

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Draga N. Dimitrijević

**FRAKTALNA I TEKSTURALNA ANALIZA
STRUKTURE HROMATINA LIMFOCITA
KRVI KOD PACIJENATA SA RAZLIČITIM
STEPENOM DEPRESIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Draga N. Dimitrijević

**FRACTAL AND TEXTURAL ANALYSIS
OF BLOOD LYMPHOCYTE CHROMATIN
STRUCTURE IN PATIENTS WITH
DIFFERENT GRADES OF DEPRESSION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTOR: Doc. dr Igor Pantić, fiziolog, psihijatar, docent na Katedri za medicinsku fiziologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof. dr Aleksandar Damjanović**, psihijatar, profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Katedra za psihijatriju
2. **Prof. dr Dejan Nešić**, fiziolog, vanredni profesor na Katedri za medicinsku fiziologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. **Doc. dr Biserka Vukomanović Đurđević**, patolog, docent na Univerzitetu odbrane, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

Datum odbrane:

FRAKTALNA I TEKSTURALNA ANALIZA STRUKTURE HROMATINA LIMFOCITA KRVI KOD PACIJENATA SA RAZLIČITIM STEPENOM DEPRESIJE

Rezime

Uvod. Imajući u vidu dokazanu povezanost između promena u strukturnoj kompleksnosti tkiva i pojedinih fizioloških i patoloških procesa, pretpostavili smo da u toku depresije dolazi do smanjenja strukturne kompleksnosti nukleusnog hromatina limfocita, odnosno da sa povećanjem depresivnih simptoma dolazi do smanjenja hromatinske fraktalne dimenzije. Takođe smo pretpostavili da su depresivni simptomi u pozitivnoj korelaciji sa nivoom hromatinske neuređenosti, odnosno da teksturalna entropija hromatina limfocita raste sa povećanjem depresije kod pacijenata. Ciljevi istraživanja su bili: (1) Utvrditi postojanje razlike u fraktalnim i teksturalnim parametrima hromatina limfocita između pacijenata sa depresijom, i ispitanika koji ne zadovoljavaju dijagnostičke kriterijume za depresiju i (2) Utvrditi postojanje i jačinu korelacije između stepena depresije i fraktalnih, odnosno teksturalnih parametara hromatina limfocita

Metod. Istraživanje je dizajnirano po tipu studije preseka i obavljeno na uzorku od 100 ispitanika, od kojih 50 pacijenata obolelih od rekurentnog depresivnog poremećaja lečenih u Klinici „Dr Laza Lazarević“ u Beogradu. Kontrolnu grupu je činilo 50 ispitanika koji su pripadali drugim dijagnostičkim kategorijama, a nisu ispunjavali dijagnostičke kriterijume za depresiju. Eksperimentalni protokol je sproveden na sledeći način: uzimanje detaljne istorije bolesti, primena Bekove skale za procenu depresije i Skale

depresivnosti, anksioznosti i stresa DASS-21, uzimanje krvi za standardne hormonske (tireoidni hormoni) i biohemijske analize. Upravo sa uzimanjem krvi za analize, pristupilo se pravljenju krvnih razmaza na predmetnim staklima i njihovom fiksiranju u metanolu. Krvni razmazi su bili obojeni modifikacijom metode Gimza bojenja po uzoru na prethodno publikovanu studiju u kojoj su autori radili fraktalnu analizu hromatina krvnih ćelija. Nakon bojenja razmaza, kreirani su digitalni mikrografi limfocita i svaki ispitivani limfocit je izračunata prosečna vrednost hromatinske fraktalne dimenzije, lakunarnosti, entropije, angularnog drugog momenta, teksturalnog kontrasta, varijanse, teksturalne korelacije i inverznog momenta razlike, po ugledu na prethodno publikovane studije. Nakon toga za svakog pacijenta izračunali smo prosečne vrednosti ovih parametara. Kao dodatak, u *in vitro* delu studije, ispitivana je mogućnost da dopamin, odnosno njegov derivat oksidopamin ima određenu ulogu u promenama fraktalnih i teksturalnih (GLCM) parametara hromatina limfocita.

Rezultati. Postojala je značajna razlika u pogledu fraktalnih parametara jedra limfocita periferne krvi između pacijenata sa depresijom i kontrolne grupe. Sa druge strane, nije bilo značajne razlike u pogledu teksturalnih parametara hromatina limfocita između pacijenata sa depresijom i kontrolne grupe. Kod pacijenata obolelih of rekurentnog depresivnog poremećaja, fraktalni parametri hromatina limfocita su bili u korelaciji sa rezultatima skale za depresiju. Pokazano je da oksidopamin značajno menja teksturalne parametre hromatina limfocita periferne krvi.

Zaključak. Fraktalna i teksturalna analiza su potencijalno značajni dodaci budućim tehnikama i algoritmima za evaluaciju pacijenata sa rekurentnim depresivnim poremećajem.

Ključne reči: Depresija, Fraktal, Lakunarnost, Hromatin, Entropija

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziologija

UDK broj:

FRACTAL AND TEXTURAL ANALYSIS OF CHROMATIN STRUCTURE OF BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH DIFFERENT LEVELS OF DEPRESSION

Abstract

Introduction. Having in mind already proven connection between changes in tissue complexity and certain physiological and pathological processes, we assumed that during the depression the structural complexity of the nucleic lymphocytes chromate is reduced, that is, with the increase in depressive symptoms, the chromatin fractal dimension decreases. We also assumed that depressive symptoms were in a positive correlation with the level of chromatic disorder, that textural entropy of lymphocyte chromatin was increasing with increasing depression in patients. The objectives of the research were: (1) to determine the existence of a difference in the fractal and textural parameters of lymphocyte chromatin between patients with depression and subjects who did not meet the diagnostic criteria for depression; and (2) determine the existence and strength of the correlation between the degree of depression and fractal or textural parameters of chromatin in lymphocytes.

Methods. The study was designed as a cross section study, and performed on a sample of 100 subjects, of which 50 patients with recurrent depressive disorder treated at the Clinic "Dr Laza Lazarević" in Belgrade. The control group consisted of 50 subjects who belonged to other diagnostic categories and did not fulfill the diagnostic criteria for depression. The experimental protocol was carried out as follows: taking a detailed history of the disease, applying the Beck scale to assess depression, and Depression, anxiety

and stress scales DASS-21, taking blood for standard hormone (thyroid hormones) and biochemical analysis. Along with taking blood for analysis, blood smears were created on glass slides and fixated in methanol. The blood smears were colored using the modification of the Gimza staining method based on a previously published study in which the authors performed a fractal analysis of blood cell chromatin. After dyeing the smears, digital micrographs of the lymphocytes were created, and for each tested lymphocyte we calculated the average value of the chromatin fractal dimension, laccunarity, entropy, angular second moment, textural contrast, variance, textural correlation, and inverse moment of difference, according to the previously published studies. After that, for each patient, we calculated the average values of these parameters. In addition, in the *in vitro* part of the study, we investigated the possibility the dopamine derivative oxidopamine, has a particular role in the changes in fractal and textural (GLCM) parameters of lymphocyte chromatin.

Results. There was a significant difference in nuclear fractal parameters of the peripheral blood lymphocytes between patients with depression and control group. On the other hand, there was no significant difference in the textural parameters of lymphocyte chromatin between patients with depression and control group. In patients suffering from recurrent depressive disorder, the fractal parameters of lymphocyte chromatin were in correlation with the results of the depression scale. It was shown that oxidopamine significantly changes the textural parameters of peripheral blood lymphocyte chromatin.

Conclusion. Fractal and textural analyses are potentially significant additions to future techniques and algorithms for evaluating patients with recurrent depressive disorder.

Key words: Depression, Fractal, Lacunarity, Chromatin, Entropy

Scientific field: Medicine

Special topic: Physiology

UDK number:

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. FRAKTALNA DIMENZIJA KAO PARAMETAR U BIOMEDICINSKIM NAUKAMA | 1 |
| 1.2. TEKSTURALNA ANALIZA U MEDICINI | 4 |
| 1.3. DEPRESIJA I IMUNSKI SISTEM | 10 |
| 1.4. RADNA HIPOTEZA | 13 |
| | |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 14 |
| | |
| 3. MATERIJALI I METODE | 15 |
| | |
| 3.1. PLAN ISTRAŽIVANJA | 15 |
| 3.2. IN VITRO STUDIJA NA UZORCIMA PERIFERNE KRVI | 19 |
| 3.3. FRAKTALNA ANALIZA | 19 |
| 3.4. TEKSTURALNA ANALIZA | 23 |
| 3.5. STATISTIČKA ANALIZA | 27 |
| | |
| 4. REZULTATI | 28 |
| 4.1. REZULTATI PSIHIJATRIJSKIH SKALA | 28 |
| 4.2. REZULTATI FRAKTALNE I TEKSTURALNE ANALIZE | 31 |
| 4.3. REZULTATI GLCM ANALIZE NA LIMFOCITIMA <i>IN VITRO</i> | 36 |
| | |
| 5. DISKUSIJA | 45 |
| | |
| 6. ZAKLJUČCI | 96 |
| | |
| 7. LITERATURA | 97 |

1. Uvod

1.1. Fraktalna dimenzija kao parametar u biomedicinskim naukama

Fraktalna analiza je matematički i biofizički algoritam koji se danas široko primenjuje u medicinskim naukama. Koncept fraktala je prvi uveo matematičar Benoit Mandelbrot 1967. Godine u svom radu „How Long Is the Coast of Britain? Statistical Self-Similarity and Fractional Dimension“ publikovanom u časopisu Science. U ovoj publikaciji Mandelbrot diskutuje o pojmu samosličnosti na primeru geografskih determinanti. Fraktal kao termin je uveden 1975. Godine i od tada je u širokoj upotrebi u mnogim naučnim disciplinama uključujući i medicinske nauke (Loh et al. 2012).

Primećeno je da mnoge strukture u prirodi imaju svojstvo samosličnosti, ili barem tendenciju da se na taj način organizuju. Fraktalne karakteristike su primećene kod biljaka, kako na nivou tkiva, tako i kod pojedinačnih ćelija. Listovi, latice cvetova, koren biljaka, unutrašnjost mnogih plodova, ponekad ima strukturu koja po svojoj prirodi nije nasumično organizovana već prati određene biofizičke zakonitosti (Mandelbrot et al. 2002; Bellido et al. 2017; Losa et al. 1996).

Tokom poslednje dve decenije, mnogi autori su pokušavali da fraktalni kocept uvedu u biomedicinske nauke poput histologije, patologije i fiziologije, često bez velikog uspeha. Najviše radova vezanih za fraktalnu analizu je objavljeno u oblasti neuronauka. Primećeno je da se fraktalna dimenzija kao parametar može uspešno koristiti za analizu granjanja dendrita i aksona u nervnim ćelijama. Takođe fraktalna analiza se može koristiti za evaluaciju

citoarhitekture mozga u fiziološkim i patološkim uslovima (Losa et al. 1996).

Jedna od glavnih prednosti fraktalne analize u odnosu na druge metode u ćelijskoj biologiji je činjenica da je to relativno egzaktn matematički metod koji ne zavisi mnogo od samog istraživača već je unapred definisan softverskim algoritmima (He et al. 2017; Beretta-Piccoli et al. 2017; Hiroshima et al. 2016; Cai et al. 2017; Chen et al. 2017; Koutsiana et al. 2017; Sheelakumari et al. 2017). Ova egzaktnost omogućava visok stepen objektivnosti i nepristrasnosti u istraživanju. Takođe, sama činjenica da se rezultati dobijaju softverskom analizom omogućava potencijalno veliku reproducibilnost. Na ovaj način se podaci dobijeni u ranijim istraživanjima u fiziološkim uslovima, mogu koristiti za dalja ispitivanja u patologiji. Na primer, određivanjem hromatinske fraktalne dimenzije kod limfocita zdravih ljudi, dobijaju se korisni podaci koja se u kasnijim studijama mogu koristiti kao osnova za ispitivanja na populaciji psihijatrijskih pacijenata.

Pre pojave matematičkih metoda poput fraktalne i teksturalne analize, u histologiji, patologiji i drugim morfološkim naukama nije bilo puno načina da se kvantifikuju strukturne promene. Evaluacija citoarhitekture u tkivima često je zavisila od subjektivne procene medicinskog ili nemedicinskog stručnjaka (patologa, biologa), odnosno od njegovog znanja i iskustva. I danas takođe, kad se na primer ispituje toksičnost neke supstance na organ ili tkivo, patolog često koristi termine poput „homogen“, „heterogen“, „rastresit“, „kompleksan“, ali bez kvantifikacije. U istraživačkom radu, često se zato dešava da je stepen saglasnosti evaluatora relativno mali, što smanjuje kvalitet studije.

U naučno-istraživačkom radu, niska saglasnost stručnjaka generalno ne ostavlja teške posledice, imajući u vidu da se nauka

vremenom sama koriguje sa povećanjem broja istraživanja. Međutim u stručnom radu u medicini, naročito dijagnostici, oslanjanje isključivo na iskustvo i subjektivnost stručnjaka može rezultovati medicinskim greškama sa teškim posledicama po pacijenta. Ovo je od posebno velikog značaja u patologiji. Analiza biopsije tkiva je često poslednja u nizu dijagnostička procedura koja daje konačni odgovor da li je tkivo patološki izmenjeno i koja je bolest u pitanju. Na osnovu patohistološkog nalaza, često se donosi konačna odluka o vrsti i intenzitetu terapijske mere (poput primene hemioterapije, ili hirurškog zahvata u slučaju maligniteta). Lekarska greška u ovoj fazi može biti fatalna po pacijenta jer dovodi do primene neodgovarajućeg terapijskog sredstva.

Fraktalna analiza je u osnovi jedna od prvih metoda koja je promenama u strukturi tkiva i ćelija uspela da dodeli „brojku“. S obzirom da se radi u osnovi o softverskom matematičkom algoritmu, procedura se može ponoviti više puta, i svi evaluatori dobijaju iste rezultate. Promene u kompleksnosti tkiva su od posebne važnosti u medicini jer se one dešavaju u različitim patološkim uslovima poput infiltracije vezivnim tkivom, inflamaciji, kancerogenezi, traumi itd (Azemin et al. 2012; Chappard et al. 2001; Di Ieva et al. 2012; Gaudio et al. 2005; Hotta et al. 2005).

Veliki je broj radova koji je pokušao da primeni fraktalnu analizu u medicini (Lebedev et al. 2005; Karperien et al. 2008; Karperien et al. 2008; Moal et al. 2006; Losa et al. 2005; Roy et al. 2004; Silva et al. 2012). Pokazano je da je fraktalna dimenzija relativno senzitivni pokazatelj programirane ćelijske smrti (apoptoze). Na primer, švajcarski istraživači Losa i Kasteli su pokazali na tumorskim ćelijama karcinoma dojke, hromatin menja svoje fraktalne karakteristike nakon izlaganja proapoptotskoj hemijskoj supstanci. Ova studija je urađena korišćenjem tehnika elektronske mikroskopije, odnosno određivani su parametri

ultrastrukture. Ovo je susštinska razlika u odnosu na našu studiju gde je korišćena svetlosna mikroskopija. Takođe, istraživači su zasebno ispitivali heterohromatin i euhromatin dok je u našem radu određivana fraktalna dimenzija celokupne hromatinske (jedarne) strukture.

Značaj studije Lose i Kastelija je taj što su autori ne samo pokazali da se fraktalna dimenzija hromatina tokom apoptoze menja, nego su promene u toj meri izražene da se ova metoda može koristiti za detekciju rane faze programirane ćelijske smrti. Pokazano je da se fraktalna dimenzija menja pre nego što konvencionalne tehnike protočne citofluorometrije pokažu da je došlo do apoptoze. Tehnike protočne citofluorometrije poput aktivnosti kaspaza, aneksin propidijum jodid bojenje, određivanje faze ćelijskog ciklusa izgleda da nisu toliko senzitivne kao fraktalna analiza u identifikaciji rane faze apoptoze. A činjenica je da čak i na samom početku ovog procesa dolazi do diskretnih promena u strukturnoj organizaciji hromatina u jedru, poput početka kondenzacije i marginalizacije.

Posebno interesantan zaključak koji proizilazi iz gore navedene studije je da je metoda koja u svojoj osnovi ima analizu slike u mikroskopiji senzitivnija od konvencionalnih tehnika koje zahtevaju mnogo veću količinu finansijskih sredstava, opreme i ekspertize. Sve ovo ukazuje da bi fraktalna analiza u budućnosti mogla da postane značajan dodatak dijagnostičkim i terapijskim protokolima u kliničkoj praksi.

1.2. Teksturalna analiza u medicini

Teksturalna analiza je savremeni matematički metod za procenu strukture dvodimezionalnih objekata poput slika i

mikrografa (Castellanos et al. 2011; Galavis et al. 2010; Harrison et al. 2010; Harrison et al. 2011; Huber et al. 2009). Dizajniran od strane matematičara Haralika sredinom dvadesetog veka, u početku se koristio u geografiji i srodnim disciplinama za analizu topografskih karakteristika zemljišta i objekata koji su prethodno slikani iz satelita ili letelica (Warnick et al. 2011). Kasnije je metod počeo da se upotrebljava za evaluaciju stukturnih osobina zemljišta i materijala u industriji da bi početkom 21.veka našao svoju primenu u biologiji i medicini (Mayerhoefer et al. 2010; Linder et al. 2012; Park et al. 2011; Rangayyan et al. 2010; de Oliveira et al. 2011).

Postoji nekoliko različitih metoda za kvantifikaciju teksture, a Haralikov tehnika je samo jedna od njih. Ipak,, barem kada su pitnju medicinske nauke, ona ostaje suverena matematička metoda za detekciju diskretnih teksturalnih promena u ćelijama i tkivima. Haralikova tehnika se zasniva na algoritmu matriksa pojave sivihvrednosti na crno-belim dvodimenzinalnim strukturama, odnosno takozvanom GLCM (Grey level co-occurrence matrix) algoritmu (Djuričić et al. 2017; Peuna et al. 2017; Fan et al. 2017; Thor et al. 2017).

GLCM algoritmom se može pored ostalog proceniti vrednost angularnog drugog momenta, inverznog momenta razlike, entropije, varijanse, teksturalnog kontrasta, teksturalne korelacije, teksturalne inercije, i prominencije. Ovo su uglavnom parametri takozvane statistike drugog reda pri čemu se umesto pojedinačnih vrednosti pri analizi sirovih podataka, uzimaju u obzir parovi vrednosti koji sačinjavaju odgovarajući matematički matriks (u ovom slučaju nazvan Grey level co-occurrence matrix).

Treba istaći da je GLCM metod isključivo matematički metod za procenu teksture, pa samim tim njegova potencijalna primena u biološkim naukama još uvek nije dovoljno istražena. Na primer,

promena celularnog angularnog momenta, iako je pokazano da postoji tokom nekih fizioloških procesa (apoptoza, starenje), ne znači obavezno da kod svake ćelije sa promenom ovog parametra dolazi i do tog fiziološkog procesa

Verovatno najznačajniji GLCM parametar sa aspekta biomedicinskih nauka je entropija. Entropija fizičkom smislu predstavlja stepen neuređenosti i haosa u sistemu, i zavisi od velikog broja faktora. Termodinamska entropija je u vezi sa toplotnim sadržajem sistema, ili težnja sistema da pređe u stanje kada je uređenost najveća, što se dešava pri temperaturi bliskoj apsolutnoj nuli. Matematički se računa kao proizvod Bolcmanove konstante i logaritmamogućih stanja sistema koji je termoginamski izolovan (Mayerhoefer et al. 2010; Linder et al. 2012; Park et al. 2011; Rangayyan et al. 2010; de Oliveira et al. 2011)..

Klod Šenon je 1948. godine opisao pojam „informaciona entropija“ (danas nazvan Šenonovom entropijom“). Ova entropija ocenjuje informacionu neuređenost, imajući u vidu količinu bitova koji mogu da kodiraju neku informaciju (poput dvodimenzionalnog objekta ili slike) (Hwang et al. 2016; Rodrigues da Silva Vde et al. 2016; Sherif et al. 2015; Chao et al. 2015; Aytac Korkmaz et al. 2017; Korkmaz, 2017; González-Durruthy et al. 2017; Urigüen et al. 2017). Haralikova entropija korišćena u našoj studiji ima izvesn sličnosti sa Šenonovom entropijom. Međutim, osnovna razlika je ta što se kod GLCM entropije procenjuje statistička neuređenost na osnovu parova vrednosti, a ne pojedinačnih vrednosti rezolucioničkih jedinica. Takođe, u našoj studiji, mi smo analizirali 8-bitne mikrografe, što u osnovi znači da je svaka rezoluciona jedinica imala 8 mogućih brojčanih vrednosti koje su kasnije uključene u algoritam. Treba usvakom slučaju istaći da da ni Šenonova ni Haralikova entropija nisu direktno u vezi sa termodinamskom entropijom hromatina kao biološkog sistema. Termodinamsku entropiju je nemoguće proceniti na osnovu

dvodimenzionalnog mikrografa u našim eksperimentalnim uslovima. Ipak, sama činjenica da bilo kakvu neuređenost (pa čak i ona teksturalna) moguće odrediti na hromatinskoj strukturi predstavlja potencijalni doprinos u oblasti ćelijske biologije i fiziologije.

Haralikova entropija ipak predstavlja važan parametar u histologiji i patologiji. Posebno značajan je za evaluaciju strukturnih promena u tkivima i ćelijama koje se dešavaju tokom procesa fiziološkog starenja. Na primer, Shamir i saradnici su 2009. godine publikovali studiju urađenu na animalnom eksperimentalnom modelu *Caenorhabditis elegans* tokom koje su analizirali entropiju mišićnog tkiva. Autori su koristili GLCM metod za detekciju diskretnih strukturnih promena u citoarhitektonici. Utvrđeno je da se teksturalna neuređenost sa starenjem povećava, odnosno da postoji statistički značajna korelacija između starosti životinje i teksturalne entropije njenog mišićnog tkiva. Nalazi su bili u skladu sa rezultatima studije genske ekspresije, iz čega su autori izvukli odgovarajuće zaključke o prirodi procesa starenja u organizmu *Caenorhabditis elegans* (Shamir et al. 2009).

Entropija kao GLCM parametar je uspešno primenjena u studiji iz 2012. godine na tkivu slezine zamorčića (Pantic & Pantic 2012). Autori su odredili entropiju germinativnih centara slezine (sastavljeni uglavnom od B limfocita) koji su prethodno obojeni Gimza metodom. Autori su takođe za svaku životinju određivali parametre humoralnog imunskog odgovora PFC metodom (Plaque forming cells). Utvrđeno je da postoji statistički značajna povezanost između jačine humoralnog imuniteta i entropije germinativnih centara. Iako je ova studija urađena na relativno malom uzorku, ona je prva koja je pokazala da se matematički parametar poput entropije može dovesti u vezu sa funkcionalom determinantom imunosti. Ako se ovi rezultati potvrde u budućnosti, to bi moglo da ukaže na potencijalnu primenu entropije u za predviđanje normalnog

fiziološkog funkcionisanja slezine i ostalih limfatičkih tkiva poput timusa i limfnih čvorova. Takođe, treba istaći da je ovo prvo istraživanje primene GLCM metoda za evaluaciju citoarhitekture u limfatičkim tkivima. Osim što je pokazano da je moguće dobiti egzaktne i relativno homogene rezultate, nalazi su ukazali na dostupnost i praktičnost ove matematičke tehnike koja ne zahteva značajne finansijske i ljudske resurse (Mayerhoefer et al. 2010; Linder et al. 2012; Park et al. 2011; Rangayyan et al. 2010; de Oliveira et al. 2011)..

Entropija i drugi parametri teksturalne analize, uspešno su primenjeni za analizu i tkiva timusa na animalnom eksperimentalnom modelu (Pantic et al. 2013). Autori su poredili jedra kortikalnih i medularnih limfocita u timusu miševa nakon odgovarajuće matematičke obrade. Za svako jedro, određene su vrednosti entropije, angularnog drugog momenta, tekstruralne varijanse i teksturalne korelacije. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u ovim parametrima između dve populacije timocita. Ova studija je prema našim saznanjima, prva u svetu koja je primenila GLCM tehniku na tkivu timusa, i prva koja je na ovaj način izvršila teksturalnu analizu u cilju morfometrijske i morfološke evaluacije ćelija. Takođe, studija je važna jer je prva primenila ROC (Receiver Operating Characteristic) analizu za određivanje senzitivnosti i specifičnosti parametara teksturalne analize, odnosno za određivanje diskriminatorne sposobnosti metode u razlikovanju kortikalnih od medularnih ćelija timusa. U tom pogledu, entropija je imala najveću diskriminatornu moć sa površinom ispod ROC krive između 0,6 i 0,7.

Teksturalna analiza je takođe uspešno primenjena za evaluaciju jedarne strukture limfocita u germinativnim centrima slezine kod zamorčića (Pantic et al. 2012). U ovoj studiji, autori su koristili standardne morfometrijske parametere poput nuklearne površine i obima jedarne membrane da bi izračunali cirkularnost. Cirkularnost

je u snovi parametar koji pokazuje u kojoj meri dvodimanzinalni objekat nalikuje savršenom krugu (odnosno njegove ivice savršenoj kružnici). Primećeno je da u pojedinim ćelijskim populacijama, tokom programirane ćelijske smrti, jedro ima tendenciju da se „zaokrugljuje“ što dovodi d povećanja cirkularnosti. Autori su u ovoj studiji pokazali da postoji statistički značajna povezanost između angularnog drugog momenta i morfometrijskih parametara veličine i oblika jedra (Pantic et al. 2012). Slična povezanost je nađena i između morfometrijskih parametara i inverznog momenta razlike kao indikatora homogenosti. Ova studija je dala potencijalno veliki doprinos daljoj primeni GLCM metode u istraživanjima programirane ćelijske smrti.

Potrebno je takođe spomenuti studiju iz 2012. godine u vezi promena entropije jedra tokom starenja na populaciji stem ćelija u slezini miševa (Pantic et al. 2012b). U ovom istraživanju, autori su uradili GLCM analizu jedara eritroidnih prekurzora slezine (kod miševa, slezina je hematopoetski organ i nakon rođenja, za razliku od čoveka), pri čemu je određivana vrednost Haralikove entropije i ostalih parametara poput inverznog momenta razlike (indikatora teksturalne homogenosti). Životinje su bile podeljene na četiri starosne grupe: 10 dana, 1 mesec, 4 meseca i 7 meseci. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između grupa, kako po pitanju vrednosti entropije, tako i po pitanju inverznog momenta razlike. Entropija se povećala sa starenjem, dok se homogenost jedra smanjila. Ovo je prvo istraživanje koje je pokazalo da se struktura celog jedra na ovoj populaciji ćelija menja sa starenjem. Autori su ove promene doveli u vezu sa potencijalnim intrinzičkim faktorima koji utiču na genetski materijal ćelije tokom starenja. Neki od ovih intrinzičkih faktora obuhvataju epigenetsku disregulaciju kao i akumulaciju oštećenja DNK molekula za koje je dokazano da imaju

značajnu ulogu u promenama u ćelijskoj funkciji tokom procesa fiziološkog starenja (Zhou et al. 2012).

1.3. Depresija i imunski sistem

Depresija je psihijatrijski poremećaj u čijoj osnovi postoji poremećaj emocija kao psihičke funkcije, odnosno negativno polarisana hipertimija. Depresija nije jedinstven poremećaj, već postoji više tipova koji se međusobno razlikuju po kliničkoj slici i patofiziološkom mehanizmu nastanka. U kliničkoj praksi, od svih poremećaja raspoloženja, prema MKB dijagnostičkim vodičima, danas bi trebalo da je najzastupljeniji rekurentni depresivni poremećaj (Yroni et al. 2017; Leff-Gelman et al. 2016; Kovaru et al. 2009).

Rekurentni depresivni poremećaj (RDP) se odlikuje postojanjem više depresivnih epizoda, koje traju minimum 2 nedelja, između kojih postoji takozvani „miran“ period. Ovaj poremećaj ima kompleksan i za sada nedovoljno poznat mehanizam nastanka i etiologiju, u koju su uključeni različiti spoljni i unutrašnji činioci. Postoje brojne biološke teorije koje pokušavaju da objasne faktore koji tokom života imaju uticaja na razvoj RDP, poput genetskih, imunskih i endokrinih teorija (Yroni et al. 2017; Leff-Gelman et al. 2016; Kovaru et al. 2009).

Poslednjih godina, posebna pažnja je posvećena imunskim teorijama depresije, imajući u vidu vešestruku povezanost između imunskog i centralnog nervnog sistema. Poznato je da depresija sama po sebi utiče na jačinu celularnog i humoralnog imunskog odgovora

ali još uvek nije razjašnjeno da li i kako određene komponente imunskog sistema utiču na čovečije raspoloženje.

Primećeno je da mnogi citokini i interleukini imaju prodepresivni efekat. Takođe, veliki broj različitih hemijskih medijatora koji direktno deluje na humoralni i celularni imunski odgovor, takođe može, u određenim uslovima da utiče na kognitivne i konativne psihičke funkcije koje su poremećene kod depresije.

Posebno je interesantna potencijalna uloga limfocita u nastanku depresije. B limfociti, nakon transformacije u plazma ćelije, stvaraju velike količine antitela (gama globulina), a pojedini tipovi antitela mogu barem indirektno da utiču na funkcionisanje centralnog nervnog sistema. I T limfociti, prema pojedinim autorima, mogu da budu potencijalno značajan doprinoseći činilac u nastanku poremećaja raspoloženja. Oni to mogu da čine bilo direktno, stvarajući različite vrste interleukina, ili indirektno, aktivacijom drugih komponenti centralnog nervnog sistema (Yroni et al. 2017; Leff-Gelman et al. 2016; Kovaru et al. 2009).

Limfociti kao ćelije imaju svoje morfološke osobenosti u pogledu oblika, veličine i strukture. Ove ćelije se mogu bojiti različitim histološkim metodama od kojih se danas najviše koriste varijante Gimza bojenja. Hromatin limfocita obojen Gimza metodom ima specifičnu strukturu, koja varira od ćelije do ćelija, a na nju utiču brojni faktori poput sekretorne aktivnosti, prisustva/odsustva različitih medijatora i faktora rasta, kao i ekspresija brojnih gena koji spadaju u takozvanu grupu hromatinskih regulatora (Yroni et al. 2017; Leff-Gelman et al. 2016; Kovaru et al. 2009).

Još uvek je nepoznato da li se tokom različitih mentalnih poremećaja struktura hromatina limfocita menja, kao ni da li te promene imaju neki veći fiziološki i patofiziološki značaj. I pored brojnih nalaza koji ukazuju da kod depresije postoje značajne

promene u imunskom sistemu (npr. sekrecija pojedinih citokina), nejasno je da li na višim nivoima jedarne arhitekture postoje strukturne promene koje se mogu kvantifikovati i koje bi eventualno u budućnosti mogle biti potencijalni biomarker bolesti.

Iako je korišćenjem konvencionalnih metoda svetlosne mikroskopije gotovo nemoguće uočiti diskretne promene u hromatinskoj arhitekturi limfocita, pojedini autori su utvrdili da, uz dodatak raznih matematičkih metoda za analizu slike, postoji način da se ovakve promene barem donekle kvantifikuju. Primer takvog metoda je upravo fraktalna analiza kojom se može indirektno odrediti stepen kompleksnosti određene strukture. Fraktalna analiza hromatina je do sada uspešno primenjena za evaluaciju jedarne strukture kancerskih krvnih ćelija, kao i za detekciju ovih promena u ćelijskom i tkivnom starenju. U našem istraživanju fraktalnu analizu kao i druge matematičke metode za evaluaciju strukture smo primenili u cilju detekcije i procene strukturnih promena u hromatinu limfocita kod pacijenata sa dijagnozom rekurentnog depresivnog poremećaja. Predstavljamo rezultate koji ukazuju da su matematički pokazatelji strukturne organizacije hromatina u limfocita u korelaciji sa psihološkim pokazateljima težine depresivne slike kod ovih pacijenata. Ovi nalazi ukazuju da fraktalna analiza kao novi i egzaktni metod ima određenu potencijalnu vrednost u psihijatrijskoj praksi.

