

## NEKE METODOLOŠKE POTEŠKOĆE U PSIHONEUROIMUNOLOŠKIM ISPITIVANJIMA

NATAŠA ŠIMIĆ  
Filozofski fakultet u Zadru  
*Faculty of Philosophy in Zadar*

UDK/UDC: 159.07  
Pregledni članak  
*Review*

Primljeno  
: 2001-10-17  
*Received*

Termin psihoneuroimunologija odnosi se na relativno novo multidisciplinarno područje istraživanja koje je usmjereno na proučavanje dinamičke interakcije između živčanog, endokrinog i imunološkog sustava. Ovaj rad daje kratak pregled dosadašnjih istraživanja efekata stresa na imunološki sustav, te ukazuje na neke metodološke poteškoće ovakvih ispitivanja.

KLJUČNE RIJEČI: psihoneuroimunologija, stres, imunološki sustav

### *Psihoneuroimunologija*

Termin psihoneuroimunologija (PNI) odnosi se na relativno novo multidisciplinarno područje istraživanja koje je usmjereno na proučavanje dinamičke interakcije između živčanog, endokrinog i imunološkog sustava. Pod ovim terminom pokušavaju se sjediniti interakcije između psiholoških, endokrinih i imunoloških faktora koji pridonose nastanku nekih bolesti. Ispitivanja koja su pokazala da psihička stanja mogu utjecati na funkcioniranje imunološkog sustava, datiraju još od 1918. godine, a poseban su interes privukla u zadnja dva desetljeća.

### *Imunološki sustav*

Općenito govoreći, postoje dva oblika obrambenih reakcija, tzv. humoralna obrana, koju čine topive tvari u tjelesnim tekućinama (protutijela ili antitijela), te celularna obrana, u čijoj su osnovi imunološke stanice. Osnovne stanice imunološkog sustava su limfociti. Na osnovi funkcionalnih kriterija razlikuju se T, B i 0 (nula) limfociti, s tim što T-limfociti imaju tzv. regulacijsku i izvršnu podgrupu. U regulacijske se ubrajaju tzv. pomagački T-limfociti, koji potiču ostale limfocite B ili T na reakciju protiv antigena (stranih tijela), te supresijski, koji tu reakciju potiskuju. Efektorski ili izvršni T-limfociti glavni su posrednici stanične imunosti. Dio limfocita B sazrijeva nakon kontakta s nekim antigenom u plazma-stanice koje proizvode različite vrste antitijela (imunoglobulina). Drugi dio tih limfocita funkcionira kao stanice koje pamte (memorijski limfociti B), dok treću vrstu limfocita (limfociti 0) čine tzv. stanice ubojice (K i NK stanice). U imunološkoj reakciji sudjeluju još i fagociti (makrofagi, te neutrofilni i eozinofilni leukociti), kao i medijatorske stanice (mastociti, bazofilni leukociti i trombociti). Limfociti u dodiru s antigenom luče limfokine, koji pojačavaju imunološku reakciju. Količina imunoglobulina (IgA, IgG, IgM) često je zavisna varijabla u PNI ispitivanjima. To su zapravo glikoproteini koji su vezani uz površinu limfocita B kao receptori za antigen (Alegretti i sur., 1991).

Temeljne karakteristike imunološke reakcije su prepoznavanje, specifičnost i tzv. imunološko pamćenje. Prepoznavanje se odnosi na sposobnost imunološkog sustava da razlikuje "vlastito od tuđeg". Specifičnost znači da se reakcija odvija samo prema onom antigenu koji je reakciju pokrenuo. Imunološko pamćenje je sposobnost imunološkog sustava da na ponovni ulazak istog antigena odgovori bržom, jačom i efikasnijom reakcijom. Blalock (1989) razvio je ideju o novoj funkciji imunološkog sustava kao "senzornog organa", koji prepoznaje podražaje koje centralni živčani sustav nije u stanju prepoznati. Ovakve podražaje naziva nekognitivnima, a uključuju bakterije, viruse i ostala strana tijela.

### *Pokazatelji stanja imunološkog sustava*

PNI ispitivanja uključuju mjerenje različitih imunoloških parametara koji ukazuju na efikasnost imunološkog sustava. Kao pokazatelji stanja ovog sustava koriste se kvantitativne varijable, tj. broj različitih vrsta, kao što su T i B

limfociti, NK stanice, neutrofilii, monociti, i sl. Broj različitih stanica u krvi je važan, jer imunološki sustav ne može efikasno reagirati na antigene s minimalnim brojem određenog tipa imunoloških stanica. (Cohen i Herbert, 1996). Veća količina imunoglobulina u krvnom serumu ili slini, koji se često mjere u PNI ispitivanjima, ukazuje na veću efikasnost imunološkog sustava. U nekim ispitivanjima efikasnost imunološkog sustava se određuje na osnovi količine antitijela za Epstein-Barr virus (EBV). Njihov povećan broj ukazuje na slabije stanje imunološkog sustava. Kao pokazatelji funkcionalne razine aktivnosti ovog sustava koriste se reakcije limfocita na mitogene koji potiču njihovo dijeljenje. U imunologiji se koriste standardni mitogeni (fitohemaglutinin (PNA), konkavalin (Con A), te "pokeweed" mitogen (PWM)) da bi se ustanovilo koliko će se uspješno imunološke stanice dijeliti. O efikasnosti imunološkog sustava zaključuje se i na osnovi aktivnosti NK stanica, koje se izlažu djelovanju kancerogenih stanica, a njihova efikasnost u uništavanju ovih stanica ukazuje na stanje sustava. Svaki od navedenih imunoloških parametara mjeri samo jedan aspekt imunološke funkcije, pa se često postavlja pitanje izbora najprikladnijih parametara.

### *Interakcija živčanog, endokrinog i imunološkog sustava*

Iako postoje relativno novi dokazi o dvosmjernoj komunikaciji između živčanog i imunološkog sustava, nije u potpunosti jasno kako se ta komunikacija odvija.

