficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede (Slika 11). Na osnovu navedenih kliničkih i laboratorijskih parametara te dodatnom mikrobiološkom analizom utvrdili smo da su pneumonija, sepsa i infekcije mokraćnih putova najučestalije infekcije u našoj skupini bolesnika s teškom ozljedom mozga (Slika 12), a najveći ih je broj dijagnosticiran 4. dana nakon ozljede (Slika 13). Najčešći uzročnici pneumonije bili su *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*. U bolesnika u kojih je došlo do razvoja sepse najčešći izolirani uzročnik bila je bakterija *Staphylococcus aureus*, dok je infekcija mokraćnih putova bila posljedica razmnožavanja bakterije *Enterococcus faecalis* i *Escherichiae coli* te gljivice *Candida albicans* u mokraći. Smatra se da je za ovakvu

učestalost pojedinih vrsta bakterija u razvoju pneumonije odgovorna kolonizacija potencijalno patogenih bakterija iz gornjih u donje dišne putove, te aspiracija želučanog sadržaja (275,276). Kolonizaciji bakterija u donje dišne putove dodatno doprinosi orotrahealna intubacija koja narušava prirodnu zapreku između orofarinksa i dušnika pri čemu se kontaminirani sekret usne šupljine potiskuje u donje dišne putove. Za razvoj sepse smatra se odgovornim kolonizacija krvi potencijalno patogenim bakterijama preko unutaržilnih katetera i inficiranih rana, dok je infekcija mokraćnih putova posljedica poremećaja funkcije mokraćnog mjehura i stavljanja urinarnog katetera (262).

Međutim, danas se zna da je ozljeda središnjeg živčanog sustava neovisni čimbenik koji sam po sebi značajno povećava podložnost razvoju infekcija (272).

Teorija da je mozak "imunološki privilegirano mjesto" zbog nedostatka limfatičnog sustava u svojoj strukturi i zaštite koju čini krvno-moždana barijera tek nedavno se pokazala neopravdanom. Noviji znanstveni radovi su pokazali da središnji živčani sustav značajno imunološki reagira na vanjske podražaje (25). Ozljeda središnjeg živčanog sustava dovodi do poremećaja dobro uravnoteženog međuodnosa između dva integracijska sustava organizma: imunološkog i živčanog. Posljedica te neravnoteža je slabljenje funkcije imunološkog sustava čime se objašnjava način na koji ozljeda središnjeg živčanog sustava dovodi do razvoja sekundarne infekcije. Miesel i sur. te Klehmet i sur. su u svojim radovima 2005. i 2009. godine opisali ovo stanje kao imunodepresija uzrokovana ozljedom središnjeg živčanog sustava (od engl. Central nervous system injury-induced immunodeficiency syndrome) (262,277). To je skup imunoloških mehanizama koji u konačnici dovode do nishodne regulacije imunološkog odgovora. Tako su 1991. godine Quattrocchi i sur. u svojim istraživanjima uočili manjkavost funkcije pomagačkih T limfocita nakon stimulacije mitogenima i citotoksičnost limfocinima-aktivirane ubilačke aktivnosti u bolesnika s teškom ozljedom mozga (278). U ovih bolesnika uočili su nedostatak odgođene reakcije preosjetljivosti što ukazuje na oštećenje stanicama posredovane imunosti (279). Nakon ovih slijedilo je nekoliko istraživanja u kojima su istraživači ukazali na poremećaj funkcije imunološkog odgovora nakon ozljede središnjeg živčanog sustava i time nastojali objasniti visoku učestalost infekcija u bolesnika s ozljedom središnjeg živčanog sustava (280,281). Meert i sur. su u svojim istraživanjima pokazali smanjeni odgovor cirkulirajućih limfocita T na stimulaciju mitogenima u djece s teškom ozljedom mozga (282). Wolach i sur. su pokazali smanjeni odgovor limfocita T i stanica NK, nosioca stanične imunosti, na stimulaciju mitogenima, ali i manjkavost u humoralnoj imunosti u bolesnika s teškom ozljedom mozga

koja se je očitovala u smanjenom lučenju imunoglobulina (IgG i IgM) i proizvodnji superoksida iz granulocita (280,281).

Smrcka i sur. su u svojim istraživanjima potvrdili nishodnu regulaciju CD3<sup>+</sup> limfocita T, pomagačkih CD4<sup>+</sup> limfocita T i citotoksičnih/supresorskih CD8<sup>+</sup> stanica u krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga neposredno nakon ozljede i njihov postepeni rast tijekom liječenja (283). U njihovom istraživanju koristili su metodu izravne imunofluorescencije s jednostrukim obilježavanjem biljega na površini limfocita. U našem istraživanju pokazali smo rezultate dobivene istovremenim višestrukim obilježavanjem i analizom na protočnom citometru biljega na površini različitih imunokompetentnih stanica periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u ranom razdoblju nakon ozljede mozga. Na ovaj način smo mnogo detaljnije pokazali promjene pojedinih limfocitih subpopulacija i monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga, te dodatno ukazali na razlike njihovog udjela između inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga.

Smanjenje postotka CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T u krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede izgleda da je rezultat smanjenja udjela CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>, a ne CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> subpopulacije limfocita T (Slika 16). Ove promjene podudaraju se s pojavom infekcija u bolesnika s teškom ozljedom mozga što ukazuje da bi nishodna regulacija limfocita T, osobito CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> subpopulacije, za koju je svojstveno da posjeduje citotoksičnu aktivnost, bila odgovorna za pojavu infekcije u ovih bolesnika. To potvrđuje i nalaz da inficirani bolesnici s teškom ozljedom mozga imaju manji postotak limfocita T i njihovih CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> subpopulacija u odnosu na neinficirane bolesnike 4. dana nakon ozljede (Slika 16), u vrijeme kada je učestalost infekcija u ovih bolesnika najveća (Slika 13). Razlike u udjelu limfocita T i njihovih subpopulacija nismo uočili između inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dana nakon ozljede, jer se infekcija još nije razvila, ali niti 7. dana što objašnjava da je antibiotska terapija bila učinkovita. Smanjenje izražaja srednjeg intenziteta fluorescencije za molekulu CD3 na površini limfocita T u bolesnika s teškom ozljedom mozga u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 17) ukazuje na smanjenu sposobnost aktivacije limfocita T u bolesnika s teškom ozljedom mozga. Dodatno, smanjenje udjela i srednjeg intenziteta fluorescencije ranog (CD25) i kasnog (HLA-DR) aktivacijskog biljega na površini limfocita T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede (Slika 19), ukazuje na nishodnu regulaciju limfocita T koja se očituje odgođenom proliferacijom i diferencijacijom limfocita T u izvršne stranice. Ovime se može objasniti povećana sklonost infekcijama bolesnika s teškom ozljedom mozga, osobito infekcijama bakterijske etiologije s obzirom da bakterije

prvenstveno potiču staničnu imunost posredovanu limfocitima T (284). Povećani izražaj molekule CD25 na površini limfocita T 4. dana nakon ozljede u inficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u odnosu na neinficiranu skupinu te povećanje njezinog udjela 7. dana liječenja ukazuje na očuvanu aktivacijsku sposobnost limfocita T periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga (Slika 19 i 21).

Osim smanjenja udjela limfocita T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede zabilježili smo i značajno smanjenje postotka CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stanica NK i njihove CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> subpopulacije (Slika 22) za koje je svojstvena snažna citotoksična aktivnost prema inficiranim ciljnim stanicama (172,173). Ovo smanjenje stanica NK dodatno objašnjava pojavu infekcije u bolesnika s teškom ozljedom mozga. Doista, statistički značajno manji postotak stanica NK našli smo u perifernoj krvi inficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u odnosu na neinficirane bolesnike 4. dana nakon ozljede (Slika 24) u vrijeme pojave infekcija. Iako u našem istraživanju nismo našli promjene udjela, kao niti promjene srednjeg intenziteta fluorescencije, ranih aktivacijskih biljega (CD25 i CD69) na površini stanica NK, udio molekule HLA-DR na površini stanica NK je bio veći u bolesnika s teškom ozljedom mozga nego li u kontrolnoj skupini, što ukazuje da stanice NK u ovih bolesnika ipak zadržavaju sposobnost kasne aktivacije.

Slično promjenama udjela limfocita T i stanica NK u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga i stanice NK-T su pokazale smanjenje udjela 4. dana nakon ozljede, ali i postepeni porast 7. dana intenzivnog liječenja (Slika 28) kada smo zabilježili i porast ranih aktivacijskih biljega CD25 i CD69 na površini ovih stanica (Slika 31). Ove promjene ukazuju na nishodnu regulaciju stanica NK-T bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede što doprinosi smanjenju otpornosti organizma na infekciju. Nadalje, povećanje postotka stanica NK-T i ushodna regulacija ranih aktivacijskih biljega na površini ovih stanica 7. dana nakon ozljede, kada se smanjuje učestalost infekcija u bolesnika s teškom ozljedom mozga, ukazuju na njihovu važnu ulogu u obrani od infekcija u ovih bolesnika (161).

Za razliku od udjela limfocita B u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga koji se nije mijenjao u istraživanom razdoblju (Slika 34), postotak monocita bio je viši u bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dana nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu i pokazao značajni pad 7. dana nakon ozljede (Slika 37). Ovakva dinamika promjena učestalosti monocita ukazuje na njihov klasični nespecifični rani imunološki odgovor na endogeno ili egzogeno izazvanu noksu. Zanimljivo je da se srednji intenzitet fluorescencije za molekulu CD14 na površini monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga nije značajnije mijenjao, a nismo našli ni značajnije promjene udjela monocita u inficiranih i

neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga. Ovi rezultati ukazuju na svojevrsni oblik anergije monocita na infektivne čimbenike u bolesnika s teškom ozljedom mozga. Tek neznatni porast molekule CD80 i smanjenje molekula izražaja molekula CD86, CD91 i HLA-DR zabilježili smo na površini monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 40). Ove promjene udjela aktivacijskih biljega na površini monocita ukazuju na njihov spor proces aktivacije u bolesnika s teškom ozljedom mozga, a time i smanjeni odgovor imunološkog sustava na patogene.

Mehanizam promjena udjela pojedinih subpopulacija limfocita i monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga još nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da u tome važnu ulogu ima međudjelovanje središnjeg živčanog i imunološkog sustava putem brojnih topljivih čimbenika (npr. hormona, citokina). Istraživanja *in vitro* su pokazala da oslobađanje katekolamina u akutnom stresu ili nakon ozljede središnjeg živčanog sustava selektivno koči funkciju Th1 imunološkog odgovora i potiče protuupalna Th2 imunološka zbivanja (254).

Poznato je da katekolamini ostvaruju svoj učinak na limfocite i monocite vezujući se na  $\beta$ -adrenergične, ali ne i  $\alpha$ -adrenergične receptore koji nisu svojstveni limfocitima (285). Za razliku od  $CD3^+CD8^+CD56^-$  limfocita T koji na svojoj površini snažno izražavaju  $\beta_2$ -adrenergične receptore, tek neznatan broj  $\beta_2$ -adrenergičnih receptora nađen je na površini  $CD3^+CD4^+CD56^-$  limfocita T (255). Ovako mali izražaj  $\beta_2$ -adrenergičnih receptora na površini  $CD3^+CD4^+CD56^-$  limfocita T mogao bi objasniti relativno stabilni udio  $CD3^+CD4^+CD56^-$  limfocita T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga tijekom intenzivnog liječenja. Iako se još uvijek ne zna izražaj  $\beta_2$ -adrenergičnih receptora na površini stanica NK-T, ove stanice pokazuju slične dinamičke promjene kao i  $CD3^+CD8^+CD56^-$  limfociti T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga. Jedno od mogućih objašnjenja smanjenog broja stanica NK, limfocita T, stanica NK-T i monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga mogao bi biti snažan učinak katekolamina na nishodnu regulaciju ovih stanica, ali njihov prijelaz iz periferne krvi u oštećeno moždano tkivo (254,286).

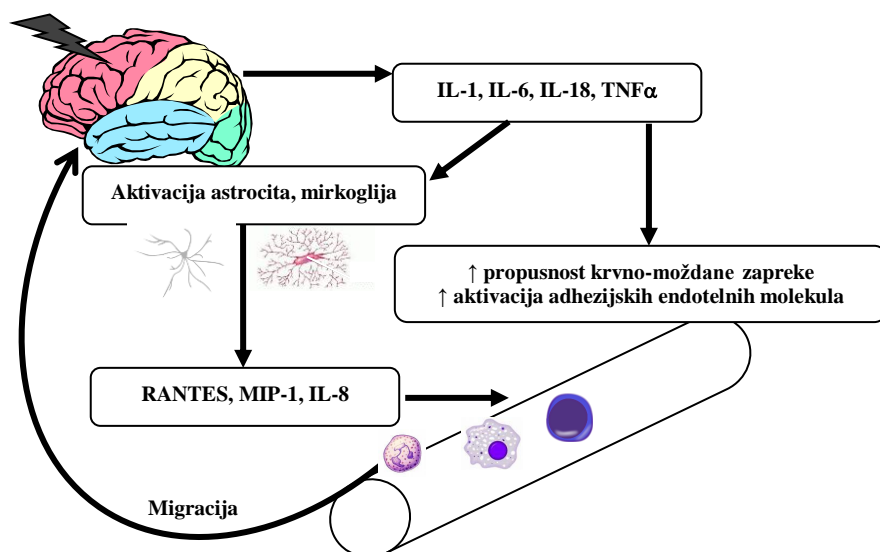
Mogućnost da benzodiazepini i opiodi koji su korišteni u analgozaciji bolesnika s teškom ozljedom mozga, smanjuju broj stanica NK u perifernoj krvi ovih bolesnika ne može se sa sigurnošću dokazati, s obzirom da je poznato dugotrajno davanje benzodiazepina i opioda smanjuju citotoksičnost stanica NK (287,288). Smatramo da ovi lijekovi ne utječu na funkciju  $CD3^+CD56^{+bright}$  stanica NK ili  $CD3^+CD4^+CD56^-$  limfocita T s obzirom da se njihov postotak nije bitnije mijenjao u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga tijekom intenzivnog liječenja. Slično tome, čini se da benzodiazepini i opiodi bitno ne utječu na broj

CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T i stanica NK-T, s obzirom da im se postotak postupno povećao 7. dana poslije ozljede.