1.4. Radna hipoteza

Imajući u vidu dokazanu povezanost između promena u strukturnoj kompleksnosti tkiva i pojedinih fizioloških i patoloških procesa, pretpostavili smo da u toku depresije dolazi do smanjenja strukturne kompleksnosti nukleusnog hromatina limfocita, odnosno da sa povećanjem depresivnih simptoma dolazi do smanjenja hromatinske fraktalne dimenzije. Takođe smo pretpostavili da su depresivni simptomi u pozitivnoj korelaciji sa nivoom hromatinske neuređenosti, odnosno da teksturalna entropija hromatina limfocita raste sa povećanjem depresije kod pacijenata.

2. Ciljevi istraživanja

1. Utvrditi postojanje razlike u fraktalnim i teksturalnim parametrima hromatina limfocita između pacijenata sa depresijom, i ispitanika koji ne zadovoljavaju dijagnostičke kriterijume za depresiju
2. Utvrditi postojanje i jačinu korelacije između stepena depresije i fraktalnih, odnosno teksturalnih parametara hromatina limfocita

3. Materijali i metode

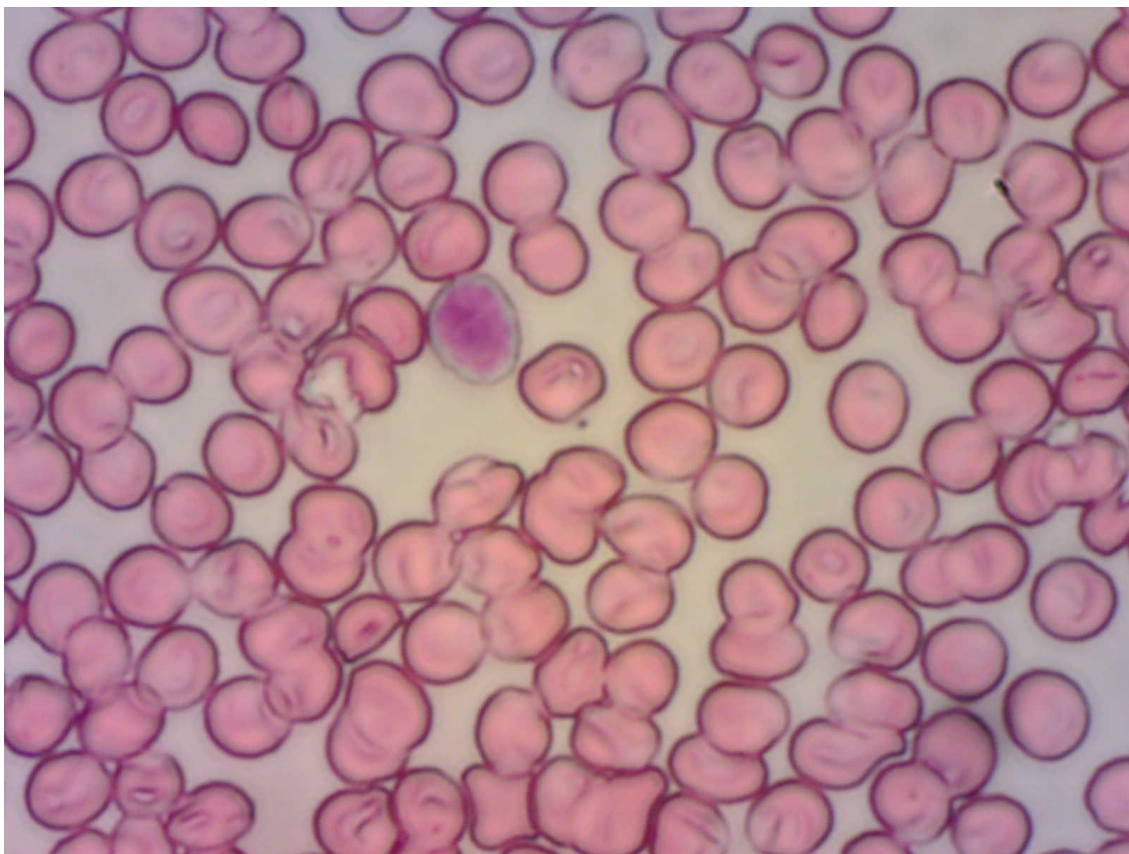
3.1. Plan istraživanja

Istraživanje je dizajnirano po tipu studije preseka i obavljeno na uzorku od 100 ispitanika, od kojih 50 pacijenata obolelih od rekurentnog depresivnog poremećaja lečenih u Klinici „Dr Laza Lazarević“ u Beogradu. Kontrolnu grupu je činilo 50 ispitanika koji su pripadali drugim dijagnostičkim kategorijama, a nisu ispinjavali dijagnostičke kriterijume za depresiju. Ekskluzioni kriterijumi su bili organski mentalni poremećaj, zloupotreba i zavisnost od psihoaktivnih supstanci, sistemske bolesti, hipotireoza i hipertireoza.

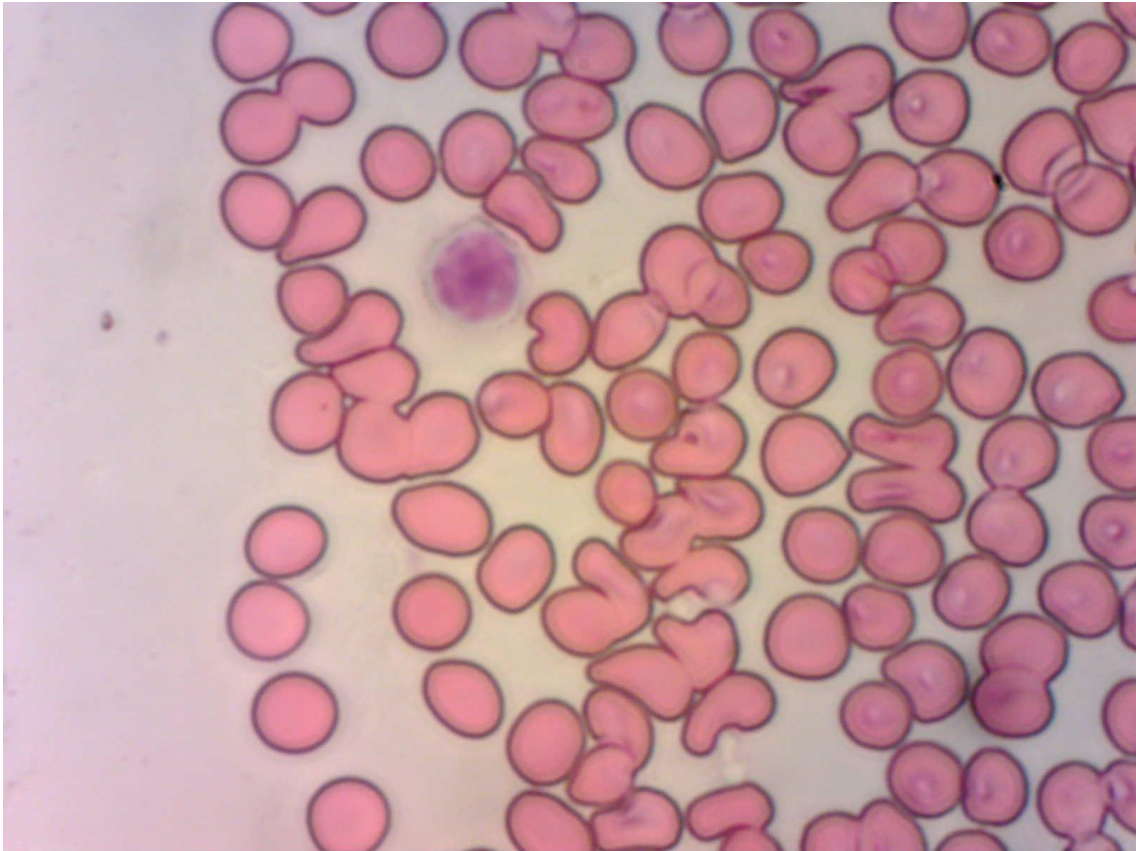
Studija je sprovedena prateći sledeći protokol: uzimanje detaljne istorije bolesti, primena Bekove skale za procenu depresije (validacija od strane Novović i sar. 2011) i Skale depresivnosti, anksioznosti i stresa DASS-21 (validacija Jovanović i sar. 2014), uzimanje krvi za standardne hormonske (tireoidni hormoni) i biohemijske analize. Uporedo sa uzimanjem krvi za analize, pristupilo se pravljenju krvnih razmaza na predmetnim staklima i njihovom fiksiranju u metanolu. Krvni razmazi su bili obojeni modifikacijom metode Gimza bojenja po uzoru na prethodno publikovanu studiju Ferro et al. (2011) u kojoj su autori radili fraktalnu analizu hromatina krvnih ćelija.

Nakon bojenja, kreirani su digitalni mikrografi limfocita uz pomoć 200 High-Speed Color CMOS Chip DC 5V / 250 mA (Oplenic Optronics, Hangzhou, CN) instrumenta postavljenog na Olympus CX21FS1 mikroskop (slika 1 i 2). Digitalni mikrografi su bili napravljeni i obrađeni po uzoru na prethodne studije (Gilmore et al. 2009; Pantic et al. 2012). Za svaki razmaz je napravljeno 20 mikrografa limfocita. Za svaki limfocit, uz pomoć softvera ImageJ

Nacionalnog instituta za zdravlje (SAD) drugih programa specijalno dizajniranih za fraktalnu i teksturalnu analizu, je određena prosečna vrednost hromatinske fraktalne dimenzije, lakunarnosti, angularnog drugog momenta, varijanse, teksturalnog kontrasta, entropije, teksturalne korelacije i inverznog momenta razlike, po ugledu na prethodno publikovane studije (Pantic et al. 2012, Ferro et al. 2004; Pantic et al. 2015). Nakon toga za svakog pacijenta izračunali smo prosečne vrednosti ovih parametara. Pored testiranja povezanosti hromatinskih parametara sa skorom ostvarenim na psihijatrijskim skalama depresije, testirala se i korelacija između samih fraktalnih i teksturalnih parametara. Korelaciona analiza je urađena kako u eksperimentalnoj, tako i u kontrolnoj grupi. Takođe je statističkim testovima za procenu značajnosti razlike testirano postojanje razlike između eksperimentalne i kontrolne grupe u vrednostima fraktalnih i teksturalnih parametara.



Slika 1. Primer mikrografa limfocita periferne krvi obojenog Gimza metodom. Razmaz periferne krvi pacijenta sa rekurentnim depresivnim poremećajem. Vrednost fraktalne dimenzije hromatina iznosila je 1.484.



Slika 2. Primer mikrografa limfocita periferne krvi obojenog Gimza metodom. Razmaz periferne krvi ispitanika u okviru kontrolne grupe. Vrednost fraktalne dimenzije hromatina iznosila je 1.544.

3.2. In vitro studija na uzorcima periferne krvi

Kao dodatak prethodno opisanom istraživanju, urađena je i in vitro studija na uzorcima periferne krvi ispitanika. Krv je tretirana različitim dozama oksidopamina, supstance za koju se zna da ima uticaja na nastanak depresije i raznih neuroloških poremećaja kod na animalnim eksperimentalnim modelima. Periferna krv je inkubirana na 37 °C sa dodatkom RPMI medijuma. Nakon toga su pravljene razmazi, a mikrofotografije limfocita su analizirani tehnikama fraktalne i teksturalne analize. Detalji eksperimentalnog protokola su objašnjeni u skorašnjem publikovanom radu (Pantic et al. 2016).

3.3. Fraktalna analiza

Fraktalna analiza je urađena nakon binarizacije digitalnih mikrofotografija jedara limfocita periferne krvi. Analiza je urađena u programu FracLac, dizajniranom od strane Audrey Karperien (Charles Sturt University, Australia). Tokom izvođenja ove metode, program automatski konvertuje mikrofotografije u binarni format (opcija „Autoconvert to binary“), s tim što je unapred podešeno da pozadina (euhromatin) se tretira kao bela dok tamniji regioni budu crne boje. Tokom analize, hromatinska struktura se prekriva sa serijom kvadrata (boxova) na različitim skalama pri čemu se određuje broj kvadrata (N) koji su makar delimično ispunjeni strukturom, odnosno crnim pikselima. Pošto postoji više skala (ϵ), dobije se i veliki broj vrednosti N. Zatim program kreira grafikon na kome se na ordinati nalaze vrednosti N, dok su vrednosti skale na apscisi (slika 3 i 4). Grafikon se zatim pretvori u logaritamski oblik pri čemu se može videti linija regresije. Na osnovu pada linije regresije logaritamskog grafika, određuje se vrednost fraktalne dimenzije (D):

$$D = \text{regression slope } [\ln(N) / \ln(\varepsilon)]$$

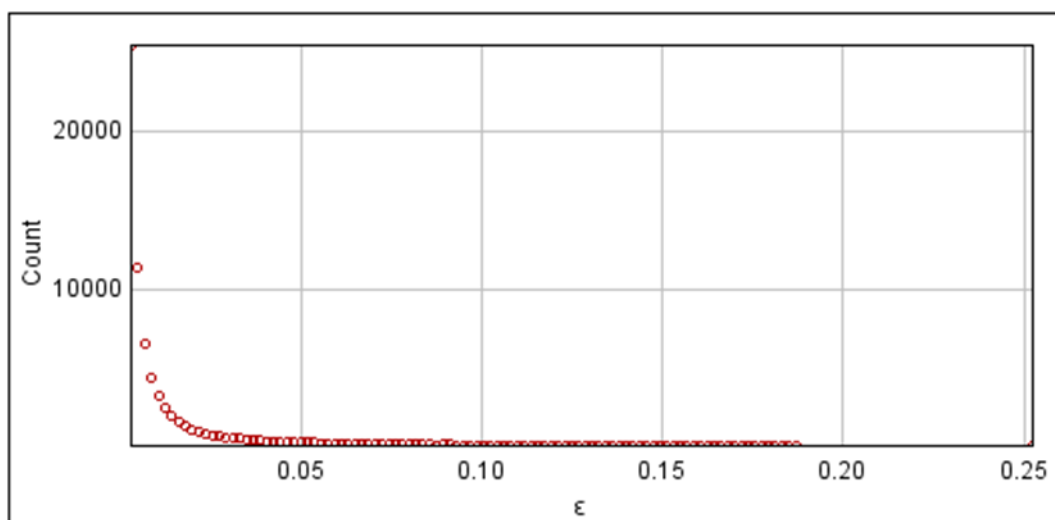
Fraktalna dimenzija je indirektni pokazatelj kompleksnosti strukture. Što objekat ima viš detalja, to u principu ima veće vrednosti fraktalne dimenzije. Za dvodimenzionalne objekte u našoj studiji, fraktalna dimenzija varira između vrednosti 1 i 2.

Lakunarnost (λ) je određena na osnovu formule:

$$\lambda = CV_{\varepsilon,g}^2 = (\sigma_{\varepsilon,g} / \mu_{\varepsilon,g})^2$$

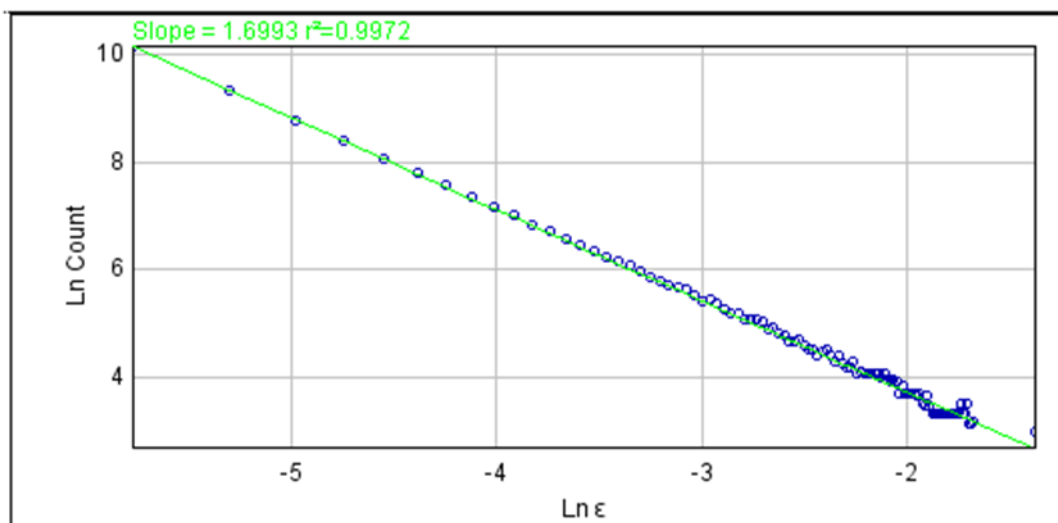
gde je CV koeficijent varijacije, σ predstavlja standardnu devijaciju, a μ aritmetičku sredinu za datu skalu (ε) i orijentaciju (g).

Lakunarnost je indirektna mera fraktalne heterogenosti binarizovane strukture. Za njeno određivanje se u osnovi koristi isti algoritam kao za određivanje fraktalne dimenzije (u našem slučaju takozvani „box counting“ metod). Lakunarnost i fraktalna dimenzija su ponekad u korelaciji, ali njihov međusobni odnos kada su u pitanju biološki sistemi je još uvek nedovoljno istražen.



Slika 3. Primer grafikona u FracLac programu na kome se na ordinati nalaze vrednosti N, dok su vrednosti skale na apscisi. Grafikon je kreiran u okviru box counting metoda.

Lakunarnost kao parametar fraktalne analize ne treba mešati sa sličnim parametrima strukture u teksturalnoj analizi. Na primer, u teksturalnoj analizi, inverzni momenat razlike je u osnovi determinanta teksturalne homogenosti, ali to ne znači da je u korelaciji sa fraktalnom lakunarnošću. Metode određivanja fraktalnih i teksturalnih parametara se kvalitativo razlikuju, pored ostalog i zbog primene drugačijeg formata mikrografa (binarni prema 8-bitnom formatu).



Slika 4. Logartamska obrada grafikona sa brojem kvadrata i skalama. Jasno se vidi linija regresije na osnovu čijeg pada se određuje vrednost fraktalne dimenzije. Veći broj tačaka utiče na veću preciznost fraktalne analize kao metoda. Koeficijent r je pokazatelj jačine korelacije.

I fraktalna dimenzija i lakunarnost su relativno egzaktni parametri, s obzirom da je uticaj ispitivača na rezultat relativno mali (Zhang et al. 2007; Panti et al. 2012). U svim dosadašnjim ispitivanjima varijabilnost između ispitivača (interobserver variability) kao i unutar jednog ispitivača (intrabserver variability) se pokazala veoma mala, a stepen saglasnosti je bio veliki. U teoriji, jedini značajan faktor koji može da utiče na reproducibilnost je deo protokola tokom samog kreiranja mikrografa, poput veličine svetlosne ekspozicije, kvalitet izoštravanja tokom mikroskopije itd. Takođe potencijalno značajan faktor koji dovodi do većih varijacija u fraktalnoj dimenziji i lakunarnosti je kvalitet samih histoloških preparata. U našem slučaju, analiza nije obavljena na isečcima tkiva već na razmazima krvi, što dodatno povećava stepen reproducibilnosti.

3.4. Teksturalna analiza

Teksturalna analiza je u osnovi obrada dvodimenzionalnih struktura uz pomoć metoda više matematike (Joseph et al. 2011; Vido et al. 2011; Yogesan et al. 1996). U našoj studiji je korišćena statistika drugog reda na 8-bitnim mikrografima jedara limfocita. Analiza je rađena u ImageJ programu korišćenjem odgovarajućih podprograma (Pligins). Matematička osnova, odnosno kod za teksturalnu analizu je dizajniran na osnovu podsttojećih funkcija u MatLab programu (Nattick, MA, SAD).

Teksturalna analiza je rađena korišćenjem GLCM (Grey level co-occurrence matrix) algoritma. Ovde se svakoj rezolucionoj jedinici dvodimenzionalnog objekta dodeljuje takozvana „siva vrednost“ na osnovu intenziteta sive boje (a nakon konverzije slike u 8-bitni format). Nakon toga se analiziraju parovi rezolucionih jedinica (prema odgovarajućoj orijentaciji i distanci). Program automatski određuje GLCM parametre poput angularnog drugog momenta, inverzonog momenta razlike, entropije, kontrasta, korelacije, varijanse itd.

Angularni drugi momenat (Angular second moment, ASM) je u osnovi indirektni parametar teksturalne uniformnosti. Računa se na osnovu sledeće formule:

$$ASM = \sum_i \sum_j \{p(i, j)\}^2$$

gde su i i j koordinate u GLCM matriksu.

Inverzni momenat razlike (inverse difference moment) je parametar teksturalne homogenosti i izračunava se na sledeći način:

$$\text{IDM} = \sum_i \sum_j \frac{1}{1+(i-j)^2} p(i,j)$$

Inverzni momenat razlike je prema našim opservacijama senzitivniji pokazatelj diskretnih promena u ćelijskoj strukturi, ali ovaj nalaz treba da bude potvrđen nekom budućom studijom.

Entropija je određena uz pomoć sledeće formule:

$$\text{ENT} = - \sum_i \sum_j p(i,j) \log(p(i,j))$$

Entropija je pokazatelj strukturne neuređenosti, odnosno haosa. Sistemi sa većim stepenom dezorganizacije u teksturi imaju tendenciju da imaju veću vrednost ovog parametra. Ipak, treba imati u vidu da teksturalna entropija, i pored sličnosti u formuli, nije direktno povezana sa termodinamskom entropijom sistema. Termodinamska entropija je fizičko svojstvo koje proističe iz prirodne tendencije materije (npr. gasova, tečnosti) da zauzmu stanje sa većim stepenom neuređenosti. Teksturalna entropija je sa druge strane, samo parameter neuređenosti dvodimenzionalne teksture u 8-bitnom formatu gde su rezolucionim jedinicama date vrednosti na osnovu njihove crne prebojenosti. Ipak, i pored svojih potencijalnih nedostataka, u prethodnim studijama, teksturalna

entropija se pokazala kao potencijalno senzitivni pokazatelj fizioloških i patoloških promena u ćelijama i subcelularnim strukturama.

Ovde treba pomenuti još jednu vrstu entropije koja se teoretski može odrediti na dvodimenzionalnom objektu, a ponekad se radi zajedno sa teksturalnim parametrima. Šenonova entropija je mera informacione neuređenosti sistema. Kao i Haralikova, i Šenonova entropija se može izračunati primenom dostupnih konvencionalnih softvera poput MatLab-a. Njena formula je u principu slična Haralikovoj entropiji:

$$H = - \sum_x p(x) \log [p(x)]$$

gde je p verovatnoća nalaženja varijable x u nekoj informaciji. Međutim, postoji suštinska razlika između ove dve determinante neuređenosti. Haralikova entropija se određuje nakon što se rezolucione jedinice teksture označe vrednostima u skladu sa intenzitetom sive boje. Sa druge strane, kod određivanja Šenonove entropije, ceo fajl (npr. u TIFF) formatu, može se pretvoriti u tekst string a onda se taj string matematički analizira. U našoj studiji iz tehničkih razloga nismo određivali Šenonovu entropiju jedara limfocita, tako da to ostaje interesantan zadatak za neko buduće istraživanje iz oblasti komputacione biologije.

Teksturalni kontrast u našem radu je određen na osnovu sledeće formule:

$$\text{CON} = \sum_i \sum_j (i - j)^k P_d[i, j]^n$$

Teksturalni kontrast treba razlikovati od slikovnog kontrasta koji se može modifikovati pri obradi slike. U osnovi, GLCM kontrast je takođe jedan indirektni pokazatelj teksturalne heterogenosti analiziranog sistema.

Teksturalna korelacija verovatno od svih GLCM parametar ima najkompleksniji matematički algoritam računanja:

$$\text{COR} = \frac{\sum_i \sum_j (ij)p(i, j) - \mu_x \mu_y}{\sigma_x \sigma_y}$$

gde je μ srednja vrednost, a σ standardna devijacija zasnovana na parovima rezolucionih jedinica u matriksu ($p(i, j)$). Delovi tekture mogu biti u većoj ili manjoj korelaciji što je takođe važno za kvantifikaciju strukturnih promena. Teksturalna korelacija je u osnovi specifičan parametar u odnosu na ostale determinante tekture, pošto nema puno zajedničkih elemenata u matematičkom algoritmu. Tako, može se desiti se angularni drugi momenat, entropija i inverzni drugi momenat ne promene značajno tokom nekog eksperimenta, dok korelacija pretrpi visoko statistički značajne promene.

Treba istaći da GLCM analiza nije jedina vrsta teksturalne analize, kao i da se sama GLCM analiza može obaviti na različitim formatima slike. U našem slučaju korišćen je 8-bitni format, ali u teoriji, sličan protokol bi se mogao raditi i na 4-bitnom i binarnom

formatu. Takođe GLCM parametri su u osnovi više matematički nego biološki parametri strukturne promene u ćelijama i tkivima. Pogrešno je determinante poput angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike interpretirati kao uniformnost, odnosno homogenost samog hromatinskog makromolekula pošto vizuelna uniformnost i homogenost, onako kao ih vidi profesionalni patolog/histolog ne moraju obavezno biti u korelaciji sa ovim matematičkim parametrima.

3.5. Statistička analiza

Za procenu statističke značajnosti povezanosti (korelacije) koristiće se Pirsonova, odnosno Spirmanova korelacija u zavisnosti od parametarske prirode podataka i normalnosti distribucije. Za procenu značajnosti razlike koristiće se T test ili analiza varijanse uz pomoć ANOVA testa. P vrednost manja od 0,05 smatraće se statistički signifikantnom.

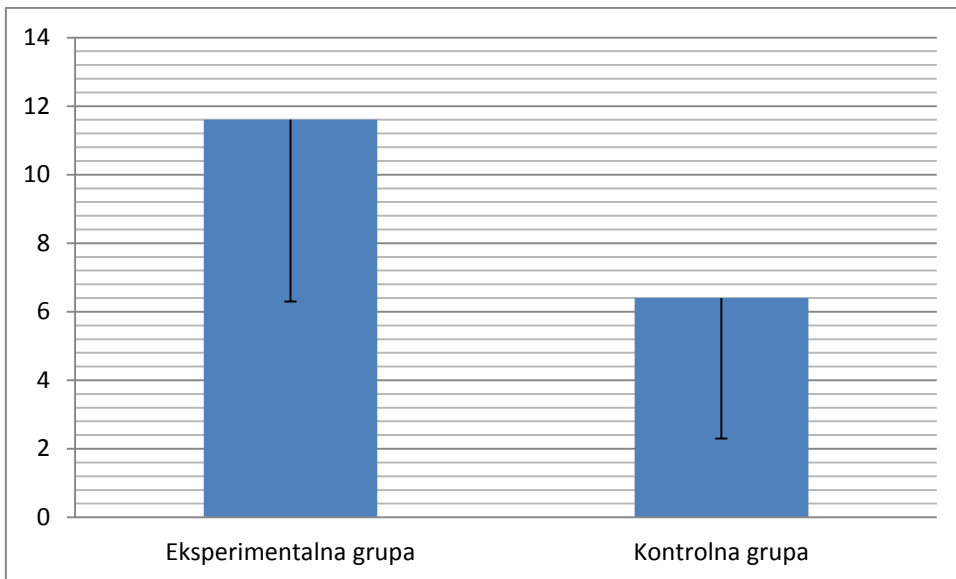
4. REZULTATI

4.1. Rezultati psihijatrijskih skala

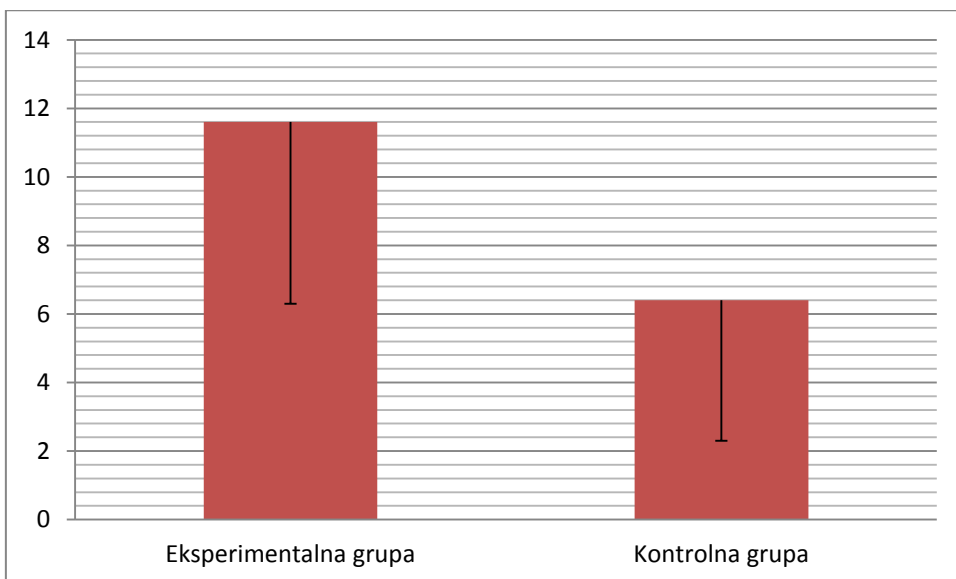
Prosečna starost pacijenata u eksperimentalnoj grupi bila je 53.88 ± 6.38 godina, a u kontrolnoj 40.58 ± 11.19 godina. Telesna težina u ove dve grupe iznosila je 77.5 ± 15.6 kg, odnosno 84.4 ± 18.2 kg, a visina 169.4 ± 8.2 cm, odnosno 177.1 ± 9.4 cm. U eksperimentalnoj grupi, pacijentima je u proseku ovo bila četvrta hospitalizacija zbog rekurentnog depresivnog poremećaja.

U eksperimentalnoj grupi, prosečna vrednost skora Bekove skale za depresiju je bila 25.8 ± 11.8 , dok je u kontrolnoj grupi ona iznosila 12.8 ± 9.7 . Očekivano, postojala je statistički visoko značajna razlika u ovom parametru između dve grupe ($p < 0.01$, slika 5).

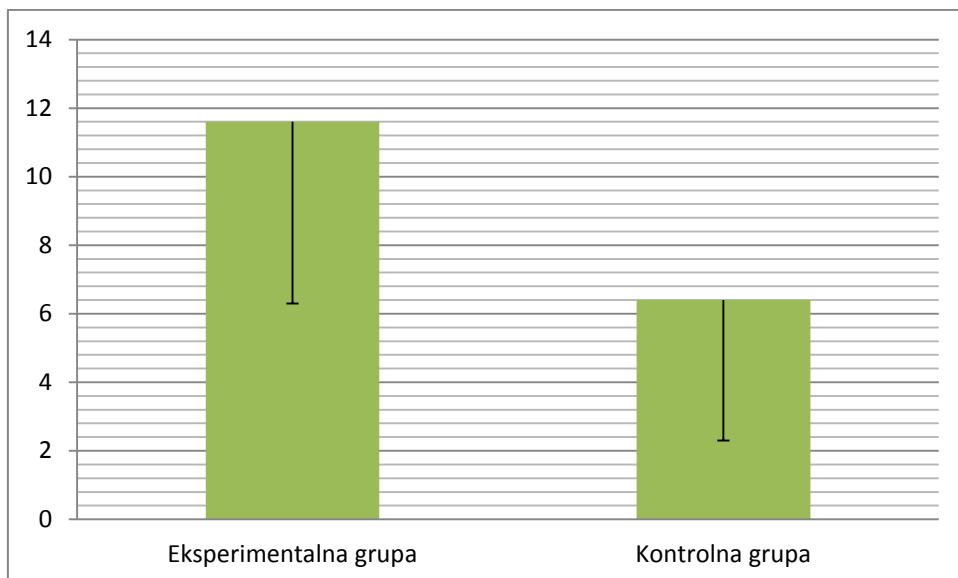
Srednja vrednost skorova za depresivnost, anksioznost i stres u eksperimentalnoj grupi iznosile su 10.9 ± 5.3 , 9.2 ± 4.4 , odnosno 11.6 ± 5.3 . U kontrolnoj grupi iznosile su 5.8 ± 5.1 , 5.3 ± 4.1 , odnosno 6.4 ± 4.1 . Za sva tri aspekta DASS skale, postojala je statistički visoko značajna razlika između grupa (slike 6, 7 i 8).