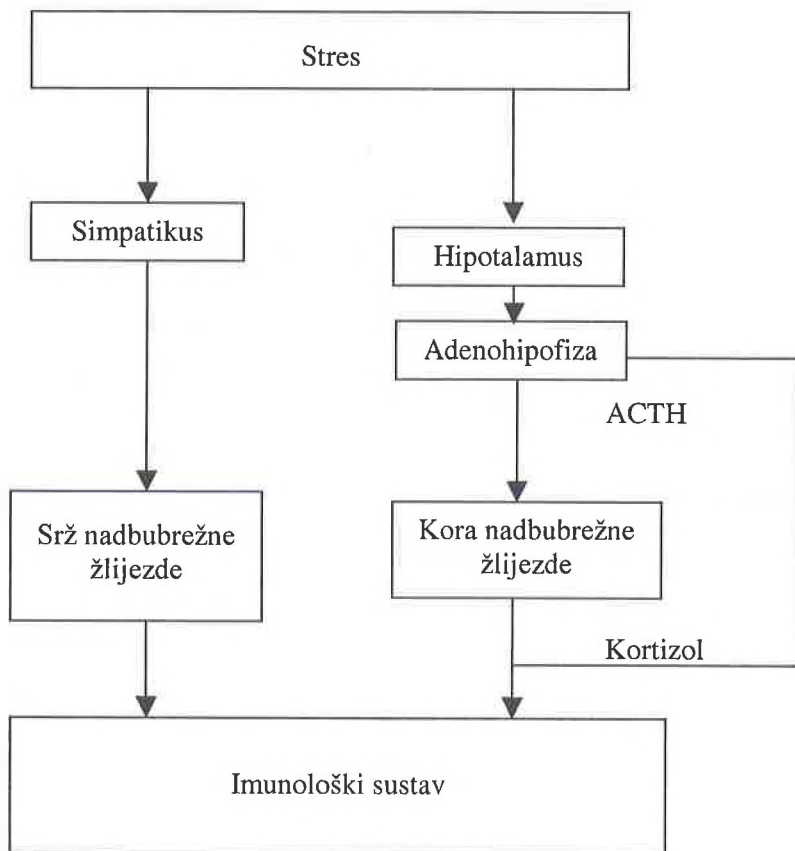
Neke dokaze utjecaja centralnog živčanog sustava na imunološki dali su Ader i Cohen (1975; 1982; 1991) čija su ispitivanja pokazala da se imunološke reakcije mogu uvjetovati. Nadalje, istraživanja koja navodi Dunn (1989) ukazala su na utjecaj lezija mozga na imunitet te na postojanje lateralizacije u kortikalnoj kontroli imunoloških reakcija. Naime, kortikalne lezije lijeve hemisfere, ali ne i desne, dovode do imunoloških deficita u stvaranju limfocita, te u slabljenju aktivnosti NK stanica. Nadalje, lezije lijeve hemisfere slabe funkciju T-limfocita, ali ne utječu na aktivnost B-limfocita i makrofaga, dok lezije desne hemisfere povećavaju funkciju T-limfocita (Ader i sur., 1995). Također, imunološki sustav može djelovati na živčani sustav, preko citokina, koje izlučuju imunološke stanice. Utjecaji viših živčanih struktura na imunološki sustav odvijaju se i preko hipotalamusa. Utvrđeno je da su lezije medijalnih jezgara hipotalamusa povezane sa smanjenjem broja T i B limfocita (Ader i sur., 1995), a lezije anteriornih jezgara sa slabljenjem NK stanične

aktivnosti te sa smanjenom produkcijom imunoglobulina. Lezije limbičkih struktura, septuma, hipokampusa i amigdaloidnih jezgara također utječu na funkcioniranje imunološkog sustava (Dunn, 1989). Kao dokazi simpatičnog djelovanja na imunološki sustav u literaturi se navodi prisustvo beta adrenergičnih receptora na limfocitima u krvi (Dunn 1995a; Dunn 1995b). Prisustvo acetilkolinesteraze na organima imunološkog sustava, kao što su timus, slezena i koštana srž, ukazuje na parasimpatičnu inervaciju ovih organa. Podaci koje navodi Besedovsky i sur. (1985), pokazuju da imunološke stanice imaju receptore za iste neuropeptide koji se nalaze u živčanom i endokrinom sustavu, što opet upućuje na moguću dvosmjernu komunikaciju između živčanog i imunološkog sustava, koja može biti u osnovi negativnih efekata stresa na celularni i humoralni imunitet.

### *Efekti stresa na imunološki sustav*

Sistematsko istraživanje stresa u različitim znanstvenim disciplinama započinje tridesetih godina, zahvaljujući radu H. Selyea (1982). Ovaj autor pod stresom podrazumijeva nespecifične promjene u organizmu, koje nastaju pod utjecajem različitih okolinskih faktora (stresora), tj. stanje organizma koje se manifestira kroz sklop tjelesnih promjena koje je nazvao općim adaptivnim sindromom. Prema Selyeu, stres predstavlja nespecifičnu reakciju organizma na vanjske i/ili unutrašnje promjene, koja prisiljava organizam na prilagodbu novim zahtjevima, tj. ponovnom uspostavljanju narušene unutarnje ravnoteže. Reakcijski sindrom manifestira se na specifičan način u pojačanom lučenju hormona adenohipofize, koji u stanju stresa stimuliraju koru nadbubrežne žlijezde na lučenje kortikosteroida. Istovremeno srž nadbubrežne žlijezde luči katekolamine (adrenalin i noradrenalin), hormone koji podižu razinu opće aktivacije organizma. Selye razlikuje nekoliko faza ovog procesa. U prvoj, tzv. fazi alarma, dolazi do mobilizacije organizma. Iz adenohipofize se luči adrenokortikotropni hormon (ACTH) koji stimulira koru nadbubrežne žlijezde na veću produkciju glukokortikoida i mineralokortikoida. Druga je faza otpora, u kojoj brojne hormonalne promjene potiču obrambene mehanizme, te uspostavljaju unutrašnju ravnotežu organizma. Ova faza je karakteristična po povećanoj razini katekolamina i kortikosteroida u organizmu. U trećoj, fazi iscrpljenja, djelovanje stresora je suzbijeno ili je pak organizam odustao od borbe. Ako organizam odustaje od borbe, dolazi do narušavanja normalnog funkcioniranja, a u drastičnim okolnostima i do smrti. Pokusi na životinjama,

koje je Selye (1979) podvrgao različitim stresorima (intoksikacija, visoka i niska temperatura, infekcije, i sl.), pokazali su da se, bez obzira na prirodu podražaja koji ga je izazvao, javlja reakcijski sindrom. Nakon izlaganja životinja stresu, uočio je i promjene u nekim aspektima imunološkog sustava (opadanje stvaranja imunoglobulina, slabljenje reakcija T i B limfocita na mitogene, te slabljenje aktivnosti NK stanica).