Oštećenje moždanog tkiva predstavlja jaki upalni odgovor kojeg obilježava stvaranje i lučenje brojnih imunomodulatora, osobito proupalnih citokina kao što su IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-18, kemokina (IL-8), citolitičkih proteaza i slobodnih kisikovih radikala (25). Za TNF $\alpha$  i IL-1 se pokazalo da pojačavaju izražaj i aktivaciju endotelnih adhezijskih molekula, povećavaju propusnost krvno-moždane zapreke olakšavajući time ekstravazaciju stanica, osobito leukocita u oštećeno moždano tkivo (289). I TNF $\alpha$  i IL-1 dodatno aktiviraju imunokompetentne stanice mozga (astrociti i mikroglia) na stvaranje i lučenje kemokina kao što su beta-kemokin RANTES (engl. regulated upon activation, normal T cell and secreted, CCL5) (291), MIP-1 (engl. monocyte chemoattractant protein-1) (R) i IL-8 (CXCL8) (290,292).

Kemokin RANTES privlači neutrofile, monocite i limfocite T, MIP-1 je snažan kemotaktični čimbenik za monocite, dok IL-8 privlači neutrofile i limfocite T (290,291). Posljedica ovih zbivanja je prijelaz imunokompetentnih stanica iz periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u oštećeno moždano tkivo gdje bi imale ulogu u stišavanju i ograničavanju daljnjeg upalnog odgovora nastalog oštećenjem mozga i njegovih struktura. Posljedica prijelaza imunokompetentnih stanica u oštećeno moždano tkivo bila bi njihova nishodna regulacija i povećana sklonost razvoju infekcija (Slika 80).

Što je veće oštećenje moždanog tkiva veći je i smanjenje postotka limfocita T i stanica NK u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga ukazujući da opsežnije oštećenje moždanog tkiva zahtjeva snažni nadzor njegove kontrole. Ovu pretpostavku smo dokazali statistički značajnom pozitivnom korelacijom između GCS, kao pokazatelja težine ozljede mozga i udjela limfocita T i stanica NK u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede (Slika 74 i 75).



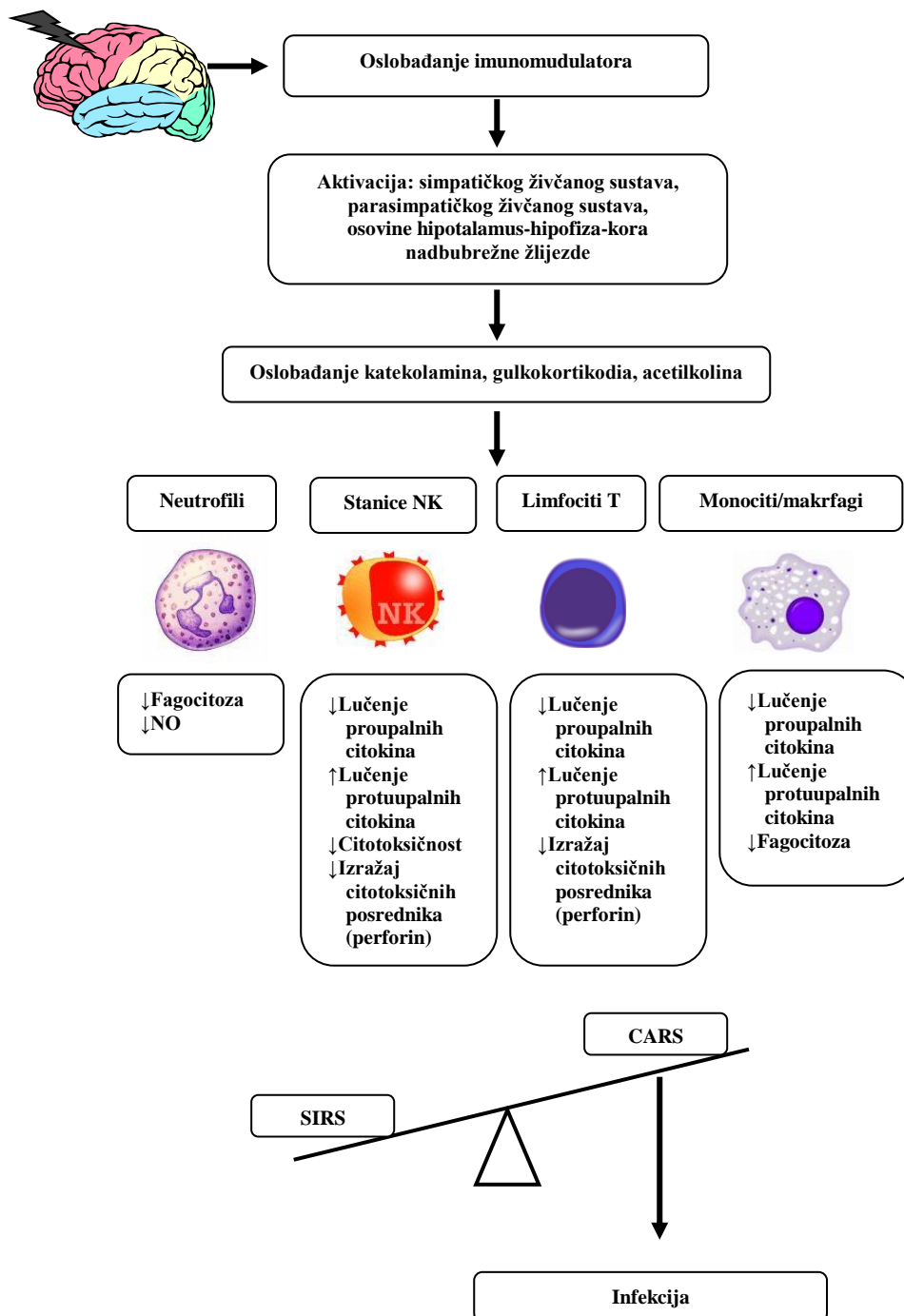
**Slika 80. Pretpostavljeni način ulaska leukocita iz periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga u oštećeno moždano tkivo (objašnjenje u tekstu)**

Nadalje, smatra se da lučenje glukokortikoida, kao krajnjeg produkta osovine hipotalamus-hipofiza-kora nadbubrežne žlijezde, dodatno doprinosi nishodnoj regulaciji imunokompetentnih stanica periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga. Ovaj imunosupresivni učinak glukokortikoida očituje se potiskivanjem lučenja proupalnih posrednika kao što su citokini (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ), kemokini (IL-8), prostagladini i dušični oksid (293-295). Sličan učinak na nishodnu regulaciju imunološkog odgovora u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga ostvaruje i parasimpatički živčani sustav putem svojeg posrednika acetilkolina za kojeg je utvrđeno da smanjuje stvaranje i lučenje proupalnih citokina TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-18 iz makrofaga (261). Ove učinke acetilkolin ostvaruje vezivanjem za  $\alpha$ -7 nikotinske kolinergične receptore koji su izraženi na površini monocita/makrofaga (296).

U pokusima unutarstaničnog obilježavanja citokina u različitim subpopulacijama limfocita i monocita periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga utvrdili smo vrlo niski izražaj proupalnih citokina IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  i IL-15 u ispitivanim staničnim populacijama (Slika 46, 51 i 54) bez znatnije ushodne regulacije u inficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga (Slika 48, 53 i 56). Ovi rezultati vjerojatno su posljedica imunosupresivnog učinka topljivih tvari kao što su glukokortikoidi ili acetilkolin koji se oslabđaju iz oštećenog i noksom aktiviranog

središnjeg živčanog sustava. Niski izražaj proupalnih citokina u limfocitima T, stanicama NK, stanicama NK-T i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga praćen je i vrlo niskim srednjim intenzitetom fluorescencije za IFN $\gamma$  (Slika 47), TNF $\alpha$  (Slika 52) i IL-15 (Slika 55). Ovakav niski izražaj i stvaranje proupalnih citokina, osobita IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$ , u bolesnika s teškom ozljedom mozga mogao bi objasniti smanjenu aktivaciju i nishodnu regulaciju izvršnih stanica (limfocita T, stanica NK, stanica NK-T) i posljedično povećanu sklonost k razvoju infekcija u ovih bolesnika. S obzirom da je IL-15 važan citokin koji potiče proliferaciju, diferencijaciju i citotoksičnu aktivnost stanica NK i limfocita T periferne krvi (245), smanjeno stvaranje i IL-15 u krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga objašnjava smanjenje postotka ovih stanica i povećanu sklonost infekcijama. Za razliku od IFN $\gamma$  koji potiče diferencijaciju limfocita Th1 koji posjeduju snažno proupalno i citotoksično djelovanje, IL-4 potiče diferencijaciju protuupalnog Th2 imunološkog odgovora (225). U našem istraživanju smo pokazali dominaciju IL-4 nad IFN $\gamma$  u svim limfocitnim subpopulacijama i monocitima periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga (Slika 49), što upućuje na posijetraumatsko usmjeravanje prema Th2 obrascu lučenja citokina i obrane organizma (254). Ovi rezultati podupiru hipotezu koja opisuje ozljedu središnjeg živčanog sustava kao snažni upalni odgovor s oslobađanjem proupalnih posrednika u cirkulaciju gdje uzrokuju snažnu upalnu reakciju s obilježjima sindroma sustavnog upalnog odgovora (SIRS, engl. systemic inflammatory response syndrome). S druge strane, da bi se obuzdala snažna proupalna reakcija, imunokompetentne stanice periferne krvi bolesnika s ozljedom središnjeg živčanog sustava luče brojne protuupalne tvari (IL-10, IL-1 receptor antagonist, topljivi čimbenik TNF $\alpha$ ). Na taj način se ostvaruje protuteža protuupalnom sindromu poznatom pod nazivom CARS (engl. compensatory anti-inflammatory response syndrome) (Slika 81) (262).





**Slika 81. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja teške ozljede mozga na nishodu regulaciju imunološkog odgovora (objašnjenje u tekstu).**

Točan mehanizam kojim ozljeda središnjeg živčanog sustava dovodi do sustavnog protuupalnog odgovora još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Nekoliko laboratorijskih i kliničkih studija su pokazale da proupalne tvari oslobođene iz oštećenog moždanog tkiva izazivaju stimulaciju simpatičkog i parasimpatičkog živčanog sustava te osovinu hipotalamus-hipofiza-kora nadbubrežne žlijezde koji putem svojih posrednika (katekolamini, acetilkolin, glukokortikoidi) izravno uzrokuju nishodnu regulaciju imunokompetentnih stanica koja se očituje smanjenjem postotka limfocita T, stanica NK, stanica NK-T, monocita (Slika 16, 22, 28 i 37), smanjenju proliferacije limfocita T na stimulaciju mitogenima (278,279), smanjenju fagocitoze neutrofila i monocita (281), smanjenju stvaranja i lučenja proupalnih citokina i dušičnog oksida (279), te smanjenju lučenja IFN $\gamma$  u monocitima kao odgovor na stimulaciju s LPS (Slika 50). Stanje CARDS je osobito izraženo u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dan nakon ozljede kada je zabilježena i najveća učestalost infekcija u ovih bolesnika.

Najvažnija funkcija imunološkog sustava je prepoznavanje i uništavanje promijenjenih i inficiranih stanica te održavanje homeostaze. Taj cilj se postiže citotoksičnom aktivnosti limfocita koji uključuju CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocite T, stanice NK, stanice NK-T te Th1 i Treg CD4<sup>+</sup> stanice. Ove stanice svoj citotoksični učinak ostvaruju putem nekoliko mehanizama citotoksičnosti kao što je o perforinu ovisan ili o smrtonosnim receptorima ovisan mehanizam citotoksičnosti (209). Jedan od najvažnijih brzih mehanizama citotoksične aktivnosti ostvaruje se putem perforina za kojeg je svojstveno da se oslobađa iz citotoksične stanice, veže i ovisno o ionima Ca<sup>++</sup> polimerizira na površini ciljne stanice stvarajući pore na njenoj površini kroz koje ulaze pro-apoptotičke molekule (granzimi, granulizin) ili izvanstanična tekućina uzrokujući apoptozu ili nekrozu ciljne stanice (207-209).

U našem istraživanju smo pokazali značajno smanjenje perforin pozitivnih stanica i srednji intenzitet fluorescencije za perforin u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede. U isto vrijeme smo zabilježili i pad CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T, stanica NK, stanica NK-T koje konstitucijski i u velikom postotku sadrže perforin u svojim zrcima (Slika 58, 59, 62A, 62C, 63A, 63C, 65A, 66, 68 i 69). Jedan od mogućih razloga ove nishodne regulacije perforina u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga je prijelaz imunokompetentnih stanica u oštećeno moždano tkivo gdje bi perforin mogao biti uključen u ograničavanje snažne upalne reakcije koja se razvija nakon ozljede mozga.

Ovo dodatno potvrđuje nalaz značajnog smanjenja perforin pozitivnih stanica u perifernoj krvi inficiranih i neinficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga (Slika 60).

Mogućnost da je pad perforina perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga uzrokovan njegovom fiziološkom nishodnom regulacijom koja je svojstvena populaciji starijom od 73

godine života (297) nije opravdana, s obzirom da su bolesnici s teškom ozljedom mozga uključeni u ovu studiju bili mlađi od 73 godine.

Sedmog dana nakon ozljede zabilježili smo porast ukupnog postotka perforin pozitivnih stanica u perifernoj krvi te udjela perforin pozitivnih stanica u svim ispitivanim limfocitnih subpopulacijama (Slika 62, 65 i 68). Zanimljiv je rezultat povećanja udjela perforina u stanicama NK u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 1. dana nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovo povećanje udjela perforina u stanicama NK moglo bi biti rezultat djelovanja proupalnih citokina (IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6) koji se luče iz oštećenog moždanog tkiva, ulaze u cirkulaciju i potiču snažan proupalni odgovor. Pad udjela perforina u stanicama NK periferne krvi inficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede doprinosi razvoju infekcije. Porast udjela perforina u stanicama s citotoksičnim fenotipom (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T, stanica NK, stanica NK-T) 7. dana nakon ozljede doprinosi uz primjenu antibiotika smanjenju pojave infekcije.

To potvrđuje visoka pozitivna korelacija između GCS, kao pokazatelja težine ozljede mozga, i postotka perforin pozitivnih stanica u krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede. Niske vrijednosti GCS su bile povezane s niskim postotkom svih perforin pozitivnih stanica kao i postotkom dvostruko pozitivnih CD3<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> stanica (Slika 77 i 78).