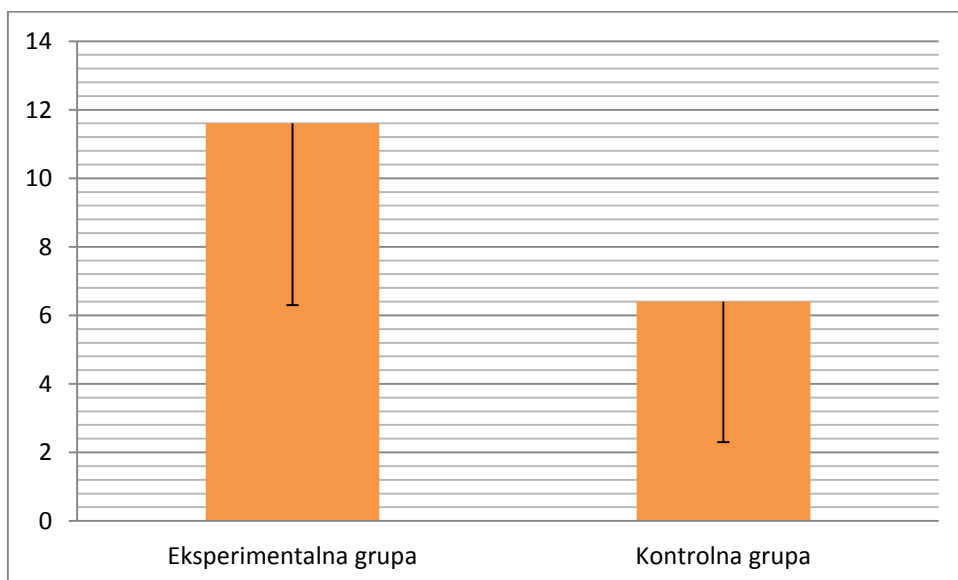
Slika 5. Vrednosti skorova Bekove skale za depresiju u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi



Slika 6. Vrednosti skora za depresiju DASS skale u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi



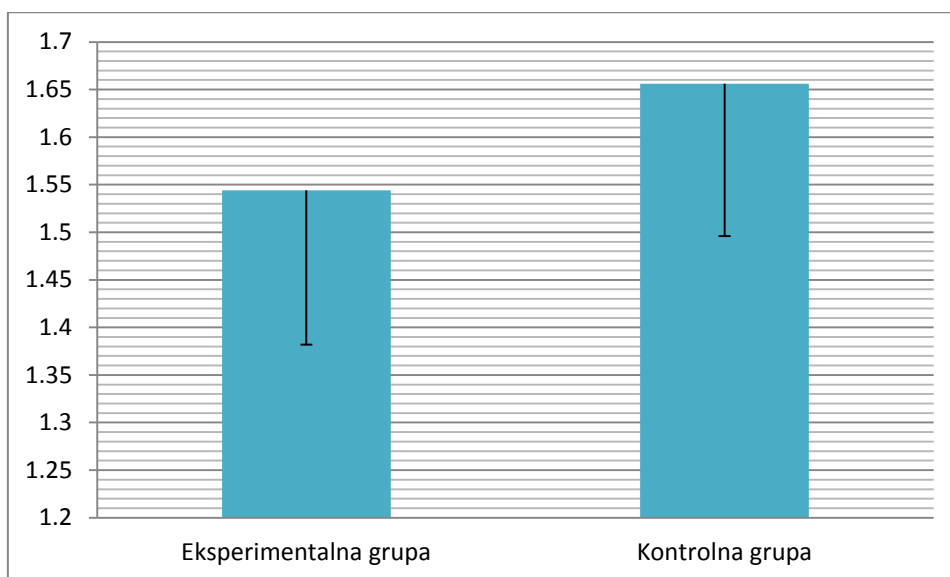
Slika 7. Vrednosti skora za anksioznost DASS skale u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi



Slika 8. Vrednosti skora za stres DASS skale u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi

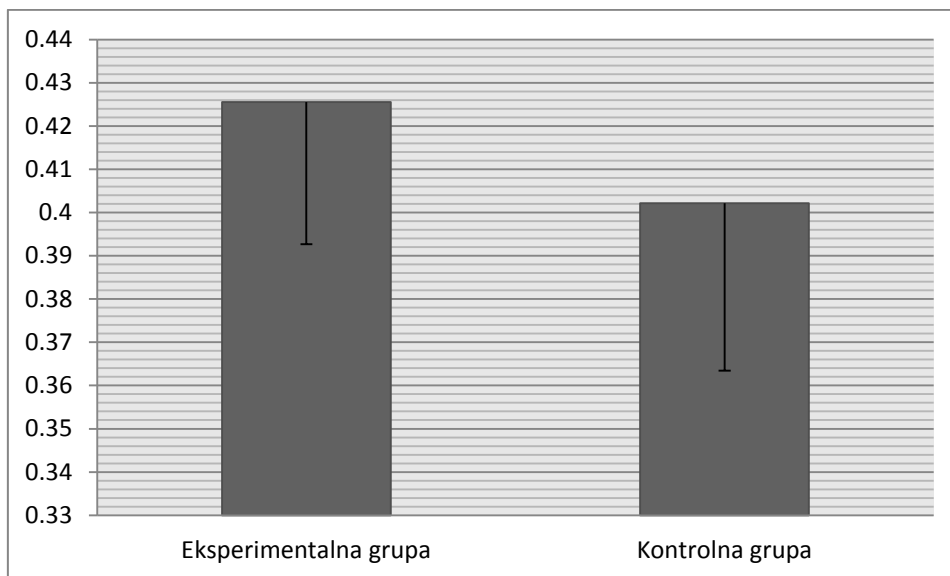
4.2. Rezultati fraktalne i teksturalne analize

Prosečna vrednost fraktalne dimenzije hromatina limfocita u grupi pacijenata sa rekurentnim depresivnim poremećajem, iznosila je 1.544 ± 0.162 , a u kontrolnoj grupi 1.656 ± 0.160 . Detektovana je statistički visoko snačajna razlika između dve grupe ($p < 0.01$, slika 9).



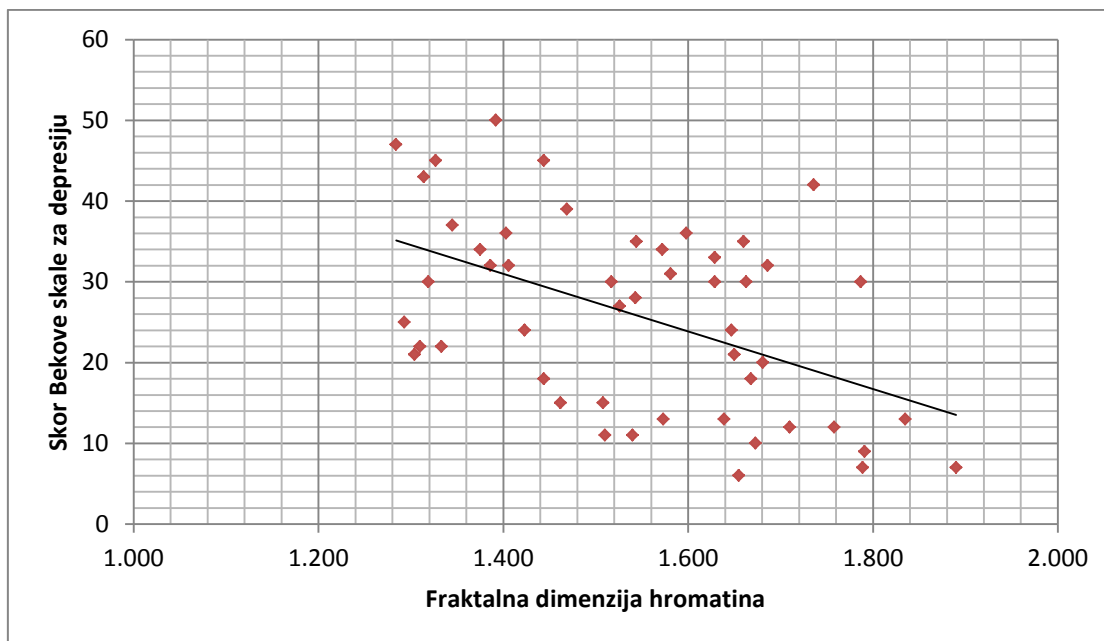
Slika 9. Vrednosti fraktalne dimenzije hromatina limfocita u grupi pacijenata sa rekurentnim depresivnim poremećajem i kontrolnoj grupi.

Vrednost hromatinske lakunarnosti je takođe bila značajno različita između grupa ($p < 0.01$, slika 10), ali, za razliku od fraktalne dimenzije, ona je bila veća u eksperimentalnoj grupi. Kod rekurentnog depresivnog poremećaja, ona je iznosila 0.425 ± 0.032 , a u kontrolnoj grupi 0.402 ± 0.038 .



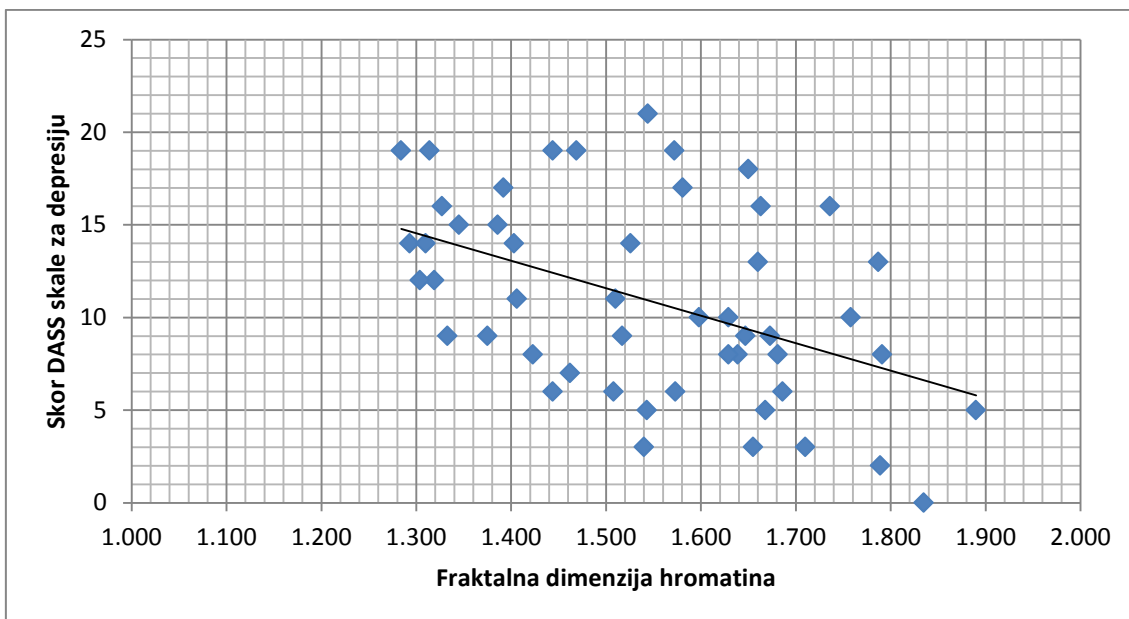
Slika 10. Vrednost hromatinske lakunarnosti limfocita periferne krvi u dve grupe pacijenata.

Detektovana je statistički visoko značajna negativna korelacija između vrednosti skora Bekove skale za depresiju i fraktalne dimenzije hromatina u uzorku pacijenata sa rekurentnim depresivnim poremećajem ($p < 0.01$). Drugim rečima, sa povećanjem skora Bekove skale, došlo je do smanjenja vrednosti fraktalne dimenzije, i obrnuto. Ovaj rezultat ukazuje potencijalni prediktorski značaj fraktalne analize u evaluaciji težine depresivnog poremećaja. Na slici 11 su prikazani plotovani podaci za ova dva parametra.

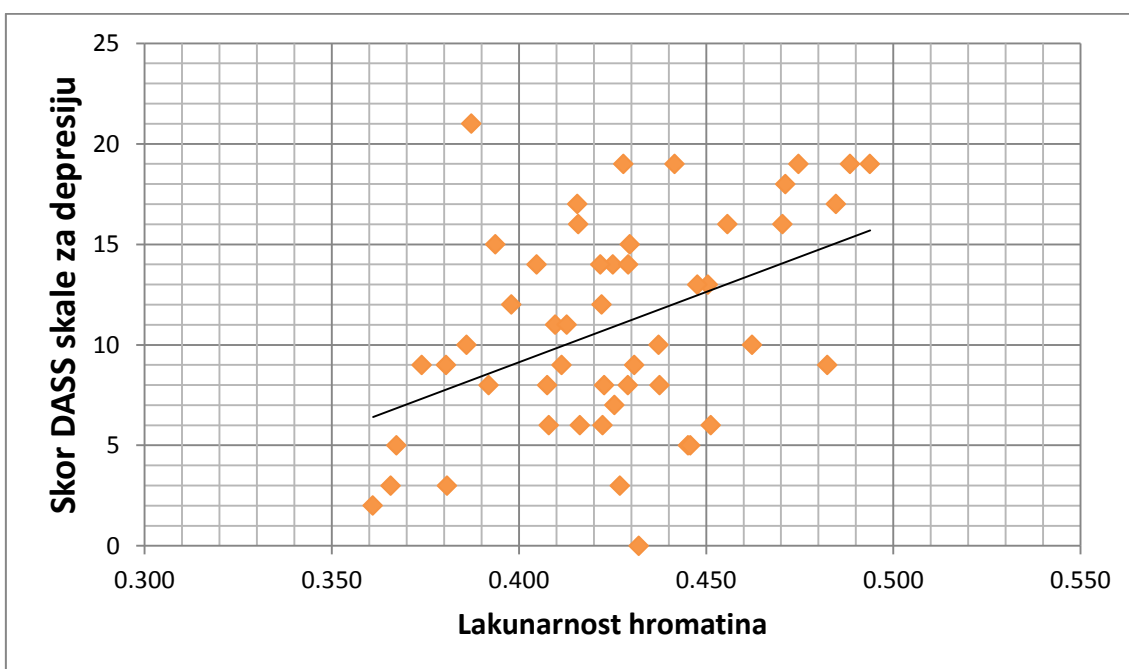


Slika 11. Detektovana je statistički visoko značajna negativna korelacija između vrednosti skora Bekove skale za depresiju i fraktalne dimenzije hromatina u uzorku pacijenata sa rekurentnim depresivnim poremećajem ($p < 0.01$).

Slična, statistički značajna ($p < 0.01$, slika 12), negativna korelacija je detektovana između vrednosti fraktalne dimenzije hromatina i depresivnog skora DASS skale. Takođe postojala je statistički značajna ($p < 0.01$, slika 13), pozitivna korelacija između vrednosti lakunarnosti hromatina i depresivnog skora DASS skale.



Slika 12. Negativna korelacija je detektovana između vrednosti fraktalne dimenzije hromatina i depresivnog skora DASS skale



Slika 13. Postojala je statistički značajna ($p < 0.01$), pozitivna korelacija između vrednosti lakunarnosti hromatina i depresivnog skora DASS skale.

GLCM parametri se nisu značajno razlikovali između eksperimentalne i kontrolne grupe. U okviru tabele 1 i 2 su prikazane prosečne vrednosti angularnog drugog momenta, inverznog momenta razlike, teksturalnog kontrasta, teksturalne korelacije, entropije i varijanse hromatina limfocita kod dve grupe pacijenata.

Tabela 1. Vrednosti GLCM parametara u grupi pacijenata sa rekurentnim depresivnim poremećajem

| | Srednja vrednost | Standardna devijacija |
|--------------------------|------------------|-----------------------|
| Angularni drugi momenat | 0.0082 | 0.00053 |
| Inverzni momenat razlike | 0.579 | 0.027 |
| Teksturalni kontrast | 2.47 | 0.10 |
| Entropija | 5.23 | 0.30 |
| Varijansa | 75.2 | 6.1 |
| Teksturalna Korelacija | 0.0132 | 0.001 |

Tabela 2. Vrednosti GLCM parametara u kontrolnoj grupi pacijenata

| | Srednja vrednost | Standardna devijacija |
|--------------------------|------------------|-----------------------|
| Angularni drugi momenat | 0.008 | 0.0005 |
| Inverzni momenat razlike | 0.579 | 0.034 |
| Teksturalni kontrast | 2.52 | 0.11 |
| Entropija | 5.27 | 0.29 |
| Varijansa | 76.4 | 5.7 |
| Teksturalna Korelacija | 0.013 | 0.0008 |

4.3. Rezultati GLCM analize na limfocitima *in vitro*

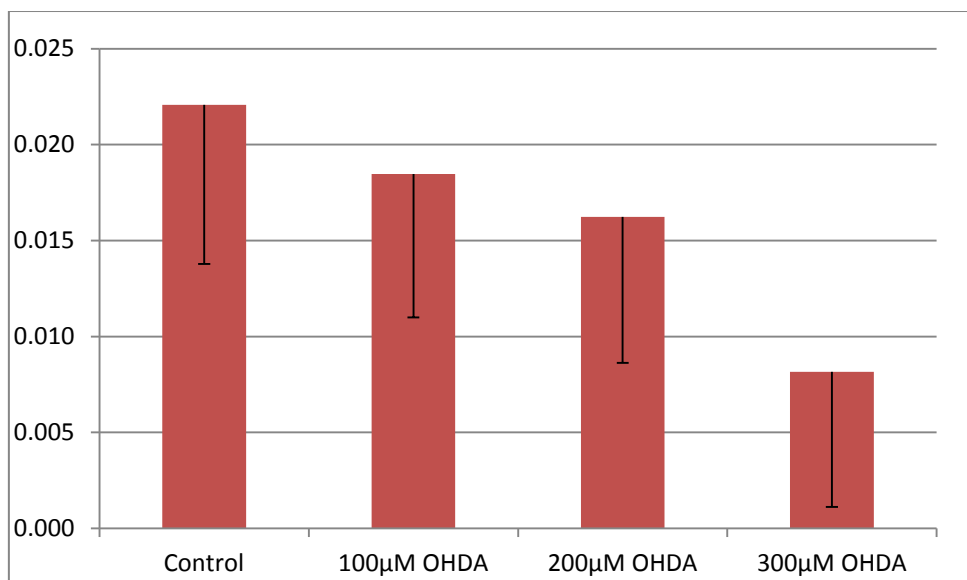
Prosečna vrednost hromatinske entropije u kontrolnom uzorku je bila 5.47 ± 0.27 , a nakon tretmana oksidopaminom, došlo je do povećanja. U zorku koji je bio tretiran dozom od $100 \mu\text{M}$, entropija je iznosila 5.57 ± 0.27 , dok je u uzorcima sa dozama oksidopamina $200 \mu\text{M}$ i $300 \mu\text{M}$ entropija iznosila 5.66 ± 0.30 , odnosno 6.15 ± 0.38 (slika 18). Naknadnom analizom je utvrđeno da je prvo statistički značajno povećanje, u odnosu na kontrolni uzorak postojalo pri koncentraciji od $300 \mu\text{M}$.

Prosečna vrednost inverznog momenta razlike hromatinske strukture iznosila je u kontrolnom uzorku 0.46 ± 0.03 . U uzorku tretiranom sa $100 \mu\text{M}$ oksidopamina, nije došlo do promene

(0.46 ± 0.02). Značajno smanjenje inverznog momenta razlike uočeno je tek u poslednjem uzorku (0.40 ± 0.04 , $p < 0.05$, slika 16).

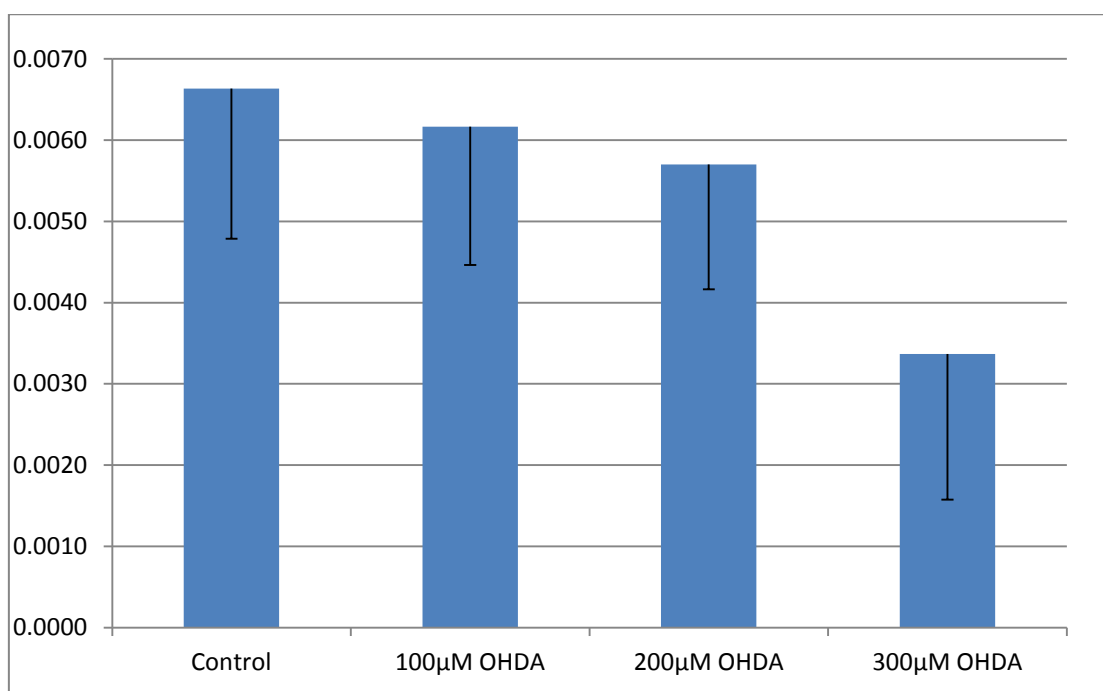
Teksturalna varijansa se tokom eksperimenta statički značajno povećala. U kontrolnom uzorku iznosila je 51.75 ± 36.22 , dok je u tretiranim uzorcima iznosila 67.62 ± 66.81 , 81.53 ± 63.80 odnosno 178.23 ± 106.17 . U poređenju sa kontrolnim uzorkom, uzorak tretiran sa $300 \mu\text{M}$ oksidopamina pokazao je visoko statistički značajno ($p < 0.01$, slika 19) povećanje.

Slično vrednostima inverznog momenta razlike, teksturalna korelacija je pretrpela značajno smanjenje koje je bilo dozno zavisno. U kontrolnom uzorku, njena vrednost iznosila je 0.022 ± 0.008 . U tretiranim uzorcima, vrednosti su bile 0.018 ± 0.007 , 0.016 ± 0.008 , odnosno 0.008 ± 0.007 . Uočen je statistički značajan trend smanjenja GLCM korelacije (slika 14).

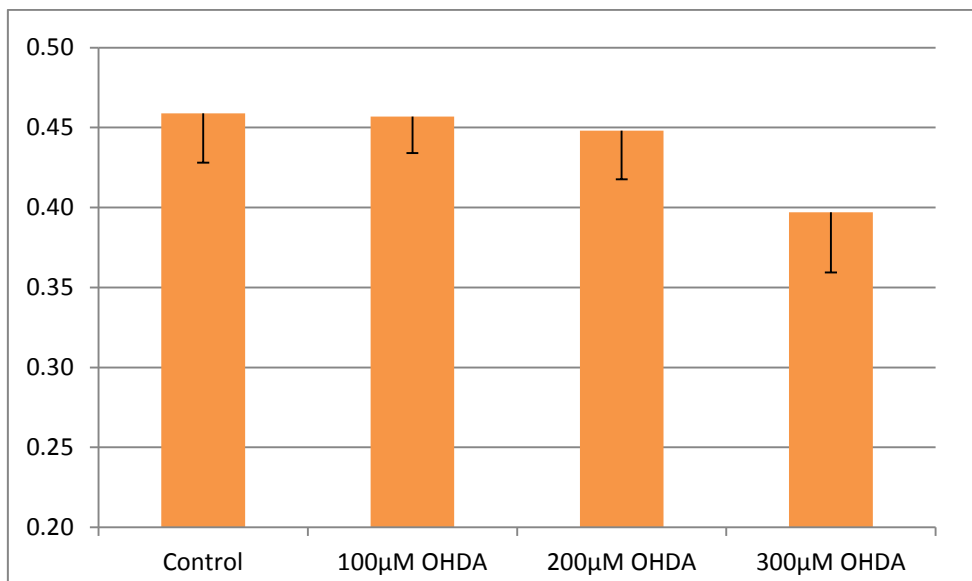


Slika 14. Vrednosti teksturalne korelacije u uzorcima. Nađen je statistički značajan trend smanjenja.

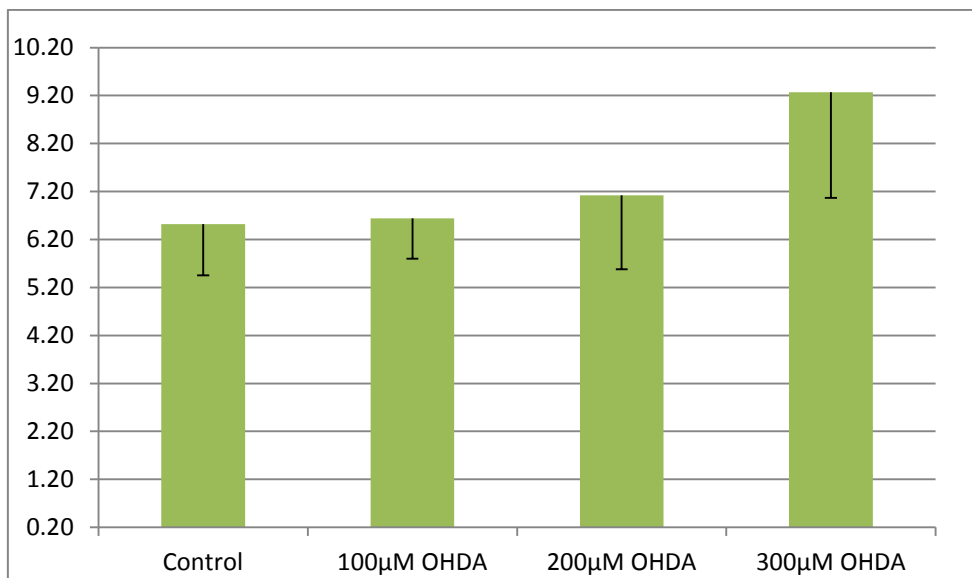
Vrednosti angularnog drugog momenta hromatinske strukture su se takođe značajno promenile nakon tretmana. U kontrolnom uzorku, vrednost je iznosila 0.0066 ± 0.0018 , dok u tretiranim uzorcima je bila 0.0062 ± 0.0017 , 0.0057 ± 0.0015 , odnosno 0.0034 ± 0.0018 . Utvrđen je statistički značajan trend ($p < 0.01$, slika 15) smanjenja.



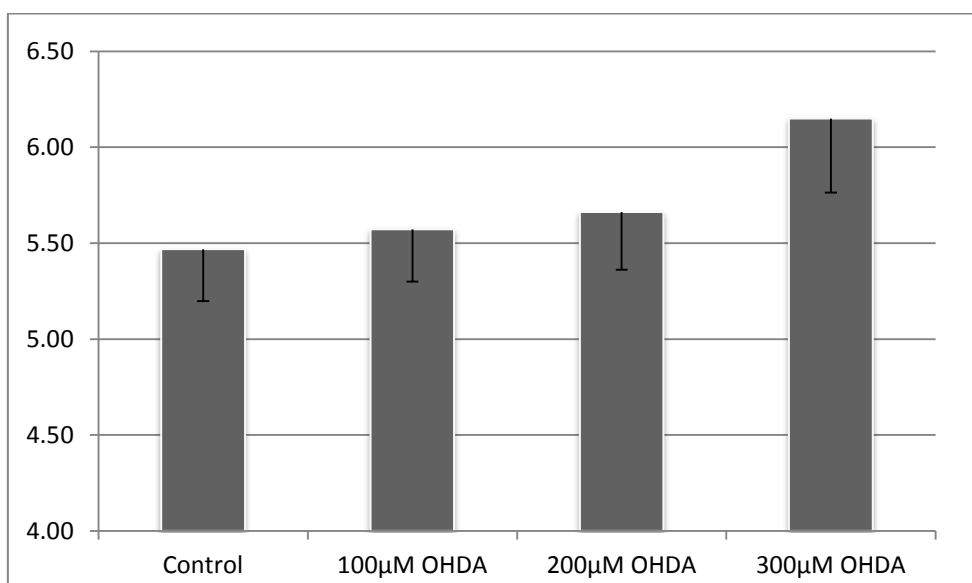
Slika 15. Vrednosti angularnog drugog momenta hromatinske strukture.



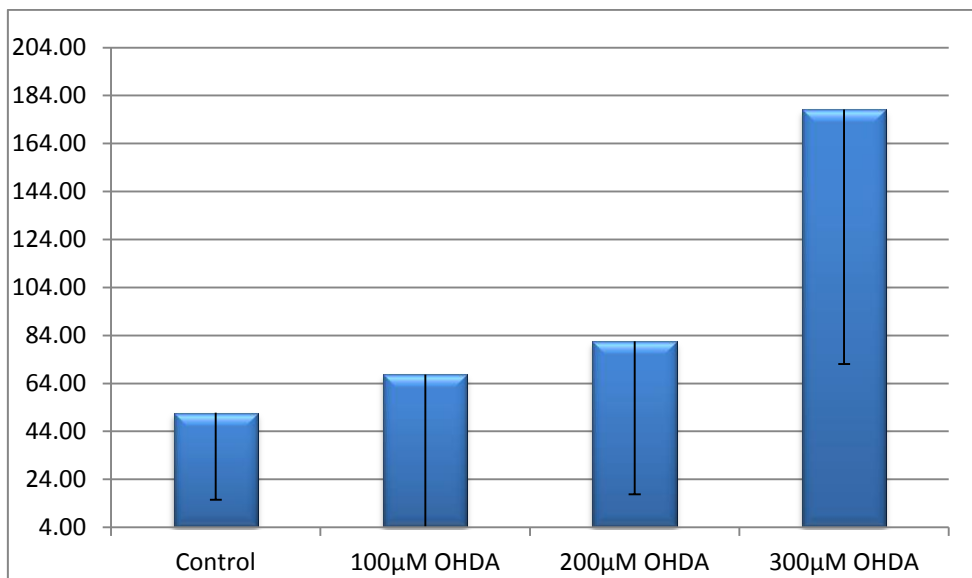
Slika 16. Vrednosti inverznog momenta razlike hromatinske strukture.



Slika 17. Vrednosti GLCM kontrasta hromatinske strukture.