Slika 1. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na imunološki sustav

Istraživanja potaknuta Selyevim pristupom, polaze od pretpostavke da su dva sustava uključena u reakcije na stres (Slika 1.). Aktivacija sustava simpatikus-srž nadbubrežne žlijezde praćena je lučenjem katekolamina u krv,

koji smanjuju efikasnost limfocita (Benscop i sur., 1996). Aktivacija pak sustava hipotalamus - hipofiza - kora nadbubrežne žlijezde rezultira povećanim lučenjem adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i kortikosteroida, osobito kortizola. Utvrđeno je da kortizol ima veći supresivni utjecaj na celularni (T-limfociti) nego na humoralni (B-limfociti) imunitet (Weisse i sur., 1998), pa reducira broj limfocita, slabi njihove reakcije na mitogene, te djeluje supresijski na aktivnost NK stanica (O'Leary, 1990). Prema nekim autorima (Ader i sur., 1995) imunosupresijski efekti kortizola opaženi su uglavnom poslije farmakoloških doza ovog hormona, dok je njegova fiziološka funkcija normalna regulacija imunoloških stanja, pa može i jačati imunološki sustav. Imunološki sustav također utječe na aktivaciju sustava hipotalamus-hipofiza-kora nadbubrežne žlijezde, tj. na lučenje kortizola, preko citokina koje izlučuju imunološke stanice (Ader i sur., 1995). Nadalje, u nekim imunološkim promjenama (proliferacija limfocita) živčani sustav ima veću ulogu u imunološkim promjenama induciranim stresom nego sustav hipotalamus-hipofiza - kora nadbubrežne žlijezde (Herbert i Cohen, 1993). U stresnim situacijama povećava se i lučenje tiroksina, tireotropina, vazopresina, prolaktina, od kojih neki utječu i na imunološke procese (Jemmot i Locke, 1984). Efekti povećanog lučenja endogenih opioida u stresnim situacijama na imunološki sustav također su kompleksni. Tako, na primjer endorfini imaju facilitatorne efekte na neke imunološke parametre te inhibitorne na druge (Dunn, 1989).

### *Efekti akutnog i kroničnog stresa na imunološki sustav*

U dosadašnjim PNI ispitivanjima ispitivani su efekti "akutnih laboratorijskih stresora", čije je trajanje bilo manje od pola sata, "kratkotrajni prirodni" s trajanjem između jednog dana i mjeseca (npr. studentski ispiti), te "dugotrajni prirodni", čije je trajanje bilo duže od jednog mjeseca (npr. smrt bračnog partnera).

Akutni laboratorijski stresori - U laboratorijskim ispitivanjima imunoloških reakcija na akutni stres korišteni su zadaci u kojima su ispitanici odbrojavali unatrag po sedam od zadanog četveroznamenkastog broja (tzv. zadaci mentalne aritmetike), Stroopov test, nerješivi problemni zadaci i sl. Rezultati ovih ispitivanja pokazali su povećano lučenje salivarnog imunoglobulina A (Carroll i sur., 1996), povećanje aktivnosti NK stanica (Delahanty i sur., 1996; Benschop et al., 1995), kao i broja T limfocita i

katekolamina (Sgoutas-Emch i sur., 1994) neposredno nakon izvođenja ovih zadataka. Imunološke promjene u ovim ispitivanjima objašnjavane su aktivacijom sustava simpatikus-srž nadbubrežne žlijezde, iako u većini ovih ispitivanja (Benschop i sur., 1995; Delahanty i sur., 1996; Wilemsen, 1997) razine katekolamina nisu ni mjerene.

Iako ova ispitivanja u laboratorijskim uvjetima, kao i ona u prirodnim, doprinose boljem razumijevanju mehanizama kojima stres inducira imunološke promjene, relativno kratko trajanje eksperimentalnih postupaka nije dovoljno za opažanje cijelog procesa koji često ima i dugoročne efekte. Naime, u laboratorijskim ispitivanjima vrši se odabir manjeg broja (dopuštenih) stresora i ispitanikovih reakcija, što ne odgovara složenosti stresora vanjskog svijeta. Zbog navedenih razloga čini se da je zaključivanje o reakcijama na stres na osnovu rezultata dobivenih u ovakvim uvjetima ograničeno, a katkada i nemoguće.

*Kratkotrajni prirodni stresori* - U ispitivanjima efekata kratkotrajnih prirodnih stresora na imunološki sustav, najviše je ispitivan tzv. ispitni stres. Rezultati niza ispitivanja pokazali su da ovaj stresor može narušiti funkciju imunološkog sustava (Glaser i sur., 1985a; Glaser i sur., 1985b; Glaser i sur., 1986; Glaser i sur., 1987; Glaser i sur., 1997; McCann i sur., 1996). Rezultati navedenih ispitivanja potvrdili su hipotezu o slabljenju nekih aspekata imunološkog sustava u ispitnom periodu, dok mehanizmi kojima ispitni stres inducira imunosupresiju, nisu još uvijek poznati. Nepostojanje značajnih povezanosti između doživljaja stresa, razine kortizola i nekih aspekata imuniteta (broj antitijela EBV) (Glaser i sur., 1985a; Glaser i sur., 1987; Glaser i sur., 1997) daje indikacije da i drugi hormoni mogu biti uključeni u reguliranje imunoloških reakcija.