Četvrtog dana nakon ozljede utvrdili smo statistički značajno smanjenje citotoksične aktivnosti stanica NK posredovane perforinom u *in vitro* modelu za ispitivanje citotoksičnosti stanica NK (Slika 72 i 73). To govori u prilog smanjenju sposobnosti obrane od infekcija, poglavito uzrokovanih unutarstaničnim patogenima. S obzirom da je perforin prototip citotoksične molekule, koji pored smrti ciljne stanice nekrozom, osigurava učinak apoptotičkih molekula na ciljnu (inficiranu) stanicu, smanjenje perforinom posredovane citotoksičnosti utječe i na ubijanje ciljnih stanica patofiziološkim putovima apoptoze (208,209). Iako se udio perforin pozitivnih stanica obnovio 7. dana nakon ozljede prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici NK dodatno se smanjio u bolesnika s teškom ozljedom mozga što se odražava na nisku razinu citotoksičnosti prema NK osjetljivim K-562 stanicama.

Spoznaje dobivene ovim istraživanjem jasno ukazuju da je povećana učestalost infekcija u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede posljedica složenih zbivanja koje, među ostalim, uključuju smanjenje broja stanica s citotoksičnim fenotipom (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfociti T, stanice NK, stanice NK-T), smanjenje udjela citotoksičnog proteina perforina u njihovim granulama i smanjenje njihove citotoksične aktivnosti. Ove promjene su posljedica

složenog međudjelovanja središnjeg živčanog i imunološkog sustava s ciljem ograničavanja snažne upalne reakcije nastale ozljedom središnjeg živčanog sustava. Središnji živčani sustav, kao najvažniji sustav u organizmu u trenutku svojeg oštećenja nastoji ograničiti daljnje oštećenje i potaknuti svoj oporavak mobilizirajući sve raspoložive snage, osobito imunološki sustav, čak i pod cijenu nedostatka obrane protiv vanjskih čimbenika u perifernim tkivima. Daljnje rasvjetljavanje složenih imunoloških zbivanja nakon ozljede mozga sigurno će doprinijeti stvaranju novih smjernica u učinkovitijem liječenju bolesnika s teškom ozljedom mozga.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. U 55% bolesnika s teškom ozljedom mozga došlo je do razvoja infekcije. U 30% bolesnika dijagnosticirana je pneumonija, u 15% sepsa, dok se u 10% bolesnika s teškom ozljedom mozga razvila infekcija mokraćnih putova.
2. Najčešće izolirani uzročnici pneumonije bili su *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*. U bolesnika kod kojih je došlo do razvoja sepsa najčešće izolirana bakterija bila je *Staphylococcus aureus*, dok su najčešći uzročnici uroinfekcije bili bakterije *Enterococcus faecalis* i *Escherichia coli*, te gljivca *Candida albicans*.
3. Najveća učestalost pojave pojedine vrste infekcija u bolesnika s teškom ozljedom mozga je bila 4. dana nakon ozljede.
4. Statistički značajno smanjenje CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga uočeno je 4. dana nakon ozljede. Ove promjene su posljedica smanjenja njegove CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> subpopulacije. Udio CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga se nije značajnije mijenjao u ispitivanim danima. Inficirani bolesnici s teškom ozljedom mozga imali su statistički značajno smanjenje CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T i njihovih CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> subpopulacija 4. dana nakon ozljede u odnosu na neinficirane bolesnike.
5. Statistički značajno smanjenje udjela CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> stanica NK zabilježen je u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede. Ove promjene su posljedica smanjenja CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> subpopulacije. Četvrtoga dana nakon ozljede bilježi se statistički značajno smanjenje udjela CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> stanica NK u inficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u odnosu na neinficirane.
6. Postotak CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stanica NK-T u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga statistički se značajno smanjuje 4. dana nakon ozljede i pokazuje ushodnu regulaciju 7. dana.
7. Postotak CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> limfocita B u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga nije se statistički značajnije mijenjao u istraživanim danima.
8. Udio CD14<sup>+</sup> monocita u perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga pokazao je statistički značajan porast 1. dana nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu, a smanjenje 7. dana u odnosu na 1. dan.
9. U bolesnika s teškom ozljedom mozga zabilježili smo niski postotak udjela proupalnih citokina (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-15) u svim leukocitnim subpopulacijama (limfocitima T, stanicama NK, stanicama NK-T, monocitima) 1., 4. i 7. dana nakon ozljede.

10. Prevlast IL-4 nad IFN $\gamma$  zabilježena je u svim leukocitnim subpopulacijama periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga (limfocitima T, stanicama NK, stanicama NK-T, monocitima) 1., 4. i 7. dana nakon ozljede.
11. Stimulacija monocita periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga s različitim koncentracijama LPS potiče stvaranje IFN $\gamma$  1. i 7. dana nakon ozljede i u kontrolnoj skupini, ali nema učinka 4. dana nakon ozljede.
12. Statistički značajno smanjenje perforin pozitivnih stanica zabilježeno je perifernoj krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede. Pad udjela perforina uočen je u CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocitima T uključujući i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> subpopulaciju, stanicama NK i njihovim CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+dim</sup> i CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+bright</sup> subpopulacijama te stanicama NK-T. Dodatno smanjenje udjela perforina u CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> i CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+dim</sup> stanicama NK zabilježeno je u inficiranih bolesnika s teškom ozljedom mozga u odnosu na bolesnike koji nisu razvili infekciju 4. dana nakon ozljede.
13. Stanice NK periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga pokazuju statistički značajno manju citotoksičnu aktivnost prema NK osjetljivoj staničnoj liniji K-562 4. i 7. dana nakon ozljede u odnosu na 1. dan i kontrolnu skupinu. Citotoksični učinak stanica NK iz periferne krvi bolesnika s teškom ozljedom mozga prema K-562 staničnoj liniji posredovan je perforinom s obzirom da dodatak protu-perforinskih protutijela uklanja njihovu citotoksičnost prema ciljnim stanicama.
14. Četvrtog dana nakon ozljede u bolesnika s teškom ozljedom mozga utvrđena je pozitivna korelacija između GCS, kao pokazatelja težine ozljede mozga, i postotka CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> limfocita T, kao i između GCS i CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> stanica NK. Pozitivna korelacija nađena je između GCS i postotka svih perforin pozitivnih stanica, uključujući CD3<sup>+</sup> perforin<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup> perforin<sup>+</sup> stanice u bolesnika s teškom ozljedom mozga 4. dana nakon ozljede. Značajna korelacija nije utvrđena 1. i 7. dana nakon ozljede.

## **7. LITERATURA**



1. Granacher RA. Traumatic Brain Injury: Methods for Clinical & Forensic Neuropsychiatric Assessment. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group; 2007, str. 1.
2. Sanchez GM, Burrige AL. Decision making in head injury management in the Edwin Smith Papyrus. *Neurosurg Focus*. 2007;23:E5.
3. Boake C, Diller L. History of rehabilitation for traumatic brain injury. U: High WM, Sander AM, Struchen MA, Hart KA, ur. *Rehabilitation for Traumatic Brain Injury*. Oxford/Oxfordshire: Oxford University Press, 2005; str. 3.
4. Belanger HG, Kretzmer T, Yoash-Gantz R, Pickett T, Tupler, LA. Cognitive sequelae of blast-related versus other mechanisms of brain trauma. *J Int Neuropsychol Soc* 2009;15: 1–8.
5. Marion DW. Introduction. U: Marion DW, ur. *Traumatic Brain Injury*. Stuttgart: Thieme, 1999, str. 3-9.
6. Parikh S, Koch M, Narayan RK. Traumatic brain injury. *Int Anesth Clin* 2007;45:119–35
7. Jennett B. May. Epidemiology of head injury. *Arch Dis Child* 1998;78: 403–6.
8. Collins C, Dean J. Acquired brain injury. U: Turner A, Foster M, Johnson SE, ur. *Occupational Therapy and Physical Dysfunction: Principles, Skills and Practice*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002; str. 395–96.
9. LaPlaca MC, Simon CM, Prado GR, Cullen DK. CNS injury biomechanics and experimental models. *Prog Brain Res* 2007;161:13-26.
10. Smith DH, Meaney DF, Shull WH. Diffuse axonal injury in head trauma. *J Head Trauma Rehab* 2003;18:307–16.
11. Seidenwurm DI. Introduction to brain imaging. U: Brant WE, Helms CA, ur. *Fundamentals of Diagnostic Radiology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007; str. 53–5.
12. Barkley JM, Morales D, Hayman LA, Diaz-Marchan PJ. Static neuroimaging in the evaluation of TBI. U: Zasler ND, Katz DI, Zafonte RD. *Brain Injury Medicine: Principles and Practice*. Demos Medical Publishing, 2006; str. 140–43.
13. Valadka AB. Injury to the cranium. U: Moore EJ, Feliciano DV, Mattox KL, ur. *Trauma*. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division, 2004; str. 385–406.
14. Hardman JM, Manoukian A. Pathology of head trauma. *Neuroimaging Clin N Am* 2004;12:175–87.

15. Morrison AL, King TM, Korell MA, Smialek JE, Troncoso JC. Acceleration-deceleration injuries to the brain in blunt force trauma. *Am J Forensic Med Pathol* 1998;19:109–112.
16. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth* 2007;99:4-9.
17. Park E, Bell JD, Baker AJ. Traumatic brain injury: Can the consequences be stopped?. *Canadian Medical Association Journal* 2008;178:1163–70.
18. Beauchamp K, Mutlak H, Smith WR, Shohami E, Stahel PF. Pharmacology of traumatic brain injury: where is the "golden bullet"? *Mol Med* 2008;14:731-40.
19. Veenith T, Goon SSh, Burnstein RM. Molecular mechanisms of traumatic brain injury: the missing link in management. *World J Emerg Surg* 2009;4:7.
20. Reilly PL. Brain injury: the pathophysiology of the first hours. 'Talk and Die revisited'. *J Clin Neurosci* 2001;8:398-403.
21. Graham DI, Saatman KE, Marklund M, Conte V, Morales D, Royo N, McIntoch TK, Evans RW, ur. *Neurology and trauma*. Oxford: Oxford Press, 2006; str. 45-95.
22. Generelli TA, Graham DI. *Neuropathology*. U: Silver JM, McAllister TW, Yudofsky SC, ur. *Text book of traumatic brain injury*. Arlington: American Psychiatric Publishint Inc, 2005; str. 27-51.
23. Chen G, Shi J, Hu Z, Hang C. Inhibitory effect on cerebral inflammatory response following traumatic brain injury in rats: a potential neuroprotective mechanism of N-acetylcysteine. *Mediators Inflamm* 2008;:716:45-8.
24. Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol* 2001;24:169-81.
25. Morganti-Kossmann MC, Satgunaseelan L, Bye N, Kosmann T. Modulation of immune response by head injury. *Injury, Int J Care Injured* 2007;38:1392-1400.
26. Campuzano O, Castillo-Ruiz MM, Acarin L, Castellano B, Gonzalez B. Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. *J Neurosci Res* 2009;87:2484-97.
27. Lu J, Goh SJ, Tng PY, Deng YY, Ling EA, Mochhala S. Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. *Front Biosci* 2009;14:3:795-813.
28. Folkersma H, Brevé JJ, Tilders FJ, Cherian L, Robertson CS, Vandertop WP. Cerebral microdialysis of interleukin (IL)-1beta and IL-6: extraction efficiency and production in the acute phase after severe traumatic brain injury in rats. *Acta Neurochir (Wien)* 2008;150:1277-84.

29. Yatsiv I, Morganti-Kossmann MC, Perez D i sur. Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22:971-8.
30. Frugier T, Morganti-Kossmann MC, O'Reilly D, McLean CA. In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury. *J Neurotrauma* 2010;27:497-507.
31. Herx LM, Yong VW. Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:961-71.
32. Hutchinson PJ, O'Connell MT, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Nortje J, Carpenter KL, Timofeev I, Al-Rawi PG, Menon DK, Pickard JD. Inflammation in human brain injury: intracerebral concentrations of IL-1alpha, IL-1beta, and their endogenous inhibitor IL-1ra. *J Neurotrauma* 2007;24:1545-57.
33. Bartfai T, Sanchez-Alavez M, Andell-Jonsson S, Schultzberg M, Vezzani A, Danielsson E, Conti B. Interleukin-1 system in CNS stress: seizures, fever, and neurotrauma. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1113:173-7.
34. Csuka E, Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Joller H, Trentz O, Kossmann T. IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and blood-brain barrier function. *J Neuroimmunol* 1999;101:211-21.
35. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997;6:315-25.
36. Hans VH, Kossmann T, Lenzlinger PM, Probstmeier R, Imhof HG, Trentz O, Morganti-Kossmann MC. Experimental axonal injury triggers interleukin-6 mRNA, protein synthesis and release into cerebrospinal fluid. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:184-94.
37. Knoblauch SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 1998;153:143-51.
38. Hayakata T, Shiozaki T, Tasaki O, Ikegawa H, Inoue Y, Toshiyuki F, Hosotubo H, Kieko F, Yamashita T, Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H. Changes in CSF S100B and

- cytokine concentrations in early-phase severe traumatic brain injury. *Shock* 2004;22:102-7.
39. Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Hans V, Stahel P, Csuka E, Ammann E, Stocker R, Trentz O, Kossmann T. Production of cytokines following brain injury: beneficial and deleterious for the damaged tissue. *Mol Psychiatry* 1997;2:133-6.
  40. Rancan M, Otto VI, Hans VH, Gerlach I, Jork R, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Upregulation of ICAM-1 and MCP-1 but not of MIP-2 and sensorimotor deficit in response to traumatic axonal injury in rats. *J Neurosci Res* 2001;63:438-46.
  41. Coles JP. Regional ischemia after head injury. *Curr Opin Crit Care* 2004;10:120-5.
  42. Inoue Y, Shiozaki T, Tasaki O, Hayakata T, Ikegawa H, Yoshiya K, Fujinaka T, Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H. Changes in cerebral blood flow from the acute to the chronic phase of severe head injury. *J Neurotrauma* 2005;22:1411-8.
  43. Chierigato A, Tanfani A, Compagnone C, Turrini C, Sarpieri F, Ravaldini M, Targa L, Fainardi E. Global cerebral blood flow and CPP after severe head injury: a xenon-CT study. *Intensive Care Med* 2007;33:856-62.
  44. Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:133-50.
  45. DeWitt DS, Prough DS. Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. *J Neurotrauma* 2003;20:795-825.
  46. Rodríguez-Baeza A, Reina-de la Torre F, Poca A, Martí M, Garnacho A. Morphological features in human cortical brain microvessels after head injury: a three-dimensional and immunocytochemical study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;273:583-93.
  47. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience*. 2004;129:1021-9.
  48. Marmarou A, Signoretti S, Aygok G, Fatouros P, Portella G. Traumatic brain edema in diffuse and focal injury: cellular or vasogenic? *Acta Neurochir Suppl* 2006;96:24-9.
  49. Marmarou A, Signoretti S, Fatouros PP, Portella G, Aygok GA, Bullock MR. Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. *J Neurosurg*. 2006;104:720-30.
  50. World report on traffic injury prevention. World Health Organisation; 2004.
  51. Narayan RK, Michel ME, Ansell B i sur. Clinical trials in head injury. *J Neurotrauma* 2002;19:503-57.