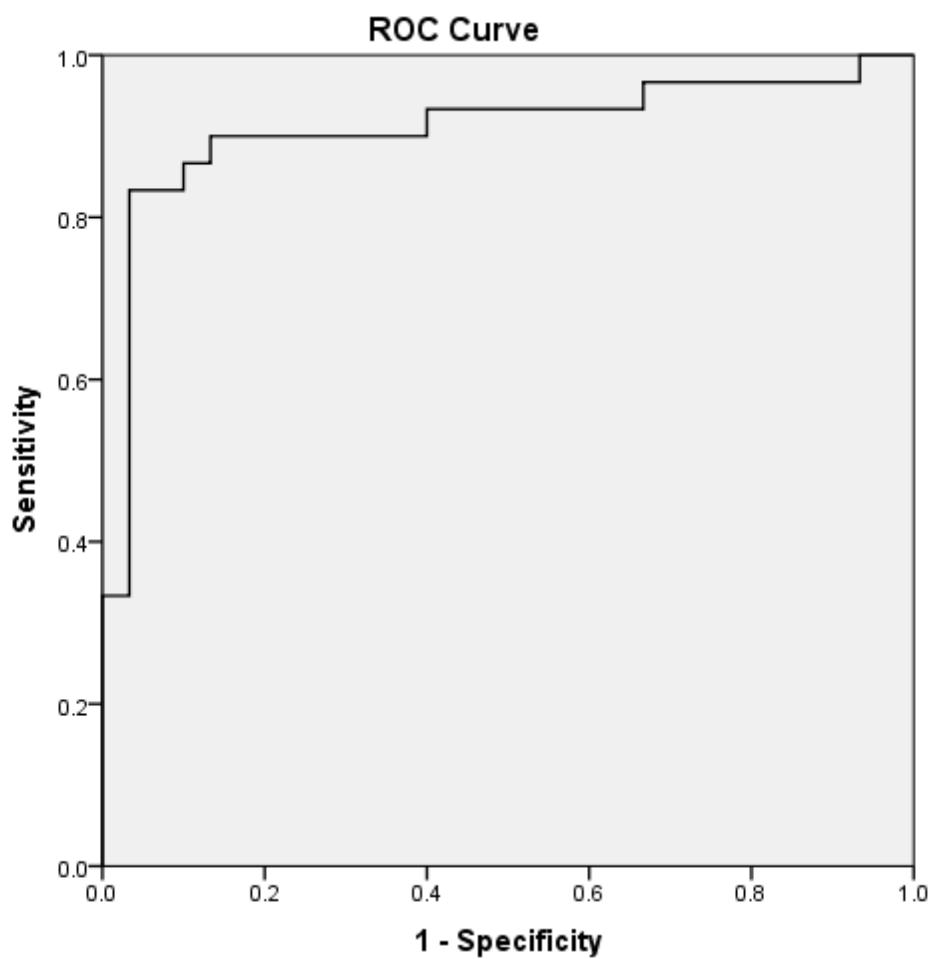


Slika 18. Vrednosti GLCM entropije hromatinske strukture.



Slika 19. Vrednosti GLCM varijanse hromatinske strukture.

Kada je urađena ROC (Receiver operating curve) analiza podataka, utvrđeno je da je GLCM varijansa jedan od najsenzitivnijih GLCM parametara, sa najvećom moći diskriminacije između tretiranih (uzorak sa najvećom koncentracijom oksidopamina) i netretiranih ćelija. Površina spod ROC krive iznosila je 0.91 (slika 20, tabela 3), a za kriterijum VAR veći ili jednak 21.66, senzitivnost ovog parametra je bila 96.7%. Ovo pokazuje da je GLCM analiza potencijalno značajan dodatak konvencionalnim patohistološkim tehnikama za evaluaciju hromatinske strukture i njenih promena u eksperimentalnim uslovima.



Slika 20. ROC analiza vrednosti GLCM varijanse. Površina spod ROC krive iznosila je 0.91, a za kriterijum VAR veći ili jednak 21.66, senzitivnost ovog parametra je bila 96.7%.

Tabela 3. ROC analiza vrednosti GLCM varijanse sa koordinatama ROC krive

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): VAR00001

| Positive if Greater Than or Equal To ^a | Sensitivity | 1 - Specificity |
|---|-------------|-----------------|
| 20.4510 | 1.000 | 1.000 |
| 21.6760 | 1.000 | .967 |
| 23.9120 | 1.000 | .933 |
| 26.3615 | .967 | .933 |
| 26.9635 | .967 | .900 |
| 27.9500 | .967 | .867 |
| 31.5300 | .967 | .833 |
| 34.3770 | .967 | .800 |
| 35.0085 | .967 | .767 |
| 35.6465 | .967 | .733 |
| 35.9455 | .967 | .700 |
| 36.7615 | .967 | .667 |
| 37.4405 | .933 | .667 |
| 38.0305 | .933 | .633 |
| 38.6880 | .933 | .600 |
| 39.1100 | .933 | .567 |
| 39.5355 | .933 | .533 |
| 42.1665 | .933 | .500 |
| 45.4145 | .933 | .467 |
| 46.2710 | .933 | .433 |
| 47.0550 | .933 | .400 |
| 48.8195 | .900 | .400 |
| 50.4450 | .900 | .367 |
| 51.2870 | .900 | .333 |
| 51.7925 | .900 | .300 |
| 53.8235 | .900 | .267 |
| 56.0810 | .900 | .233 |
| 61.2485 | .900 | .200 |
| 70.5090 | .900 | .133 |
| 77.4930 | .867 | .133 |
| 79.9660 | .867 | .100 |
| 81.1695 | .833 | .100 |
| 84.6605 | .833 | .067 |
| 88.7205 | .833 | .033 |
| 97.3575 | .800 | .033 |

| | | |
|----------|------|------|
| 109.2285 | .767 | .033 |
| 114.6430 | .733 | .033 |
| 116.2465 | .700 | .033 |
| 118.2325 | .667 | .033 |
| 122.6400 | .633 | .033 |
| 131.3090 | .600 | .033 |
| 136.9215 | .567 | .033 |
| 147.8290 | .533 | .033 |
| 160.6100 | .500 | .033 |
| 163.8980 | .467 | .033 |
| 172.0055 | .433 | .033 |
| 183.6235 | .400 | .033 |
| 189.5295 | .367 | .033 |
| 206.1585 | .333 | .033 |
| 221.9195 | .333 | .000 |
| 224.2745 | .300 | .000 |
| 228.4080 | .267 | .000 |
| 234.1520 | .233 | .000 |
| 248.9245 | .200 | .000 |
| 281.4890 | .167 | .000 |
| 303.3570 | .133 | .000 |
| 315.6490 | .100 | .000 |
| 343.0840 | .067 | .000 |
| 432.4720 | .033 | .000 |
| 506.9470 | .000 | .000 |

5. DISKUSIJA

5.1. Fraktalna analiza i hromatin

Dezoksiribonukleinska kiselina ima u svojoj strukturi određeni stepen samosličnosti. Samosličnost je vidljiva već na nivou sekundarne helikoidne organizacije, a posebno se manifestuje analizom hromatida i hromatinskih niti. Tokom elektronske mikroskopije, delovi euhromatina i heterohromatina pokazuju fraktalne karakteristike, a to je posebno vidljivo na euhromatinu. Utvrđeno je da euhromatin u ultrastrukturi ima značajno veću vrednost fraktalne dimenzije u poređenju sa heterohromatinu. Moguće je da ovaj nalaz ima osnovu u različitom stepenu transkripcione aktivnosti ovih delova hromatina, ili specifičnosti u interakciji histon- DNK tokom stvaranja informacione RNK (Alvarenga et al. 2007; Ameyar-Zazoua et al. 2012; Appay et al. 2010; Chandra et al. 2012; Schwartzenruber et al. 2012; Talbert et al. 2012; Thurman et al. 2012; Riddle et al. 2012; Ptasinska et al. 2012).

Fraktalni model distribucije hromatina u jedru je značajno doprineo našem razumevanju organizacije DNK kao molekula i njegove interakcije sa proteinima (Bancaud et al. 2009; Pantic et al. 2013). Konvencionalni, ekvilibrijumski model se bazirao na tendenciji molekula da zauzmu najveći stepen entropije, odnosno da postignu ravnotežno stanje sa aspekta uložene i predate slobodne energije u sistemu. Međutim, fraktalni model je ovo stanovište donekle izmenio. Utvrđeno je da su delovi ćelijskog jedra kao biološkog sistema slični manjim delovima, a manji delovi slični još manjim strukturama. Ovakav vid organizacije sa aspekta termodinamike zahteva veću količinu energije, ali i pored toga,

opstaje kao fenomen u živim ćelijama, bez obzira na sintetsku aktivnost, odnosno gensku ekspresiju.

Nažalost, još uvek je puno nepoznanica kada je u pitanju fraktalni model hromatinske organizacije. Ovaj princip nije potvrđen da postoji u svim ćelijama, i u svim fiziološkim stanjima. Činjenica je da su pojedine studije pokazale da se fraktalna dimenzija hromatina menja sa starenjem, iako nema dokaza da j u tim ćelijama došlo do velikih DNK oštećenja ili apoptoze. U budućnosti, ostaje da se vidi, da li je ekvilibrijuski model zaista prevaziđen ili i dalje ima veliku primenu u ćelijskoj biologiji i fiziologiji (Bancaud et al. 2009; Pantic et al. 2013)..

Moguće je da fraktalna analiza ima određenu primenu u evaluaciji transkripcione aktivnosti jedra kao celine. Ako je tačno da euhromatin i heterohromatin imaju različite vrednosti fraktalne dimenzije, logično je pretpostaviti da jedro u kojoj se DNK prepisuje u većoj meri, ima i veću vrednost ovog parametra. Ako bi se ovo dokazalo u budućnosti, ova metoda bi mogla da da veliki doprinos u postojećim tehnikama ćelijske i molekularne biologije. Korišćenjem relativno jeftine strategije slikanja ćelija, moglo bi se utvrditi da li pojedine ćelije stvaraju veće količine proteina, pa bi fraktalna analiza mogla biti korišćena kao pristupačni i jednostavni biosenzor u biohemiji i drugim fundamentalnim granama medicine.

Pojedine studije su utvrdile da je samosličnost hromatina karakteristična ne samo za njegovu ultrastrukturu (na elektronskoj mikroskopiji), već da ona postoji čak i kod konvencionalne svetlosne mikroskopije. Naime, čak i kada je jedro obojeno Gimza ili Hematoksilin-Eozin metodom, fraktalna analiza kao metodse može relativno lako uportebiti za evaluaciju ptencijalnih strukturnih promena. Treba napomenuti da samosličnost kao fenomen, iako poželjna, nije i neophodna da bi se fraktalna analiza jedra sproveda u

delo. To je zato što se fraktalnom analizom može u osnovi kvantifikovati kompleksnost bilo kog dvodimenzionalnog objekta, a ne samo onog koji pokazuje samosličnost.

Uostalom, cilj naše studije nije ni bio da se prikaže da li su jedra limfocita fraktali, već da li se fraktalna analiza kao široko dostupan metod može koristiti za evaluaciju ćelija kod depresivnih pacijenata. Drugim rečima fraktalna analiza je u ovom slučaju testirana kao potencijalni senzor za jednu u osnovi multifaktorsku bolest koja ima svoje kliničke i biološke manifestacije na skoro svim tkivima i organima u ljudskom telu.

5.2. Lakunarnost u u biomedicinskim istraživanjima

Lakunarnost je u osnovi parametar fraktalne analize kojim se određuje stepen heterogenosti fraktalne strukture (Yasar et al. 2005; Borys et al 2008; Gilmore et al. 2009). Broj i veličina praznih polja (rupa, regiona bez strukture) nakon binarizacije slike, direktno utiče na vrednost ovog parametra (Waliszewski, 2016; Pribic et al. 2015; Borys et al 2008; Gilmore et al. 2009) . Lakunarnost može da bude u obrnutoj korelaciji sa vrednošću fraktalne dimenzije. Strukture koje imaju veliku količinu detalja u svojoj organizaciji, i samim tim veću vrednost fraktalne dimenzije, imaju tendenciju da se odlikuju relativno malom lakunarnošću, i obrnuto. Međutim, ovo ne mora da bude pravilo, odnosno, bar prema našim saznanjima, ne postoji jasna matematička povezanost između ova dva parametra fraktalne analize.

Lakunarnost je detaljno proučavana u prethodno publikovanoj studiji (Pantic et al. 2012) u kojoj su autori pokazali da ovaj parametar poseduje relativno veliki stepen senzitivnosti u detekciji ranih promena u ćelijskom jedru tokom programirane ćelijske smrti.

Studija je urađena na U251 ćelijskoj kulturi (ćelije humanog malignog neuroblastoma) koja je izlagana ultraljubičastim zracima u kratkom vremenskom intervalu. Nakon ekspozicije, ćelije su otpočinjale proces apoptoze koji se razvijao tokom perioda od nekoliko časova. Pravljeni su i digitalni mikrografi ćelija na svakih 30 minuta u periodu od početka tretmana pa sve do 5 časova nakon tretmana, kada se i konvencionalnim svetlosnim mikroskopom, bez upotrebe analitičkih metoda moglo videti da je apoptoza završena. Takođe su primenjene tehnike konvencionalne protočne citofluorometrije da bi se utvrdio momenat započinjanja programirane ćelijske smrti u uzorcima.

Utvrđeno je da su fluorometrijske metode (analiza ćelijskog ciklusa, anaksin propidijum jodid bojenje, aktivnost kaspaza) bile u stanju da detektuju apoptozu ali relativno kasno u odnosu na fraktalnu analizu lakunarnosti jedra. Naime, lakunarnost jedra se statistički značajno promenila već pola sata nakon tretmana, dok je većina citofluorometrijskih metoda uspjela da identifikuje prisustvo apoptotičkih ćelija tek nakon 2 sata od ekspozicije ultraljubičastim zracima.

Ova studija je ukazala da je lakunarnost potencijalno važan parametar (možda čak i važniji od fraktalne dimenzije) u ćelijskoj fiziologiji i molekularnoj biologiji. Čak i kod struktura koje u osnovi ne pokazuju veliki stepen samosličnosti, ovaj parametar se može koristiti za identifikaciju diskretnih promena koje nisu vedljive standardnom mikroskopijom.

Potencijalna primena lakunarnosti u kliničkoj medicini je velika. Na primer, prilikom skorovanja uzoraka dobijenih biopsijom, ova metoda možda može biti od pomoći za donošenje validnog zaključka. Takođe, lakunarnost, fraktalna dimenzija i parametri teksturalne analize se možda mogu zajedno koristiti da bi se

dizajnirao takozvani skoring sistem u histopatološkoj evaluaciji izmenjenih tkiva i ćelija.

5.3. Ograničenja fraktalne i teksturalne analize kao metoda u fundamentalnoj medicini

Mora se priznati da fraktalna analiza kao metod ima i svoje nedostatke. Jedan od najznačajnijih potencijalnih problema je fokusiranost ove analize na dvodimenzionalni objekat, odnosno mikrograf tkiva. Karakteristike mikrografa zavise od velikog broja faktora, a mi ćemo pomenuti samo neke. Svetlosna ekspozicija, korišćenje odgovarajućeg objektiva (uveličanja), tip mikroskopa, tip kamere, filteri, karakteristike kondenzora na mikroskopu su samo neki od faktora koji utiču na kvalitet i osobine dobijene slike. Na primer, ako se slikanje jednog tkiva obavlja u mračnoj prostoriji, a zatim isto slikanje izvrši pri uključenom osvetljenju, dobiće se dva mikrografa sa različitim vrednostima fraktalne dimenzije (Pantic et al. 2015; Pantic et al. 2016).

Drugo potencijalno ograničenje, ne samo fraktalne analize, već svih matematičkih metoda je u samom tkivu koje se analizira. Čak i normalna tkiva u fiziološkim uslovima imaju delove koje su više homogeni (na primer ispunjeni ćelijama) i više heterogeni (npr. Ispunjeni vezivnim tkivom). Ako se slika napravi u području koje ima više detalja (ćelija), prirodno je očekivati da će fraktalna dimenzija kao mera kompleksnosti imati veću vrednost. Sa druge strana, slikanje područja sa malo celularnih ili drugih elemenata će verovatno rezultovati manjim vrednostima fraktalne dimenzije. Da bi se ovaj problem prevazišao u patologiji i histologiji, preporučuje se

pravljenje uzorka od većeg broja slika i računanje srednje vrednosti i standardne devijacije za fraktalne parametre, pre donošenja definitivnog zaključka o kompleksnosti citoarhitekture. Druga opcija bi bila da se slika uvek pravi na istom mestu u tkivu, na primer fotografisanje istih ćelija pre i posle delovanja nekog štetnog činioca (Pantic et al. 2015; Pantic et al. 2016).

U našem istraživanju, mi nismo bili suočeni sa ovim problemima, pošto smo analizirali pojedinačne ćelije, odnosno njihova jedra, a ne celokupnu citoarhitekturu. Takođe, reproducibilnost studije je povećana činjenicom da su limfociti kao ćelijska populacija relativno homogeni u strukturi (boje se na sličan način, bez velikih varijacija u distribuciji boje).

Još jedno potencijalno ograničenje fraktalne analize je činjenica da se za njeno izvođenje slika binarizuje. Naime kod box-counting metode, slika se prvo binarizuje, pa onda pokriva nizom kvadrata različitih veličina. Softver određuje broj kvadrata na svakoj skali, koji su ispunjeni crnim rezolucionim jedinicama (pikselima). Ovo je komplikovan matematički metod iz koga proističe mnogo korisnih podataka, međutim, treba imati u vidu da se tokom procesa binarizacije veći deo informacija gubi. Tačno je da je heterohromatin na mikrofotografiji tamniji od euhromatina, ali to ne znači da će nakon binarizacije ceo heterohromatin postati crn, a euhromatin beo. Ishod binarizacije u velikoj meri zavisi od praga, a prag je određen u softveru za fraktalnu analizu (Pantic et al. 2015; Pantic et al. 2016).

Moguće je da čak i u Gimza – obojenim jedrima postoji regioni koji su heterogeni, u smislu da dolazi do smenjivanja područja sa euhromatinom i heterohromatinom, ali da se ta heterogenost izgubi nakon binarizacije, jer ceo region postane beo ili crn. Za očekivati je da ta heterogenost u tom slučaju neće doprineti povećanju, odnosno smanjenju fraktalne dimenzije ili lakunarnosti jedra. Ipak, treba

istaći da i pored ovog gubitka, činjenica da fraktalna dimenzija može da kvantifikuje stukturne promene u jedru je sama po sebi značajna za naučno-istraživački rad, s obzirom da je alternativa obična subjektivna vizuelizacija i evaluacija (oslanjanje na iskustvo, bez kvantifikacije).

5.4. Histološka bojenja, limfociti i fraktalne karakteristike jedra

Postoji veliki broj histoloških bojenja za vizuelizaciju ćelijskih elemenata periferne krvi. Danas se najčešće koristi Mej Grinvald – Gimza tehnika kojom se jedro boji tamno plavo a citoplazma je obično bezbojna ili svetlo plavo-sive boje. Kod velikih limfocita, često se uočavaju izražene crvenkaste granule pa se taj tip ćelija zovu veliki granulisani limfociti. Veliki granulisani limfociti su u najvećoj meri NK ćelije i učestvuju u urođenoj imunosti.

Limfociti obojeni Mej Grinvald – Gimza metodom obično imaju kompaktni, homogeni hromatin koji kada se posmatra standardnim svetlosnim mikroskopom (bez upotrebe analitičkih metoda) pokazuje uniformnu distribuciju u jedru. Obično se ne vide značajne razlike između perifernih i centralnih regiona jedra, kao ni regioni sa velikom količinom heterohromatina poput jedarca. Međutim, primenom fraktalne analize, mogu se zapaziti diskretne promene u hromatinu limfocita, naročito u patološkim uslovima.

Grupa istraživača iz Brazila je zapazila da hromatin imunskih ćelija krvi, kada je obojen Gimza tehnikom, u pojedinim hematološkim bolestima pokazuje značajne promene u fraktalnoj organizaciji (Ferro et al. 2011) Fraktalna dimenzija ovakvog hromatina je bila u korelaciji sa preživljavanjem pacijenata sa

multiplim mijelomom. Ovo je jedna od prvih studija koja je pokazala da se fraktalna dimenzija hromatina kao matematički parametar može koristiti u prognostičke svrhe u kliničkim uslovima, odnosno da ima značajnu prediktivnu vrednost ishoda bolesti. Još jedna vrednost ove studije je što je pokazala da za fraktalnu analizu hromatina nije neophodno specijalno bojenje koje prikazuje isključivo DNK molekul ili neki drugi deo hromatinske strukture, već je i konvencionalna histološka tehnika dovoljna da se iz analize izvuče informacija od koristi za kliničku praksu (Ferro et al. 2011).

U našoj studiji, takođe je korišćeno specijalno Felgen bojenje za vizuelizaciju DNK u in vitro uslovima. Ovo je bojenje specifično za DNK sa visokim stepenom afiniteta, tolikim da se u laboratorijskim uslovima koristi u kvantitativne svrhe. Zbog cene i kompleksnosti izvođenja, ovo bojenje je teško primenljivo (iako ne nemoguće) u kliničkoj praksi.

Još jedno bojenje koje se danas često koristi za vizuelizaciju i analizu hromatina je Toluidin plavo. Ova boja se vezuje za sve nukleinske kiseline (DNK i RNK), i po svojoj prirodi je semikvantitativno. U prethodnim studijama, korišćeno je za fraktalnu analizu hromatina hepatocita u postnatalnom razvoju i starenju na animalnim eksperimentalnim modelima. Iz našeg prethodnog iskustva, prednost ovog bojenja je što se u pojedinim ćelijskim populacijama jasno vidi euhromatin i heterohromatin kao i granica između ove dve strukture. Ovo može biti od koristi za dalja istraživanja u kliničkoj praksi (Pantic et al. 2016).

Toluidin plavo bojenje je korišćeno i za analizu citoarhitekture hematopoeznog tkiva slezine kod miševa. Nađeno je da se fraktalna dimenzija ovog tkiva smanjuje sa starošću što predstavlja osnovu za dalja istraživanja na ovom organu i imunskom sistemu uopšte (Pantic et al. 2013).

Konačno, kad su u pitanju čvrsta tkiva, u histologiji i patologiji se veoma često za fraktalnu analizu jedara koristi i hematoksilin-eozin tehnika. Ova metoda je korišćena u prethodnim studijama na bubregu (jedra regiona makule denze) gde su ispitivane promene u fraktalnim karakteristikama jedara tokom procesa fiziološkog starenja.

5.5.Genetska osnova depresije

Depresija je multifaktorska bolest, i postoji veliki broj molekularnih i celularnih mehanizama koji učestvuju u njenoj patogenezi. Tri neurotranskitterska sistema, serotoniniski, dopaminski i noradrenalinski, i njihova međusobna interakcija su makar delimično odgovorni za osnovni emocionalni ton, temperament, kao i raspoloženje. Pored neurotransmitera, odnosno premećaja u njihovom funkcionisanju, identifikovan je veliki broj gena čija promena u ekspresiji možda tiče na raspoloženje i emocije. Ipak, treba istaći da većina ovih teorija, i pored određenog broja naučnih dokaza, i dalje ostaju teorije, i biće potrebno mnogo vremena u budućnosti da bi se spoznao pravi patofiziološki način nastanka depresije i ostalih afektivnih poremećaja (Nurnberger, 2017; Serra et al. 2017; Borroto-Escuela et al. 2017; Milaneschi et al. 2017).

Unipolarna depresija i bipolarni afektivni poremećaj (BAP) imaju drugačiju biološku osnovu. Bipolarni poremećaj ima nešto veći stepen učešća naslednih činilaca, međutim to ne znači da kod rekurentnog depresivnog poremećaja nasleđe nema značajnu ulogu. Na primer, moguće je da kod BAP, u više od dve trećine obolelih postoji izvesna nasledna predispozicija. Ako je jedan od roditelja oboleo od poremećaja raspoloženja, postoji nekoliko puta veći rizik da će potomak takoe da oboli, u poređenju sa opštom populacijom.

Studije blizanaca su međutim utvrdile da nasleđe nije jedini faktor koji utiče na razvoj poremećaja raspoloženja, već da sredinski faktori takođe imaju značajnu ulogu.

Gen za neurotrofni moždani faktor (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) je tokom poslednjih nekoliko godina postao fokus za istraživanje genetske osnove depresija. BDNF je u osnovi protein koju pomaže diferencijaciju novih neurona kao i njihovu razgranatost i broj sinapsi u centralnom nervnom sistemu. Ovaj faktor takođe prevenira programiranu ćelijsku smrt (apoptozu) neurona i glijalnih ćelija u mozgu (Nurnberger, 2017; Serra et al. 2017; Borroto-Escuela et al. 2017; Milaneschi et al. 2017).

Značajna ekspresija BDNF gena je lokalizovana u hipokampusu, korteksu, ali i u perifernim tkivima poput bubrega, prostate, a moguće i u imunskom sistemu. BDNF se vezuje za receptore poput TrkB (Track B) and the LNGFR (Low-affinity nerve growth factor receptor). Aktivacija TrkB dovodi do procesa autofosforilacije i pokretanja signalnog puta koji dovodi do promena u ekspresiji određenih regiona hromatina i povećan sinteze proteina koji opet, drugim kompleksnim mehanizmima utiču na fenomen plastičnosti neurona.

BDNF gen se nalazi na hromozomu 11 i njegova ekspresija je kontrolisana od strane velikog broja faktora. Smatra se da dopaminski receptori iz familije D1 mogu dovesti do povećanog stvaranja BDNF u određenim regionima mozga, naročito u frontalnom lobusu. Celularni transkripcioni faktor pod nazivom CREB (cAMP response element-binding protein) takođe utiče na proizvodnju BDNF u centralnom nervnom sistemu. On to radi tako što se vezuje za sekvence DNK koji su pod uticajem cikličnog AMP (cAMP response elements, CRE). CREB nije usko specifičan za gensku ekspresiju BDNF s obzirom da reguliše i niz drugih gena poput onih za enkefaline,

cirkadijalne ritmove i neuropeptide poput somatostatina. NMDA receptor i glutamat kao neurotransmiter takođe možda utiču na ekspresiju BDNF i CREB (Nurnberger, 2017; Serra et al. 2017; Borroto-Escuela et al. 2017; Milaneschi et al. 2017).

Postoji veliki broj poznatih genskih polimorfizama za BDNF. Većina njih su tačkasti polimorfizmi, ograničeni na samo jedan nukleotid, i nepoznato je u kojoj meri oni utiču na sveukupnu plastičnost sinapsi i eventualni razvoj mentalnog poremećaja. Neki lekovi, poput selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina i stabilizatora raspoloženja, u pojedinim slučajevima mogu da utiču na veličinu ekspresije gena za BDNF. Ipak, treba napomenuti da ovo nije glavni efekat ovih lekova i nejasno je u kojoj meri doprinosi njihovom povoljnom efektu kod poremećaja raspoloženja.

5.6. Dopamin, oksidopamin i patogeneza depresije

Dopamin (3,4-dihidroksifeniletilamin) je hemijsko jedinjenje koje je ujedno i neurotransmiter i hormon. Zbog svoje dualne prirode i rasprostranjenosti u organizmu, on predstavlja nezamenljivu supstancu, bez koje čovek, kao živo biće, ne može da opstane. Po svojoj hemijskoj prirodi dopamin pripada porodici kateholamina, zajedno sa adrenalinom i nordrenalinom. Svi oni potiču od zajedničkog prekursora. Sinteza dopamina se odvija u najvećoj meri u nervnim ćelijama gde prvenstveno predstavlja neurotransmiter, ali takodje i u ćelijama srži nadbubrežne žlezde, gde poprima entitet hormona. Njegova sinteza se može odvijati indirektno preko aminokiseline fenilalanin ili direktno preko aminokiseline tirozin, koja dalje, kaskadnim hemijskim reakcijama, preko međuproizvoda L-DOPA, rezultira u nastanku dopamina. Mehanizam sinteze dopamina je veoma kompleksan proces, koji pored samih hemijskih

reaktanata obuhvata i brojne enzime, koenzime i kofaktore. Prilikom konverzije fenilalanina u tirozin, ključni enzim u procesu je fenilalanin hidroksilaza koji zajedno sa kofaktorom tetrahidrobiopterinom i uz utrošak molekularnog kiseonika omogućavaju nastanak konačnog proizvoda. Sličan je proces koji sledi zatim, gde dolazi do stvaranja L-DOPA, proizvoda L-tirozina, uz učešće enzima tirozin hidroksilaze, kofaktora tetrahidrobiopterina, molekularnog kiseonika i takodje dvovalentnog gvoždja. Stvaranje L-DOPA predstavlja ključni a ujedno i poslednji proces u kaskadi sinteze dopamina. Pod dejstvom enzima DOPA dekarboksilaze i koenzima piridoksal fosfata dolazi do stvaranja konačnog proizvoda dopamina. Dopamin dalje, pod dejstvom različitih enzima i sledstvenih hemijskih modifikacija, biva preveden u adrenalin a potom i u noradrenalin (Schübler et al. 2017; Berry et al. 2017; van Holst et al. 2017; Ito et al. 2017; Eisenberg et al. 2017).

Pored same hemijske sinteze dopamina, mora se razmatrati i nervna ćelija koja ima ključnu ulogu u njegovoj produkciji. Nervna ćelija, kao visoko diferencirana i specijalizovana ćelija, koja se sastoji od brojnih organela i biomakromolekula, omogućava svojim strukturom i funkcijom da Dopamin bude adekvatno sintetisan. Ona takodje omogućava da Dopamin bude ispravno usmeren ka sinaptičkoj pukotini i sledećoj nervnoj ćeliji, obezbeđujući na taj način siguran prenos informacija u nervnom sistemu. Hemijska sinteza dopamina se odvija u citosolu tela nervne ćelije, on zatim biva transportovan u sinaptičke vezikule pomoću VMAT2 (vesicular monoamine transporter 2). U sinaptičkim vezikulama Dopamin ostaje sve dok nervna ćelija ne bude nadražena akcionim potencijalom. U tom slučaju, akcioni potencijal, preko niza sekundarnih glasnika i jona kalcijuma kao glavnih posrednika, izaziva posledičnu egzocitozu sinaptičkih vezikula koje sadrže dopamin u sinaptičku pukotinu. Dopamin koji se nakon egzocitoze nalazi slobodan u sinaptičkoj

pukotini, vezuje se za svoje receptore na postsinaptičkoj membrani sledeće nervne ćelije kao i za autoreceptore presinaptičke membrane na nervnom završetku. Dopamin se spontano odvajaju od svojih receptora i biva prenesen nazad u presinaptički neuron iz koga je iz potakao pod dejstvom odgovarajućih specifičnih transportera ili ostaje slobodan u sinaptičkoj pukotini. U oba slučaja, kao sledeći korak sledi njegova razgradnja i eliminacija produkta njegovog metabolizma iz organizma. Razgradnja dopamina se odvija unutar citosola presinaptičkog neurona i na membrani postsinaptičkog neurona. U degradacionom procesu učestvuju visokospecijalizovani enzimi MAO (monoamino oksidaza) koji su prisutni u svoje dve izoforme MAO-A i MAO-B i enzim COMT (katehol-o-metiltransferaza). Enzimi MAO se nalaze u citosolu presinaptičkog neurona, i nakon ponovnog preuzimanja dopamina iz presinaptičke pukotine, dovode do njegove razgradnje procesom oksidacije. COMT se nalazi pretežno na membrani postsinaptičkog neurona, i jedan njegov manji deo strukture prominira ka citosolu postsinaptičkog neurona. Kao produkt razgradnje u oba slučaja nastaje homovanilna kiselina. Ona iz krvi biva filtrirana kroz glomerularnu membranu bubrega, ne resorbuje se ponovo u tubulima bubrega i zadržava se kao konačni produkt u finalnoj mokraći. Nivo homovanilne kiseline u urinu može se koristiti u dijagnostičke svrhe nekih psihijatrijskih oboljenja (Schübler et al. 2017; Berry et al. 2017; van Holst et al. 2017; Ito et al. 2017; Eisenberg et al. 2017).