*Dugotrajni prirodni (kronični) stresori* - Brojna PNI ispitivanja imala su za cilj da utvrde događa li se adaptacija imunološkog sustava kada je stresor prisutan dugo vremena. Rezultati ovih ispitivanja pokazali su povezanost stresnih životnih događaja (smrt bračnog partnera, rastava braka, njegovanje člana obitelji s Alzeimerovom demencijom) sa slabljenjem nekih aspekata imunološkog sustava (Irwin i sur., 1987a; Irwin i sur., 1987b; Irwin i sur., 1988; Biondi i Kotzalidis, 1990; Kiecolt-Glaser i sur., 1987; Kiecolt-Glaser i sur., 1996a; Malarkey i sur., 1996). Za razliku od laboratorijskih stresora, ovi stresori popraćeni su depresivnim i anksioznim stanjima te drugim afektivnim reakcijama, koje mogu imati dodatne negativne efekte na imunološki sustav.

Čini se da akutni i kronični stresori imaju različite imunološke efekte, gdje akutni laboratorijski stresori kratkotrajno povećavaju neke imunološke

parametre (broj T-limfocita, aktivnost NK stanica i sl.), dok ih kronični smanjuju. Pretpostavlja se da su imunološke promjene nakon izlaganja akutnim stresorima najvjerojatnije uvjetovane povećanim lučenjem katekolamina, tj. aktivacijom sustava simpatikus - srž nadbubrežnih žlijezda. Nasuprot ovome, kronični stresori aktiviraju sustav hipotalamus – hipofiza - kora nadbubrežne žlijezde, tj. dovode do povećanja razine kortizola. Dosadašnja ispitivanja ipak ne potvrđuju hipotezu o imunosupresijskim efektima kortizola kod kroničnog stresa. Većina ovih ispitivanja su korelacijska, tj. o imunosupresijskim efektima kortizola zaključivalo se na osnovu korelacija između njegove razine u krvi ili slini i ispitivane imunološke varijable. Tek su u nekoliko ispitivanja nađene povezanosti između razine ovog hormona i imunoloških varijabli (Irwin i sur., 1987a; Kiecolt-Glaser i sur., 1996b). U dosadašnjim ispitivanjima efekata stresa na imunološki sustav uglavnom su nađene imunološke promjene, dok se razina kortizola nije značajno mijenjala (Glaser i sur., 1987; Glaser i sur., 1997; Malarkey i sur., 1996; Irwin i sur., 1997; Šimić, 1999). U nekim ispitivanjima dobivene su značajne promjene kortizola i imuniteta u stresnoj situaciji, ali one nisu bile povezane (Zeier i sur., 1996).

### *Metodološke poteškoće u PNI ispitivanjima*

Konзумacija alkohola - Osnovna kritika PNI ispitivanja svodi se na to da efekti stresa na imunološki sustav mogu biti posredovani poremećajem prehrane, pušenjem, konzumiranjem alkohola ili poremećajem spavanja koje prati stres. Depresivne i anksiozne osobe češće posežu za alkoholom, što ima direktne negativne efekte na imunološki sustav, kao i indirektne preko promjena u ishrani (Cohen i Herbert, 1996; Irwin i sur., 1990b). Povećana konzumacija alkohola povezana je sa smanjenom NK aktivnošću te povećanim brojem leukocita, neutrofila i monocita (Irwin i sur., 1990a). Ova varijabla u nekim ispitivanjima (Canals i sur., 1997) promatrana je kao stimulator sustava hipotalamus-hipofiza-kora nadbubrežne žlijezde, a dobiveni rezultati nisu pokazali značajne efekte na razinu kortizola u krvi. Nekontrolirani efekti ove varijable mogu rezultirati pogrešnim zaključcima o mehanizmima kojima stres inducira imunološke promjene. Postoji nekoliko različitih metoda za procjenjivanje potrošnje alkoholnih pića. Najjednostavnija, te najčešće korištena metoda uključuje samoiskaz ispitanika o dnevnoj ili pak, tjednoj potrošnji. U nekim ispitivanjima (Sgoutas-Emch i sur., 1994; Malarkey i sur., 1996), ispitanici koji su izjavljivali da uzimaju više od 10 alkoholnih pića tjedno,

izostavljeni su iz uzorka. Poznato je da su osobe koje pretjerano konzumiraju, alkohol sklone podcijeniti njegovo uzimanje. Osim toga, neke osobe mogu piti veće količine alkoholnih pića, a da se to ne odražava negativno na imunološke funkcije. Analiza urina daje veći stupanj pouzdanosti za isključenje iz uzorka onih ispitanika čija konzumacija alkohola može rezultirati negativnim efektima na imunitet.

Pušenje također rezultira negativnim efektima na imunitet pa su zbog toga u nekim ispitivanjima (Manuck i sur., 1991) bili eliminirani ispitanici koji puše, naročito kada se radilo o mjerenjima katekolamina. U nekim pak drugim ispitivanjima (Sgoutas-Emch i sur., 1994; Malarkey i sur., 1996; Šimić, 1999) iz uzorka su isključeni ispitanici koji su izjavljivali da puše kutiju ili više cigareta dnevno. Nikotinu se pripisuju antidepresivni efekti, a pušenje više od 10 cigareta dnevno povezano je s povišenim razinama salivarnog kortizola (Canals i sur., 1997), te sa smanjenjem broja pomagačkih T-limfocita (Fletcher i sur., 1998). Pouzdanija metoda za diskriminiranje pušača i nepušača uključuje mjerenje razine kotinina, metabolita, nikotina u urinu, slini ili krvi (Schneider i sur., 1997).