52. León-Carrión J, Domínguez-Morales Mdel R, Barroso y Martín JM, Murillo-Cabezas F. Epidemiology of traumatic brain injury and subarachnoid hemorrhage. *Pituitary* 2005;8:197–202.
53. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurology* 2008;7:728–41.
54. Bruns J Jr, Hauser WA. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia* 2003;44:2-10.
55. Tiret L, Hausherr E, Thicoipe M, Garros B, Maurette P, Castel JP, Hatton F. The epidemiology of head trauma in Aquitaine (France), 1986: a community-based study of hospital admissions and deaths. *Int J Epidemiol* 1990;19:133-40.
56. Brown AW, Elovic EP, Kothari S, Flanagan SR, Kwasnica C. Congenital and acquired brain injury. 1. Epidemiology, pathophysiology, prognostication, innovative treatments, and prevention. *Arch Phys Med Rehabil* 2008;89:S3–8.
57. Hannay HJ, Howieson DB, Loring DW, Fischer JS, Lezak MD. Neuropathology for neuropsychologists. U: Lezak MD, Howieson DB, Loring DW, ur. *Neuropsychological Assessment*. Oxford/Oxfordshire: Oxford University Press, 2004; str. 158–62.
58. Moppett IK. Traumatic brain injury: Assessment, resuscitation and early management. *Br J Anaesth* 2007;99:18–31.
59. McIntosh AS, McCrory P. Preventing head and neck injury. *Br J Sports Med* 2005;39:314–18.
60. Park E, Bell JD, Baker AJ. Traumatic brain injury: Can the consequences be stopped?. *CMAJ* 2008;178:1163–70.
61. Marshall LF, Marshall SB, Klauber MR, Van Berkum Clark M, Eisenberg H, Jane JA, Luerksen TG, Marmarou A, Foulkes MA. The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography. *J Neurotrauma* 1992;9:S287-92.
62. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007;24:S1-106.
63. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS..Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. I. Blood pressure and oxygenation. *J Neurotrauma* 2007;24:S7-13.

64. Winkler SR, Munoz-Ruiz L. Mechanism of action of mannitol. *Surg Neurol* 1995;43:59.
65. Morley EJ, Zehtabchi S. Mannitol for traumatic brain injury: Searching for the evidence. *Ann Emerg Med* 2008;52:298–300.
66. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. II. Hyperosmolar therapy. *J Neurotrauma* 2007;24:S14-20.
67. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. VI. Indications for intracranial pressure monitoring. *J Neurotrauma* 2007;24:S37-44.
68. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. XI. Anesthetics, analgesics, and sedatives. *J Neurotrauma* 2007;24:S71-6.
69. Bassin SL, Bleck TP. Barbiturates for the treatment of intracranial hypertension after traumatic brain injury. *Crit Care* 2008;12:185.
70. Wilberger JE, Cantella D. High-dose barbiturates for intracranial pressure control. *New Horiz* 1995;3:469-73.
71. Adembri C, Venturi L, Pellegrini-Giampietro DE. Neuroprotective effects of propofol in acute cerebral injury. *CNS Drug Rev* 2007;13:333-51.
72. Otterspoor LC, Kalkman CJ, Cremer OL. Update on the propofol infusion syndrome in ICU management of patients with head injury. *Curr Opin Anaesthesiol* 2008;21:544-51.
73. Papazian L, Albanese J, Thirion X, Perrin G, Durbec O, Martin C. Effect of bolus doses of midazolam on intracranial pressure and cerebral perfusion pressure in patients with severe head injury. *Br J Anaesth* 1993;71:267-71.
74. Lauer KK, Connolly LA, Schmeling WT. Opioid sedation does not alter intracranial pressure in head injured patients. *Can J Anaesth.* 1997;44:929-33.
75. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. VII. Intracranial pressure monitoring technology. *J Neurotrauma* 2007;24:S45-54.

76. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. XIV. Hyperventilation. *J Neurotrauma* 2007;24:S87-90.
77. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. III. Prophylactic hypothermia. *J Neurotrauma* 2007;24:S21-5.
78. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. XIII. Antiseizure prophylaxis. *J Neurotrauma* 2007;24:S83-6.
79. Knudson MM, Ikossi DG. Venous thromboembolism after trauma. *Curr Opin Crit Care* 2004;10:539-48.
80. Page RB, Spott MA, Krishnamurthy S, Taleghani C, Chinchilli VM. Head injury and pulmonary embolism: a retrospective report based on the Pennsylvania Trauma Outcomes study. *Neurosurgery* 2004;54:143-8.
81. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. V. Deep vein thrombosis prophylaxis. *J Neurotrauma* 2007;24:S32-6.
82. Young B, Ott L, Norton J, Tibbs P, Rapp R, McClain C, Dempsey R. Metabolic and nutritional sequelae in the non-steroid treated head injury patient. *Neurosurgery* 1985;17:784-91.
83. Young B, Ott L, Phillips R, McClain C. Metabolic management of the patient with head injury. *Neurosurg Clin N Am* 1991;2:301-20.
84. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. XII. Nutrition. *J Neurotrauma* 2007;24:S77-82.
85. Maxwell RE, Long DM, French LA. The effects of glucosteroids on experimental cold-induced brain edema. Gross morphological alterations and vascular permeability changes. *J Neurosurg* 1971;34:477-87.

86. Kaal EC, Vecht CJ. The management of brain edema in brain tumors. *Curr Opin Oncol* 2004;16:593-600.
87. Giannotta SL, Weiss MH, Apuzzo ML, Martin E. High dose glucocorticoids in the management of severe head injury. *Neurosurgery* 1984;15:497-501.
88. Dearden NM, Gibson JS, McDowall DG, Gibson RM, Cameron MM Effect of high-dose dexamethasone on outcome from severe head injury. *J Neurosurg* 1986;64:81-8.
89. Gaab MR, Trost HA, Alcantara A i sur. "Ultrahigh" dexamethasone in acute brain injury. Results from a prospective randomized double-blind multicenter trial (GUDHIS). German Ultrahigh Dexamethasone Head Injury Study Group. *Zentralbl Neurochir* 1994;55:135-43.
90. Grumme T, Baethmann A, Kolodziejczyk D i sur. Treatment of patients with severe head injury by triamcinolone: a prospective, controlled multicenter clinical trial of 396 cases. *Res Exp Med* 1995;195:217-29.
91. Roberts I, Yates D, Sandercock P i sur. Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;364:1321-8.
92. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. XV. Steroids. *J Neurotrauma* 2007;24:S91-5.
93. Ercan M, Inci S, Kilinc K, Palaoglu S, Aypar U. Nimodipine attenuates lipid peroxidation during the acute phase of head trauma in rats. *Neurosurg Rev* 2001;24:127-30.
94. Murray GD, Teasdale GM, Schmitz H. Nimodipine in traumatic subarachnoid haemorrhage: a re-analysis of the HIT I and HIT II trials. *Acta Neurochir (Wien)* 1996;138:1163-7.
95. Langham J, Goldfrad C, Teasdale G, Shaw D, Rowan K. Calcium channel blockers for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;4:CD000565.
96. Hall ED, Travis MA. Effects of the nonglucocorticoid 21-aminosteroid U74006F on acute cerebral hypoperfusion following experimental subarachnoid hemorrhage. *Exp Neurol* 1988;102:244-8.
97. Roberts I. Aminosteroids for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;4:CD001527.



98. Morris GF, Bullock R, Marshall SB, Marmarou A, Maas A, Marshall LF. Failure of the competitive N-methyl-D-aspartate antagonist Selfotel (CGS 19755) in the treatment of severe head injury: results of two phase III clinical trials. The Selfotel Investigators. *J Neurosurg* 1999;91:737-43.
99. Chenard BL, Bordner J, Butler TW i sur. (1S,2S)-1-(4-hydroxyphenyl)-2-(4-hydroxy-4-phenylpiperidino)-1-propanol: a potent new neuroprotectant which blocks N-methyl-D-aspartate responses. *J Med Chem* 1995;38:3138-45.
100. Yurkewicz L, Weaver J, Bullock MR, Marshall LF. The effect of the selective NMDA receptor antagonist traxoprodil in the treatment of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2005;22:1428-43.
101. Sanders GT, Huijgen HJ, Sanders R Magnesium in disease: a review with special emphasis on the serum ionized magnesium. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1011-33.
102. McIntosh TK, Faden AI, Yamakami I, Vink R. Magnesium deficiency exacerbates and pretreatment improves outcome following traumatic brain injury in rats: 31P magnetic resonance spectroscopy and behavioral studies. *J Neurotrauma* 1988;5:17-31.
103. Feldman Z, Gurevitch B, Artru AA, Oppenheim A, Shohami E, Reichenthal E, Shapira Y. Effect of magnesium given 1 hour after head trauma on brain edema and neurological outcome. *J Neurosurg* 1996;85:131-7.
104. Arango MF, Mejia-Mantilla JH. Magnesium for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;4:CD005400.
105. Winn HR, Temkin NR, Anderson GD, Dikmen SS. Magnesium for neuroprotection after traumatic brain injury. *Lancet Neurol* 2007;6:478-9.
106. Sen AP, Gulati A. Use of magnesium in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 2010;7:91-9.
107. Axelrod J, Felder CC. Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide. *Neurochem Res* 1998;23:575-81.
108. Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V. Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol* 1998;359:1-18.
109. Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 1999;6:635-64.
110. Shohami E, Gallily R, Mechoulam R, Bass R, Ben-Hur T. Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. *J Neuroimmunol* 1997;72:169-77.

111. Roche M, Kelly JP, O'Driscoll M, Finn DP. Augmentation of endogenous cannabinoid tone modulates lipopolysaccharide-induced alterations in circulating cytokine levels in rats. *Immunology* 2008;125:263-71.
112. Knoller N, Levi L, Shoshan I, Reichenthal E, Razon N, Rappaport ZH, Biegon A. Dexanabinol (HU-211) in the treatment of severe closed head injury: a randomized, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Crit Care Med* 2002;30:548-54.
113. Maas AI, Murray G, Henney H 3rd, Kassem N i sur. Efficacy and safety of dexanabinol in severe traumatic brain injury: results of a phase III randomised, placebo-controlled, clinical trial. *Lancet Neurol* 2006;5:38-45.
114. Ray SK, Dixon CE, Banik NL. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histol Histopathol* 2002;17:1137-52.
115. Francel PC. Bradykinin and neuronal injury. *J Neurotrauma* 1992;9:S27-45.
116. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 2005;57:27-77.
117. Narotam PK, Rodell TC, Nadvi SS, Bhoola KD, Troha JM, Parbhoosingh R, van Dellen JR. Traumatic brain contusions: a clinical role for the kinin antagonist CP-0127. *Acta Neurochir (Wien)* 1998;140:793-802.
118. Marmarou A, Guy M, Murphey L, Roy F, Layani L, Combal JP, Marquer C; American Brain Injury Consortium. A single dose, three-arm, placebo-controlled, phase I study of the bradykinin B2 receptor antagonist Anatibant (LF16-0687Ms) in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2005;22:1444-55.
119. Ivashkova Y, Svetnitsky A, Mayzler O, Pruneau D, Benifla M, Fuxman Y, Cohen A, Artru AA, Shapira Y. Bradykinin B2 receptor antagonism with LF 18-1505T reduces brain edema and improves neurological outcome after closed head trauma in rats. *J Trauma* 2006;61:879-85.
120. Asbury ET, Fritts ME, Horton JE, Isaac WL. Progesterone facilitates the acquisition of avoidance learning and protects against subcortical neuronal death following prefrontal cortex ablation in the rat. *Behav Brain Res* 1998;97:99-106.
121. Pettus EH, Wright DW, Stein DG, Hoffman SW. Progesterone treatment inhibits the inflammatory agents that accompany traumatic brain injury. *Brain Res* 2005;1049:112-9.

122. Roof RL, Hoffman SW, Stein DG. Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol Chem Neuropathol* 1997;31:1-11.
123. Wright DW, Hoffman SW, Virmani S, Stein DG. Effects of medroxyprogesterone acetate on cerebral oedema and spatial learning performance after traumatic brain injury in rats. *Brain Inj* 2008;22:107-13.
124. Wright DW, Kellermann AL, Hertzberg VS i sur. ProTECT: a randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury. *Ann Emerg Med* 2007;49:391-402.
125. Greenwald BD, Burnett DM, Miller MA. Congenital and acquired brain injury. 1. Brain injury: epidemiology and pathophysiology. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84:S3-7.
126. Kwasnica C, Brown AW, Elovic EP, Kothari S, Flanagan SR. Congenital and acquired brain injury. 3. Spectrum of the acquired brain injury population. *Arch Phys Med Rehabil* 2008;89:S15-20.
127. Agrawal A, Timothy J, Pandit L, Manju M. Post-traumatic epilepsy: An overview. *Clin Neurol Neurosurg* 2006;108:433-9.
128. Schiff ND, Plum F, Rezai AR. Developing prosthetics to treat cognitive disabilities resulting from acquired brain injuries. *Neurological Research* 2002;24:116-24
129. Vinsent JL. Nosocomial infection in adult intensive-care units. *Lancet* 2003;361:2068-77.
130. Bronchard R, Albaladejo P, Brezac G i sur. Early onset pneumonia: risk factors and consequences in head trauma patients. *Anesthesiology* 2004;100:234-9.
131. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112:1570-80.
132. Čulo F, Batinić D. Stanice, tkiva i organi imunskog sustava. U: Andreis I i sur., ur. *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2010. str. 18-58.
133. Tung, James; Leonore A Herzenberg. Unraveling B-1 progenitors. *Curr Opin Immunol* 2007;19:150-5.
134. Martin F, Kearney JF. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2001;13:195-201.
135. Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006;176:705-10.
136. Mauri C, Ehrenstein MR. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol* 2008;29:34-40.
137. Čulo F, Višnjić S. Stanična imunost. U: Andreis I i sur., ur. *Imunologija*. Zagreb: Medicinska Naklada; 2010; str. 225-237.