U cilju ispoljavanja svih svojih dejstava u centralnom nervnom sistemu a i šire, neophodno je da se Dopamin veže za svoje specifične receptore i dovede do njihove adekvatne aktivacije. Postoji pet vrsti dopaminskih receptora, D1 do D5, koji su široko rasprostranjeni unutar mozga kao i u brojnim drugim organima i tkivima organizma. Zbog razlike u mehanizmu kojim se uspostavlja aktivacija receptora kao i razlika u sekundarnim glasnicima koji su zaduženi za dalji

prenos signala unutar ćelije, pet dopaminskih receptora su svrstani u dve klase, D1 i D2 klasu. Pored funkcionalnih razlika u klasama receptora, dopaminski receptori se razlikuju i po svojoj rasprostranjenosti u organizmu koja, između ostalog, korelira i sa njihovom predominantnom ulogom u određenom organu. Klasa D1 receptora obuhvata D1 i D5 dopaminske receptore. Ovi receptori su G_{α} transmembranski proteini i pripadaju porodici G proteina. Vezivanjem dopamina za njih i njihovom aktivacijom dolazi posledično do stimulacije aktivacije enzima adenilat ciklaze, koji dovodi do porasta cikličnog AMP, a koji je ujedno i sekundarni glasnik u prenosu signala. Klasa D2 receptora obuhvata D2, D3 i D4 dopaminske receptore. Njihovi receptori su $G_{i\alpha}$ transmembranski proteini porodice G proteina. Njihovom aktivacijom dolazi do inhibicije adenilat ciklaze i do sniženja nivoa cikličnog AMP. Prema distribuciji na nivou nervnog sistema, uočeno je da se na presinaptičkim dopaminergičkim neuronima nalaze pretežno receptori D2 klase, dok se postsinaptički nalaze mnogo češće receptori D1 klase. Pored funkcionalnih i strukturnih razlika u dopaminskim receptorima, ustanovljeno je, da njihove razlike potiču još od njihovog samog genetičkog zapisa. Nadjeni su različiti polimorfizmi za koje se pretpostavlja da imaju ulogu u nastanku razlike u afinitetu različitih vrsta receptora prema određenim antipsihoticima, ali je preciznije određivanje njihove uloge još uvek u fazi istraživanja (Schübler et al. 2017; Berry et al. 2017; van Holst et al. 2017; Ito et al. 2017; Eisenberg et al. 2017).

Pored same hemijske potentnosti dopamina kao neurotransmitera, za uspostavljanje njegovog punog efekta i specifičnih funkcija važna je karakteristična distribucija dopaminskih receptora u mozgu i na perifernim organima (Farar et al. 2017; Bezu et al. 2017; Luis-Ravelo et al. 2017; Doly et al. 2017). D1 receptori se u mozgu nalaze u visokom broju u mezolimbickim, mezokortikalnim i

nigrostrijatnim putevima. Glavnim strukturama sa ekspresijom D1 receptora mogu se smatrati strijatum, amigdale, nuc. accumbens, substantia nigra i frontalni korteks, dok su isti receptori u drugim strukturama mozga znatno manje zastupljeni. D5 receptori se nalaze u brojnim regionima mozga u nižim koncentracijama u odnosu na D1 receptore. D2 receptori su široko rasprostranjeni u mezolimbičkim, mezokortikalnim, tuberoinfundibularnim i nigrostrijatnim putevima. Visoke koncentracije ovih receptora mogu se naći u substantia nigra, nuc. accumbens, strijatumu, amigdalama, ventralnom tegmentumu, hipotalamusu i hipokampusu. Distribucija D3 dopaminskih receptora je veoma slična distribuciji D2 receptora, ali je za razliku od koncentracije D2 receptora, njihov broj znatno manji. Koncentracija D3 receptora pretežno dominira u okviru limbičkog sistema. Od svih navedenih vrsta receptora, daleko najmanje su prisutni D4 dopaminski receptori. Njihova distribucija je dosta široka, ali je njihova gustina znatno manja. Mogu se naći u frontalnom korteksu, amigdalama, hipokampusu, hipotalamusu, tampusu, pars retikularis substantia nigra i brojnim drugim regionima mozga. Ovakva distribucija dopaminskih receptora odnosi se na različita područja mozga. Svih pet vrsti dopaminskih receptora se nalaze i u perifernim organima i tkivima kao što su: bubrezi, nadbubrežne žlezde, gastrointestinalni trakt, krvni sudovi i srce. Veliki broj D2 dopaminski receptora se nalazi i u hipofizi. U ovoj žlezdi, koja je usko povezana sa centranim nervnim sistemom i endokrinim sistemom, Dopamin ima nezamenljivu ulogu u regulaciji nivoa prolaktina u krvi kao i u uspostavljanju kompleksnog odnosa između hipotalamusa, hipofize i perifernih organa. Zbog široke rasprostranjenosti dopaminskih receptora unutar centralnog nervnog sistema kao i unutar perifernih organa, može se zaključiti da su njegove funkcije raznovrsne i od ključnog značaja da dobro stanje i opstanak jedinice (Beaulieu et Gainetdinov, 2011; Farar et al. 2017; Bezu et al. 2017; Luis-Ravelo et al. 2017; Doly et al. 2017).

Funkcije dopamina unutar centralnog nervnog sistema prvenstveno se odnose na regione mozga koji su zaduženi za kontrolu motornih radnji i izvršavanje adekvatnog motornog odgovora. Dopamin takodje predstavlja ključnu komponentu centra za nagradu zbog koje je usko povezan sa motivacijom kao i u ispoljavanju emocija. Regioni mozga koji se mogu smatrati najviše zaduženim za ispoljavanje dopaminergičkih dejstva zbog većinskog prisustva dopaminskih receptora i dopaminergičkih vlakana u tim regionima su: substantia nigra, ventralni tegmentum, hipotalamus, nuc. accumbens, zona incerta i nuc. paraventricularis. Substantia nigra, je struktura koja se nalazi i mezencefalonu, i bogata je dopaminergičkim neuronima, naročito deo poznat kao pars compacta. Ova region je od posebnog značaja jer predstavlja glavno mesto gde su smeštena vlakna nigrostrijalnog puta. Substantia nigra, zajedno sa svojim dopaminergičkim neuronima i putevima predstavlja bazalnu gangliju, čija je glavna uloga u održavanju funkcionalnosti motornih radnji kao i u učenju novih motornih komandi. Kakav uticaj nedostatak dopamina u ovim regionima mozga ima na čoveka, najbolje se može videti kod pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti. U mezencefalonu je takodje smesten ventralni tegmentum, region koji je bogat dopaminergičkim neuronima koji čine deo mezokortikalnog puta, spajajući svojim vlaknima ovaj region sa prefrontalnim korteksom. Jedan ključna neuronska relacija u blizini navedenih regija je veza između nuc. accumbensa i ventralnog tegmentuma. Ona je većinski posredovana dopaminom i sačinjava glavnu i ključnu komponentu centra za nagradu lociranu u mezolimbičkom dopaminergičkom sistemu. Ovom sistemu pridodati su sporedni regioni takodje od određenog značaja u centru za nagradu, to su amigdaloidna tela, cingularni girus, hipokampus i olfaktorni bulbus. Preko uspostavljanja komunikacije između navedenih regiona preko dopaminergičkih vlakana dolazi do ispoljavanja emocija vezanih za nagradu, izražene kao osećaj

zadovoljstva, radosti, euforije ili sitosti. S ovim regijama u vezi je i nastanak motivacije kao i omogućenje procesa asocijativnog učenja, prevashodno odnoseći se na tip klasičnog i operantnog uslovljavanja. Patološke promene u ovim regionima mogu se naći kod različitih psihijatrijskih poremećaja, naročito onih udruženih sa poremećajima raspoloženja kao sto su bipolarni afektivni poremećaj i depresija. Promene u aktivnosti ovih regiona i ekscitaciji neurona ovih regija mogu se naći prilikom konzumiranja različitih psihoaktivnih supstanci, naročito kokaina i metamfetamina. Dejstva većine psihoaktivnih supstanci koje su psihostimulansi upravo se bazira na aktiviranju regiona mozga u neposrednoj vezi sa centrom za nagradu. Ekscitacijom neurona ovih delova dolazi do subjektivnog osećaja euforije i snage. Nakon prestanka efekta psihoaktivne supstance, naglo prestaje nadraženost centra za nagradu sto se zatim može povezati sa nastankom apstinencijalnog sindroma. Tubuloinfundibularni put predstavlja četvrti i poslednji ključni dopaminergički put mozga (ostala tri su predhodno navedena, nigrostrijatni, mezokortikalni i mezolimbički) njegova vlakna potiču od nuc. paraventricularis i nuc. arcuatus, spajajući medjusobno ova dva jedra mozga kako modjusobno tako i svaki od njih pojedinačno sa hipofizom. Funkcija dopamina u ovom regionu je pretežno endokrinološka i nadmašuje njegove uobičajene uloge kao neurotransmitera i neuromodulatora. U ovom regionu dopamin predstavlja glavni inhibitor sekrecije prolaktina iz adenohipofize. Kao i većina ostlih hormona koji pripadaju hipotalamus-hipofiza osovini, Dopamin iz jedara nuc. arcuatus i nuc. paraventricularis preko portnog sistema hipofize dospeva do eminencije medijane gde inhibitorno utiče da lučenje prolaktina iz hipofize. Endokrinološki, zona incerta, smeštena izmedju nuc. arcuatus i nuc. paraventricularis takodje je bitna dopaminergička celina koja utiče na sekreciju gonadotropin rilizing hormona iz hipotalamusa. Preko delovanja na gonadotropin rilizing hormon, Dopamin indirektno utiče na nivoe

folikulo stimulirajućeg hormona i luteinizirajućeg hormona, dovodeći do promena u nivou polnih hormona u krvi, a samim tim utičući i na seksualne karakteristike osobe (Schübler et al. 2017; Berry et al. 2017; van Holst et al. 2017; Ito et al. 2017; Eisenberg et al. 2017).

Dopamin se u većini slučajeva povezuje sa centralnim nervnim sistemom i njegovom ulogom kao neurotransmiter. Međutim, njegova uloga se odražava na više perifernih organa i ne može se smatrati manje bitnom i ključnom za funkcionisanje organizma. Dopamin ima ulogu u regulaciji tonusa zidova krvnih sudova. Dopaminski receptori su prisutni na zidovima arterija i vezivanjem dopamina za njih dovodi do vazodilatacije. Dopamin takodje ima sposobnost da inhibiše otpuštanje noradrenalina u vaskularnom sistemu, doprinoseći i na taj način smanjenju tenzije zidova krvnih sudova. Sve vrste dopaminskih receptora mogu se naći u bubrezima. Dopamin do bubrega dospeva kako krvotokom tako i preko sekrecije samih tubulskih ćelija bubrega. Njegovo dejstvo manifestuje se povećanjem priliva krvi u glomerule bubrega, a takodje dovodi i do znatnog povećanja glomerularne filtracije na nivou tubula. On takodje utiče na povećano izlučivanje jona natrijuma preko mokraće, delujući na taj način indirektno na krvni pritisak i sprečavajući pojavu hipertenzije. Imunske ćelije pored brojnih i raznovrsnih receptora, na svojoj površini sadrže i receptore za Dopamin, limfociti u ovom pogledu imaju najveći značaj. Oni pored receptora za Dopamin poseduju i sposobnost da sami produkuju i izlučuju Dopamin. Uticaj dopamina na imuni sistem i dalje nije dovoljno proučen, ali se smatra da ima uticaj i na smanjenje aktivnosti limfocita (Schübler et al. 2017; Berry et al. 2017; van Holst et al. 2017; Ito et al. 2017; Eisenberg et al. 2017; Pacheco et al. 2009; Nestler et Carlezon, 2006; Manakova, 2005; 183. Beaulieu et Gainetdinov, 2011) .

Glavna uloga dopamina kao hormona ogleda se preko prolaktina i njegovih bioloških dejstava. U telima nervnih ćelija

određenih jedara hipotalamusa, dolazi do sinteze dopamina, koji zatim vezujući se za D2 receptore, inhibitorno utiče na oslobađanje prolaktina iz hipofize dovodeći na taj način i do smanjenja nivoa slobodnog prolaktina na periferiji i u perifernim tkivima. U fiziološkim uslovima, sekrecija prolaktina iz hipotalamusa je pod konstantnim inhibitornim uticajem dopamina iz hipotalamusa. U određenim okolnostima pod uticajem visokih nivoa tireotropin rilizing hormona iz hipotalamusa, može doći do povećane produkcije prolaktina. Međutim, takvih slučajeva je malo. Nivo lučenja prolaktina je također pod kontrolom polnih hormona, prvenstveno estrogena. Estrogen deluje na lučenje prolaktina dvostruko, direktno stimuliše lučenje hormona preko delovanja na hipofizu a indirektno dovodi do inhibicije lučenja dopamina u hipotalamusu odražavajući se onda i na nivoe prolaktina. Manifestacije dejstva prolaktina najviše dolaze do izražaja tokom trudnoće i odmah nakon porodjaja žene. Tokom trudnoće, visoki nivoi estrogena i progesterona dovode do povišenja nivoa prolaktina što se izražava povećanjem volumena mlečnih žlezda a neposredno nakon porodjaja nastankom laktacije i razvoja materinskog ponašanja. Ubrzo nakon porodjaja nivoi polnih hormona opadaju ali nakon početka dojenja deteta, dolazi do draženja mehanoreceptora u dojka majke koji prenose signal do hipotalamusa da se nastavi sa obustavom lučenja dopamina a ujedno i da se poveća lučenje oksitocina iz neurohipofize pospešujući i produžavajući na taj način trajanje procesa laktacije. U patološkim okolnostima može postojati hiper ili hipoprodukcija prolaktina. Češće je slučaj da je u pitanju hiperprolaktinemija, osnovni uzrok je poremećaj u samoj osovini hipotalamus-hipofiza-gonade. Zbog povećanog nivoa prolaktina prisutna je supresija gonadotropin rilizing hormona, a što se posledično odražava i na FSH i LH nivoe a ujedno i na nivoe estrogena i testosterona u krvi. Zbog takvih promena kod žena dolazi do izražaja efekata hipoestrogenemija, što se manifestuje oligomenorejom, amenorejom, spontanim laktacijama,

infertilitetom i padom libida. Kod muškaraca se manifestuju erektilna disfunkcija i pad libida. Hipoprolaktinemija, iako znatno redja, značajno je povezana sa dopaminergickom hiperaktivnošću tubuloinfundibularnog puta. Zbog visokih nivoa dopamina i smanjene sekrecije prolaktina dolazi do pojavi ovarijalne disfunkcije kod žena. Kod muškaraca je klinička slika kompleksnija, uz prisutnu arteriogenu erektilnu disfunkciju, prevremene ejakulacije, oligospermiju i hipoandrogenizam (Pacheco et al. 2009; Nestler et Carlezon, 2006; Manakova, 2005; 183. Beaulieu et Gainetdinov, 2011).

Oksidopamin (6-hidroksidopamin) je veštački sintetisano jedinjenje i strukturni analog dopamina koje ima sposobnost da se selektivno veže za dopaminske i noradrenalinске receptore. Vezivanjem za receptore, on dovodi do njihove dezintegracije i destrukcije, ispoljavajući na taj način kateholaminsko neurotoksično dejstvo (Pantic et al. 2016). Njegova primena je ograničena na različite životinjske eksperimentalne modele, prvenstveno glodare, pacove i zeceve. Na ogleđima izvedenim na pacovima, prilikom sistemske primene došlo je do pojave efekata na simpatičkim nervnim završecima na nivou perifernog nervnog sistema. Zbog izostanka sposobnosti da prodje krvno-moždanu barijeru, a u cilju ispoljavnja svojih efekata na nivou centralnog nervnog sistema, neophodno je aplikovati ga intracerebralno. Prilikom intraparenhimske aplikacije oksidopamin dovodi do degeneracije parenhima mozga u najbližem rastojanju od aplikacije. On takodje dovodi do degeneracije noradrenalnih i dopaminskih neurona, pri čemu su nervni završeci neurona podložniji oštećenju i degeneraciji od tela nervnih ćelija. Oksidopamin dospeva u neurone vezujući se za transportni sistem koji je inače fizioloski prilagodjen za preuzimanje kateholamina. Stepem nastalog oštećenja zavisi u velikoj meri od načina primene oksidopamina, odnosno da li je u pitanju

intraventrikularna ili intraparenhimska aplikacija. Razlike u efektu se takodje mogu primetiti u zavisnosti od doze i tacnog mesta aplikovanja oksidopamina (Pacheco et al. 2009; Nestler et Carlezon, 2006; Manakova, 2005; 183. Beaulieu et Gainetdinov, 2011; Pantic et al. 2016). Glavni mehanizam kojim ovaj neurotoksin izaziva svoja dejstva je preko stvaranja reaktivnih oblika kiseonika i naknadno nastalim oksidativnim stresom. Nastanak oksidativnog stresa je najuže povezan sa funkcijom mitohondrija i smatra se da su upravo one glavni funkcionalni fokus po kome se bazira nastanak ostecenja. Promene na nivou mitohondrija su funkcionalne i strukturne prirode. Pod uticajem oksidopamina dolazi do promene u odvijanju glavnog procesa unutar mitohondrija, oksidativne fosforilacije. Toksično delovanje oksidopamina ometa ispravno funkcionisanje kompleksa I i IV, koji se smatraju ključnim karikama u procesu oksidativne fosforilacije. Nadjene su promene i u propustljivosti mitohondrijske membrane, a takve promene se mogu naci i u ćelijama tokom procesa apoptoze. Smatra se da sličnim mehanizmom deluje i oksidopamin na neurona, dovodeci i do njihove apoptoze. Prilikom promene u propustljivosti mitohondrijske membrane, dolazi do otpustanja citohroma c koji dodatno doprinosi oksidativnom oštećenju ćelije. Oksidopamin se danas u najsiroj meri koristi za ispitivanje parkinsonove bolesti na animalnim eksperimentalnim modelima. Ciljana aplikacija oksidopamina u regione bogate dopaminskim putevima, kao sto su strijatum, substantia nigra i grupe neurona koji čine medial forebrain bundle, dovodi do ispoljavanja motornih simptomata karakterističnih za parkinsonizam. Svrha aplikacije oksidopamina je upravo ta, da se na eksperimentalnim životinjama i u kontrolisanim uslovima veštački izazove parkinsonizam. Da bi se ispoljili motorni simptomi parkinsonizma kod eksperimentalnim modela a i kod čoveka, neophodno je da bude uništeno 70-90% ćelija dopaminergickih regiona odgovornih za specifične motorne funkcije. Izazivanje parkinsonizma na eksperimentalnim modelima, omogućava

sprovođenje detaljnijih i raznovrsnijih istraživanja koja se mogu odnositi na etiologiju, patogenezu i terapiju parkinsonizma. Dalja ispitivanja u budućnosti također mogu da dovedu do razvoja potencijalnih preventivnih mera u cilju smanjenja incidence i prevalencije parkinsonizma u opštoj populaciji (Pacheco et al. 2009; Nestler et Carlezon, 2006; Manakova, 2005; 183. Beaulieu et Gainetdinov, 2011; Pantic et al. 2016).

5.7. Imunski sistem i depresija

Po definiciji koju je dao Abul K. Abbas "Imunski sistem čine molekuli, ćelije, tkiva i organi koji kolektivno funkcionišu s ciljem obezbeđivanja imunosti, odnosno zaštite od infektivnih patogena". Pored definicije imunskog sistema bitna je i sama spoznaja da je imunski sistem kompleksna celina koja se sastoji od brojnih, međusobno isprepletanih komponenti. Imunski sistem se prema svojoj prirodi deli na urođenu (prirodnu, nativnu) imunost i stečenu (adaptivnu, specifičnu) imunost. Urođena imunost je prisutna još od samog rođenja jedinke, predstavlja njenu nepromenljivu i genetski determinisanu karakteristiku. Ona je kako po mehanizmu svog delovanja tako i prema uzročniku ka kome je usmerena, nespecificna. Fiziološki je prisutna kod svake jedinke i sastoji se od istih osnovnih elemenata koji obuhvataju kako različite molekule i ćelije tako i sama tkiva. Urođenu imunost čine epitelne barijere, različite vrste ćelija kao što su fagociti, antigen-prezentujuće ćelije, NK ćelije, mastociti ali i različiti proteini plazme u koje se svrstavaju komponente sistema komplementa i citokini (Abbas, 2014; Beyer et al. 2011; Boiret et al. 2001; Aucagne et al. 2011).

Epitelne barijere prevashodno predstavljaju mehaničku odbranu protiv infektivnih patogena iz spoljašnje sredine. Njihov

kontinuitet fizički sprecava prolaz mikroorganizama u organizam, krvotog i organe. Pored fizičke barijere, epitel omogućava i hemijsku i biološku barijeru i zaštitu. Hemijska barijera se ogleda u prisustvu beta-defenzina, lizozima, fosfolipaze A2 u sekretima na površini kože i sluznica, nastalih kao produkt sekrecije različitih žlezda ili epitela, delujući antimikrobno i zaštitno. Biološku zaštitu omogućava fiziološka mikroflora prisutna na koži i sluzokoži gastrointestinalnog trakta, gornjih respiratornih puteva (sve do terminalnih bronhiola), urogenitalnog trakta sa izuzetkom mokraćne bešike i proksimalnog dela uretre. Bakterijska flora je mešana i sastoji se od nepatogenih i uslovnog patogenih mikroorganizama koji svojim sintetisanim produktima i prisustvom onemogućavaju kolonizaciju i infekciju patogenim mikroorganizmima (Abbas, 2014).

Ćelije fagociti su sledeća linija odbrane od infekcije (Dale et al. 2008). Zbog specifičnog sastava organela u svojoj citoplazmi, i prisutnih brojnih lizozoma, zaduženi su za intracelularnu destrukciju i skladištenje patogena. Pomoću receptora prisutnih na površini njihove membrane u mogućnosti su da prepoznaju specifične regione na površini patogena, da se pomoću njih spoje sa patogenima i izvrše njihovu ingestiju. Ovakva specifična funkcija se prevashodno odnosi na monocite u krvi i makrofage i neutrofile u tkivima. Zbog prisustva MHCII (molekul glavnog kompleksa tkivne podudarnosti) na njihovoj površini, ove ćelije imaju i sposobnost prezentacije antigena (Neefjes et al. 2011) . Neutrofili i makrofagi zajedno sa dendritskim ćelijama pripadaju grupi antigen-prezentujućih ćelija i sve sadrže MHCII na površini svojih membrana. One imaju funkciju u prikazivanju određenih delova antigena različitih patogena limfocitima, na taj način one imaju nezamenljivu ulogu u iniciranju stečenog (adaptivnog) imunskog odgovora i omogućavaju da imunski sistem na celishodan način reaguje na određen patogen posredstvom urođenog i stečenog imuniteta (Neefjes et al. 2011).

NK (natural killer) ćelije, pripadaju po tipu ćelije limfocitima, ali predstavljaju element urodjene imunosti (Vivier et al.2008). Slične su fagocitima po svojoj sposobnosti uništavanja infektivnih patogena, ali za razliku od njih ne poseduju sposobnost ingestije mikroorganizama i vršenja fagocitoze. Mehanizam kojim se one služe je perforin-granzin. U granulama unutar njihove citoplazme nalaze se perforin i granzim koji, nakon susreta sa mikroorganizmom, biva izlučen i izaziva oštećenje membrane ćelije i izaziva apoptozu. NK ćelije takodje izazivaju apoptozu ćelije direktno, putem aktiviranja signalnog receptora Fas-Fas ligand i aktiviranja puta apoptoze. Treći mehanizam eliminacije patogena je posredstvom ADCC (antitelom posredovana ćelijska citotoksičnost) u kome pored NK ćelija učestvuju antitela koja su se predhodno vezala za mikroorganizam i izvršila njegovu opsonizaciju. NK ćelija vrši destrukciju takve ćelije (Vivier et al.2008; Akhtari et al. 2010).

Sistem komplementa sačinjen je od 20 različitih proteina plazme, koja se nalaze slobodne u neaktivnom obliku u krvi. Aktivacijom pojedinih komponenti sistema komplementa putem infektivnog patogena, dolazi do kaskadne aktivacije većine ostalih komponenti komplementa. Postoje tri puta aktivacije sistema komplementa, klasični, alternativni i lektinski, koji kao krajnji ishod dovode do direktne ili indirektno destrukcije mikroorganizma. Aktivacijom sistema komplementa dolazi do obrazovanja MAC (kompleks koji napada membranu - membrane attack complex) koji vezujući se za mikroorganizam dovodi do destrukcije njegove membrane a samim tim i samog organizma. Sistem komplementa takodje može da dovede do opsonizacije mikroorganizma i indirektno posredstvom fagocita do njegove eliminacije.

Citokini su takodje proteini plazme, njihova uloga u imunom sistemu je neprocenljiva i ako direktno ne dovode do destrukcije mikroorganizama (Zlotnik et Yoshie, 2008). Citokine luče skoro sve

ćelije imunog sistema, ali takodje i ćelije koje nisu u direktnom smislu članovi imunog sistema kao sto su glatke mišićne ćelije, fibroblasti, endotel i brojne druge ćelije. Dejstvo citokina moze biti autokrino, gde ćelija izlučujući citokin deluje na receptore koji se nalaze na njenoj površini, u takvim okolnostima citokini često imaju funkciju faktora raasta. Parakrino lučenje citokina omogućava komunikaciju izmedju ćelija u odredjenom regionu a i održavanje adekvatne mikrosredine. I najzad moguća je i endokrina produkcija citokina, direktno u krvotok i ispoljavanje njihovog dejstva na udaljenim organima i ćelijama. Glavna funkcija citokina je da omoguće komunikaciju izmedju ćelija, tkiva i organa imunskog sistema. Neophodni su za adekvatno aktiviranje i povezivanje urodjenog i stečenog imunskog odgovora u jednu svrsishodnu celinu. Uloga citokina, a posredstvom njih i celog urodjenog imunskog sistema, najbolje se uočava u reakciji zapaljenja koja predstavlja glavni način odbrane od infektivnih patogena posredstvom urodjenog imunskog sistema. Zapaljenska reakcija nastaje na mestu prodora infektivnog patogena i predstavlja fiziološki odgovor tkiva na oštećenje. Citokini imaju bitnu ulogu u izazivanju hemotakse leukocita ka mestu oštećenja. Prisustvo mikroorganizma dovodi do reakcije tkivnih makrofaga koji odgovaraju lučenjem TNF (tumor necrosis factor) i IL-1 (interleukin 1) koji deluju hemotaksično na leukocite, dovodeći do njihovog povećanog priliva ka mestu oštećenja. Navedeni citokini utiču kako na leukocite u cirkulaciji tako i na sam vaskularni endotel, dovodeći do povećanog eksprimiranja receptora na njihovoj površini izazivajući prvo kotrljanje leukocita po krvnim sudovima, zatim njihovu adherenciju i na kraju migraciju ka oštećenom tkivu. Ovim resledom dogadjanja do mesta oštećenja dospevaju ćelije kao sto su fagociti koji dovode do eliminacije i destrukcije patogena. U procesu zapaljenja učestvuju i prostaglandini i leukotrieni, supstance koje luče endotelne ćelije krvnih sudova. Oni dovode do vazodilatacije, povećane propustljivosti krvnih sudova i do

povećanog priliva leukocita na mesto infekcije. Navedene komponente predstavljaju samo neke od brojnih koje su uključene u veoma kompleksan proces zapaljenja i zajedno dovode do ispoljavanja kardinalnih znakova zapaljenja kao što su toplota, otok, crvenilo i bol. Zapaljenska reakcija predstavlja glavni mehanizam kojim urodjena imunost omogućava odbranu od infektivnih patogena. Tokom ovog procesa dolazi do odstranjivanja i destrukcije infektivnog patogena a zatim i reparacije oštećenog tkiva (Zlotnik et Yoshie, 2008; Aoyagi et al. 2008; Roberts et al. 2012).

Stečeni (adaptivni, specifični) imunitet predstavlja veliki deo celokupnog imunskog sistema, koji se po brojnim karakteristikama razlikuje od pretkodno navedenog urodjenog imuniteta (Carrol, 2004). Upravo njegove brojne razlike u odnosu na urodjenu imunost omogućavaju, zahvaljujući citokinskoj i medijatorskoj komunikaciji sa urodjenim imunitetom, celishodan i opširan imunski odgovor na brojne infektivne patogene. Stečeni imunitet, za razliku od urodjenog, se ne nasledjuje genetički, vec se stiče tokom godina pomoću ponovljenih brojnih i raznovrsnih kontakata sa mikroorganizmima. Njegove glavne komponente koje su izvršiocci zaštite organizma su limfociti. Limfociti su ćelije krvi, prisutni u svoje dve glavne grupe ili populacije, B i T limfocita. Podela na ovde dve grupa je izvršena zbog razlika u njihovom mehanizmu delovanja na određenje infektivne patogene, ali pored tih funkcionalnih razlika, postoje i brojne strukturne i biohemijske, takodje od velikog značaja. Pored ove dve glavne populacije limfocita, postoje odredjene podgrupe ili subpopulacije unutar B i T limfocita. Glavne odlike stečenog imuniteta a ujedno i limfocita je njihova specifičnost u odnosu na uzročnika infekcije. Imuni odgovor se pokreće na tačno odredjeni mikroorganizam i to tačno odredjenim i specificnim mehanizmom (Zuklys et al. 2012; Sleckman, 2015; Sun et al. 2012; Zubkova et al. 2005; Chen et al. 2012). Takodje, tokom susreta sa uzročnikom dolazi

do amplifikacije imunskog odgovora, za koju su odgovorni sami limfociti i njihova sposobnost da tokom imunskog odgovora eksponencijalno i konstantno povećaju svoj broj specifičan u odbrani na određeni mikroorganizam. Jedan od glavnih obeležja stečenog imuniteta je nastanak imunološke memorije nakon izlaganja određenom infektivnom patogenu (Corcione et al. 2010; Gomariz et al. 1989; Pantic et al. 2012b; Randall et al. 2006; Shim et al. 2006). Prilikom prodiranja uzročnika u organizam čoveka, dolazi do izlaganja limfocita stranim antigenima putem antigen-prezentujućih ćelija i do izazivanja reaktivnog imunskog odgovora. Međutim, pored toga, određeni limfociti nakon sanirane infekcije ostaju u organizmu i one su i dalje specifične za uročnika, predstavljajući memorijske ćelije. Prilikom svakog sledećeg susreta sa istim uročnikom antigenima, dolazi do aktivacije memorijskih limfocita koji imaju sposobnost, da na brži i efikasniji način indukuju imunski odgovor, dovodeći do znatno boljeg i potpunijeg eliminisanje infektivnog patogena. Pored samih ćelija, veoma su bitni organi u kojima se nalaze i sintetišu ćelije stečenog imunog odgovora. Kostna srž i timus se svrstavaju u primarne limfne organe u kojima se nalaze matične ćelije krvne loze, koja pored ostalih, obuhvata i matične ćelije limfocita. U kostnoj srži se u početku odvija sinteza prekursora obe vrste i B i T limfocita, da bi zatim, kasnije, doslo do daljeg sazrevanja T limfocita u timusu. Prilikom sazrevanja, limfociti koje se nalaze u specifičnoj mikrosredini i pod stalnim uticajem citokina, faktora rasta i hormona počinju da poprimaju osobine zrelih, imunokompetentnih ćelija. Prilikom sazrevanja limfociti stiču sposobnost prepoznavanja stranih antigena i stiču sposobnost imunske tolerancije. Oni koji ne uspeju na adekvatan način da steknu navedene sposobnosti, zbog svoje potencijalne autodestruktivne prirode, bivaju eliminisani indikovanim apoptozom. Periferni limfni organi zaslužni su za skladištenje limfocita obezbeđuju mesto susreta limfocita sa antigen-prezentujućim ćelijama i stranim

antigenima. Limfni čvorovi, slezina i MALT (mucosa associated lymphoid tissue) svrstavaju se u periferne limfne organe. U njima se nalaze smeštene populacije i B i T limfocita u tačno ograničenim odgovarajućim, njima pripadnim zonama (Von Andrian et Mempel, 2003). B limfociti su smešteni u kružnim regionima poznatim kao limfni folikuli u čijim centrima se mogu nalaziti germinativni centri. Germinativni centri predstavljaju mesta gde se odvija stvaranje različitih klasa antitela specifičnih za određeni antigen. Zone u kojima se nalaze skoncentrisani T limfociti su manje određene u limfnim čvorovima i MALT-u nego što je slučaj kod B limfocita. Nalaze se grupisani u regionima koji okružuju limfne folikule i takodje subkapsularno u limfnim čvorovima. U slezini postoji jedan više ograničen region koji okružuje terminalnu arteriolu, nazvan PALS (periarteriolarne limfni omotac) koga sačinjavaju gusto zbijeni T limfociti, odvojeni od limfnih folikula sa B limfocitima koji se nalaze blizu kapsule slezine (Carroll, 2004; Appay et al. 2010; Minami et al. 2007; Luc et al. 2012).