Poremećaj spavanja i prehrane - Deprivacija spavanja dva-tri dana može promijeniti imunološke reakcije, što se očituje u povećanoj produkciji interferona i oslabljenim reakcijama limfocita na mitogene (Fletcher i sur., 1998), te u povećanoj razini katekolamina i kortizola (Jemmot i Locke, 1984). Promjene u navikama uzimanja hrane u stresnim situacijama, bilo da se radi o pretjeranom uzimanju ili pak gubitku apetita, također imaju negativne efekte na stanični i humoralni imunitet (Kiecolt-Glaser i Glaser, 1988). Stoga podaci o prehrani ispitanika trebaju biti sastavni dio svakog PNI ispitivanja. Najlakši, a ujedno i najjednostavniji postupak procjene poremećaja prehrane ispitanika uključuje njihov iskaz o promjenama tjelesne težine. Danas se u PNI ispitivanjima koriste biokemijske analize za utvrđivanje ovog poremećaja (mjerenje razine albumina u krvi). Većina ispitivanja koja su izvršili Kiecolt-Glaser, Glaser i suradnici (Glaser i sur., 1985a; Glaser i sur., 1985b; Kiecolt-Glaser i sur., 1987; Glaser i sur., 1987), uključivala je praćenje dužine spavanja i prehrane ispitanika. Njihovi rezultati pokazali su da poremećaji prehrane i spavanja za vrijeme stresne situacije ne interferiraju s imunološkim promjenama. U još nekim ispitivanjima (Esterling i sur., 1994) promjene u navikama spavanja i prehrane za vrijeme stresa nisu korelirali s imunološkim promjenama. Čini se da će PNI ispitivanja u kojima su kontrolirani efekti ovih varijabli, doprinijeti boljem razumijevanju mehanizama kojima stres inducira imunološke promjene.

*Odabir ispitanika* - Da bi se imunološke promjene mogle pripisati efektima stresa, iz uzorka treba isključiti ispitanike s kroničnim bolestima, koji uzimaju lijekove, kao i rekonvalescentne. Ako se imunološki i/ili endokrinološki parametri uzimaju iz uzoraka krvi, također treba isključiti ispitanice koje uzimaju oralne kontraceptive, zbog njihovih efekata na imunološke funkcije. Čini se da estrogeni imaju imunomodulatorne efekte jer su nađene varijacije u aktivnosti NK stanica tijekom menstrualnog ciklusa (Lukomska i sur., 1983; prema Kiecolt-Glaser i Glaser, 1988). Stoga u cilju izbjegavanja metodoloških pogrešaka u ovakvim ispitivanjima, u uzorak treba uzimati ispitanice koje su u istim fazama menstrualnog ciklusa u vrijeme ispitivanja. Metodološke poteškoće također se javljaju u PNI ispitivanjima na starijim ispitanicima. Ispitanike iznad 70 godina, koji ne uzimaju lijekove i nisu kronično bolesni nebi trebalo stavljati u uzorak. Mogućnosti generaliziranja dobivenih rezultata su limitirane jer gotovo i nema stare osobe koja ne uzima lijekove, tj. nije kronično bolesna.

U PNI ispitivanjima važan je i izbor kontrolne skupine ispitanika. Ova skupina ispitanika može imati povećan broj antitijela, kao i neke druge imunološke promjene koje prate svakodnevne stresne događaje. Istraživači najčešće ne provjeravaju stupanj stresa na ovoj skupini. U nekim ispitivanjima (Irwin i sur., 1990a; Irwin i sur., 1990b; Irwin i sur., 1991; Schleifer i sur., 1984; Schleifer i Keller, 1992) ispitivani su efekti depresije na imunitet hospitaliziranih pacijenata, a dobivena imunosupresija može se pripisati hospitalizaciji koja sama po sebi djeluje kao stresor na pacijente. Hospitalizacija može također rezultirati promjenama u navikama hranjenja i spavanja, koje nisu ispitivane, a koje opet mogu dodatno narušiti funkcioniranje imunološkog sustava. U nekim ispitivanjima (Delisi i sur., 1986, prema Kiecolt-Glaser i Glaser, 1988) ispitanici kontrolne skupine radili su na psihijatrijskim odjelima, a upravo ovakva vrsta posla je stresna za zaposleno osoblje.

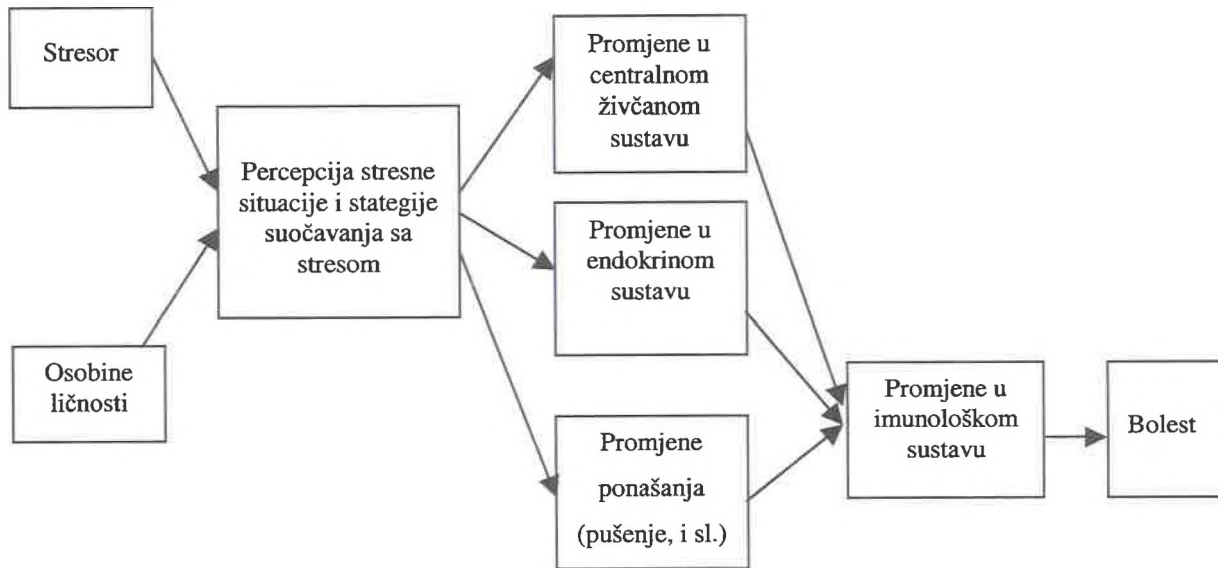
*Laboratorijske analize uzoraka krvi i/ili sline* - U većini novijih PNI ispitivanja korištena je analiza uzoraka sline za određivanje razine kortizola i/ili imunoloških parametara, bez kontrole ukupne količine producirane sline, koja može biti povećana ili smanjena u stresnoj situaciji. U nekim ispitivanjima (Evans i sur., 1997) razina salivarnog IgA bila je pozitivno povezana s ispitaničkim procjenama doživljaja stresa te s ukupnom količinom producirane sline. Kirschbaum i Hellhammer (1989) navode međutim da količina producirane sline ne utječe značajno na razinu kortizola. Uzimanje uzoraka sline, za razliku od uzoraka krvi, za ispitanike nije stresno, te je primjenjivo na ispitanicima koje uzimaju oralne kontraceptive, koji ne utječu na razinu