138. Kedzierska K, La Gruta NL, Stambas J, Turner SJ, Doherty PC. Tracking phenotypically and functionally distinct T cell subsets via T cell repertoire diversity. *Mol Immunol* 2008;45:607-18.
139. Zhang N, Hartig H, Dzhagalov I, Draper D, He YW. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res* 2005;15:749-69.
140. Singer A, Adoro S, Park JH. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* 2008;8:788-801.
141. Yu Q, Erman B, Bhandoola A, Sharrow SO, Singer A. In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells. *J Exp Med* 2003;197:475-87.
142. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008;112:1557-69.
143. Fehérvári Z, Sakaguchi S. CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest* 2004;114:1209-17.
144. Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG i sur. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 2007;204:273-83.
145. Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 2007;204:285-97.
146. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007;8:1390-7.
147. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997;185:817-24.
148. Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, O'Shea JJ, Strober WT. Tbet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med* 2006;203:755-66.
149. Kano S, Sato K, Morishita Y i sur. The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon-gamma-interleukin 12 signaling axis and TH1 versus TH-17 differentiation of CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2008;9:34-41.
150. Yang J, Zhu H, Murphy TL, Ouyang W, Murphy KM. IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2001;2:157-64.

151. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 2006;16:3-10.
152. Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, Chiodetti L, Young HA, Hu-Li J, Zhu J, Paul WE. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3880-5.
153. Afzali B, Mitchell P, Lechler RI, John S, Lombardi G. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2010;159:120-30.
154. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-6.
155. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
156. Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg HH, Kabelitz D. Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology* 2008;213:173-82.
157. Godfrey DI, Pellicci DG, Patel O, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Rossjohn J. Antigen recognition by CD1d-restricted NKT T cell receptors. *Semin Immunol* 2010;22:61-7.
158. Godfrey, DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name?. *Nat Rev Immunol* 2004;4: 231-7.
159. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000 ;21:573-83.
160. Godfrey DI, Berzins SP. Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007;7:505-18.
161. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007;19:354-64.
162. Bezbradica JS, Gordy LE, Stanic AK, Dragovic S, Hill T, Hawiger J, Unutmaz D, Van Kaer L, Joyce S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates effector differentiation of invariant natural killer T cells during thymic ontogeny. *Immunity* 2006;25:487-97.
163. Seino K, Taniguchi M. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. *J Exp Med.* 2005;202:1623-6.
164. Umetsu DT, DeKruyff RH. A role for natural killer T cells in asthma. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:953-8.

165. Akbari O, Faul JL, Hoyte EG, Berry GJ, Wahlström J, Kronenberg M, DeKruyff RH, Umetsu DT. CD4<sup>+</sup> invariant T-cell-receptor<sup>+</sup> natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 2006;354:1117-29.
166. Sonoda KH, Exley M, Snapper S, Balk SP, Stein-Streilein J. CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J Exp Med*. 1999;190:1215-26.
167. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ* 2008;15:226-33.
168. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:1915-9.
169. Veiga-Fernandes H, Kioussis D, Coles M. Natural killer receptors: the burden of a name. *J Exp Med* 2010;207:269-72.
170. Orange JS. Human natural killer cell deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6:399-409.
171. Yokoyama WM, Plougastel BF. Immune functions encoded by natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 2003;3:304-16.
172. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22:633-40.
173. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935-47.
174. Lanier LL. Activating and inhibitory NK cell receptors. *Adv Exp Med Biol* 1998;452:13-8.
175. Borrego F, Masilamani M, Marusina AI, Tang X, Coligan JE. The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance. *Immunol Res* 2006;35:263-78.
176. Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999 30;285:730-2.
177. Chang C, Dietrich J, Harpur AG, Lindquist JA, Haude A, Loke YW, King A, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ. Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *J Immunol* 1999;163:4651-4.
178. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008;9:495-502.

179. Colonna M, Navarro F, Bellon T i sur. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1997;186:1809-18.
180. Cosman D, Fanger N, Borges L i sur. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997;7:273-82.
181. Navarro F, Llano M, Bellon T, Colonna M, Geraghty DE, Lopez-Botet M. The LT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 1999;29:277-283.
182. Giuliani M, Giron-Michel J, Negrini S i sur. Generation of a novel regulatory NK cell subset from peripheral blood CD34+ progenitors promoted by membrane-bound IL-15. *PLoS One* 2008;3:e2241.
183. Huntington ND, Vosshenrich CA, Di Santo JP. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol* 2007;7:703-14.
184. Di Santo JP, Vosshenrich CA. Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol Rev* 2006;214:35-46.
185. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008;112:461-9.
186. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ i sur. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003;101:3052-7.
187. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL i sur. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 2004;172:1455-62.
188. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* 2004;25:47-52.
189. Chan A, Hong DL, Atzberger A i sur. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 2007;179:89-94.
190. Vosshenrich CA, García-Ojeda ME, Samson-Villéger SI i sur. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol* 2006;7:1217-24.
191. Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA i sur. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* 1998 ;161:400-8.
192. Timmons BW, Cieslak T. Human natural killer cell subsets and acute exercise: a brief review. *Exerc Immunol Rev* 2008;14:8-23.

193. Fan YY, Yang BY, Wu CY. Phenotypically and functionally distinct subsets of natural killer cells in human PBMCs. *Cell Biol Int* 2008;32:188-97.
194. Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* 2000;67:603-6.
195. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 2008;112:935-45.
196. Kerrigan AM, Brown GD. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 2009;214:562-75.
197. Kristensen T, Moestrup SK, Gliemann J, Bendtsen L, Sand O, Sottrup-Jensen L. Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor. *FEBS Lett* 1990;276:151-5.
198. Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol* 2002 ;168:2997-3003.
199. Moré SH, Breloer M, von Bonin A. Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: Hsp60-mediated activation of cytotoxic T cells. *Int Immunol* 2001;13:1121-7
200. Lehner T, Bergmeier LA, Wang Y, Tao L, Sing M, Spallek R, van der Zee R. Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. *Eur J Immunol* 2000;30:594-603.
201. Dai J, Liu B, Caudill MM *in situ*. Cell surface expression of heat shock protein gp96 enhances cross-presentation of cellular antigens and the generation of tumor-specific T cell memory. *Cancer Immun* 2003;3:1.
202. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 2001;69:11-20.
203. Thomas R, Lipsky PE. Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J Immunol* 1994;153:4016-28.
204. Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998;160:4587-95.
205. Podack ER, Young JD, Cohn ZA. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 ;82:8629-33.
206. Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol Today* 1995;16:194-201.



207. Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol* 2007;19:339-47.
208. Pipkin ME, Lieberman J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 2007;19:301-8.
209. Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2009;6:15-25.
210. Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ i sur. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 2000;103:491-500.
211. Trapani JA, Sutton VR, Thia KY, Li YQ, Froelich CJ, Jans DA, Sandrin MS, Browne KA. A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J Cell Biol* 2003;160:223-33.
212. Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* 2005;23:249-62.
213. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 2000;192:755-60.
214. Muralitharan S, Al Lamki Z, Dennison D i sur. An inframe perforin gene deletion in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis is associated with perforin expression. *Am J Hematol* 2005;78:59-63.
215. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004;21:589-601.
216. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005;174:1783-6.
217. Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006;107:3925-32.
218. Smyth MJ, Ortaldo JR, Bere W, Yagita H, Okumura K, Young HA. IL-2 and IL-6 synergize to augment the pore-forming protein gene expression and cytotoxic potential of human peripheral blood T cells. *J Immunol* 1990;145:1159-66.

219. Barbey C, Baumgaertner P, Devevre E i sur. IL-12 controls cytotoxicity of a novel subset of self-antigen-specific human CD28+ cytolytic T cells. *J Immunol* 2007;178:3566-74.
220. Strbo N, Laskarin G, Bogovic Crncic T i sur. Short-term cytolytic mediators' expression in decidual lymphocytes is enhanced by interleukin-15. *Am J Reprod Immunol* 2006;55:217-25.
221. Tokmadzic VS, Tsuji Y, Bogovic T i sur. IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* 2002;48:191-200.
222. Ebert EC. Interleukin 21 up-regulates perforin-mediated cytotoxic activity of human intra-epithelial lymphocytes. *Immunology* 2009;127:206-15.
223. Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992;10:295-331.
224. Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, Paul WE. Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med* 1982;155:914-23.
225. Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991;77:1859-70.
226. Gilmour J, Lavender P. Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells. *Immunology* 2008;124:437-44.
227. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163-89.
228. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 2001;22:556-60.
229. Gessani S, Belardelli F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:117-23.
230. Čulo F. Citokini i kemokini. U: U: Andreis I i sur. *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2010. str. 123-141.
231. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
232. Oettgen HF, Carswell EA, Kassel RL i sur. Endotoxin-induced tumor necrosis factor. *Recent Results Cancer Res* 1980;75:207-12.

233. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10:45-65.
234. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K i sur. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994;264:965-8.
235. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001;97:14-32.
236. Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, Waldmann TA. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 1996;4:329-36.
237. Kumaki N, Anderson DM, Cosman D, Kumaki S. Expression of interleukin-15 and its receptor by human fetal retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 1996;15:876-82.
238. Reinecker HC, MacDermott RP, Mirau S, Dignass A, Podolsky DK. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology* 1996;111:1706-13.
239. Weiler M, Rogashev B, Einbinder T, Hausmann MJ, Kaneti J, Chaimovitz C, Douvdevani A. Interleukin-15, a leukocyte activator and growth factor, is produced by cortical tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 1998 ;9:1194-201.
240. Lee YB, Satoh J, Walker DG, Kim SU. Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture. *Neuroreport* 1996;7:1062-6.
241. Mohamadzadeh M, Takashima A, Dougherty I, Knop J, Bergstresser PR, Cruz PD Jr. Ultraviolet B radiation up-regulates the expression of IL-15 in human skin. *J Immunol* 1995;155:4492-6.
242. Budagian V, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006 ;17:259-80.
243. Santoni A, Carlino C, Gismondi A. Uterine NK cell development, migration and function. *Reprod Biomed Online* 2008;16:202-10.
244. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G i sur. Role of interleukin-2 (IL-2), IL-7, and IL-15 in natural killer cell differentiation from cord blood hematopoietic progenitor cells and from gamma c transduced severe combined immunodeficiency X1 bone marrow cells. *Blood* 1996;88:3901-9.
245. Carson WE, Fehniger TA, Haldar S i sur. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest.* 1997;99:937-43.

246. Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA i sur. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest.* 1995;96:2578-82.
247. Mori A, Suko M, Kaminuma O, i sur. IL-15 promotes cytokine production of human T helper cells. *J Immunol.* 1996;156:2400-5.
248. Ye W, Young JD, Liu CC. Interleukin-15 induces the expression of mRNAs of cytolytic mediators and augments cytotoxic activities in primary murine lymphocytes. *Cell Immunol* 1996;174:54-62.
249. Besedovsky HO, del Rey A, Sorkin E, Da Prada M, Keller HH. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell Immunol* 1979;48:346-55.
250. Besedovsky HO, del Rey A. Interactions between immunological cells and the hypothalamus pituitary-adrenal axis: an example of neuroendocrine immunoregulation. *Recenti Prog Med* 1988;79:300-4.
251. Besedovsky HO, del Rey AE, Sorkin E. Immune-neuroendocrine interactions. *J Immunol* 1985;135:750s-754s.
252. Sabioncello A. Imunoreaktivnost osoba izloženih aktunom i kroničnom stresu. U: Boranić M i sur., ur. *Psihoneuroimunologija*. Zagreb: Školska knjiga, 2008; str. 79-99.
253. Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2006;6:318-28.
254. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000;52:595-638.
255. Maisel AS, Harris T, Rearden CA, Michel MC. Beta-adrenergic receptors in lymphocyte subsets after exercise. Alterations in normal individuals and patients with congestive heart failure. *Circulation* 1990;82:2003-10.
256. Benschop RJ, Rodriguez-Feuerhahn M, Schedlowski M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav Immun* 1996;10:77-91.
257. Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Lucia PD i sur. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J Clin Invest.* 1997;100:1513-9.
258. Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* 1996;108:374-81.

259. van der Poll T, Coyle SM, Barbosa K, Braxton CC, Lowry SF. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J Clin Invest* 1996;97:713-9.
260. Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D i sur. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med.* 1998 ;4:808-13.
261. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M i sur. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405:458-62.
262. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:775-86.
263. Franchimont D, Galon J, Gadina M i sur. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J Immunol* 2000;164:1768-74.
264. Ramírez F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D. Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J Immunol* 1996;156:2406-12.
265. Sinuff T, Muscedere J, Cook D i sur. Ventilator-associated pneumonia: Improving outcomes through guideline implementation. *J Crit Care* 2008;23:118-25.
266. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM i sur. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med* 2008;34:17-60.
267. Williams JD. Criteria for diagnosis of urinary tract infection and evaluation of therapy. *Infection* 1992;20:S257-60.
268. Mrljan A, Smrcka M, Klabusay M. The importance of immune system disorders related to the Glasgow Outcome Score in patients after severe brain injury. *Bratisl Lek Listy* 2007;108:329-34.
269. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Resp Crit Care Med* 2002;165:867-903.
270. Fabergas N, Torres A. Pulmonary infection in the brain injured patient. *Minerva Anesthesiol* 2002; 68:285-90.
271. Rincon-Ferrari MD, Flores-Cordero JM, Leal-Noval SR i sur. Impact of ventilator-associated pneumonia in patients with severe head injury. *J Trauma* 2004; 57:1234-40.
272. Catania A, Lonati C, Sordi A, Gatti S. Detrimental consequences of brain injury on peripheral cells. *Brain Behav Immun* 2009;23:877-84.