T limfociti u okviru stečenog imunskog odgovora imaju brojne funkcije, a koje imaju određene specifičnosti i shodno tome se i nazivaju celularnom imunošću. Celularna imunost kao naziv odnosi se na T limfocite zbog načina na koji vrše eliminaciju uzročnika, a to je pre svega na celularnom nivou, dovodeći do destrukcije ćelija inficiranih intracelularnim mikroorganizmima. Postoje više grupa T limfocita. Glavna podela je na dve grupe, T helper limfociti i citotoksični T limfociti. Takodje, postoji i treća, manja grupa, sa limfocitima koji su gama-delta T limfociti. Razlike između grupa T limfocita, pored funkcionalnog postoje i u strukturnom smislu. Strukturno, najveće razlike između grupa T limfocita, mogu se naći na površini njihovih ćelijskih membrana, u sastavu i broju receptora i CD (cluster of differentiation) koreceptora.

T helperi su grupa T limfocita koja na svojoj površini ćelijske membrane sadrže TCR (t ćelijski receptor) koji se sastoji od dva polipeptidna lanca, alfa i beta, i koji ima ključnu ulogu u prepoznavanju MHC II koji se nalaze na površini antigen-prezentujućih ćelija (Reiner et al. 2007). Zajedno sa TCR na T helper limfocitima su prisutni i CD3 (cluster of differentiation) i zeta protein. Ova tri elementa, TCR, CD3 i zeta protein, zajedno čine TCR kompleks, koji se nalazi na svim T limfocitima, nezavisno da li su T helper ili citotoksični T limfociti. Na T helperima se pored TCR kompleksa nalazi i koreceptor, CD4. Da bi nastao odgovarajući imunski odgovor, neophodno je da antigen-prezentujuće ćelije prikazu antigen mikroorganizma u sklopu MHC II T helper limfocitima, i da se taj signal prenese preko TCR kompleksa i CD4 koreceptora i izazove aktivaciju signalnog puta unutar T helpera. Medjutim, osim signala samog antigena, koji predstavlja prvi neophodni signal, neophodno je da T helper dobije kostimulaciju od strane antigen-prezentujuće ćelije, koja može biti makrofag, dendrićna ćelija ili B limfocit u vidu izlučenih citokina. Ovaj korak, zajedno sa specifičnom mikrosredinom u kojoj se nalazi, je ključan za aktivaciju T helpera. Od ovog koraka također zavisi u koju subpopulaciju će se diferencirati inicijalni T helper, u TH1, TH2 ili TH17. TH1 subpopulacija u uskom je kontaktu sa makrofagima i njihovom ulogom u ingestiji i fagocitozi infektivnih patogena. Putem izlučivanja interferona gama, TH1 pospešuju funkciju makrofaga u ubijanju mikroorganizama unutar fagolizozoma. TH2 subpopulacija lučenjem interleukina 4 i 5 pospešuje funkciju eozinofila, a koji predstavljaju najbitnije ćelije krvne loze u odbrani protiv parazitskih infekcija. Dok interleukin 4 i 5 deluju toksično na parazite, izlučeni interleukin 13 deluje na crevnu peristaltiku, dovodeći do mehaničke eliminacije parazita. TH17 subpopulacija, za razliku od prethodne dve, utiče manje specifično na zaštitu od infektivnog patogena. Izlučeni interleukin 17 i interleukin 22 iz TH17 pojačavaju

zapaljensku reakciju i privlače leukocite, i među njima naročito neutrofile i monocite, pogodne za eliminaciju uzročnika kao što su gljivice, na mesto infekcije. Navedene uloge pojedinih subpopulacija T helpera pokazuju da i ako pripadaju celularnom imunitetu, ova populacija T limfocita ima takodje važnu ulogu i u zaštiti od ekstracelularnih patogena.

Citotoksični T limfociti (CTL) su prototipski predstavnici celularnog imuniteta, obzirom da je njihova glavna odlika, destrukcija intracelularnih mikroorganizama (Lieberman J). Strukturno oni sadrže TCR kompleks, identičan onom kod T helpera, ali se razlikuju od njih po koreceptoru, koji je u slučaju citotoksičnih T limfocita CD8. Zbog prisustva CD8 koreceptora, CTL se vezuju za MHC I koji se nalazi na površini ćelijske membrane svake ćelije sa jedrom. U sklopu MHC I mogu se prikazivati antigeni intracelularnog mikroorganizma, što predstavlja prvi i jedini akcioni signal koji je potreban za aktivaciju CTL. Za razliku od T helpera, CTL ne zahtevaju drugi signal u vidu kostimulacije, već samim vezivanjem za inficirane ćelije, mogu da pokrenu proces ćelijske destrukcije. Mehanizam kojim CTL uništavaju inficirane ćelije je perforin-granzim reakcija. Perforin dovodi do stvaranja diskontinuiteta ćelijske membrane inficirane ćelije, narušavajući njenu propustljivost, dok granzim dodatno pokreće intracelularni put apoptoze. CTL mogu i direktno da pokrenu proces apoptoze putem Fas-Fas ligand interakcije, koja se odvija na površini obe ćelijske membrane T limfocita i inficirane ćelije. Zbog aktivnog učešća CTL u uništenju mikroorganizmom zahvaćene ćelije, u odnosu jedan na jedan, tokom aktivacije CTL dolazi i do klonske proliferacije ove populacije T limfocita. To nije slučaj kod T helpera kod kojih je samo moguće u mnogo manjoj meri (Von Andrian et Mempel, 2003; Reiner, 2007; Lieberman, 2003; Parren, 2001; Allen et al. 2007).

Gama-delta T ćelijska populacija, je malobrojna i čini 5-10% svih T limfocita. U sklopu TCR (T ćelijskog receptora) kod ovih limfocita, umesto polipeptidnih lanaca alfa i beta prisutni su gama i delta. Pored razlike u strukturi receptora između ove populacije T limfocita i prethodne dve, postoji razlika i u njihovoj funkciji, distribuciji i prirodi. Zbog odsustva koreceptora CD8 i CD4 gama-delta T limfociti nisu ograničeni na prepoznavanje MCH klase I i II. Oni su sposobni da prepoznaju proteinske i neproteinske antigene, što nije slučaj sa prethodne dve populacije, koje su ograničene na striktno obradjene peptidne antigene. Zbog takve osobine, oni se mogu smatrati elementom urođjene imunosti, a čemu u prilog ide i spoznaja da su neke NK ćelije upravo vrsta gama-delta T limfocita, pod nazivom gama-delta NK T ćelije. Pored naziva, dele sa njima i način prepoznavanja infektivnih patogena, po tipu prepoznavanja molekularnih obrazaca i načina eliminisanja infektivnih patogena. Sa druge strane, gama-delta T ćelije poseduju i osobine stečenog imuniteta, i to sveobuhvatno glavnu ulogu stečenog imuniteta, stvaranje memorijskih ćelija. Gama-delta T limfociti, nakon prvog susreta sa određenim antigenom imaju sposobnost da stvore memorijske ćelije, koje će pri sledećem susretu sa istim infektivnim patogenom da dovedu do efikasnije i brže aktivacije imunskog odgovora. Ova ćelijska populacija odstupa i po svojoj distribuciji u organizmu. Nadjeno je da i ako se mogu naći u celom organizmu, njihov broj preovladava u koži i na epitelim barijerama. Zbog svega navedenog gama-delta T ćelije se svrstavaju u treću zasebnu grupu T limfocita. Njihova pripadnost u smislu urođenog ili stečenog imuniteta takodje ostaje diskutabilna (Von Andrian et Mempel, 2003; Reiner, 2007; Lieberman, 2003; Parren, 2001; Allen et al. 2007).

B limfociti su populacija limfocita odgovorna za humoralnu imunost (Parren PV, Burton DR). Njihova glavna funkcija ogleda se u uništavanju ekstracelularnih mikroorganizama i toksina posredstvo

antitela. B limfociti na svojoj površini takodje poseduju MHC II i ispoljavaju dejstvo antigen-prezentujućih ćelija. Na svojoj ćelijskoj membrani B limfociti poseduju antitela koja se sastoje od dva identična laka polipeptidna lanca (kapa i lamda) i dva identična teška polipeptidna lanca (mi, delta, alfa, gama, epsilon). Regioni antitela kojima se vezuju za antigen su Fab i veoma su varijabilni regioni, ostali deo antitela je Fc region i nema ulogu u vezivanju antigena. U zavisnosti od tipa teškog lanca, antitela mogu biti IgM, IgG, IgA, IgE, IgD i predstavljaju klase antitela. Jedna B ćelija može da produkuje samo jednu vrstu antitela. Bitno je naglasiti da samo zrele B ćelije koje su već bile u susretu sa određenim antigenom su u mogućnosti da produkuju antitela, dok sve ostale native B ćelije, ili služe kao antigen-prezentujuće ćelije, ili ostaju afunkcionalne dok ne budu aktivirane antigenom. Native B ćelije koje se još nisu susrele sa antigenom, na površini svoje plazma membrane sadrže IgM i IgD antitela i takodje lance imunoglobulina alfa i beta koji svi zajedno čine B ćelijski receptorski (BCR) kompleks. BCR kompleks omogućava kontakt sa antigenom pomoću svojih Fab regiona na antitelima, ali isto tako i prenos aktivacionih signala u unutrašnjost B ćelije preko proteinskih imunoglobulinskih lanaca alfa i beta. Odgovor na antigen od strane B ćelije nije uvek isti i zavisi od prirode i sastava antigena ali takodje i od učesća T helper limfocita. U slučaju kada je antigen proteinske prirode, neophodno je da bude prezentovan T helper limfocitima u sklopu antigen-prezentujuće ćelije, a zatim T helper omogućava kostimulaciju B ćelija i modifikuje njenu aktivaciju i odgovor na antigen. T-zavisni B ćelijski odgovor je jačeg intenziteta, potentniji je protiv mikroorganizma, dužeg je trajanja i omogućava brze pojave promene klase teških lanaca (Allen CD i sar). Na ovaj način u zavisnosti od uzročnika može doći do lučenja antitela sve 4 klase (IgM, IgG, IgA, IgE) specifičnih za mikroorganizam. Antigeni koji su po sastavu polisaharidi, kakav je često slučaj sa inkapsuliranim bakterijama, ne bivaju prezentovani antigen-

prezentujućim ćelijama T helper limfocitima. Oni su sami sposobni da aktiviraju native B ćelije i da provociraju njihov odgovor. Ovakav B ćelijski odgovor je T nezavisan. Zbog izostanka dodatne kostimulacije poreklom od T hepera, imunski odgovor u ovom slučaju je slabijeg intenziteta, manje potentan protiv mikroorganizma, kraćeg trajanja i promena klase antitela se retko dešava. U B ćelijskom odgovoru dominantna klasa antitela je IgM. B ćelijski odgovor u velikoj meri zavisi od broja susreta sa istim antigenom, što je uostalom i glavna osobina stečenog imunskog odgovora. B ćelijski imunitet nije izuzet od pravila da, prilikom susreta sa antigenom, nastaju memorijske ćelije i da je svaki sledeći susret sa antigenom predstavljen burnijom i potentnijom imunskom reakcijom. Primani odgovor na do tad nepoznati antigen rezultira nastankom slabog imunskog odgovora, kraćeg trajanja i pretežno posredovano IgM antitelom. Svaki naredni susret sa istim antigenom izaziva burniju, bržu i efikasniju reakciju, posredovanu pretežno IgG antitelima. Pored interakcija sa T helper limfocitima, B ćelije stupaju u kontakt i sa brojnim drugim ćelijama imunskog sistema, medju njima su i antigen-prezentujuće ćelije, zatim i proteini plazme kao sto su komponente sistema komplementa i brojni citokini. Ove reakcije dodatno pospesuju imunski odgovor na infektivni patogen. U sadejstvu sa ostalim komponentama imunskog sistema, antitela B limfocita omogućavaju neutralizaciju mikroorganizama i toksina. Antitela takodje vrše opsonizaciju mikroorganizama i dovode do posledične fagocitoze. Oni takodje učestvuju u ćelijskoj citotoksičnosti posredovanom antitelima (ADCC). U ovom procesu pored antitela, bitnu ulogu igraju i NK ćelije urodjene imunosti. Antitela dovode do aktivacije sistema komplementa putem klasičnog puta aktivacije komplementa. Antitela IgE igraju bitnu ulogu u nastanku alergijskih reakcija i u degranulaciji mastocita, dovodeći do ispoljavanja nekih od ključnih simptoma alergijskih reakcija, kao sto su otok, crvenilo, svrab, vazodilatacija, a što može biti toliko izraženo da u krajnjem ishodu

rezultira anafilaktičkim sokom i potencijalno smrću. IgE posredovan odgovor je takodje fiziološki, veoma efikasan u odbrani organizma od parazita, naročito parazita iz roda Helminata. Na površini sluznica respiratornog, gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta nalazi se sintetisana IgA antitela koje proizvodi limfno tkivo mukoza. Ono na površini sluznica sprečava prodor kroz i infekciju sluznica ovih predela. Antitela imaju nezamenljivu ulogu još od neonatalnog doba. Tokom trudnoće i do dva meseca nakon porodjaja, u krvi deteta mogu se naći antitela majke. Antitelo IgG zbog svoje solubilnosti i veličine, tokom trudnoće slobodno prolazi placentarnu barijeru i omogućava zaštitu fetusa tokom trudnoće. Nakon porodjaja, novorodjenče i ako nije više u direktnom, krvnom kontaktu sa majkom i dalje neko vreme u svojoj krvi poseduje antitela od majke. Antitela ostaju u krvnom sistemu novorodjenčeta do dva meseca, i do tad ona pružaju novorodjenčetu zaštitu od potencijalno fatalnih komplikacija i infekcija. Kao što je slučaj sa T helper limfocitima, tako i B limfociti imaju svoje subpopulacije. Subpopulacije B limfocita prevažno se odnose na njihovu distribuciju i tip antigena na koji reaguju. Folikulske B ćelije nalaze se u limfnim folikulima sekundarnih limfnih organa. Odgovorne su za T zavisni imunski odgovor i čine ih dugo živeće plazma ćelije. B ćelije marginalne zone su skoncentrisane u slezini i učestvuju u T nezavisnom imunskom odgovoru na polisaharidne antigene poreklom iz krvi. B1 ćelije većinski se nalaze na sluzokožama i u peritoneumu i takodje učestvuju u T nezavisnom imunskom odgovoru. B1 ćelije i B ćelije marginalne zone proizvode dominantno IgM antitela dok folikularne B ćelije aktivno učestvuju u procesu rearanžiranja klasa antitela i proizvode sve klase antitela (Von Andrian et Mempel, 2003; Reiner, 2007; Lieberman, 2003; Parren, 2001; Allen et al. 2007).

Sve šira saznanja o imunitetu i imunskom sistemu dovela su do brojnih zaključaka, između ostalog i spoznaju da je imunski sistem

sa svim svojim komponentama, direktno ili indirektno, rasprostranjen duž celog čovekovog organizma (Loftis et Janowsky, 2014). Takva saznanja dovela su do daljih proučavanja imunskog sistema unutar brojnih organa, od kojih su mozak i kičmena moždina činili glavnu zagonetku, zbog njihovog kompleksnog i nedovoljno proučenog medjusobnog odnosa. Zbog povezanosti imunskog sistema i nervnog sistema uveden je termin neuroimunologija, koji direktno povezuje navedena dva sistema u jednu jedinstvenu celinu (Rogers, 2012). I ako je mozak, za razliku od svih drugih organa tela, krvno-moždanom barijerom zaštićen od većine patogena iz spoljne sredine, infekcije i oštećenja možda su i dalje moguće (Gimsa et al. 2013). Krvno-moždana barijera i ako efikasna kao barijera, poseduje usku sposobnost promene svoje permeabilnosti i omogućava komunikaciju mozga sa okolnim organima. Zbog potencijalne opasnosti od infekcija postoje određeni neuroimunski mehanizmi koji omogućavaju zaštitu nervnog sistema od virusnih, bakterijskih parazitskih i drugih uzročnika. Pored samih infektivnih agenasa, pojava neuroimunskih i neurodegenerativnih bolesti, čija etiologija nije do dan danas dovoljno proučena i dokazana, još čvršće povezuju nervni sistem sa imunskim sistemom. Imunološke reakcije unutar nervnog sistema u okviru neurodegenerativnih i neuroimunskih bolesti su nezaobilazna pojava u patogenezi, uprkos nepoznatoj etiologiji ovih oboljenja. Najbolje ilustrovani primer u slučaju neurodegenerativnih bolesti i povezanosti sa imunskim sistemom bi bila Alzheimerova demencija ali postoje i brojni drugi primeri. Prototip neuroimunološke bolesti bi bila multipla skleroza (MS) kao jedna od najpoznatijih ali i druge neurološke bolesti, kao sto su mijastenija gravis i Guillain-Barre sindrom (GBS), imaju predominantnu imunološku komponentu u svojoj patogenezi (Tian et al. 2012; Farfara et al. 2008; Hickman & Khoury, 2013). Neuroimunologija pored uobičajnih komponenti imunskog sistema, zahvaljujući širokom dijapazonu dejstva citokina ispoljava brojne specifične osobenosti. Funkcija neuroimunskog

sistema sem kroz odbranu nervnog sistema, može se manifestovati i u vidu promena funkcije nervnog sistema. Ove promene mogu biti funkcionalne prirode u vidu sloga, poremećaja pokreta ili senzibiliteta. Mogu biti prisutne kognitivne promene i promene raspoloženja, dovodeći do manifestacija psihijatrijskih poremećaja kao što su depresija, manija i druge. Kod dece mogu biti prisutni poremećaji u razvoju koji po kliničkoj slici odgovaraju autizmu, Aspergerovom sindromu, hiperkinetskom sindromu i brojnim drugim sindromima. Ceo koncept neuroimunskog sistema bazira se na komunikaciji između imunskog sistema i nervnog sistema posredstvom brojnih medijatora koji su biohemijske ili električne prirode i čija je glavna uloga zaštita nervnog sistema od mikroorganizama. Od strane imunskog sistema, komunikacija sa nervnim sistemom uspostavlja se preko citokina koje luče ćelije imunskog sistema kao što su makrofagi, limfociti i druge ćelije. Nervni sistem je pretežno lišen ćelija imunskog sistema, i osim mastocita koji imaju ulogu u održavanju relacije mikroflora-digestivni trakt-mozak, nervni sistem ne poseduje uobičajene ćelije imunskog sistema. Umesto toga, prisutne su specifično diferencirane potporne ćelije koje imaju pojedine imunološke funkcije, nazvane glija ćelije. Najvažnije glija ćelije u nervnom sistemu su makroglija, astrociti i oligodendrociti (Miller et al. 2009). Funkcije glija ćelija su brojne i većinom se odnose na zaštitu nervnog sistema od infektivnih patogena i mehaničkih oštećenja. Mikroglia u mozgu vrši sličnu funkciju kao makrofagi u krvi i tkivima. Pomoću svojih receptora mikroglia vrši fagocitozu patogena i ćelijskog detritusa nastalog posle oštećenja mozga. Mikroglie su takodje sintetski aktivne ćelije i imaju sposobnost da luče brojne citokine i faktore rasta. Uloga oligodendrocita prvenstveno se vezuje za mijelinski omotač i nervne završetke. Njihovo prisustvo je najviše neophodno prilikom oštećenja aksona i neurona, jer je njihova uloga regeneracija i remijelinizacija nervnih zvršetaka. Astrociti su zvezdolike ćelije sa brojnim

produžecima. Nalaze se inkorporisane u okviru krvno-moždane barijere. Po nekim svojim funkcijama dosta su slični mikroglijiji, oni takodje imaju sposobnost da učestvuju u odbrani od infektivnih patogena i mehaničkog oštećenja mozga, ali za razliku od mikroglije, na indirektan način. Njihova funkcija je, zbog njihove pozicione bliskosti sa krvno-moždanom barijerom, usko povezana sa transportom materija kroz ovu veoma selektivno propustljivu barijeru. Lučenjem brojnih citokina i medijatora, astrociti utiču na propustljivost krvno-moždane barijere, čineći je više propustljivom za ćelije imunskog sistema u krvi kao što su makrofagi i limfociti. Njihovim dejstvom tokom infekcije dolazi do direktnog uspostavljanja komunikacije i prelaska imunskih ćelija u nervni sistem. Interakcije između nervnog i imunskog sistema moguće su posredstvom brojnih zajedničkih signalnih puteva za koje su odgovorni receptori. Među glavne receptore spadaju CXCR4 hemokinski receptori, kanabinoidni receptori, TAAR1 (trace amine-associated receptor 1) i opioidni receptori. Dejstvo citokina od strane imunskih i nervnih ćelija odražava se na različite načine, dovodeći do ekscitacije ili inhibicije neurona, delujući na količine neurotransmitera, plastičnost sinapsi i nastanak brojnih senzacija. IL-1 kao glavni proinflamatorni citokin, prisutan je u nervnom sistemu prilikom pokretanja neuroimunskog sistema. Dejstvo ovog citokina može se manifestovati dejstvom na nociceptorne neurone čije stvaranje impulsa u njima dovodi do osećaja bola. Aktivaciju CXCR4 receptora za hemokine izazivaju mikroorganizmi, pre svega bakterijski produkti koji zatim, aktivacijom CXCR4 dovode do promene permeabilnosti membrane neurona i do generisanja akcionih potencijala. Neurimunski sistem, iako kompleksan, nije usko specijalizovan za određeni uzročnik, što dokazuje i činjenica da do neuroinflamacije dovode i povrede mozga koje rezultiraju u apoptozi i nekrozi nervnih ćelija. Oštećenje neurona dovodi do aktivacije brojnih signalnih puteva i, iako se kaskade puta razlikuju, sam ishod

se manje razlikuje od inflamacije izazvane infektivnim patogenom. Oštećenje neurona dovodi do otpuštanja ATPa koji se nalazi intracelularno i do aktiviranja sa jedne strane mikroglije neuroimunskog sistema a sa druge sistem nociceptora nervnog sistema. Aktivacijom mikroglije dolazi do lučenja citokina medju kojima je i IL-1 (interleukin 1) i posledičnog nastanka neuroinflamacije dok aktivacijom nociceptora dolazi do senzacije bola. U toku neuroinflamacije dolazi do ulaska T limfocita i monocita iz krvi kroz znatno propustljiviju krvno-moždanu barijeru. Takodje lučenje citokina stimuliše i porast nivoa neuropeptida kao što su supstanca P i brojnih neurotransmitera. Zbog široke povezanosti neuroinflamacije preko citokina sa brojnim signalnim putevima i neurotransmisijom u mozgu, došlo je do uspostavljanja odredjenih korelacija izmedju neuroinflamacije i poremećaja raspoloženja kao što je depresija. Povezanost depresije sa neuroinflamacijom usledila je nakon razjašnjenja neuroimunskog sistema i neuroinfekcije. Kod pacijenata obolelih od depresije nadjeni su povišeni nivoi proinflamatornih citokina kao sto su IL-1, IL-6, i TNF- α . Takodje došlo se do uspostavljanja uske veze izmedju prolongirane inflamacije i pojave depresije i njenih simptoma. Ova saznanja dovela su do proširenja znanja o psihijatrijskim poremećajima, kao što su depresija i stavili imunski sistem i neuroinflamaciju u fokus prilikom daljih istraživanja različitih psihijatrijskih oboljenja. Napredak u ovom polju išli su i u suprotnom smeru, fokusirajući se na terapiju i prevenciju depresije i psihijatrijskih oboljenja sa fokusom na imunski sistem i primenom lekova koji ciljano deluju na inflamaciju i medijatore inflamacije kao sto su citokini (Tian et al. 2012; Farfara et al. 2008; Hickman & Khoury, 2013).

Shizofrenija je jedno od najčešćih psihijatrijskih oboljenja sa vrlo šarolikom kliničkom slikom koja uključuje poremećaje mišljenja, percepcije, ponašanja i emocija. Postoje različite teorije o etiologiji

shizofrenija, a koje uključuju i imunološke hipoteze (Heath, 1990; Kirch, 1993). U poslednjih 70 godina, intenzivno je ispitivana povezanost autoimunih bolesti i psihoza, kao posledica uočenih protektivnih efekata shizofrenije na pojavu reumatoidnog artritisa sredinom prošlog veka (Benros et al. 2013), a što je bilo u potpunoj suprotnosti sa neuobičajeno visokom incidencom celijakije u pacijenata obolelih od shizofrenije. Akumulirana znanja u ovoj oblasti su dovela do uočavanja korelacije između čitavog niza autoimunih bolesti i antitela i shizofrenije. Populacione studije iz različitih delova sveta (Danska, Tajvan) su pokazale asocijaciju niza autoimunih bolesti i psihoza sa posebnim naglaskom na asocijaciju sa celijačnom bolesti, autoimunom tirotoksikozom, psorijazom i pernicioznom anemijom (Benros et al. 2013). Nasuprot tome, trenutno se stoji na stanovištu da postoji negativna asocijacija sa reumatoidnim artritisom. Takođe, podaci ukazuju na slabu asocijaciju između porodične istorije bolesti, ukazujući na zajedničke genetske faktore rizika. Ipak, ostaje do danas nerazjašnjeno da li je pojava autoimunih bolesti u pacijenata sa shizofrenijom kauzalno povezana sa psihijatrijskim simptomima te otuda i kontradiktorni stavovi da li se psihoza može smatrati autoimunom bolešću. Iako postoji nekoliko nivoa dokaza koji sugeriraju da bar jedan deo psihoza ima autoimunu komponentu, istraživači se i dalje susreću sa pitanjima koja je to komponenta, kod koga se ona javlja i šta to može značiti ne samo u dijagnostičke već i u terapijske svrhe. Sa sigurnošću se može ustvrditi da većina dokaza o mogućoj autoimunoj osnovi psihoza nije direktna i da trenutno postoje vrlo limitirani naučni dokazi za takve tvrdnje (Al-Diwani et al. 2017). To predstavlja poseban izazov za istraživače u ovoj oblasti u kojoj bi dalja istraživanja odnosa citokina, kao neurotransmitera i hormonskog sistema mogao biti jedan od fokusa napora istraživača (Sperner-Unterweger, 2005).

5.8. DEPRESIJA KAO ZAPALJENSKA (INFLAMATORNA) BOLEST

Iako su se i psihijatrija i imunologija zasebno razvijale sa velikim zamahom u prošlom veku, sve do 1985.g. odnos između mozga i imunog sistema nije bio u žiži kliničkih ispitivanja. Tada je dokazano da su imuni odgovori suprimirani u pacijenata obolelih od depresije (Stein et al. 1985; Patel, 2013). Ipak, čitav niz imunih komponenti, kao što su razni inflamatorni biomarkeri, su zapravo povišeni u pacijenata obolelih od depresije (Maes et al. 1991; Patel, 2013). U poslednje dve dekade uočen je intenzivan istraživački napor upravljen ka objašnjavanju odnosa između depresije i inflamacije za koji se veruje da bi mogao biti centralna tačka u razvoju i progresiji čitavog niza bolesti kao što su kardiološke, reumatske i autoimune (Miller et al. 2005).

Pored podele inflamacija na akutne i hronične, inflamatorni procesi mogu biti periferni i centralni, od kojih ovi potonji uključuju i neuroinflamaciju. Od više vrsta imunih ćelija u CNS-u, mikroglia i astrociti su najvažnije imunokompetentne ćelije (Kohler et al. 2016; Bentivoglio et al. 2011). Smatra se da ove ćelije imaju važnu ulogu u regulaciji kako indukcije, tako i u limitaciji neuroinflamatornog procesa (Bentivoglio et al. 2011; Jiang et al. 2014). U suprotnosti sa ranijim shvatanjima CNS-a kao imunolški-privilegovanog organa, novije studije ukazuju na postojanje komunikacije CNS-a i periferije a koji izgleda postoji u oba pravca (Anthony et al. 2012), a što uključuje postojanje limfatičnih sudova u CNS (Louveau et al. 2015) i povećanje permeabilnosti krvno-moždane barijere za vreme inflamacije (Engelhardt et al. 2009). Ovome bi trebalo dodati i stimulaciju n.vagus (Dantzer et al. 2008; Kohler et al. 2016), kao i

činjenicu da endotelne ćelije krvno-moždane barijere igraju ulogu u prenosu signala od perifernih citokina u CNS (Banks et al. 1995; Quan et al. 1998). Dokazano je da TNF- α , IL-6 i drugi pro-inflamatorni citokini prolaze krvno-moždanu barijeru putem transportnog sistema (Banks et al. 1995). Postoje i drugi dokazi kontakata između receptora moždanih citokina i perifernih citokina (Kohler et al. 2016).

U pacijenata obolelih od depresije detektovani svi kardinalni znaci inflamatornog odgovora, uključujući pojačanu ekspresiju pro-inflamatornih citokina i njihovih receptora, kao i povećane nivoe reaktanata akutne faze, i hemokina u perifernoj krvi i cerebrospinalnoj tečnosti (Miller et al. 2009). Opisani su i profili ekspresije gena periferne krvi konzistentni sa pro-inflamatornim 'M1' fenotipom makrofaga kao i povećano prisustvo IL 6, IL 8 i tipa I IFN-induciranih signalnih puteva (Miller et Raison, 2009). Konačno, pojačana ekspresija niza imunih gena i proteina, kao što su IL 1 β , IL 6, TNF, TLR3 i TLR4, je detektovana prilikom post-mortem analiza uzoraka depresivnih pacijenata koji su izvršili suicid. Sumacija literature je pokazala da IL 1 β , IL 6, TNF i C reaktivni protein (CRP) iz periferne krvi su najpouzdaniji inflamatorni biomarkeri u pacijenata sa depresijom (Miller et al. 2009). Neke studije su takodje pokazale da postoji 40%-50% povećanja u koncentracijama cirkulišućih CRP i IL-6 kao pokazatelja sistemske inflamacije u kliničkoj depresiji. Ovi primeri toničke povezanosti depresije i inflamacije su praćeni i dokazima o postojanju istih fenomena uočenih za vreme akutnog stresa (Miller et al. 2005) jer je depresija bila povezana sa većom rezistencijom na molekule koji normalno završavaju inflamatornu kaskadu (Miller et Raison, 2016).

Važno je napomenuti da novija istraživanja ukazuju na to da su inflamatorni biomarkeri povišeni i u pacijenata sa drugim neuropsihijatrijskim poremećajima, kao što su anksioznost ili

shizofrenija (Michopoulos et al, 2015; Fernandes et al. 2015). Stoga je National Institute of Mental Health (US Department of Health and Human Services) indicirao da je preciznije karakterisati uticaj inflamacije na ponašanje ne kao jedino udružen samo sa depresijom već i sa specifičnim simptomima u više dijagnoza bolesti koje su specificirane u tzv. Research Domain Criteria Framework. Neki od tih simptoma uključuju promenjenu motivaciju i motornu aktivnost i pojačanu osetljivost na pretnju (Morris et al. 2012). Konačno, u prilog ovim opažanjima ide u prilog i činjenica da je inflamacija bila udružena sa slabom reakcijom na terapiju antidepresivima (Miller et Raison, 2016). Tako je u jednoj skorašnjoj studiji, 45% pacijenata bez odgovora na konvencionalnu terapiju antidepresivima ispoljilo nivo CRP >3 mg L⁻¹, a što indicira visoki nivo inflamacije (Miller et Raison, 2016).