salivarnog kortizola (Kirschbaum i Hellhammer, 1989). Iako razine salivarnog kortizola visoko koreliraju s razinama kortizola u krvi (Nicolson, 1992), za pretpostaviti je da su njegove razine stabilnije u krvi nego u slini.

Dodatni problem za istraživače predstavlja čuvanje uzoraka krvi i/ili sline. Vrijeme čuvanja uzoraka krvi može imati značajne efekte na imunološke parametre. Stoga bi u ovim ispitivanjima uzorke krvi eksperimentalne i kontrolne skupine trebalo uzimati u isto vrijeme. Za razliku od imunoloških parametara, čini se da su razine kortizola u krvi stabilne, tj. ne mijenjaju se značajno u uzorcima koji su čuvani na sobnoj temperaturi 24 sata (Nicolson, 1992). Prema Kirschbaum i Hellhammer (1989) razine kortizola u krvi stabilne su na sobnoj temperaturi 30 dana. S ciljem kontroliranja dnevnih varijacija u razinama ovog hormona i imunoloških varijabli, uzorke krvi ili sline treba uzimati u isto doba dana. Ispitivanja cirkadijurnih varijacija razine kortizola pokazala su da su njegove razine najveće u jutarnjim satima, kada su i najstabilnije, dok su u poslijepodnevnom i večernjim satima više pod utjecajem eksternalnih faktora.

### *Zaključak*

U zaključku treba kazati da su PNI ispitivanja komplicirana, a samim time i metodološki zahtjevna, jer je imunološki sustav dio kompleksne interaktivne mreže koju čine mozak, neurotransmiteri, hormoni te različite vrste imunoloških stanica, o čemu treba voditi računa, osobito u interpretaciji dobivenih rezultata. Uz sve već navedeno, treba kazati da je rezultate različitih ispitivanja teško uspoređivati zbog korištenja različitih stresora, različitih metoda uzimanja uzoraka sline ili krvi, u različito doba dana, te korištenja različitih imunoloških parametara. Dodatne efekte na imunološki sustav mogu imati i ranije spomenute varijable, koje su povezane s navikama uzimanja različitih tvari (hrana, piće, pušenje i sl.), te spavanje. One mogu pogoršati funkcioniranje imunološkog sustava, a njihove efekte u PNI ispitivanjima treba kontrolirati, osobito kada se radi o kroničnom stresu. Različiti razlozi isključivanja ispitanika iz uzorka za sobom povlače nemogućnost generaliziranja dobivenih rezultata. U principu, ovakva ispitivanja treba provoditi na zdravim ispitanicima, na kojima u razdoblju od nekoliko dana, treba ponoviti psihološka i imunološka mjerenja. Ispitivanja sa složenijim i eksplikativnijim modelima omogućit će utvrđivanje kauzalnih veza među varijablama uključenima u ovakva ispitivanja (Slika 2.). Složeniji statistički postupci dat će uvid u uzročno-posljedične veze međusobno koreliranih varijabli stresa i funkcioniranja imunološkog sustava.



Slika 2. Efekti stresa na imunološki sustav

*Literatura*

- ADER, R., and COHEN, N. (1975): Behaviorally Conditioned Immunosuppression, *Psychosomatic Medicine*, 37, 4, 333-340.
- ADER, R., and COHEN, N. (1982): Behaviorally conditioned Immunosuppression and Murine Systemic Lupus Erythematosus, *Science*, 215, 1534-1536.
- ADER, R., and COHEN, N. (1991): The Influence of Conditioning on Immune Responses (private communication).
- ADER, R., COHEN, N. and FELTEN, D. (1995): Psychoneuroimmunology: Interactions Between the Nervous System and the Immune System, *The Lancet*, 345, 99-103.
- ALEGRETTI, N., ANDREIS, I., ČULO, F., MARUŠIĆ, M., TARADI, M. (1991): *Imunologija*, Zagreb, Školska knjiga.
- BASEDOVSKY, H.O., REY, A.E., and SORKIN, E. (1985): Immunoneuroendocrine Interactions, *The Journal of Immunology*, 135, 750-754.
- BENSCHOP, R. J., RODRIGUEZ-FEUERHAHN, M. and SCHEDLOWSKI, M. (1996): Catecholamine-Induced Leukocytosis: Early Observations, Current Research, and Future Directions, *Brain, Behavior, and Immunity*, 10, 77-91.
- BIONDI, M. and KOTZALIDIS, G. H. (1990): Human Psychoneuroimmunology Today, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 4, 22-38.
- BLALOCK, J. E. (1989): A Molecular Basis for Bidirectional Communication between the Immune and Neuroendocrine Systems, *Physiological Reviews*, 69, 1-32.
- CANALS, J., COLOMINA, M. T., DOMINGO, J. L. and DOMENECK, E. (1997): Influence of Smoking and Drinking Habits on Salivary Cortisol Levels, *Personality and Individual Differences*, 23, 4, 593-599.
- CARROLL, D., RING C., SHRIMPTON, J., EVANS, P., WILLWMSSEN, G. and HUCKLEBRIDGE, F. (1996): Secretory Immunoglobulin A and Cardiovascular Responses to Acute Psychological Challenge, *International Journal of Behavior Medicine*, 3, 3, 266-279.
- COHEN, S. and HERBERT, T. B., (1996): Health Psychology: Psychological Factors and Physical Disease from the Perspective of Human Psychoneuroimmunology, *Annual Review of Psychology*, 47, 113-142.