273. Rodriguez JL, Gibbons KJ, Bitzer LG, Dechert RE, Steinberg SM, Flint LM. Pneumonia: incidence, risk factors, and outcome in injured patients. *J Trauma* 1991;31:907-12.
274. Kappstein I, Schulgen G, Beyer U, Geiger K, Schumacher M, Daschner FD. Prolongation of hospital stay and extra costs due to ventilator-associated pneumonia in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:504-8.
275. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Resp Crit Care Med* 2002;165:867-903.
276. Combes A, Luyt CE, Trouillet JL, Chastre J. Controversies in ventilator-associated pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med*. 2010;31:47-54.
277. Klehmet J, Harms H, Richter M i sur. Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience* 2009;158:1184-93.
278. Quattrocchi KB, Frank EH, Miller CH et al. Impairment of helper T-cell function and lymphokine-activated killer cytotoxicity following severe head injury. *J Neurosurg* 1991;75:766-73.
279. Miller CH, Quattrocchi KB, Frank EH, Issel BW, Wagner FC Jr. Humoral and cellular immunity following severe head injury: review and current investigations. *Neurol Res* 1991;13:117-24.
280. Wolach B, Sazbon L, Gavrieli R, Broda A, Schlesinger M. Early immunological defects in comatose patients after acute brain injury. *J Neurosurg* 2001;94:706-11.
281. Wolach B, Sazbon L, Gavrieli R, Ben-Tovim T, Zagreba F, Schlesinger M. Some aspects of the humoral and neutrophil functions in post-comatose awareness patients. *Brain Inj* 1993;7:401-10.
282. Meert KL, Long M, Kaplan J, Sarnaik AP. Alterations in immune function following head injury in children. *Crit Care Med* 1995;23:822-8.
283. Smrcka M, Mrlan A, Klabusay M. Immune system status in the patients after severe brain injury. *Bratisl Lek Listy* 2005;106:144-6.
284. Kubota K.A novel functional T cell hybridoma recognizes macrophage cell death induced by bacteria: a possible role for innate lymphocytes in bacterial infection. *J Immunol* 2006;176:7576-88.
285. Kavelaars A. Regulated expression of alpha-1 adrenergic receptors in the immune system. *Brain Behav Immun* 2002;16:799-807.

286. Lünemann A, Lünemann JD, Roberts S i sur. Human NK cells kill resting but not activated microglia via NKG2D- and NKp46-mediated recognition. *J Immunol* 2008;181:6170-7.
287. Sanders RD, Hussell T, Maze M. Sedation & immunomodulation. *Crit Care Clin* 2009;25:551-70.
288. Sacerdote P. Opioids and the immune system. *Palliat Med* 2006;20:9-15.
289. Eugenin EA, Berman JW. Chemokine-dependent mechanisms of leukocyte trafficking across a model of the blood-brain barrier. *Methods*. 2003;29:351-61
290. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia* 2001;36:180-90
291. Lumpkins K, Bochicchio GV, Zagol B i sur. Plasma levels of the beta chemokine regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted (RANTES) correlate with severe brain injury. *J Trauma* 2008;64:358-61
292. Rhodes J, Sharkey J, Andrews P. Serum IL-8 and MCP-1 concentration do not identify patients with enlarging contusions after traumatic brain injury. *J Trauma* 2009;66:1591-7
293. Kwon OJ, Au BT, Collins PD, Baraniuk JN, Adcock IM, Chung KF, Barnes PJ. Inhibition of interleukin-8 expression by dexamethasone in human cultured airway epithelial cells. *Immunology* 1994;81:389-94.
294. Szabó C, Thiemermann C, Wu CC, Perretti M, Vane JR. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:271-5.
295. AyanlarBatuman O, Ferrero AP, Diaz A, Jimenez SA. Regulation of transforming growth factor-beta 1 gene expression by glucocorticoids in normal human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1991;88:1574-80.
296. Wang H, Yu M, Ochani M i sur. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003 ;421:384-8.
297. Rukavina D, Laskarin G, Rubesa G i sur. Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Blood* 1998;92:2410-20.

# ŽIVOTOPIS

## IME I PREZIME

Vlatka Sotošek Tokmadžić

## DATUM I MJESTO ROĐENJA

28. kolovoza 1972. Rijeka

## ADRESA

Vrtlarski put 11c

51 000 Rijeka

Hrvatska

## ZAPOSLENJE

1998. – 2003. Zavod za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

2003. – 2004. Zavod za hitnu medicinu, Klinički bolnički centar Rijeka

Od 2004. Klinika za anesteziologiju i intenzivno liječenje, Klinički bolnički centar Rijeka

Od 2005. Katedra za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

## ŠKOLOVANJE

1979. - 1987. osnovna škola u Kraljevici i Novom Vinodolskom

1987. - 1991. srednja škola CUO "Vladimir Čopić", Senj

1991. - 1997. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

1997. - 1998. Pripravnički staž (27. siječnja 1999. položen državni ispit)

1997. - 1999. Poslijediplomski znanstveni studij "Biomedicina" elektivni smjer "Klinička imunologija" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci

2004. – 2008. specijalistički staž iz Anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja na Klinici za anesteziologiju i intenzivno liječenje, Kliničkog bolničkog centra Rijeka (7. srpnja

2008. položen specijalistički ispit iz Anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja u KBC Rijeka)



## **AKADEMSKI STUPNJEVI**

1997. Doktor medicine, Medicinski fakultet Sveučilište u Rijeci

2001. - 2003. Asistent na na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

2005. Asistent na Katedri za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

## **ZNANSTVENI STUPNJEVI**

1998. - 2001. Znanstveni novak na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

2001. Magistar biomedicinskih znanosti

## **TEČAJEVI I USAVRŠAVANJA**

Od 11. do 14. listopada 1998, pohađala sam John Humphrey tečaj u Dubrovniku pod nazivom ""Effector functions of immune cells".

14. svibnja 1999. godine prisustvovala sam tečaju pod nazivom "Intracellular detection of cytokines by flow cytometry" u Zagrebu.

Od siječnja 2002. do prosinca 2002. radila sam na Zavodu za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet u Miamiu, Florida, SAD; postdoktorski studij. Tijekom tog boravka radila sam na projektu prof. dr. ER Podacka na istraživanjima uloge proteina toplinskoga stresa gp96 u regulaciji imunološkog odgovora u tumorskom modelu.

Od 5. do 23. ožujka 2007. boravila sam na Zavodu za anesteziologiju i intenzivno liječenje Sveučilišne bolnice u Udinama, Italija.

Od 1. veljače do 31. ožujka 2008. boravila sam na Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KBC Rebro te Klinici za plućne bolesti Jordanovac u Zagrebu.

Od 16. do 18. studenog 2007. godine u Rijeci pohađala sam i uspješno položila Tečaj za pružatelje naprednih postupaka oživljavanja.

## **A. ZNANSTVENA DJELATNOST**

### **Kvalifikacijski radovi**

Sotošek V. Uloga interleukina 18 u regulaciji citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita, magistarski rad, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci (mentor: akademik Daniel Rukavina)

## **1. Znanstveni radovi**

### **1.1. Znanstveni rad objavljen u časopisu citiranom u sekundarnim publikacijama**

1. Rukavina D, Štrbo N, **Sotošek V**, Bedenicki I, Laškarin G. Recent advances in immunology of early pregnancy. *Gynaecol Perinatol* 1998;7:77-83.
2. Rukavina D, Laškarin G, Štrbo N, **Sotošek V**, Bogović T. Immunobiology of reproduction: role of uniquely abundant NK cells in the placenta. *Clinical Immunology Newsletter* 1999;19:59-61.
3. Podack ER, Strbo N, **Sotosek V**, Muta H. CD30-governor of memory T cells? *Ann N Y Acad Sci*, 2002;975:101-113.
4. Golubović S, Golubović V, Cindrić-Stančin M, **Sotošek Tokmadžić V**. Anagesic effect of intraperitoneal tramadol during laproscopic cholecystectomy. *Period biol* 2007;109: 317-320.
5. Golubović V, Golubović S, **Sotošek Tokmadžić V**, Mrakovčić-Šutić I. Immune response in patients with cancer pain. *Period biol* 2009;111: 223-225.
6. Golubović S, Golubović V, **Sotošek Tokmadžić V**. Intraperitoenal analgesia for laparoscopic cholecystectomy. *Period biol* 2009;111: 263-266.

### **1.2. Znanstveni rad objavljen u časopisu citiranom u tercijarnim publikacijama**

1. Štrbo N, Laškarin G, **Sotošek V**, Randić Lj, Podack ER, Rukavina D. Modulation of perforin expression in the decidua and peripheral blood cytotoxic lymphocytes in culture. *Am J Reprod Immunol* 1999;42:14-21.
2. **Sotošek V**, Laškarin G, Štrbo N, Dohr G, Blaschitz A, Podack ER Rukavina D. Decidual macrophages are the population of decidual adherent cells which regulates perforin expression in cytolytic cells. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42:76-82.
3. Laškarin G, Faust Zs, Štrbo N, **Sotošek V**, Szekeres-Bartho J, Podack ER, Rukavina D. Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells. *Am J Reprod Immunol* 1999;42:312-20.
4. Prpić L, Štrbo N, **Sotošek V**, Gruber F, Podack ER, Rukavina D. Assesment of perforin expression in peripheral blood lymphocytes in psoriatic patients during exacerbation of disease. *Acta Derm Venerol* 2000;211:14-16.
5. Laškarin G, **Tokmadžić SV**, Štrbo N, Bogović T, Szekeres-Bartho J, Randić Lj., Podack ER, Rukavina D. Progesteron induced blocking factor (PBIF) mediates progesterone

- induced suppression of decidual lymphocytes cytotoxicity. *Am J Reprod Immunol* 2002;48:201-9.
6. **Tokmadžić SV**, Tsuji Y, Bogović T, Laškarin G, Čupurdija K, Štrbo N, Koyama K, Okamura H, Podack ER, Rukavina D. IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes. *Am J Reprod Immunol*. 2002;48:191-200.
  7. Strbo N, Oizumi S, **Sotosek Tokmadžić V**, Podack ER. Perforin is required for innate and adoptive immunity induced by heat shock protein gp96. *Immunity* 2003;18:381-90.
  8. Podack ER, Strbo N, **Sotosek V**, Muta H. CD30-governor of memory T cells? *Ann N Y Acad Sci* 2002;975:101-13.
  9. Gulan G, Ravlić-Gulan J, **Sotošek V**, Nemeč B, Matovinović B, Podack ER, Rukavina D. Systemic and local expression of perforin in lymphocyte subsets in acute and chronic rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30:660-70.
  10. Prpic Massari L, Kastelan M, Gruber F, Laskarin G, **Sotosek Tokmadžić V**, Strbo N, Zamolo G, Zauhar G, Rukavina D. Perforin expression in peripheral blood lymphocytes and skin-infiltrating cells in patients with lichen planus. *Br J Dermatol* 2004;151:433-9.
  11. Laskarin G, Cupurdija K, **Tokmadžić VS**, Dorčić D, Dupor J, Juretić K, Strbo N, Crncić TB, Marchezi F, Allavena P, Mantovani A, Randić L, Rukavina D. The presence of functional mannose receptor on macrophages at the maternal-fetal interface. *Hum Reprod*. 2005;20:1057-66.
  12. Strbo N, Laskarin G, Crncić TB, Juretić Franković K, Bedenicki I, **Tokmadžić VS**, Randić L, Bouteiller PL, Tabiasco J, Podack ER, Rukavina D. Short-term Cytolytic Mediators' Expression in decidual lymphocytes is enhanced by interleukin-15. *Am J Reprod Immunol*. 2006;55:217-25.
  13. Bogović Crnčić T, Laškarin G, Juretić Franković K, **Sotošek Tokmadžić V**, Strbo N, Bedenicki I, Le Bouteiller P, Tabiasco J, Rukavina D. Early pregnancy decidual lymphocytes beside perforin use Fas ligand (FasL) mediated cytotoxicity. *J Reprod Immunol* 2007;2:108-17.
  14. Mrakovčić I, **Sotosek Tokmadžić V**, Laskarin G, Mahmutefendić H, Lucin P, Zupan Z, Sustić A. Early changes in frequency of peripheral blood lymphocyte subpopulations in severe traumatic brain-injured patients. *Scand J Immunol* 2010;72:57-65.

15. **Sotošek Tokmadžić V**, Laskarin G, Mahmutefendić H, Lucin P, Mrakovčić-Sutić I, Zupan Z, Sutić A. Expression of cytolytic protein – perforin – in peripheral blood lymphocytes in severe traumatic brain injured patients. *Injury* (u tisku).

## **2. Znanstveni projekti**

### **2.1. Aktivno sudjelovanje u realizaciji znanstvenih projekata**

2.3.1. „Ekspresija perforina u limfocitima periferne krvi i decidualnim limfocitima u trudnoći“ (projekt broj 006201) (Kratki naslov: „Ekspresija perforina u trudnoći“) glavnog istraživača Akademika Daniela Rukavine. Projekt financiran od Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske.

2.3.2. „Th1 citokini i citolitičke molekule u trudnoći“ (project broj 0062029), glavnog istraživača akademika Daniela Rukavine. Projekt financiran od Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske, 2002.

2.3.3. „Perkutana traheostomija u prevenciji pneumonije u strojno ventiliranih bolesnika“ (projekt broj 062-0000000-0220), glavni istraživač prof. dr. sc. Alan Šustić. Projekt financiran od Ministarstva znanosti, obrazovanje i športa Republike Hrvatske, 2007.

2.3.4. Epiduralna analgezija i stanična imunost u bolesnika s kolorektalnim karcinomom“ (projekt broj 062-0620096-0092), glavni istraživač prof. dr. sc. Vesna Golubović. Projekt financiran od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, 2007.