Da bi se detaljno objasnila pojava udruženosti inflamatornih stanja i depresije, naučni dokazi se mogu svrstati u tri grupe. Prva grupa dokaza je fokusirana na saznanja da inflamacija i somatske bolesti koje uključuju inflamatorne procese povećavaju rizik od depresije, a što je dokazano velikim populacionim studijama. Povezanost sa inflamatornim odgovorom i povećan rizik od depresije su dokazani u diabetesu tip 1, reumatoidnom artritisu i infektivnim bolestima kao sto su hepatitis i sepsa (Kohler et al. 2016). Najveća studija u ovoj oblasti, a koja potiče iz Danske, je dokazala povišeni rizik za promene raspoloženja u 45% pacijenata nakon hospitalizacije zbog autoimunih bolesti, i povišenje rizika od 62% nakon hospitalizacije zbog infekcija (Kohler et al. 2016), sa naročito povišenim rizikom za promene raspoloženja (2.35 puta) u onih pacijenata koji su istovremeno imali i autoimnu i infektivnu etiologiju kao razlog njihove hospitalizacije. Druga grupa dokaza se bazira na činjenicama da su povišeni nivoi pro-inflamatornih markera dijagnostikovani u depresivnih pacijenata. Nekoliko studija iz

poslednje dekade je obezbedilo čvrste dokaze o povišenim nivoima pro-inflamatornih markera u pacijenata sa depresijom kao što su CRP, IL-6, TNF- α i antagonist receptora IL1(IL-1ra) (Kohler et al. 2016). U okviru različitih dobnih grupa, visi nivoi CRP i IL-6 su povećali rizik od razvoja depresivnih simptoma (Kohler et al. 2016) dok su povišeni nivoi IL-6 u detinjstvu bili udruženi sa naknadnim razvojem depresije u mladjem odraslom dobu. Mora se napomenuti da su ove studije koristile samo perifere markere inflamacije i da druge studije, koje su u analizu uključile i korelaciju sa obimom struka i krvnim pritiskom, nisu uspele da potvrde ovu povezanost (Kohler et al. 2016). Stoga se ovi nalazi moraju uzeti sa rezervom, iako su najnovije studije pokazale povišene nivoe neuroinflamacije dokazane povišenom aktivacijom mikroglije u pacijenata sa akutnim depresivnim epizodama. Treća grupa dokaza se bazira na činjenicama da pro-inflamatorni agensi mogu indukovati simptome depresije koji mogu biti tretirani anti-depresivima. Agensi kao što je IFN- α su korišćeni u tretmanu specifičnih somatskih bolesti kao što je hepatitis C ili maligni melanom gde su, iako efikasni, vrlo često doveli do psihijatrijskih nus-pojava, kao što su depresivni simptomi (Kohler et al. 2016).

5.9. DEPRESIJA I CITOKINI

Pre skoro 40 godina, citokini su počeli da privlače pažnju naučne javnosti kao molekuli (proteini and glikoproteini) koje luče imune ćelije i koji omogućavaju komunikaciju između imunih i perifernih ćelija. Često nazivani "hormonima imunog sistema", smatrani su i klasičnim hormonima koji mogu funkcionisati i lokalno i sistemski i mogu koordinisati imune odgovore i sa onima drugih fizioloških sistema. Njihova najranija primena bila u oblasti

onkologije i interne medicine, gde je primećeno da je višenedeljna terapija citokinima u nekih onkoloških bolesnika dovela do razvoja simptoma akutnih psihoza i depresije. U poslednje 3 dekade, pokazalo se da su oni postali glavni naučni fokus u neuronaukama, uključujući i neuropsihijatriju (Shimura et al. 2017; Gazal et al. 2015; Li et al. 2016; Pearlman et al. 2014; Mota et al. 2013; Inagaki et al. 2013; Koutsouraki et al. 2011). Tako je Smith predložio "makrofagnu teoriju depresije" koja se zasnivala na ekscesivnoj produkciji IL-1 i drugih produkata makrofaga kao glavnih uzroka nastanka depresije. U godinama koje su sledile, čitav niz animalnih i humanih eksperimenata je ukazao ne samo na mogućnost postojanja veze između administracije pro-inflamatornih citokina i nastanka različitih simptoma depresije već i da citokini mogu aktivirati hipotalamičko-pituitarno-adrenalnu (HPA) osovinu a što čini česti nalaz u depresijama. Ipak, i pored akumulacije ovih znanja, i dalje nije bilo dovoljno čvrstih dokaza koji bi potkrepili tvrdnju da je depresija udružena sa aktivacijom imunog sistema. Suprotno ovim observacijama, prevladavalo je mišljenje da su, zasnivajući se na smanjenoj aktivnosti NK ćelija i proliferaciji limfocita kao odgovor na mitogene, depresivni pacijenti zapravo imunosuprimirani.

Ipak, nakon što je Maes (1995) dokazao aktivaciju imunog sistema u pacijenata obolelih od depresije, počelo se sa postavljanjem važnih pitanja kao što su : 1) da li bi se moglo očekivati da antidepresivi smanje produkciju citokina i njihovo dejstvo i 2) da li bi antagonisti citokina mogli da ublaže simptome depresije. Studije sa kraja devedesetih godina prošlog veka i prve dekade ovog veka su zaista i dokazale, putem animalnih i humanih istraživanja, da dugotrajni tretman antidepresivima ublažuje efekte citokina (Yirmiya, 1996) a takodje i da različiti faktori stresa dovode do ekspresije citokina u mozgu.

Citokini su intenzivno istraživani zbog svoje moguće uloge u patogenezi depresije (Sowa-Kučma et al. 2017; Sowa-Kučma et al. 2018; Kranaster et al. 2017; Chaves Filho et al. 2018; Hellmuth et al. 2017; Kamel et al. 2017; Robson et al. 2017; Kiraly et al. 2017; Wu et al. 2017; Goldstein et al. 2016). Istraživanja pojačanja urođenog imuniteta su donela kontradiktorne rezultate na bazi ispitivanja nivoa citokina u perifernoj krvi i cerebrospinalnoj tečnosti (Levin, 1999; Haack, 1999). Čak i onda kada je veza između aktivacije imunog sistema i depresije uočena, to nije bilo udruženo sa prisustvom samih depresivnih simptoma (Haack, 1999). Takođe je istraživano da li citokini mogu da indukuju neoropsihijatrijske i neurovegetativne karakteristike depresije. Egzogeno administriranje citokina dovodi do niza simptoma bolesti ponašanja, od kojih su oni iz neurovegetativne grupe najizraženiji (Dantzer, 2001). Dobro je poznato da administracija IFN- α dovodi do osećaja umora u čak 80% tretiranih pacijenata (Capuron et al., 2002a). Više studija koje su koristile tzv. dimenzionalnu analizu je pokazalo da su citokini sposobni da indukuju i neurovegetativne i psihološke simptome depresije. Tipičan dokaz za ovu tvrdnju su onkološki pacijenti, koji nakon administracije IL-2 ili IFN- α vrlo često razvijaju niz depresivnih simptoma kao što su tuga, gubitak interesa. Oni takođe razvijaju kognitivne poremećaje a i neurovegetativne simptome, kao što su umor ili poremećaji sna (Capuron et al. 2000; Capuron et al. 2002). Ove studije su takođe pokazale da postoji razlika u tempu razvijanja simptoma u zavisnosti od administrirane terapije: simptomi su se brže razvijali nakon IL-2 (kognitivni i depresivni simptomi) nego IFN- α (depresivni simptomi). Konačno, uočena razlika između pojave neurovegetativnih simptoma i promena raspoloženja možda ukazuje na činjenicu da citokini ispoljavaju različite efekte na pojavu ovih simptoma putem različitih mehanizama dejstva. Mogući mehanizmi dejstva citokina u nastanku depresije su višestruki. Oni najvažniji uključuju: 1) Modulaciju aktivnosti HPA osovine, jer su

citokini sposobni da indukuju rezistenciju na glukokortikoide, a što može nastati zbog hiperaktivnosti HPA osovine (Miller et al. 1999), i 2) Neurohemijsku transmisiju, obzirom da citokini mogu indukovati depresivne simptome putem nishodne regulacije sinteze serotonina. Takodje, aktivacija imunog sistema je udružena sa indukcijom indoleamin 2,3-dioksigenaze (IDO), enzima koji menja metabolizam triptofana ka sintezi kinurenina i kiinolonske kiseline. Ovo se odvija na štetu sinteze serotonina, a što sve ukazuje na to da se IDO može smatrati mogućom vezom izmedju serotonina i depresije. Studije su takodje pokazale da je IDO indukovana i na periferiji i u mozgu životinja tretiranih citokinima (Lestage et al. 2002).

Protekla dekada je donela dodatne dokaze da citokini igraju aktivnu ulogu u molekularnim događajima koji utiču na sinaptičku transmisiju, plastičnost neurona i depresivna ponašanja. I pored sve više dokaza u prilog tvrdnjama da je depresija uzrokovana citokinima (Raison et al. 2009; Anisman, 2009), specifični mehanizmi odgovorni za ovaj proces i dalje ostaju nepotpuno razjašnjeni. Iako potencijalni mehanizmi koji vode do depresije uzrokovane citokinima ostaju isti (hiperaktivnost HPA osovine, uticaj serotonina na serotonergičke i dopaminergičke sisteme) (Maes et al, 1993; Bonaccorso et al. 2002; Capuron et al. 2002a,b) postoji jasna potreba za nešto integrisaniji pristup ovom problemu. Iako se često tvrdi da citokini i drugi pro-inflamatorni markeri mogu služiti kao medijatori depresivnih simptoma, trenutno ne postoji konsenzus u literaturi oko uloge imunog sistema i inflamatornih dešavanja na etiologiju depresije, a neki autori (Friebe et al. 2007; Dantzer et al. 2008) i dalje izražavaju sumnju da se inflamatorni odgovori uopšte i dešavaju u mozgu.

Razvojem medicine usledila su detaljnija saznanja o imunskom sistemu kao i načinom na koji bi se moglo manipulirati njime. Zahvaljujući najnovijim medicinskim poduhvatima, transplantacije organa i tkiva postale su svakodnevnica, a koje bi bile bezuspešne i

nesvrshodne bez adekvatne imunosupresivne terapije. Pacijenti koji primaju imunosupresivnu terapiju iako su podložniji brojnim infekcijama, sposobni su da zadrže transplantat i mogućnost imunološkog odbacivanja transplantata se svodi na minimum. Sa produženjem životnog veka i pod uticajem brojnih štetnih spoljašnjih faktora, došlo je do znatnog porasta oboljevanja od malignih bolesti. Moderna medicina se fokusirala pored mera prevencije i na terapiju maligniteta, koja pored hirurških zahvata skoro nezaobilazno obuhvata hemioterapiju i/ili radioterapiju. Hemioterapija i radioterapija, iako efikasne u lečenju različitih vrsti maligniteta, kao glavnu nuspojavu imaju slabljenja imuniteta pacijenta čineći ga podložnijim infekcijama. Pacijenti smanjenog kapaciteta imunske odbrane, kao što su oni oboleli od maligniteta, pacijenti na imunosupresivnoj terapiji i pacijenti oboleli od urodjenih ili stečenih imunodeficijencija, čine zajedno grupu pacijenata. Tokom godina, nakon znatnog porasta broja obolelih od HIV i AIDS, grupu imunokompromitovanih u znatnom broju čini i ovaj skup obolelih. U brojnim istraživanjima je nadjeno da je depresija usko povezana sa imunskim sistemom, neuroinflamacijom i povećanjem nivoa proinflamatornih citokina, pa se tako identifikovana i populacija imunokompromitovanih koji su takodje oboleli od depresije (Treisman et Soudry. 2016; Apostolova et al. 2015; Murray et al. 2012; Blume et al. 2011).

Prisustvo depresije kod pacijenata obolelih od maligniteta i AIDSa na odredjen način predstavlja kontradikciju ranijim opažanjima da su inflamacija i pojačana imunska aktivnost vezane za pojavu depresije. Sveobuhvatno obrazloženje je upravo da depresija kao kompleksan poremećaj i oboljenje, iako usko povezana patogenetski i etiološki sa imunskim sistemom, nije apsolutno definisana u smislu imunosupresije ili imunoaktivacije. Još jedan faktor koji potencijalno nudi objašnjenje za ovakvu pojavu je

endokrinološki. On se odnosi na relaciju hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda i njihovu odgovarajuću negativnu povratnu spregu. Povišeni nivoi kortizola u krvi mogu se povezati u usku relaciju sa hronično prisutnom inflamacijom i stresom. Hronična inflamacija u ovom slučaju može se direktno pridodati imunoaktivnoj komponenti depresije dok povišene koncentracije kortizola u dužem vremenskom periodu i sledstvena imunosupresija naginju ka imunosupresivnoj tezi depresije. S ovim u vezi, smatra se da i sama negativna povratna sprega, zadužena sa inhibisanje aktivnosti hipotalamusa i hipofize i smanjenje nivoa kortizola u krvi, može biti defektna. Kao posledica toga dolazi do prolongiranih visokih koncentracija kortizola u krvi. Veza kortizola i depresije najbolje se može izučiti posmatrajući glavne simptome i znake pacijenata obolelih od Kušingove bolesti. Za ove pacijente, jedna od ključnih karakteristika, medju brojnim ostalim, su imunosupresija, depresija i prezistentni visoki nivoi kortizola u krvi. U grupi imunokompromitovanih, oboleli od HIV/AIDS čine znatni deo, ali uz to je i zastupljenost depresije, koja se sreće i u 60% ovih pacijenata. Depresija je široko zastupljena kod pacijenata koji su HIV pozitivni ili oboleli od AIDS. Naročito izražena je kod obolelih od AIDS, gde pored kompleksa AIDS-demencija, depresija takodje spada u bitan entitet ovog oboljenja. Neophodno je u početku razgraničiti depresivno ponašanje i osećanja pacijenta koja su vezana za njegovo teško zdravstveno stanje i koji se prevashodno odnose na strah od smrti, bespomoćnosti, infekcija, pogoršanja simptoma i druge. Depresija kod obolelih od AIDS može se povezati sa samom povećanom učestalošću maligniteta kod ove grupe pacijenata, koji dodatno utiču na imunski sistem i nervni sistem i dovode do ispoljavanja depresije. Terapija HIV pozitivnih i obolelih od AIDS takodje se smatra važnim induktorom depresije, i naročito se u ovom polju navodi antiretrovirusni lek efavirenz. Efavirenz (tenofovir) je antiretrovirusni lek koji se koristi u terapiji HIV/AIDS i pripada po

mehanizmu dejstva ne-nukleozidnim inhibitorima reverzne transkriptaze. Pored brojnih neželjenih dejstva ovog leka, depresija je jedna od glavnih, sa jasno izraženim simptomima koji dostižu razmere suicidalnih misli i pokusaja (Treisman et al. 2016; Soudry O; Apostolova et al. 2015). S obzirom na široku kompleksnost HIV infekcije i njene patogeneze kao i brojne karakteristike koje su i dalje nedovoljno ispitane, može se zaključiti da je depresija prisutna kao jedna od dominantnih simptoma ovog oboljenja, ali njeno samo poreklo i način nastanka kod ovih bolesnika jos uvek je nedovoljno proučen (Treisman et Soudry. 2016; Apostolova et al. 2015; Murray et al. 2012).

Prethodno je navedeno da imunski sistem i nervni sistem nisu dva medjusobno izolovana i nezavisna sistema, već da je njihova medjusobna komunikacija stalno prisutna i neophodna obrazujući zajednički neuroimunski sistem. Komunikacija izmedju ova dva sistema, kao što je prethodno navedeno, vrši se preko citokina, neurotransmitera i neuromodulatora i čak preko hormona. Da bi ovakva komunikacija bila moguća, na imunskim ćelijama, i to prvenstveno monocitima i limfocitima, nalaze se odgovarajući receptori. Brojna istraživanja su vršena u svrhu ispitivanja uticaja neurotransmitera na imunske ćelije i imunski odgovor. Istraživanje koje je ispitivalo uticaj serotonina na imunski odgovor B limfocita na ovčije eritrocite, prikazalo je značajne podatke o odnosu ovog neurotransimtera i imunskih ćelija (Jackson et al. 1985). Tokom ovog istraživanja namera je bila da se ovčijim eritrocitima izazove imunski odgovor B limfocita u vidu produkcije antitela klase IgM i IgG i da se daljim izlaganjem ovog procesa serotoninom zaključi o uticaju serotonina na imunski odgovor. Prilikom izlaganja ćelija serotoninu pre ali i nakon susreta imunskih ćelija sa sa serotoninom, došlo je do promene u imunskom odogvoru. Količine IgM i IgG antitela nakon izlaganja serotoninu bile su znatno manje. Ovakva pojava implicira da

serotonin utiče na aktivnost limfocita i njihovu produkciju antitela. Samo dejstvo serotoninina se po ovome može smatrati inhibitornim na produkciju antitela. Istraživanja nam ukazuju da su na imunskim ćelijama prisutni receptori za serotonin, pogotovo na limfocitima. Sama sinteza serotoninina od strane ovih ćelija jos nije dokazana. Dopamin je veoma prominentan neurotransmiter u nervnom sistemu i pripisuju mu se brojne funkcije (Pacheco et al. 2014). On je odgovoran za regulaciju pokreta, raspoloženje, emocije, afekt i brojne druge frunkcije u okviru nervnog sistema. Uloga dopamina nije ograničena samo na nervni sistem, jer je nadjeno je da imunske ćelije kao sto su dendritske antigen-prezentujuće ćelije, limfociti, NK ćelije, monociti, neutrofili pa cak i eozinofili imaju sposobnost produkcije dopamina i da se njegovo dejstvo može odražavati autokrino i parakrino. Na površini ćelijskih membrana navedenih ćelija nadjeni su domapinski receptori. Ova spoznaja ide u prilog činjenici da dopamin igra ulogu i u imunskom odgovoru na malignitete i infekcije. Uloga dopamina u neuroimunskom sistemu je dvojaka. Sa jedne strane, dopamin omogućava komunikaciju izmedju imunskih ćelija i neurona, dok sa druge strane utiče i na sam imunski odgovor. Nadjeno je da tokom aktivacije imunskog odgovora u imunskim ćelijama, kao što su dendritske ćelije, limfociti, monociti, NK ćelije i ostali granulociti, kao reakcija na strani antigen medju brojnim reakcijama dolazi i do reakcije sinteze i lučenja dopamina. Smatra se da receptore za dopamin poseduju sve ćelije imunskog sistema. Postoji pet tipova dopaminskih receptora, od D1 do D5, a koji mogu biti prisutni i na imunskim ćelijama. Stimulacijom D1 receptora na imunskoj ćeliji dolazi do usmeravanja imunskog odgovora u smeru Th2 subpopulacije T helper limfocita. Aktivacijom D1 i D5 receptora dolazi do pospešivanja imunskog odogovora preko smanjenja koncentracija inhibitornih citokina IL-10 i TGF- β . Aktivacija D2 i D3 receptora dovodi do povecane produkcije IL-10 i TNF- α i podstiče migraciju leukocita. Ovi receptori se takodje smatraju ključnim u

pokretanju Th1 subpopulacije T helper limfocita i u sintezi IFN- γ . Dopamin ima ulogu i u smanjenju imunskog odgovora, što se postiže istovremenom aktivacijom više receptora različitim inenzitetom i njihovim medjusobnim interkcijama. Noradrenalin je široko rasprostranjen neurotransmitter i najviše se vezuje za simpatički nervni sistem koji zajedno sa parasimpatičkim nervnim sistemom obrazuje autonomni nervni sistem (Pavlov et al. 2003; Rommelfanger et al. 2007; Takayanagi et al. 2012). Pored svojih glavnih funkcija u okviru autonomnog nervnog sistema, noradrenalin utiče i na imunski sistem. Svoje efekte na imunski sistem noradrenalin ispoljava preko aktivacije svojih alfa i beta receptora koji se mogu naći na površini monocita i limfocita. Dejstvo noradrenalina na imunski sistem je većinski inhibitoran. Noradrenalin snižava nivoe proinflamatornih citokina TNF- α i IL-1. Imunosupresivno dejstvo noradrenalin ispoljava i direktnom situmlacijom antiinflamatornih citokina. Uticaj noradrenalina može se zabeležiti i u imunskom sistemu sluzokoža (MALT- mucosa associated lymphoid tissue) gde noradrenalin takodje deluje imunosupresivno i snižava koncentracije proinflamatornih citokina TNF- α i IFN- γ . Receptori za noradrenalin alfa i beta mogu se naći i na površini ćelijske membrane astrocita i mikroglije u centralnom nervnom sistemu. Imunosupresija je glavna odlika noradrenalina, ali najnovije studije zastupaju stanovište da noradrenalin poseduje i proinflamatorne osobine koje još uvek trebaju da budu u potpunosti razotkrivene. Zbog svojih imunosupresivnih i potencijalnih imunoaktivirajućih osobina, smatra se da je adekvatnije noradrenalin definisati kao imunomodulator (Pavlov et al. 2003; Rommelfanger et al. 2007; Takayanagi et al. 2012).

6. Zaključci

1. Postoji značajna razlika u pogledu fraktalnih parametara jedra limfocita periferne krvi između pacijenata sa depresijom i kontrolne grupe.
2. Nema značajne razlike u pogledu teksturalnih parametara hromatina limfocita između pacijenata sa depresijom i kontrolne grupe.
3. Fraktalna analiza je potencijalno značajan dodatak budućim tehnikama i algoritmima za evaluaciju pacijenata sa rekurentnim depresivnim poremećajem

7. Literatura

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pilai S. Osnovna imunologija, IV izdanja, Data status, 2014 Beograd.
2. Akhtari M, Giver CR, Ali Z, Flowers CR, Gleason CL, Hillyer CD, Kaufman J, Khoury HJ, Langston AA, Lechowicz MJ, Lonial S, Renfro HM, Roback JD, Tighiouart M, Vaughn L, Waller EK. Receiver operating characteristic curve analysis of circulating blood dendritic cell precursors and T cells predicts response to extracorporeal photopheresis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Transfusion*. 2010;50(11):2424-31.
3. Al-Diwani AAJ, Thomas A Pollak TA, Sarosh R Irani, Belinda R Lennox. Psychosis: an autoimmune disease? *Immunology*. 2017 in press. Doi: 10.1111/imm.12795.
4. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27:190-202, 2007.
5. Alvarenga AV, Pereira WC, Infantosi AF, Azevedo CM. Complexity curve and grey level co-occurrence matrix in the texture evaluation of breast tumor on ultrasound images. *Med Phys*. 2007;34(2):379-87.
6. Ameyar-Zazoua M, Rachez C, Souidi M, Robin P, Fritsch L, Young R, Morozova N, Fenouil R, Descostes N, Andrau JC, Mathieu J, Hamiche A, Ait-Si-Ali S, Muchardt C, Batsché E, Harel-Bellan A. Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(10): 998-1004.
7. Anisman, H., 2009. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. *J. Psychiatry Neurosci*. 34, 4-20.

8. Anthony DC, Couch Y, Losey P, Evans MC: The systemic response to brain injury and disease. *Brain Behav Immun* 2012; 26: 534-540.
9. Aoyagi T, Izumi Y, Hiroyama M, Matsuzaki T, Yasuoka Y, Sanbe A, Miyazaki H, Fujiwara Y, Nakayama Y, Kohda Y, Yamauchi J, Inoue T, Kawahara K, Saito H, Tomita K, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin regulates the renin-angiotensin-aldosterone system via V1a receptors in macula densa cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(1): F100-7.
10. Apostolova N, Funes HA, Blas-Garcia A, Galindo MJ, Alvarez A, Esplugues JV. Efavirenz and the CNS: what we already know and questions that need to be answered." *J Antimicrob chemother*. 2015; 70: 2693–2708.
11. Appay V, Sauce D, Prelog M. The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals. *Aging (Albany NY)*. 2010;2(2):78-81.
12. Aucagne R, Droin N, Paggetti J, Lagrange B, Largeot A, Hammann A, Bataille A, Martin L, Yan KP, Fenaux P, Losson R, Solary E, Bastie JN, Delva L. Transcription intermediary factor 1 γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2361-70.
13. Aytac Korkmaz S. Diagnosis of cervical cancer cell taken from scanning electron and atomic force microscope images of the same patients using discrete wavelet entropy energy and Jensen Shannon, Hellinger, Triangle Measure classifier. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2016;160:39-49.
14. Azemin MZ, Kumar DK, Wong TY, Wang JJ, Mitchell P, Kawasaki R, Wu H. Age-related rarefaction in the fractal dimension of retinal vessel. *Neurobiol Aging*. 2012;33(1):194.e1-4.
15. Bancaud A, Huet S, Daigle N, Mozziconacci J, Beaudouin J, Ellenberg J. Molecular crowding affects diffusion and binding of

- nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO J* 2009; 28(24):3785-98.
16. Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD: Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 1995; 2: 241-248.
 17. Beaulieu, J-M, Gainetdinov, RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev* 63:182–217, 2011.
 18. Bellido EP, Bernasconi GD, Rossouw D, Butet J, Martin OJF, Botton GA. Self-Similarity of Plasmon Edge Modes on Koch Fractal Antennas. *ACS Nano*. 2017: in press. doi: 10.1021/acsnano.7b05554.
 19. Benros ME, Nielsen PR, Nordentoft M, Eaton WW, Dalton SO, Mortensen PB (2011): Autoimmune diseases and severe infections as risk factors for schizophrenia: A 30-year population-based register study. *Am J Psychiatry* 168:1303–1310.
 20. Benros ME, Pedersen MG, Rasmussen H, Eaton WW, Nordentoft M, Mortensen PB (2013): A nationwide study on the risk of autoimmune diseases in individuals with a personal or a family history of schizophrenia and related psychosis . *Am J Psychiatry*. 2014;171:218-226
 21. Bentivoglio M, Mariotti R, Bertini G: Neuroinflammation and brain infections: Historical context and current perspectives. *Brain Res Rev* 2011; 66: 152-173.
 22. Beretta-Piccoli M, D'Antona G, Zampella C, Barbero M, Clijsen R, Cescon C. Test-retest reliability of muscle fiber conduction velocity and fractal dimension of surface EMG during isometric contractions. *Physiol Meas*. 2017;38(4):616-630.
 23. Berry AS, Shah VD, Furman DJ, White III RL, Baker SL, O'Neil JP, Janabi M, D'Esposito M, Jagust WJ. Dopamine

- Synthesis Capacity is Associated with D2/3 Receptor Binding but Not Dopamine Release. *Neuropsychopharmacology*. 2017 in press. doi: 10.1038/npp.2017.180.
24. Beyer M, Thabet Y, Müller RU, Sadlon T, Classen S, Lahl K, Basu S, Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Krebs W, Schönfeld EA, Böttcher J, Golovina T, Mayer CT, Hofmann A, Sommer D, Debey-Pascher S, Endl E, Limmer A, Hippen KL, Blazar BR, Balderas R, Quast T, Waha A, Mayer G, Famulok M, Knolle PA, Wickenhauser C, Kolanus W, Schermer B, Bluestone JA, Barry SC, Sparwasser T, Riley JL, Schultze JL. Repression of the genome organizer SATB1 in regulatory T cells is required for suppressive function and inhibition of effector differentiation. *Nat Immunol*. 2011;12(9):898-907.
 25. Bezu M, Maliković J, Kristofova M, Engidawork E, Höger H, Lubec G, Korz V. Spatial Working Memory in Male Rats: Pre-Experience and Task Dependent Roles of Dopamine D1- and D2-Like Receptors. *Front Behav Neurosci*. 2017;11:196.
 26. Blume J, Douglas SD i Evans DL. Immune Suppression and Immune Activation in Depression. *Brain Behav Immun*. 2011; 25: 221–229.
 27. Boiret N, Kanold J, Bons JM, Rapatel C, Halle P, Tournilhac O, Guilhouard L, Guérin JJ, Travade P, Demeocq F, Bonhomme J, Berger MG. Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood CD34+ cells from children contain the same levels of long-term culture-initiating cells producing the same numbers of colony-forming cells as those from adults, but display greater in vitro monocyte/macrophage potential. *Br J Haematol*. 2001;112(3):806-13.
 28. Bonaccorso, S., Marino, V., Puzella, A., Pasquini, M., Biondi, M., Artini, M., Almerighi, C., Verkerk, R., Meltzer, H., Maes, M., 2002. Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy

- are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. *J. Clin. Psychopharmacol.* 22, 86–90.
29. Borroto-Escuela DO, DuPont CM, Li X, Savelli D, Lattanzi D, Srivastava I, Narváez M, Di Palma M, Barbieri E, Andrade-Talavera Y, Cuppini R, Odagaki Y, Palkovits M, Ambrogini P, Lindskog M, Fuxe K. Disturbances in the FGFR1-5-HT1A Heteroreceptor Complexes in the Raphe-Hippocampal 5-HT System Develop in a Genetic Rat Model of Depression. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:309.
 30. Borys P, Krasowska M, Grzywna ZJ, Djamgoz MB, Mycielska ME. Lacunarity as a novel measure of cancer cells behavior. *Biosystems* 2008; 94(3):276-81.
 31. Cai X, Yang L, Wang Z, Zhang M, Shen L, Hong H, Lin H, Yu G. Influences of fractal dimension of membrane surface on interfacial interactions related to membrane fouling in a membrane bioreactor. *J Colloid Interface Sci.* 2017;500:79-87.
 32. Capuron, L., Gumnick, J. F., Musselman, D. L., Lawson, D. H., Reemsnyder, A., Nemeroff, C. B., & Miller, A. H. (2002a). Neurobehavioral effects of interferon-a in cancer patients: Phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. *Neuropsychopharmacology*, 26, 643–652.
 33. Capuron, L., Ravaud, A., & Dantzer, R. (2000). Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/ or interferon a-2b therapy. *J. Clin. Oncol.*, 18, 2143–2151.
 34. Capuron, L., Ravaud, A., Neveu, P.J., Miller, A.H., Maes, M., Dantzer, R., 2002b. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Mol. Psychiatry* 7, 468–473.
 35. Carballido-Gamio J, Link TM, Majumdar S. New techniques for cartilage magnetic resonance imaging relaxation time analysis: texture analysis of flattened cartilage and localized

- intra- and inter-subject comparisons. *Magn Reson Med.* 2008;59(6):1472-7
36. Castellanos NP, Martínez E, Gutierrez J. Improving osteoporosis diagnosis in children using image texture analysis. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2011;2011:6184-7.
 37. Castelli C, Losa GA. Ultrastructural complexity of nuclear components during early apoptotic phases in breast cancer cells. *Anal Cell Pathol.* 2001;23(1):1-9
 38. Chandra T, Kirschner K, Thuret JY, Pope BD, Ryba T, Newman S, Ahmed K, Samarajiwa SA, Salama R, Carroll T, Stark R, Janky R, Narita M, Xue L, Chicas A, Nunez S, Janknecht R, Hayashi-Takanaka Y, Wilson MD, Marshall A, Odom DT, Babu MM, Bazett-Jones DP, Tavaré S, Edwards PA, Lowe SW, Kimura H, Gilbert DM, Narita M. Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation. *Mol Cell.* 2012;47(2):203-14.
 39. Chao A, Jost L, Hsieh TC, Ma KH, Sherwin WB, Rollins LA. Expected Shannon Entropy and Shannon Differentiation between Subpopulations for Neutral Genes under the Finite Island Model. *PLoS One.* 2015;10(6):e0125471.
 40. Chappard D, Legrand E, Haettich B, Chalès G, Auvinet B, Eschard JP, Hamelin JP, Baslé MF, Audran M. Fractal dimension of trabecular bone: comparison of three histomorphometric computed techniques for measuring the architectural two-dimensional complexity. *Journal of Pathology.* 2001; 195 (4) : 515 – 21.
 41. Chaves Filho AJM, Lima CNC, Vasconcelos SMM, de Lucena DF, Maes M, Macedo D. IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: A potential pathophysiological link between depression and obesity. *Prog*

- Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2018;80(Pt C):234-249.
42. Chen Q, Ma Q, Wu C, Tan F, Chen F, Wu Q, Zhou R, Zhuang X, Lu F, Qu J, Shen M. Macular Vascular Fractal Dimension in the Deep Capillary Layer as an Early Indicator of Microvascular Loss for Retinopathy in Type 2 Diabetic Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(9):3785-3794.
 43. Chen SJ, Lin CH, Chang CY, Chang KY, Ho HC, Hsiao SH, Lin CW, Tzeng JE, Chen YT, Tsai HM. Characterizing the major sonographic textural difference between metastatic and common benign lymph nodes using support vector machine with histopathologic correlation. *Clinical Imaging Journal.* 2012;36 (4): 353-9. e2.
 44. Corcione A, Ferretti E, Bertolotto M, Fais F, Raffaghello L, Gregorio A, Tenca C, Ottonello L, Gambini C, Furtado G, Lira S, Pistoia V. CX3CR1 is expressed by human B lymphocytes and mediates [corrected] CX3CL1 driven chemotaxis of tonsil centrocytes. *PLoS One.* 2009 Dec 29;4(12):e8485. Erratum in: *PLoS One.* 2010;5(1):11
 45. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The fagocytes, neutrophiles and monocytes. *Blood* 112:935-945, 2008.
 46. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW: From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 46-56.
 47. Dantzer, R. (2001). Cytokine-induced sickness behavior: Mechanisms and implications. *Ann. NY Acad. Sci.*, 933, 222–234.
 48. de Oliveira MS, Balthazar ML, D'Abreu A, Yasuda CL, Damasceno BP, Cendes F, Castellano G. MR imaging texture analysis of the corpus callosum and thalamus in amnesic mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011;32(1):60-6.