- DELAHANTY, D. L., DOUGLALL, A. L., HAWKEN, L., TRAKOWSKI, J. H., SCHMITZ, J. B., JENKINS, F. J. and BAUM, A. (1996): Time Course of Natural Killer Cell Activity and Lymphocyte Proliferation in Response to Two Acute Stressors in Healthy Men, *Health Psychology*, 15, 1, 48-55.
- DUNN, A. J., (1989): Psychoneuroimmunology for the Psychoneuroendocrinologist: A Review of Animal Studies of Nervous System - Immune System Interactions, *Psychoneuroendocrinology*, 14, 4, 251-274.
- DUNN, A., J. (1995a): Interactions between the Nervous System and Immune System. Implications for Psychopharmacology, in: *The Fourth Generation of Progress* (Ed. Bloom, F.E., and Kupfer, D., J.), New York, Raven Press, Ltd.
- DUNN, A., J. (1995b): *Psychoneuroimmunology: Introduction and General Perspectives*, in *Stress, the Immune System and Psychiatry* (Ed. Leonard, B., Miller, K.), John Wiley and Sons Ltd.
- ESTERLING, B. A., KIECOLT-GLASER, J. K., BODNAR, J. C. and GLASER, R. (1994): Chronic Stress, Social Support, and Persistent Alterations in the Natural Killer Cell Response to Cytokines in Older Adults, *Health Psychology*, 12, 291-298.
- EVANS, P., CLOW, A. and HUCKLEBRIDGE, F. (1997): Stress and the Immune System, *The Psychologist*, 7, 303-307.
- FLETCHER, M. A., IRONSON, G., GOODKIN, K., ANTONI, M. H., SCHNEIDERMAN, N. and KLIMAS, N. G. (1998): *Stress and Immune Function in HIV-1 Disease*, in: *Handbook of Stress Medicine: An Organ System Approach* (Ed. J. R. Hubbard, J. R. and Workman, E.A.), New York, CRC Press.
- GLASER, R., KIECOLT-GLASER, J. K., SPEICHER, C. E. and HOLLIDAY, J. E. (1985a): Stress, Loneliness, and Changes in Herpesvirus Latency, *Journal of Behavioral Medicine*, 8, 3, 249-260.
- GLASER, R., KIECOLT-GLASER, J. K., STOUT, J. C., KATHIEEN, L., T., SPEICHER, C. E. and HOLLIDAY, J. (1985b): Stress-Related Impairments in Cellular Immunity, *Psychiatry Research*, 16, 233-239.
- GLASER, R., MEHL, V. S., PENN, G., SPEICHER, C. E. and KIECOLT-GLASER, J. K. (1986): Stress-Associated Changes in Immunoglobulin Levels (private communication).
- GLASER, R., RICE, J., SHERIDAN, J., FERTEL, R., STOUT, J., SPEICHER, C., PINSKY, D., KOTUR, M., POST, A., BECK, M. and KIECOLT-

- GLASER, J. K. (1987): Stress-Related Immune Suppression: Health Implication, *Brain, Behavior, and Immunity*, 1, 7-20.
- GLASER, R., PEARL, D. K., KIECOLT-GLASER, J. K. and MALARKEY, W. B. (1997): Plasma Cortisol Levels and Reactivation of Latent Epstein-Barr Virus in Response to Examination Stress (private communication).
- HERBERT, T. B. and COHEN, S. (1993): Stress and Immunity in Humans: A *Meta-Analytic Review*, *Psychosomatic Medicine*, 55, 364-379.
- IRWIN, M., DANIELS, M., SMITH, T. L., BLOOM, E. and WEINER, H. (1987a): Impaired Natural Killer Activity During Bereavement, *Brain, Behavior, and Immunity*, 1, 98-104.
- IRWIN, M., DANIELS, M., BLOOM, E. T., SMITH, T. L. and WEINER, H. (1987b): Life Events, Depressive Symptoms, and Immune Function, *American Journal of Psychiatry*, 144, 437-441.
- IRWIN, M., DANIELS, M., RISCH, S. C., BLOOM, E. and HERBERT, W. (1988): Plasma Cortisol and Natural Killer Cell Activity during Bereavement, *Biological Psychiatry*, 24, 173-178.
- IRWIN, M., CALDWELL, C., SMITH, T. L., BROWN, S., SCHUCKIT, M. A. and GILLIN, C. (1990a): Major Depressive Disorder, Alcoholism, and Reduced Natural Killer Cell Cytotoxicity. Role of Severity of Depressive Symptoms and Alcohol Consumption, *The Archives of General Psychiatry*, 47, 713-719.
- IRWIN, M., PATTERSON, T., SMITH, T. L., CALDWELL, C., BROWN, S. A., GILLIN, J. C. and GRANT, I. (1990b): Reduction of Immune Function in Life Stress and Depression, *Biological Psychiatry*, 27, 22-30.
- IRWIN, M., BROWN, M., PATTERSON, T., HAUGER, R., MASCOVICH, A. and GRANT, I. (1991): Neuropeptide Y and Natural Killer Activity: Findings in Depression and Alzheimer Caregiver Stress. Neural Modulation of Immunity, *The FASEB Journal*, 5, 3100-3107.
- IRWIN, M., HAUGER, R., PATTERSON, T. L., SEMPLE, S., ZIEGLER, M. and GRANT, I. (1997): Alzheimer Caregiver Stress: Basal Natural Killer Cell Activity, Pituitary-Adrenal Cortical Function, and Sympathetic Tone, *Ann. Behavioral Medicine*, 19, 2, 83-90.
- JEMMOTT, J. B. and LOCKE, S. E. (1984): Psychosocial Factors, Immunologic Mediation, and Human Susceptibility to Infectious Diseases: How Much Do We Know? *Psychological Bulletin*, 95, 1, 78-108.