## **3. Sudjelovanje na znanstvenim skupovima**

### **3.1. Sudjelovanje na međunarodnim skupovima**

1. Štrbo N, Laškarin G, **Sotošek V**, Vlastelić I, Podack ER, Rukavina D. The significance of interleukin (IL)-15 in regulating perforin expression in the first trimester pregnancy decidual lymphocytes. *Periodicum Biologorum, Fourth International Meeting "Mechanisms in Local Immunity"*, Opatija, 1998; Vol 100, suppl. 3/p 64.
2. Laškarin G, Faust Zs, Štrbo N, **Sotošek V**, Podack ER, Rukavina D. The role of progesterone in regulation of perforin expression in decidual and peripheral blood lymphocytes. *Fourth International Meeting "Mechanisms in Local Immunity"*, Opatija, 1998; Vol 100, suppl. 3/p 54.
3. **Sotošek V**, Laškarin G, Štrbo N, Randić Lj, Podack ER, Rukavina D. Phenotype of decidual and peripheral blood adherent cells and their role in upregulation of perforin

- expression. Fourth International Meeting "Mechanisms in Local Immunity", Opatija, 1998; Vol 100, suppl. 3/p 54.
4. Gulan G, Ravlić-Gulan J, **Sotošek V**, Štrbo N, Matovinović D, Nemeč B, Rukavina D. Expression of cytolytic protein – perforin in peripheral blood, synovial fluid and synovial tissue lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. Fourth International Meeting "Mechanisms in Local Immunity", Opatija, 1998; Vol 100, suppl. 3/p 80.
  5. Gulan G, Ravlić-Gulan J, **Sotošek V**, Štrbo N, Matovinović D, Nemeč B, Rukavina D. Analysis of cytotoxic T-lymphocytes and natural killer cells in peripheral blood, synovial fluid and synovial tissue of patient with rheumatoid arthritis. Fourth International Meeting "Mechanisms in Local Immunity", Opatija, 1998; Vol 100, suppl. 3/p 80.
  6. Rukavina D, Laškarin G, Štrbo N, **Sotošek V**, Bedenicki I, Podack ER. Cytokines and hormones in the regulation of perforin expression in the decidual lymphocytes. Fourth International Meeting "Mechanisms in Local Immunity", Opatija, 1998; Vol 100, suppl. 3/p 41.
  7. Rukavina D, Laškarin G, Štrbo N, **Sotošek V**, Podack ER. Physiologic and pathogenetic significance of perforin in pregnancy. American Journal of Reproductive Immunology, 7<sup>th</sup> International Congress of Reproductive Immunology, New Delhi, October 27-30, 1998, 40:250.
  8. Prpić L, Gruber F, Štrbo N, **Sotošek V**, Rukavina D. Assessment of perforin expression in peripheral blood lymphocytes in psoriatic patients during exacerbation of disease. Alpe-Adria Symposium on Psoriasis, Trieste (Italy), 20-21 November 1998.
  9. **Sotošek V**, Laškarin G, Štrbo N, Randić Lj, Rukavina D. Decidual macrophages regulate cytolytic potential of decidual natural killer cells. Placenta 1999; 20 (5/6): A63.
  10. Štrbo N, Laškarin G, **Sotošek V**, Randić Lj, Rukavina D. Regulation of cytolytic activity of decidual lymphocytes: role of cytokines IL-2 and IL-15. Placenta 1999; 20 (5/6): A64.
  11. Štrbo N, Laškarin G, **Sotošek V**, Bogović T, Vlastelić I, Randić Lj, Rukavina D, Podack ER. Natural killer activity and response to Th1 cytokines of decidual lymphocytes. European Meeting of Immunology and Reproduction Rome, October 28-29, 1999. Abstract book pp 20.
  12. Laškarin G, Štrbo N, **Sotošek V**, Bogović T, Randić Lj, Rukavina D, Podack ER. The influence of progesterone in the regulation of perforin expression and cytolytic activity of decidual lymphocytes. European Meeting of Immunology and Reproduction Rome, October 28-29, 1999. Abstract book pp 15.

13. **Sotosek V**, Laskarin G, Strbo N, Bogovic T, Randic Lj, Rukavina D, Podack ER. Th1 and Th2 regulatory effects on perforin expression - the role of decidual macrophages. European Meeting of Immunology and Reproduction Rome, October 28-29, 1999. Abstract book pp 19.
14. Rukavina D, Laskarin G, Strbo N, **Sotosek V**, Podack ER. Cytolytic mechanisms at the maternal-fetal interface. European Meeting of Immunology and Reproduction Rome, October 28-29, 1999. Abstract book pp 80.
15. D. Rukavina, N. Štrbo, G. Laškarin, **V. Sotošek**, Lj. Randić. Th1 cytokines in regulation of cytotoxicity at the interface. 6<sup>th</sup> Congress of the Alps-Adria Society of Immunology of Reproduction, Pecs - Hungary, June 27-30, 2000.
16. G. Laškarin, **V. Sotošek**, T. Bogović, N. Štrbo, Lj. Randić, D. Rukavina. Interactions of progesterone and cytokines in the regulation of cytotoxicity of decidual lymphocytes. 6<sup>th</sup> Congress of the Alps-Adria Society of Immunology of Reproduction, Pecs - Hungary, June 27-30, 2000.
17. L. Prpić, G. Laškarin, **V. Sotošek**, F. Gruber, D. Rukavina. The role of perforin mediated cytolytic pathway in the pathophysiology of psoriasis. 9<sup>th</sup> Congress European Academy of Dermatology and Venerology. Geneva - Switzerland, October 11-15, 2000.
18. Rukavina D, Laskarin G, **Sotosek V**, Strbo N, Bogovic T, Cupurdija K and Randic Lj. Cytokine and Hormone Networks in the Regulation of Cytotoxicity at the Interface. Journal of the Japan Society for Immunology of Reproduction Vol 15. No.1, 2000;25-26.
19. G. Laskarin, **V. Sotosek**, T.Bogovic, K Cupurdija, LJ. Randic, E.R.Podack and D. Rukavina. Progesterone mediated regulation of cytolytic potential of decidual lymphocytes. American Journal of Reproductive Immunology 2001;46(1):40.
20. K. Cupurdija, G. Laskarin, T. Bogovic, **V. Sotosek**, LJ. Randic, E.R. Podack and D. Rukavina. The effect of progesterone induced blocking factor (PIBF) in regulation of cytolytic potential of decidual lymphocytes. American Journal of Reproductive Immunology 2001;46(1):49.
21. T. Bogovic, **V. Sotosek**, G. Laskarin, K. Cupurdija, Lj. Randic, E.R.Podack and D. Rukavina. Cytolytic activity of decidual lymphocytes in response to short and long term stimulation by Th1 cytokines. American Journal of Reproductive Immunology 2001;46(1):51.
22. **V. Sotosek**, G. Laskarin, T. Bogovic, K. Cupurdija, Lj. Randic, E.R.Podack and D. Rukavina. The effect of IL-18 on perforin mediated cytolytic activity of decidual and

- peripheral blood lymphocytes of first trimester normal human pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* 2001;46(1):53.
23. K. Juretic, K. Cupurdija, G. Laskarin, T. Bogovic, **V. Sotosek**, L.J. Randic, E.R. Podack and D. Rukavina. Involment of Fas/Fas ligand mechanism in Th1 mediated cytolytic activity of peripheral blood lymphocytes of pregnant women. *American Journal of Reproductive Immunology* 2001;46(1):54.
  24. Rukavina D, Bogovic T, Laskarin G, **Sotosek V**, Juretic K, Cupurdija K, Dorcic D. Th1 cytokines and LAK activity at the maternal-fetal interface. ASRI XXII<sup>nd</sup> Annual Meeting- Abstract Issue, Chicago, June 6-9, 2002; *American Journal of Reproductive Immunology* 2001;47(6):351-2.
  25. Laskarin G, Strbo N, **Sotosek-Tokmadzic V**, Bogovic-Crcic T, Cupurdija K, Juretic K, Dorcic D, Dupor J, Randic Lj, Rukavina D, Podack ER. Interaction of progesterone and IL-15 in the regulation of perforin expression and cytolytic activity of decidual lymphocytes at the materno-fetal interface, 8<sup>th</sup> congress of AASIR, September 7-10, Weimar, Germany, *Am J Reprod Immunol* 2002;48:3,160. (CC)
  26. Strbo N, Laskarin G, **Sotosek-Tokmadzic V**, Bogovic-Crcic T, Cupurdija K, Juretic K, Dorcic D, Dupor J, Randic Lj, Rukavina D, Podack ER. Characterisation of antigen presenting cells in the human first trimester decidua, 8<sup>th</sup> congress of AASIR, September 7-10, Weimar, Germany, *Am J Reprod Immunol* 2002;48:3,160.(CC)
  27. Rukavina D, Bogovic-Crcic T, **Sotosek V**, Laskarin G, Strbo N, Juretic K, Cupurdija K, Tsuji Y, Koyama K. Physiological roles(s) of IL-15 and IL-18 at the maternal-fetal (M-F) interface, 8<sup>th</sup> congress of AASIR, September 7-10, Weimar, Germany, *Am J Reprod Immunol* 2002;48:3,139. (CC)
  28. **V. Sotosek-Tokmadzic**, N. Strbo, ER. Podack. NK Perforin is Required for Innate and Adaptive Immunity Induced by Heat Shock Protein Gp96. 19<sup>th</sup> International Natural Killer Cell Workshop, 7<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Natural Immunity, October 6-8, 2002, San Juan, Puerto Rico.
  29. Laskarin G, Cupurdija K, **Sotosek-Tokmadzic V**, Dupor J, Dorcic D, Allavena P, Randic Lj, Rukavina D. Expression and distribution of the mannose receptor (MR) in the first trimester decidual tissue. *J Reprod Immunol* 2003;58:152-3.
  30. Bogovic Crcic T, Strbo N, Laskarin G, Cupurdija K, Dorcic D, Juretic K, Dupor J, **Sotosek Tokmadzic V**, Vlastelic I, Randic L.J., Rukavina D. Decidual NK cells use

- FAS/FASL cytolytic pathway. American Journal of Reproductive Immunology 2004;51(6):37.
31. Srsen S, Laskarin G, Dupor J, Juretic K, Štrbo N, Dorcic D, Cupurdija K, **Sotosek-Tokmadzic V**, Haller H, Rupcic S, Randic L.J., Rukavina D. Tubal mucosa implantation site is characterized by infiltration of CD3+CD8 bright+ T cells and relative lack of NK cells. American Journal of Reproductive Immunology 2004;51(6):38.
  32. Srsen S, Laškarin G, Dupor J, Juretić K, Štrbo N, Dorčić D, Čupurdija K, **Sotošek-Tokmadžić V**, Bogović Crnčić T, Haller H, Rupčić S, Randić Lj, Rukavina D. Phenotypic characteristics of leukocytes in ectopic pregnancy. Efis symposium and postgraduate course. Molecular and cellular interactions in chronic inflammatory autoimmune diseases. Belgrade, Serbia and Montenegro. August 29 – September 2, 2004.
  33. Bogović Crnčić T, Štrbo N, Laškarin G, **Sotošek Tokmadžić V**, Čupurdija K, Juretić K, Dorčić D, Dupor J, Srsen S, Vlastelić I, Randić Lj and Rukavina D. Early pregnancy decidual lymphocytes lyse NK resistant targets by perforin and FAS/FASL cytolytic mechanisms. Efis symposium and postgraduate course. Molecular and cellular interactions in chronic inflammatory autoimmune diseases. Belgrade, Serbia and Montenegro. August 29 – September 2, 2004.
  34. Laskarin G, Cupurdija K, Štrbo N, **Sotosek Tokmadzic V**, Dorcic D, Dupor J, Juretic K, Bogovic Crncic T, Allavena P, Mantovani A, Randic Lj, Rukavina D. Expression and natural ligands for the mannose receptor at the materno-fetal interface. American Journal of Reproductive Immunology 2004;52(1):30.
  35. Horvat M, Protic A, **Sotosek V**. A comparison of spinal anestehsia with combined ultrasound guided femoropopliteal nerve blocks during lower limbs surgery. 19<sup>th</sup> Alpe-Adria symposium (AAAS) and Current topics in anesthesia and critical care (CTACC): USA-Croatian joint meeting, Opatija, September 14<sup>th</sup>-16<sup>th</sup>.
  36. Horvat M, Sokolić J, Juranić J, Papež D, **Sotošek V**, Horvat J. Levobupivacain 0.125 % vs. Lidocain 0.5 % with 8.4% Sodium Bicarbonate in Intravenous Regional Anesthesia (IVRA) for Hand Surgery - Pilot Study. XXV Annual ESRA Congress Monte Carlo – Monaco, September 06-09, 2006.
  37. Protić A, Horvat M, Juranić J, **Sotošek V**. A comparison of the CUN acupuncture point as an anatomical landmark for femoral nerve block using ultrasound measurement – pilot study. 20<sup>th</sup> anaesthesia symposium Alpe-Adria, Ljubljana, Slovenia, September 7<sup>th</sup>-9<sup>th</sup> 2007.



38. Golubovic V, Mrakovcic-Sutic I, Golubovic S, **Sotosek Tokmadzic V**, Petkovic M. Changes in expression of cytolytic molecule perforin in peripheral blood lymphocytes after epidural anesthesia in patients with colorectal carcinoma. XXVI Annual ESRA Congress, Valencia, Spain September 12-15, 2007.
39. Golubovic S, Mrakovcic-Sutic I, Golubovic V, **Sotosek Tokmadzic V**, Petkovic M. The role of natural killer T cells subsets (NKT) during epidural anesthesia in patients with colorectal carcinoma. XXVI Annual ESRA Congress, Valencia, Spain September 12-15, 2007.
40. Golubovic V, Mrakovcic-Sutic I, Golubovic S, **Sotosek Tokmadzic V**, Petkovic M. The effect of epidural anesthesia on perforin expression in patients with colorectal carcinoma. 4<sup>th</sup> World Congress World Institute of Pain, Hungary, Budapest, September 25-28, 2007.
41. Mrakovcic-Sutic I, Golubovic V, Golubovic S, **Sotosek Tokmadzic V**, Petkovic M. The influence of NK and NKT cells on the innate immunity following epidural anesthesia in patients with colorectal carcinoma. 4<sup>th</sup> World Congress World Institute of Pain, Hungary, Budapest, September 25-28, 2007.
42. Golubovic V, Mrakovcic-Sutic I, Golubovic S, **Sotosek Tokmadzic V**, Petkovic M. The characteristic of postoperative epidural analgesia on immunological status of patients with colorectal carcinoma. XXVII Annual ESRA Congress, Genoa, Italy, 24-27 September 2008.
43. Golubovic V, Golubovic S, **Sotosek-Tokmadzic V**, Mrakovcic-Sutic I, Petkovic M. Effects of post-operative pain treatment using epidural or intravenous analgesia on innate and acquired immune response. XXVIII Annual ESRA Congress, September 9-12 2009, Salzburg, Austria.
44. Stuck I, **Sotosek Tokmadzic V**, Frakovic V, Azman J, Golubovic.V. A bolus -based regimen of thoracic paravertebral block for breast surgery anesthesia and postoperative analgesia. XXVIII Annual ESRA Congress, September 9-12 2009, Salzburg, Austria.
45. **Sotosek Tokmadzic V**, Laskarin G, Mahmutefendic H, Lucin P, Rukavina D, Sustic A. Modulation of peripheral blood lymphocyte subpopulations in patients with severe brain injury. 22<sup>nd</sup> Annual Congress of European Society of Intensive Care Medicine, October 11-14, 2009, Vienna, Austria.