- KIECOLT-GLASER, J. K., FISHER, L. D., OGROCKI, P., STOUT, J. C., SPEICHER, C. E. and GLASER, R. (1987): Marital Quality, Marital Disruption, and Immune Function, *Psychosomatic Medicine*, 49, 13-34.
- KIECOLT-GLASER, J. K. and GLASER, R. (1988): Commentary: Methodological Issues in Behavioral Immunology Research with Humans, *Brain, Behavior, and Immunity*, 2, 67-78.
- KIECOLT-GLASER J. K., GLASER R., GRAVENSTEIN S., MALARKEY W. B. and SHERIDAN J. (1996a): Chronic Stress Alters the Immune Response to Influenza Virus Vaccine in Older Adults, *Medical Sciences*, 93, 3043-3047.
- KIECOLT-GLASER, J. K., NEWTON, T., CACIOPPO, J. T., Maccallum, R. C., GLASER, R. and MALARKEY, W. B. (1996b): Marital Conflict and Endocrine Function: Are Men Really More Physiologically Affected Than Women? *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 64, 2, 324-332.
- KIRSCHBAUM, C. and HELHAMMER, D. H. (1989): Salivary Cortisol in Psychobiological Research: An Overview, *Neuropsychobiology*, 22, 150-169.
- MALARKEY W. B., WU H., CACIOPPO J. T., MALARKEY K. L., POEHLMANN M. and GLASER R., KIECOLT-GLASER J. K. (1996): Chronic Stress Down-Regulates Growth Hormone Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Older Adults, *Endocrine*, 5, 1, 33-39.
- MANUCK, S. B., COHEN, S., RABIN, B. S., MULDOON, M. F. and BACHEN, E. A. (1991): Individual Differences in Cellular Immune Response to Stress, *Psychological Science, Research Report*, 2, 2, 111-115.
- MCCANN, B. S., BENJAMIN A. H., WILKINSON C. W., CARTER J., RETZLAFF B.M., RUSSO J., KNOPP R. H. (1996): Variations in Plasma Lipid Concentration During Examination Stress, *International Journal of Behavioral Medicine*, 3, 3, 251-265.
- NICOLSON, N. A. (1992): Stress, coping and cortisol dynamics in daily life, in: *The Experience of Psychopathology: Investigating Mental Disorders in their Natural Settings* (Ed. DeVries, M. W.), Cambridge, Cambridge University Press, 219-232.
- O'LEARY, A., (1990): Stress, Emotion, and Human Immune Function, *Psychological Bulletin*, 108, 3, 363-382.

- SCHLEIFER, S. J., KELLER, S. E., MEYERSON, A. T., RASKIN, M. J., DAVIS, K. L. and STEIN, M. (1984): Lymphocyte Function in Major Depressive Disorder, *Archives of General Psychiatry*, 41, 484-486.
- SCHLEIFER, S. J., and KELLER, S. E. (1992): Stressful Events, Depressive Disorders and Immunity, in: *Psychoneuroimmunology. Interactions Between Brain, Nervous System, Behavior, Endocrine and Immune System* (Ed. Schmoll, H.L. and Plotnikoff, N.P.), Lewiston, NY, Toronto, Bern, Gottinger, Hogrefe and Huber Publishers.
- SCHNEIDER, N., JACOB, P., NILSSON, F., LEISCHOW, S. J., BENOWITZ, N. L. and OLMSTEAD, R. E. (1997): Saliva Cotinine Levels as a Function of Collection Method, *Addiction*, 92, 3, 347-351.
- SELYE, H. (1979): The Stress Concept and Some of its Implications, in *Human Stress and Cognition. An Information Processing Approach* (Ed. Hamilton, V., Warburton, M.), New York, John Wiley and sons.
- SELYE, H., (1982): History and Present Status of the Stress Concept, in *Handbook of Stress* (Ed. Goldberger, L. and Breznitz, S.), New York, Macmillan Publishing Co Inc.
- SGOUTAS-EMCH, S. A., CACIOPPO, J. T., UCHINO, B. N., MALARKEY, W., PEARL, D., KIECOLT-GLASER, J. K. and GLASER, R. (1994): The Effects of an Acute Psychological Stressor on Cardiovascular, Endocrine, and Cellular Immune Response: A Prospective Study of Individuals High and Low in Heart Rate Reactivity, *Psychophysiology*, 31, 264-271.
- ŠIMIĆ, N. (1999): Efekti stresa na imunološki sustav, Magistarski rad, Filozofski fakultet, Zagreb.
- WEISSE, C. S., GALLIVEN, E. A., STERNBERG, W. F., and SULLIVAN, E. R. (1998): Does Cortisol Mediate Stress-Induced Immune Changes in Humans? (private communication).
- WILLEMSEN, G. (1997): Secretory Immunoglobulin A and Cardiovascular Responses to Mental Arithmetic and Cold Pressor (private communication).
- ZEIER, H., BRAUCHLI, P. and JOLLER-JEMELKA, H.I. (1996): Effects of Work Demands on Immunoglobulin A and Cortisol in Air Traffic Controllers, *Biological Psychology*, 42, 413-423.

*Nataša Šimić*: SOME METHODOLOGICAL DIFFICULTIES IN  
PSYCHONEUROIMMUNOLOGICAL RESEARCH

*S u m m a r y*

The term psychoneuroimmunology refers to a relatively new multidisciplinary field of research which is aimed at the investigation of the dynamic interaction between the nervous, endocrine and the immunological system. The article gives a brief overview of existing investigations of the effect of stress on the immunological system and points to certain methodological difficulties of these investigations.

KEY WORDS: psychoneuroimmunology, stress, immunological system