### 3.2. Sudjelovanje na domaćim skupovima

1. G. Laškarin, N. Štrbo, **V. Sotošek**, T. Bogović, Lj. Randić, D. Rukavina. Progesterone induced blocking factor (PIBF) mediates immunosuppressive activity of progesterone at the interface. 1999 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Zagreb, November 25, 1999.
2. **V. Sotošek**, N. Štrbo, G. Laškarin, I. Bedenicki, Lj. Randić, D. Rukavina. IL-15 plays a key role in the regulation of perforin expression at the maternal-fetal interface. 1999 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Zagreb, November 25, 1999.
3. T. Bogović, G. Laškarin, N. Štrbo, **V. Sotošek**, I. Vlastelić, Lj. Randić, ER. Podack, D. Rukavina. Decidual macrophages are involved in regulation of cytolytic activity of decidual lymphocytes. 1999 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Zagreb, November 25, 1999.
4. N. Štrbo, G. Laškarin, **V. Sotošek**, T. Bogović, Lj. Randić, E.R. Podack, D. Rukavina. Effect of Th1 type cytokines (IL-2, IL-12, IL-15) on cytotoxic activity of decidual NK cells. 1999 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Zagreb, November 25, 1999.
5. G. Laškarin, N. Štrbo, **V. Sotošek**, T. Bogović, K. Čupurdija, Lj. Randić, D. Rukavina. Progesterone and Progesterone Induced Blocking Factor (PIBF) regulate perforin expression and cytolytic activity of decidual lymphocytes. 1<sup>th</sup> Congress of the Croatian Physiological Society, Osijek - Croatia, September 14-16, 2000.
6. **V. Sotošek**, G. Laškarin, N. Štrbo, T. Bogović, Lj. Randić, I. Vlastelić, D. Rukavina. Macrophages secreted cytokines regulate perforin expression in the first trimester pregnancy decidua. 1<sup>th</sup> Congress of the Croatian Physiological Society, Osijek - Croatia, September 14-16, 2000.
7. G. Laškarin, **V. Sotošek**, T. Bogović, K. Čupurdija, Lj. Randić, D. Rukavina. Utjecaj progesterona i citokina na regulaciju citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita. 2000 godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva, Zagreb, 15. prosinca 2000.
8. **V. Sotosek Tokmadzic**, Y. Tsuji, T. Bogovic, G. Laskarin, K. Cupurdija, N. Strbo, Lj. Randic and D. Rukavina. The presence and role of interleukin-18 at maternal-fetal interface. Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva, Zagreb, 6. prosinca 2001.
9. G. Laskarin, **V. Sotosek Tokmadzic**, T. Bogovic, K. Cupurdija, I. Vlastelic, Lj. Randic and D. Rukavina. The presence and regulation of IL-15 protein expression in human

- first trimester pregnancy decidua. Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva, Zagreb, 6. prosinca 2001.
10. T. Bogovic, **V. Sotošek Tokmadžić**, G. Laškarin, K. Čupurdija, K. Juretić, D. Dorčić, Lj. Randić and D. Rukavina. The effects of short and long term Th1 cytokine stimulation on Fas/FasL mediated cytotoxicity of first term pregnancy peripheral blood lymphocytes. Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva, Zagreb, 6. prosinca 2001.
  11. Juretić K, Štrbo N, Laškarin G, **Sotošek V**, Čupurdija K, Dorčić D, Dupor J, Randić Lj, Rukavina D. Phenotypic and functional characteristic of human first trimester decidual macrophages and dendritic cells. Annual Meeting 2002. Croatian Immunological Society, Trakošćan, Croatia, November 22-24, 2002. Abstract book p 35.
  12. Dorotea D, Laškarin G, Štrbo N, **Sotošek Tokmadžić V**, Bogović-Crnčić, Čupurdija K, Juretić K, Randić Lj, Rukavina D. "Progesterone decreases perforin release from decidual NK cells in a close contact with K562 targets". Annual Meeting 2002. Croatian Immunological Society, Trakošćan, Croatia, November 22-24, 2002. Abstract book p 36.
  13. Štrbo N, Yamazaki K, **Sotošek V**, Rukavina D, Podack ER. Heat shock fusion protein gp96-Ig induces activation of innate and adoptive immunity. Annual Meeting 2002. Croatian Immunological Society, Trakošćan, Croatia, November 22-24, 2002. Abstract book p 13.
  14. Čupurdija K, Laškarin G, Štrbo N, Juretić K, Dorčić D, Dupor J, **Sotošek-Tokmadžić V**, Bogović-Crnčić T, Allavena P, Randić Lj, Vlastelić I, Rukavina D. Antigen presenting cells from human first trimester pregnancy decidua express functional mannose receptor. Annual Meeting 2003. Croatian Immunological Society, Brijuni, Croatia, October 17-19, 2003. Abstract book p 12.
  15. Bogović-Crnčić T, Štrbo N, Laškarin G, Čupurdija K, Dorčić D, Juretić K, Dupor J, **Sotošek-Tokmadžić V**, Vlastelić I, Randić Lj and Rukavina D. Molecular mechanisms involved in short term cytolytic activity of early pregnancy decidual NK cells. Annual Meeting 2003. Croatian Immunological Society, Brijuni, Croatia, October 17-19, 2003. Abstract book p 4.
  16. Štrbo N, **Sotošek-Tokmadžić V**, Čupurdija K, Juretić K, Laškarin G, Dorčić D, Dupor J, Randić Lj, Podack ER, Rukavina D. Heat shock protein gp96: rare simplicity. Annual

- Meeting 2003. Croatian Immunological Society, Brijuni, Croatia, October 17-19, 2003. Abstract book p 43.
17. Dupor J, Laškarin G, Čupurdija K, Juretić K, Dorčić D, **Sotošek-Tokmadžić V**, Štrbo N, Haller H, Rupčić S, Randić Lj. and Rukavina D. Analysis of leukocyte subpopulations in ectopic pregnancy. Annual Meeting 2003. Croatian Immunological Society, Brijuni, Croatia, October 17-19, 2003. Abstract book p 15.
  18. Laškarin G, Čupurdija K, **Sotošek-Tokmadžić V**, Haller H, Rupčić S, Juretić K, Dorčić D, Dupor J, Štrbo N, Randić Lj. and Rukavina D. Expression of perforin in filloplan tuba ectopic pregnancy. Annual Meeting 2003. Croatian Immunological Society, Brijuni, Croatia, October 17-19, 2003. Abstract book p 26.
  19. **Sotošek Tokmadžić V**, Deša K, Poldan N, Merlak-Radojčić I, Miljavac T, Štampalija R, Papež Kinkela D, Golubović V, Župan Ž. Retrospective analysis of regional anesthesia in Clinic of anesthesiology and intensive care, Clinical Hospital Center of Rijeka in period from January 1<sup>st</sup> 2005. to January 1<sup>st</sup> 2006. IV Congress of Croatian association of anesthesiology and ICM, Varaždin, May 4<sup>th</sup>-6<sup>th</sup> 2006.
  20. Horvat M, Orlić-Karbić V, Božić A, **Sotošek Tokmadžić V**. Application of 5% ultracaine (Hoechst) in one day surgery for hernioplastic operation in spinal anesthesia. IV Congress of Croatian association of anesthesiology and ICM, Varaždin, May 4<sup>th</sup>-6<sup>th</sup> 2006.
  21. Župan Ž, **Sotošek V**, Deša K. The influence of application of clinical guidelines on outcome of intensive treated patients with severe traumatic brain injury. XXX Symposia of intensive care. Zagreb, November 10<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> 2006.
  22. Pavelić G, Horvat M, **Sotošek V**, Komen H. Intravenous tramadol for pain relief given at induction in children undergoing tonsillectomy. XXX Symposia of intensive care. Zagreb, November 10<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> 2006.
  23. Stuck I, **Sotošek Tokmadžić V**, Krstulović B, Protić A, Župan Ž, Golubović V. Evaluation of prognostic values of LiMON parameters in patient with severe pancreatitis and sepsis - a pilot study. XXII Symposia of intensive care. Zagreb, December 5<sup>th</sup>-6<sup>th</sup> 2008. Golubović V, Golubović S, **Sotošek Tokmadžić V**. Intraperitoneal analgesia for laparoscopic cholecystectomy. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Regional Analgesia and Pain Therapy - 3<sup>rd</sup> Croatian Congress of Regional Anesthesia and Analgesia, Zagreb, June 18-20, 2009.

24. Frković V, Horvat M, Stuck I, Ažman J, Komen-Ušljebrka H, Juranić J, **Sotošek Tokmadžić V**, Golubović S, Župan Ž. A bolus-based regimen of thoracic paravertebral blockade for breast surgery anesthesia and postoperative analgesia. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Regional Analgesia and Pain Therapy - 3<sup>rd</sup> Croatian Congress of Regional Anesthesia and Analgesia, Zagreb, June 18-20, 2009.

### **3.3. Znanstvene nagrade/priznanja**

1. **Nagrada za najbolji poster na 8<sup>th</sup> Congress of the AASIR-Abstract Issue Weimar, Njemačka, rujan, 7-10, 2002.** Laskarin G, Strbo N, **Sotosek Tokmadzic V**, Bogovic Crncic T, Cupurdija K, Juretic K, Dorcic D, Dupor J, Randic Lj, Rukavina D, Podack ER. "Interaction of progesterone and IL-15 in the regulation of perforin expression and cytolytic activity of decidual lymphocytes at the materno-fetal interface".
2. **Nagrada za "outstanding " poster presentation na 8<sup>th</sup> Congress of the AASIR-Abstract Issue Weimar, Njemačka, rujan, 7-10, 2002.** Strbo N, Laskarin G, **Sotosek Tokmadzic V**, Bogovic Crncic T, Cupurdija K, Juretic K, Dorcic D, Dupor J, Randic Lj, Rukavina D, Podack ER. "Characterisation of antigen presenting cells in the human first trimester decidua".
3. **Nagrada za najbolji poster na Godišnjem sastanku Hrvatskog imunološkog društva 2002. Trakošćan, Hrvatska, studeni, 22-24, 2002.** Dorotea D, Laskarin G, Strbo N, **Sotosek Tokmadzic V**, Bogovic Crncic T, Cupurdija K, Juretic K, Randic Lj, Rukavina D. "Progesterone decreases perforin release from decidual NK cells in a close contact with K562 targets".

### **B. NASTAVNA DJELATNOST**

1993. - 1997. Student-demonstrator na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Od 1998. aktivno sudjelovanje u izvođenju seminara i vježbi iz Fiziologije, patofiziologije, imunologije te neurofiziologije na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Od 2005. aktivno sudjelovanje u izvođenju vježbi iz Anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja Katedre za anesteziologiju, reanimatologiju i intezivno liječenje

## **1. Autorstvo i suautorstvo skripata**

„Priručnik za vježbe iz fiziologije I.dio“, Katedra za fiziologiju, imunologiju i patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Rijeka, Sveučilište u Rijeci (ožujak 1999.)

„Priručnik za vježbe iz Fiziologije, Neurofiziologije i Imunologije“, Katedra za fiziologiju, imunologiju i patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Rijeka, Sveučilište u Rijeci (listopad 1999.)

## **2. Dodiplomska nastava**

Od 1997. godine do 2003 godine aktivno sam sudjelovala u nastavi u izvođenju seminara i vježbi iz predmeta Fiziologija, Imunologija, Neurofiziologija, Patofiziologija za studente sveučilišnih studija opće medicine i stomatologije, te predmeta Fiziologija s patofiziologijom za studij diplomiranih sanitarnih inženjera. U istom razdoblju bila sa suradnik u nastavi i za kolegij Imunologija na Sveučilištu u Rijeci za studij Inženjeri medicinsko laboratorijske dijagnostike.

Od 2005. godine aktivno sudjelujem u nastavi i izvođenju vježbi iz predmeta Anesteziologija, reanimatologija i intenzivno liječenje za studente sveučilišnih studija opće medicine i dentalne medicine te stručnih studija.

## **3. Ostale nastavne djelatnosti**

### **3.1. Otvaranje, ustrojstvo i organizacija novih laboratorija, vježbališta, praktikuma i sl.**

Sudjelovala sam u organizaciji novog programa vježbi iz Fiziologije (BIOPAC program).

## **C. STRUČNA DJELATNOST**

Od 1998. do 2003. godine sudjelovala sam u stručnom radu Zavoda za fiziologiju i imunologiju, koji se provodi u suradnji s Kliničkim bolničkim centrom Rijeka u obliku stručnih usluga, konzultacija iz područja dijagnostike imunoloških oboljenja.

Od 2004. godine sudjelujem u ostvarivanju stručne djelatnosti Klinike za anesteziologiju i intenzivno liječenje KBC Rijeka.

## **D. ČLANSTVA**

- 1999. - 2003. godine članica Alps Adria Society for Immunology of Reproduction (AASIR)

- Članica Lokalnog Organizacijskog odbora za organizaciju međunarodnog skupa Fourth International Meeting " Mechanisms in Local Immunity", koji se održao od 16. do 28. rujna 1998. godine u Opatiji
- Od 1999. godine članica Hrvatskog društva fiziologa
- Od 1999. - 2003. tajnica Hrvatskog društva fiziologa
- Od 1999. godine članica Hrvatskog imunološkog društva
- Od 1999. članica Hrvatskog liječničkog zbora
- Od 1999. članica Hrvatske liječničke komore
- Članica Lokalnog organizacijskog odbora za organizaciju VIII International Congress of Reproductive Immunology koji se je održao 02. do 06. lipnja 2001. godine u Opatiji.
- Članica Lokalnog organizacijskog odbora za organizaciju XXI Alpe-Adria symposium (AAAS) and current topics in anestehsia and critical care (CTACC): USA-Croatian joint meeting koji se je održao 14-16. rujna 2006. u Opatiji.
- Od 2009. članica Europskog udruženja intenzivne medicine
- Od 2010. članica Hrvatskog društva za anesteziologiju i intenzivno liječenje