49. Di Ieva A, Matula C, Grizzi F, Grabner G, Trattinig S, Tschabitscher M. Fractal analysis of the susceptibility weighted imaging patterns in malignant brain tumors during antiangiogenic treatment: technical report on four cases serially imaged by 7 T magnetic resonance during a period of four weeks. *World Neurosurg.* 2012;77(5-6):785.e11-21.
50. Djuričić GJ, Radulovic M, Sopta JP, Nikitović M, Milošević NT. Fractal and Gray Level Cooccurrence Matrix Computational Analysis of Primary Osteosarcoma Magnetic Resonance Images Predicts the Chemotherapy Response. *Front Oncol.* 2017 ;7: 246.
51. Doly S, Quentin E, Eddine R, Tolu S, Fernandez SP, Bertran-Gonzalez J, Valjent E, Belmer A, Viñals X, Callebert J, Faure P, Meye FJ, Hervé D, Robledo P, Mameli M, Launay JM, Maldonado R, Maroteaux L. Serotonin 2B Receptors in Mesoaccumbens Dopamine Pathway Regulate Cocaine Responses. *J Neurosci.* 2017;37(43):10372-10388.
52. Eaton WW, Pedersen MG, Nielsen PR, Mortensen PB (2010): Autoimmune diseases, bipolar disorder, and non-affective psychosis. *Bipolar Disord* 12:638–646.
53. Eisenberg DP, Yankowitz L, Ianni AM, Rubinstein DY, Kohn PD, Hegarty CE, Gregory MD, Apud JA, Berman KF. Presynaptic Dopamine Synthesis Capacity in Schizophrenia and Striatal Blood Flow Change During Antipsychotic Treatment and Medication-Free Conditions. *Neuropsychopharmacology.* 2017;42(11):2232-2241.
54. Engelhardt B, Sorokin L: The blood-brain and the bloodcerebrospinal fluid barriers: Function and dysfunction. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 497-511.
55. Fan Y, Wang T, Qiu Z, Peng J, Zhang C, He Y. Fast Detection of Striped Stem-Borer (*Chilo suppressalis* Walker) Infested Rice Seedling Based on Visible/Near-Infrared

- Hyperspectral Imaging System. *Sensors* (Basel). 2017 27;17(11).
56. Farar V, Valuskova P, Sevcikova M, Myslivecek J, Slamberova R. Mapping of the prenatal and postnatal methamphetamine effects on D(1)-like dopamine, M(1) and M(2) muscarinic receptors in rat central nervous system. *Brain Res Bull.* 2017;137: 17-22.
 57. Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cellular Mol Med* 2008;12 : 762–780.
 58. Ferro DP, Falconi MA, Adam RL, Ortega MM, Lima CP, de Souza CA, Irene Lorand-Metze I, Metze K. Fractal Characteristics of May-Grunwald-Giemsa Stained Chromatin Are Independent Prognostic Factors for Survival in Multiple Myeloma. *PLoS ONE* 2011; 6: e20706.
 59. Friebe A, Horn M, Schmidt F, Janssen G, Schmid-Wendtner MH, Galea, I., Bechmann, I., Perry, V.H., 2007. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 28, 12–18.
 60. Galavis PE, Hollensen C, Jallow N, Paliwal B, Jeraj R. Variability of textural features in FDG PET images due to different acquisition modes and reconstruction parameters. *Acta Oncol.* 2010 Oct;49(7):1012-6.
 61. Gaudio E, Chaberek S, Montella A, Pannarale L, Morini S, Novelli G, Borghese F, Conte D, Ostrowski K. Fractal and Fourier analysis of the hepatic sinusoidal network in normal and cirrhotic rat liver. *Journal of Anatomy.* 2005;207(2):107-15.
 62. Gazal M, Jansen K, Souza LD, Oses JP, Magalhães PV, Pinheiro R, Ghisleni G, Quevedo L, Kaster MP, Kapczinski F, da Silva RA. Association of interleukin-10 levels with age of onset and duration of illness in patients with major depressive disorder. *Rev Bras Psiquiatr.* 2015;37(4):296-302.

63. Gigault J, Grassl B. Improving the understanding of fullerene (nC(60)) aggregate structures: Fractal dimension characterization by static light scattering coupled to asymmetrical flow field flow fractionation. *J Colloid Interface Sci.* 2017;502:193-200.
64. Gilmore S, Hofmann-Wellenhof R, Muir J, Soyer HP. Lacunarity analysis: a promising method for the automated assessment of melanocytic naevi and melanoma. *PLoS One* 2009; 13;4(10).
65. Gimsa U, Mitchison NA, Brunner-Weinzierl MC (2013). "Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation". *Mediators Inflamm.* 2013: 320519.
66. Goldstein JM, Holsen L, Huang G, Hammond BD, James-Todd T, Cherkerzian S, Hale TM, Handa RJ. Prenatal stress-immune programming of sex differences in comorbidity of depression and obesity/metabolic syndrome. *Dialogues Clin Neurosci.* 2016;18(4):425-436.
67. Gomariz RP, De Cárdenas L, Zapata A. Postnatal development of the splenic white pulp in the golden hamster *Mesocricetus auratus*. I. The periarterial lymphoid sheath (PALS). *Tissue Cell.* 1989;21(3):403-17.
68. González-Durruthy M, Alberici LC, Curti C, Naal Z, Atique-Sawazaki DT, Vázquez-Naya JM, González-Díaz H, Munteanu CR. Experimental Computational Study of Carbon Nanotube Effects on Mitochondrial Respiration: In Silico Nano-QSPR Machine Learning Models Based on New Raman Spectra Transform with Markov-Shannon Entropy Invariants. *J Chem Inf Model.* 2017;57(5):1029-1044.
69. Haack, M., Hinze-Selch, D., Fenzel, T., Kraus, T., Kuhn, M., Schuld, A., & Pollmacher, T. (1999). Plasma levels of cytokines and soluble cytokine receptors in psychiatric patients upon

- hospital admission: Effects of confounding factors and diagnosis. *J. Psychiat. Res.*, 33, 407–418.
70. Haralick, R.M., Shanmugam, K. & Dinstein, I. (1973). Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, Cybernetics* 3, 610-621.
71. Harrison LC, Nikander R, Sikiö M, Luukkaala T, Helminen MT, Ryymin P, Soimakallio S, Eskola HJ, Dastidar P, Sievänen H. MRI texture analysis of femoral neck: Detection of exercise load-associated differences in trabecular bone. *J Magn Reson Imaging*. 2011;34(6):1359-66.
72. Harrison LC, Raunio M, Holli KK, Luukkaala T, Savio S, Elovaara I, Soimakallio S, Eskola HJ, Dastidar P. MRI texture analysis in multiple sclerosis: toward a clinical analysis protocol. *Acad Radiol*. 2010;17(6):696-707.
73. He Q, Yang Z, Gong B, Wang J, Xiao K, Yang ST. Quality Evaluation Focusing on Tissue Fractal Dimension and Chemical Changes for Frozen Tilapia with Treatment by Tangerine Peel Extract. *Sci Rep*. 2017;7:42202
74. Heath RG. Psychoneuroimmunology: an autoimmune pathogenesis for schizophrenia. *Psychiatr Med* 1990; 8: 95-110
75. Hellmuth J, Colby D, Valcour V, Suttichom D, Spudich S, Ananworanich J, Prueksakaew P, Sailasuta N, Allen I, Jagodzinski LL, Slike B, Ochi D, Paul R; RV254/SEARCH 010 Study Group. Depression and Anxiety are Common in Acute HIV Infection and Associate with Plasma Immune Activation. *AIDS Behav*. 2017;21(11):3238-3246.
76. Hickman SE, El Khoury J (2013). The neuroimmune system in Alzheimer's disease: the glass is half full. *J. Alzheimers Dis*. 33 Suppl 1: S295–302.
77. Hiroshima Y, Shuto K, Yamazaki K, Kawaguchi D, Yamada M, Kikuchi Y, Kasahara K, Murakami T, Hirano A, Mori M, Kosugi C, Matsuo K, Ishida Y, Koda K, Tanaka K. Fractal Dimension of

- Tc-99m DTPA GSA Estimates Pathologic Liver Injury due to Chemotherapy in Liver Cancer Patients. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(13):4384-4391.
78. Hotta N, Otsuka K, Murakami S, Yamanaka G, Kubo Y, Matsuoka O, Yamanaka T, Shinagawa M, Nunoda S, Nishimura Y, Shibata K, Saitoh H, Nishinaga M, Ishine M, Wada T, Okumiya K, Matsubayashi K, Yano S, Ichihara K, Cornélissen G, Halberg F. Fractal analysis of heart rate variability and mortality in elderly community-dwelling people -- Longitudinal Investigation for the Longevity and Aging in Hokkaido County (LILAC) study. *Biomed Pharmacother*. 2005;59 Suppl 1:S45-8.
79. Huber MB, Carballido-Gamio J, Fritscher K, Schubert R, Haenni M, Hengg C, Majumdar S, Link TM. Development and testing of texture discriminators for the analysis of trabecular bone in proximal femur radiographs. *Med Phys*. 2009;36(11):5089-98.
80. Hwang M, Song JS, Lee YS, Li C, Shim EB, Pak HN. Electrophysiological Rotor Ablation in In-Silico Modeling of Atrial Fibrillation: Comparisons with Dominant Frequency, Shannon Entropy, and Phase Singularity. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149695.
81. Inagaki M, Akechi T, Okuyama T, Sugawara Y, Kinoshita H, Shima Y, Terao K, Mitsunaga S, Ochiai A, Uchitomi Y. Associations of interleukin-6 with vegetative but not affective depressive symptoms in terminally ill cancer patients. *Support Care Cancer*. 2013;21(8):2097-106.
82. Ito H, Kawaguchi H, Kodaka F, Takuwa H, Ikoma Y, Shimada H, Kimura Y, Seki C, Kubo H, Ishii S, Takano H, Suhara T. Normative data of dopaminergic neurotransmission functions in substantia nigra measured with MRI and PET: Neuromelanin, dopamine synthesis, dopamine transporters, and dopamine D(2) receptors. *Neuroimage*. 2017 Sep;158:12-17.

83. Jackson JC, Cross RJ, Walker RF, Markesbery WR, Brooks WH, TL. Influence of serotonin on the immune response. *Immunology*. 1985; 54: 505–512.
84. Jiang Z, Jiang JX, Zhang GX: Macrophages: A double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett* 2014; 160: 17-22.
85. Joseph GB, Baum T, Carballido-Gamio J, Nardo L, Virayavanich W, Alizai H, Lynch JA, McCulloch CE, Majumdar S, Link TM. Texture analysis of cartilage T2 maps: individuals with risk factors for OA have higher and more heterogeneous knee cartilage MR T2 compared to normal controls--data from the osteoarthritis initiative. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):R153.
86. Kamel NN, Ahmed AMH, Mehaisen GMK, Mashaly MM, Abass AO. Depression of leukocyte protein synthesis, immune function and growth performance induced by high environmental temperature in broiler chickens. *Int J Biometeorol*. 2017 in press. Doi: 10.1007/s00484-017-1342-0.
87. Karperien A, Jelinek HF, Leandro JJ, Soares JV, Cesar Jr RM, Luckie A. "Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice". *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*. 2008;2(1):109–122.
88. Karperien A. FracLac for ImageJ, version 2.5. <http://rsbinfo.nih.gov/ij//fraclac/FLHelp/Introductionhtm>. 1999-2007
89. Karperien AL, Jelinek HF, Buchan AM. Box-Counting Analysis of Microglia Form in Schizophrenia, Alzheimer's Disease and Affective Disorder. *Fractals*. 2008;16(2):103.
90. Kiraly DD, Horn SR, Van Dam NT, Costi S, Schwartz J, Kim-Schulze S, Patel M, Hodes GE, Russo SJ, Merad M, Iosifescu DV, Charney DS, Murrough JW. Altered peripheral immune profiles in treatment-resistant depression: response to ketamine and

- prediction of treatment outcome. *Transl Psychiatry*. 2017;7(3):e1065.
91. Kirch DG. Infection and autoimmunity as etiologic factors in schizophrenia: a review and reappraisal. *Schizophr Bull* 1993;19: 355-370
 92. Kohler O, Krogh J, Mors O, Benros ME. Inflammation in Depression and the Potential for Anti-Inflammatory Treatment. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(7):732-42.
 93. Kop WJ, Cohen N. Psychological risk factors and immune system involvement in cardiovascular disease. In: Ader R, Felten D, Cohen N, editors. *Psychoneuroimmunology*, Third ed. New York: Academic Press; 2001. p. 525–544.
 94. Korkmaz SA. Retraction notice to "Diagnosis of cervical cancer cell taken from scanning electron and atomic force microscope images of the same patients using discrete wavelet entropy energy and Jensen Shannon, Hellinger, Triangle Measure classifier" [SAA 160 (2016) 39-49]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2017;170:267.
 95. Koutsiana E, Hadjileontiadis LJ, Chouvarda I, Khandoker AH. Fetal Heart Sounds Detection Using Wavelet Transform and Fractal Dimension. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;5:49.
 96. Koutsouraki E, Hatzifilipou E, Michmizos D, Cotsavasiloglou C, Costa V, Baloyannis S. Increase in interleukin-6 levels is related to depressive phenomena in the acute (relapsing) phase of multiple sclerosis. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2011;23(4):442-8.
 97. Kovaru H, Pav M, Kovaru F, Raboch J, Fiserova A. Cell signalling in CNS and immune system in depression and during antidepressant treatment: focus on glial and natural killer cells. *Neuro Endocrinol Lett*. 2009;30(4):421-8.
 98. Kranaster L, Hoyer C, Aksay SS, Bumb JM, Müller N, Zill P, Schwarz MJ, Sartorius A. Antidepressant efficacy of

- electroconvulsive therapy is associated with a reduction of the innate cellular immune activity in the cerebrospinal fluid in patients with depression. *World J Biol Psychiatry*. 2017:1-11.
99. Krogh J, Benros ME, Jorgensen MB, Vesterager L, Elfving B, Nordentoft M: The association between depressive symptoms, cognitive function, and inflammation in major depression. *Brain Behav Immun* 2014; 35: 70-76.
100. Lebedev DV, Filatov MV, Kuklin AI, Islamov AKh, Kentzinger E, Pantina R, Toperverg BP, Isaev-Ivanov VV. Fractal nature of chromatin organization in interphase chicken erythrocyte nuclei: DNA structure exhibits biphasic fractal properties. *FEBS Lett* 2005; 579(6):1465-8
101. Leff-Gelman P, Mancilla-Herrera I, Flores-Ramos M, Cruz-Fuentes C, Reyes-Grajeda JP, García-Cuétara Mdel P, Bugnot-Pérez MD, Pulido-Ascencio DE. The Immune System and the Role of Inflammation in Perinatal Depression. *Neurosci Bull*. 2016 Aug;32(4):398-420.
102. Lestage, J., Verrier, D., Palin, K., & Dantzer, R. (2002). The enzyme indoleamine 2,3 dioxygenase is induced in the mouse brain in response to peripheral administration of lipopolysaccharide and superantigen. *Brain Behav. Immun.*, 16, 596-601.
103. Li G, Ruan X, Auerbach RK, Sandhu KS, Zheng M, Wang P, Poh HM, Goh Y, Lim J, Zhang J, Sim HS, Peh SQ, Mulawadi FH, Ong CT, Orlov YL, Hong S, Zhang Z, Landt S, Raha D, Euskirchen G, Wei CL, Ge W, Wang H, Davis C, Fisher-Aylor KI, Mortazavi A, Gerstein M, Gingeras T, Wold B, Sun Y, Fullwood MJ, Cheung E, Liu E, Sung WK, Snyder M, Ruan Y. Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. *Cell*. 2012;148(1-2):84-98.
104. Li R, Wang X, Qin T, Qu R, Ma S. Apigenin ameliorates chronic mild stress-induced depressive behavior by inhibiting

- interleukin-1 β production and NLRP3 inflammasome activation in the rat brain. *Behav Brain Res.* 2016;296:318-325.
105. Lieberman J. The ABCs of granular mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Rev Immunol* 2003; 3:361-370.
106. Linder N, Konsti J, Turkki R, Rahtu E, Lundin M, Nordling S, Haglund C, Ahonen T, Pietikäinen M, Lundin J. Identification of tumor epithelium and stroma in tissue microarrays using texture analysis. *Diagn Pathol.* 2012;7:22.
107. Liska V, Treska V, Mirka H, Benes J, Vycital O, Bruha J, Pitule P, Skalicky T, Sutnar A, Chlumska A, Racek J, Trefil L, Finek J, Holubec L. Immediately preoperative use of biological therapy does not influence liver regeneration after large resection--porcine experimental model with monoclonal antibody against epidermal growth factor. *In Vivo.* 2012;26(4):683-91.
108. Liu HH, Lu P, Guo Y, Farrell E, Zhang X, Zheng M, Bosano B, Zhang Z, Allard J, Liao G, Fu S, Chen J, Dolim K, Kuroda A, Usuka J, Cheng J, Tao W, Welch K, Liu Y, Pease J, de Keczer SA, Masjedizadeh M, Hu JS, Weller P, Garrow T, Peltz G. An integrative genomic analysis identifies *Bhmt2* as a diet-dependent genetic factor protecting against acetaminophen-induced liver toxicity. *Genome Res.* 2010;20(1):28-35.
109. Lobetti-Bodoni C, Ferrero D, Genuardi E, Passera R, Bernocco E, Sia D, Grignani G, Crisà E, Monitillo L, Rocci A, Drandi D, Giai V, Zanni M, Boi M, Isaia G, Barbero D, Lunghi M, Abruzzese E, Radaelli F, Pini M, Pregno P, Carlo-Stella C, Gaidano G, Boccadoro M, Ladetto M. Telomere loss in Philadelphia-negative hematopoiesis after successful treatment of chronic myeloid leukemia: Evidence for premature aging of the myeloid compartment. *Mech Ageing Development.* 2012;133(7):479-88.

110. Loftis JM, Huckans M, Morasco BJ. Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: current theories and novel treatment strategies. *Neurobiol Dis.* 2010;37(3):519-33.
111. Loftis JM, Janowsky A (2014). Neuroimmune basis of methamphetamine toxicity". *Int. Rev. Neurobiol.* 118: 165–197.
112. Loh ND, Hampton CY, Martin AV, Starodub D, Sierra RG, Barty A, Aquila A, Schulz J, Lomb L, Steinbrener J, Shoeman RL, Kassemeyer S, Bostedt C, Bozek J, Epp SW, Erk B, Hartmann R, Rolles D, Rudenko A, Rudek B, Foucar L, Kimmel N, Weidenspointner G, Hauser G, Holl P, Pedersoli E, Liang M, Hunter MS, Gumprecht L, Coppola N, Wunderer C, Graafsma H, Maia FR, Ekeberg T, Hantke M, Fleckenstein H, Hirsemann H, Nass K, White TA, Tobias HJ, Farquar GR, Benner WH, Hau-Riege SP, Reich C, Hartmann A, Soltau H, Marchesini S, Bajt S, Barthelmess M, Bucksbaum P, Hodgson KO, Strüder L, Ullrich J, Frank M, Schlichting I, Chapman HN, Bogan MJ. Erratum: Fractal morphology, imaging and mass spectrometry of single aerosol particles in flight. *Nature.* 2012; 123:11-99.
113. Losa GA, Castelli C. Nuclear patterns of human breast cancer cells during apoptosis: characterisation by fractal dimension and co-occurrence matrix statistics . *Cell and Tissue Research* 2005; 322: 257-267.
114. Losa GA, Nonnenmacher TF. Self-similarity and fractal irregularity in pathologic tissues. *Mod Pathol.* 1996;9(3):174-82.
115. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J: Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 2015; 523: 337-341.
116. Luc S, Luis TC, Boukarabila H, Macaulay IC, Buza-Vidas N, Bouriez-Jones T, Lutteropp M, Woll PS, Loughran SJ, Mead AJ,

- Hultquist A, Brown J, Mizukami T, Matsuoka S, Ferry H, Anderson K, Duarte S, Atkinson D, Soneji S, Domanski A, Farley A, Sanjuan-Pla A, Carella C, Patient R, de Bruijn M, Enver T, Nerlov C, Blackburn C, Godin I, Jacobsen SE. The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell and myeloid lineage potential. *Nat Immunol.* 2012;13(4):412-9.
117. Luis-Ravelo D, Estévez-Silva H, Barroso-Chinea P, Afonso-Oramas D, Salas-Hernández J, Rodríguez-Núñez J, Acevedo-Arozena A, Marcellino D, González-Hernández T. Pramipexole reduces soluble mutant huntingtin and protects striatal neurons through dopamine D3 receptors in a genetic model of Huntington's disease. *Exp Neurol.* 2017;299(Pt A):137-147.
118. Maes M, Bosmans E, De Jongh R, Kenis G, Vandoolaeghe E, Neels H. Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine* 1997;9: 853–858.
119. Maes, M. (1995). Evidence for an immune response in major depression: A review and hypothesis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.*, 19, 11–38.
120. Maes, M., Scharpe, S., Meltzer, H.Y., Bosmans, E., Suy, E., Calabrese, J., Cosyns, P., 1993.
121. Manakova S. Studies on the Mechanisms of 6-OHDA toxicity in neuronal and non-neuronal cells. Doctoral dissertation. 2005. Kuopio University.
122. Mandelbrot BB, Kol B, Aharony A. Angular gaps in radial diffusion-limited aggregation: two fractal dimensions and nontransient deviations from linear self-similarity. *Phys Rev Lett.* 2002;88(5):055501.
123. Massung, B., Miller, A.H., 2009. Activation of central nervous system inflammatory pathways by interferon-alpha: relationship to monoamines and depression. *Biol. Psychiatry* 65, 296–303.

124. Mayerhoefer ME, Welsch GH, Riegler G, Mamisch TC, Materka A, Weber M, El-Rabadi K, Friedrich KM, Dirisamer A, Trattnig S. Feasibility of texture analysis for the assessment of biochemical changes in meniscal tissue on T1 maps calculated from delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage data: comparison with conventional relaxation time measurements. *Invest Radiol.* 2010;45(9):543-7.
125. Milaneschi Y, Lamers F, Peyrot WJ, Baune BT, Breen G, Dehghan A, Forstner AJ, Grabe HJ, Homuth G, Kan C, Lewis C, Mullins N, Nauck M, Pistis G, Preisig M, Rivera M, Rietschel M, Streit F, Strohmaier J, Teumer A, Van der Auwera S, Wray NR, Boomsma DI, Penninx BWJH; CHARGE Inflammation Working Group and the Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Genetic Association of Major Depression With Atypical Features and Obesity-Related Immunometabolic Dysregulations. *JAMA Psychiatry.* 2017 in press. Doi: 10.1001/jamapsychiatry.2017.3016.
126. Miller AH, Raison CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(1):22-34.
127. Miller GE, Rohleder N, Stetler C, Kirschbaum C. Clinical Depression and Regulation of the Inflammatory Response During Acute Stress. *Psychosomatic Medicine* 67:679–687, 2005.
128. Miller GE, Stetler CA, Carney RM, Freedland KE, Banks WA. Clinical depression and inflammatory risk markers for coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2002;90:1279–1283.
129. Miller, A. H., Pariante, C. M., & Pierce, B. D. (1999). Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function: Glucocorticoid resistance and relevance to depression. In R. Dantzer, E. Wollman, & R. Yirmiya (Eds.),

- Cytokines, stress, and depression (pp. 107–116). New York: Plenum/Kluwer Academic Publishers.
130. Miller, R; Hosung, J; Bhangoo, S; Fletcher, W (2009). Sensory Nerves. Heidelberg, Germany: Springer. pp. 417–449.
 131. Minami A, Tsuboi I, Harada T, Fukumoto T, Hiramoto M, Koshinaga M, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Inflammatory biomarker, neopterin, suppresses B lymphopoiesis for possible facilitation of granulocyte responses, which is severely altered in age-related stromal-cell-impaired mice, SCI/SAM. *Exp Biol Med* (Maywood). 2007;232(1):134-45.
 132. Mirny LA. The fractal globule as a model of chromatin architecture in the cell. *Chromosome Res* 2011;19(1):37-51.
 133. Moal F, Chappard D, Wang J, Vuillemin E, Michalak-Provost S, Rousselet MC, Oberti F, and Cal`es.P. Fractal Dimension Can Distinguish Models and Pharmacologic Changes in Liver Fibrosis in Rats. *Hepatology* 2006;36:840-849.
 134. Mota R, Gazal M, Acosta BA, de Leon PB, Jansen K, Pinheiro RT, Souza LD, Silva RA, Oses JP, Quevedo L, Lara DR, Ghisleni G, Kaster MP. Interleukin-1 β is associated with depressive episode in major depression but not in bipolar disorder. *J Psychiatr Res*. 2013;47(12):2011-4.
 135. Murray ED, Buttner N, Price BH (2012). Depression and Psychosis in Neurological Practice. In Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J. *Bradley's Neurology in Clinical Practice: Expert Consult - Online and Print, 6e* (Bradley, Neurology in Clinical Practice e-dition 2v Set). 1 (6th ed.). Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. p. 101.
 136. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Rev Immunol* 2011;11:823-836.

137. Nestler E, Carlezon WA. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *BIOL PSYCHIATRY* 2006; 59: 1151–1159.
138. Nurnberger JI Jr. A Genetic Locus Associated With Depression: The Iceberg Begins to Melt. *Biol Psychiatry*. 2017;82(5):304-305.
139. Pacheco R, Contreras F, Zouali M. The Dopaminergic System in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2014; 5: 117.
140. Pacheco R, Prado CE, Barrientos MJ, Bernales S. Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *J Neuroimmunol*. 2009;216(1-2):8-19.
141. Pantic I, Basta-Jovanovic G, Starcevic V, Paunovic J, Suzic S, Kojic Z, Pantic S. Complexity reduction of chromatin architecture in macula densa cells during mouse postnatal development. *Nephrology*. 2012;21-44
142. Pantic I, Dimitrijevic D, Nesic D, Petrovic D. Gray level co-occurrence matrix algorithm as pattern recognition biosensor for oxidopamine-induced changes in lymphocyte chromatin architecture. *J Theor Biol*. 2016;406:124-8.
143. Pantic I, Harhaji-Trajkovic L, Pantovic A, Milosevic NT, Trajkovic V. Changes in fractal dimension and lacunarity as early markers of UV-induced apoptosis. *Journal of theoretical biology*. 2012a; 303: 87-92.
144. Pantic I, Pantic S, Basta-Jovanovic G. Gray level co-occurrence matrix texture analysis of germinal center light zone lymphocyte nuclei: physiology viewpoint with focus on apoptosis. *Microsc Microanal*. 2012b;18(3):470-5.
145. Pantic I, Pantic S, Paunovic J. Aging increases nuclear chromatin entropy of erythroid precursor cells in mice spleen hematopoietic tissue. *Microsc Microanal*. 2012c; 18 (5):313-316.
146. Pantic I, Pantic S. Germinal Center Texture Entropy as possible indicator of humoral Immune Response:

- Immunophysiology Viewpoint. *Mol Imaging Biol* 2012; 14 (5): 534-540.
147. Park S, Kim B, Lee J, Goo JM, Shin YG. GGO nodule volume-preserving nonrigid lung registration using GLCM texture analysis. *IEEE Trans Biomed Eng* 2011; 58(10):2885-94.
148. Parren PV, Burton DR. The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Adv Immunol*, 77:195-262, 2001.
149. Pavlov, V.A., Wang, H., Czura, C.J., Griedman, S.G., and Tracey, K.J. (2003). The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway: A Missing Link in Neuroimmunomodulation. *Molecular Medicine*, 9:125-134.
150. Pearlman DM, Brown JR, MacKenzie TA, Hernandez F Jr, Najjar S. Blood levels of S-100 calcium-binding protein B, high-sensitivity C-reactive protein, and interleukin-6 for changes in depressive symptom severity after coronary artery bypass grafting: prospective cohort nested within a randomized, controlled trial. *PLoS One*. 2014;9(10):e111110.
151. Peuna A, Hekkala J, Haapea M, Podlipská J, Guermazi A, Saarakkala S, Nieminen MT, Lammentausta E. Variable angle gray level co-occurrence matrix analysis of T(2) relaxation time maps reveals degenerative changes of cartilage in knee osteoarthritis: Oulu knee osteoarthritis study. *J Magn Reson Imaging*. 2017 in press. Doi: 10.1002/jmri.25881.
152. Pribic J, Vasiljevic J, Kanjer K, Konstantinovic ZN, Milosevic NT, Vukosavljevic DN, Radulovic M. Fractal dimension and lacunarity of tumor microscopic images as prognostic indicators of clinical outcome in early breast cancer. *Biomark Med*. 2015;9(12):1279-7.
153. Ptasinska A, Assi SA, Mannari D, James SR, Williamson D, Dunne J, Hoogenkamp M, Wu M, Care M, McNeill H, Cauchy P, Cullen M, Tooze RM, Tenen DG, Young BD, Cockerill PN,

- Westhead DR, Heidenreich O, Bonifer C. Depletion of RUNX1/ETO in t(8;21) AML cells leads to genome-wide changes in chromatin structure and transcription factor binding. *Leukemia*. 2012; 26(8): 112-134
154. Quan N, Whiteside M, Herkenham M: Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience* 1998; 83: 281-293.
155. Raison, C.L., Borisov, A.S., Majer, M., Drake, D.F., Pagnoni, G., Woolwine, B.J., Vogt, G.J., Randall L. Adam, Rosana C. Silva, Fernanda G. Pereira, Neucimar J. Leite, Irene Lorand-Metze, Konradin Metz.. The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Analytical Cellular Pathology* 2006; 28:55-59.
156. Rangayyan RM, Nguyen TM, Ayres FJ, Nandi AK. Effect of pixel resolution on texture features of breast masses in mammograms. *J Digit Imaging*. 2010 Oct;23(5):547-53.
157. Reiner SL. Development in motion: helper T cells at work. *Cell* 129:33-36, 2007. Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins, and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression. *Psychiatry Res*. 49, 11-27.
158. Riddle NC, Jung YL, Gu T, Alekseyenko AA, Asker D, Gui H, Kharchenko PV, Minoda A, Plachetka A, Schwartz YB, Tolstorukov MY, Kuroda MI, Pirrotta V, Karpen GH, Park PJ, Elgin SC. Enrichment of HP1a on Drosophila Chromosome 4 Genes Creates an Alternate Chromatin Structure Critical for Regulation in this Heterochromatic Domain. *PLoS Genet*. 2012 Sep;8(9):e1002954.
159. Patterson N, Koik A. Immune system and depression. *J Immunology*. 2017;121:133-141

160. Roberts NA, White AJ, Jenkinson WE, Turchinovich G, Nakamura K, Withers DR, McConnell FM, Desanti GE, Benezech C, Parnell SM, Cunningham AF, Paolino M, Penninger JM, Simon AK, Nitta T, Ohigashi I, Takahama Y, Caamano JH, Hayday AC, Lane PJ, Jenkinson EJ, Anderson G. Rank signaling links the development of invariant $\gamma\delta$ T cell progenitors and Aire(+) medullary epithelium. *Immunity*. 2012;36(3):427-37.
161. Robson MJ, Quinlan MA, Blakely RD. Immune System Activation and Depression: Roles of Serotonin in the Central Nervous System and Periphery. *ACS Chem Neurosci*. 2017;8(5):932-942.
162. Rodrigues da Silva Vde P, Belo Filho AF, Rodrigues Almeida RS, de Holanda RM, da Cunha Campos JH. Shannon information entropy for assessing space-time variability of rainfall and streamflow in semiarid region. *Sci Total Environ*. 2016 Feb 15;544:330-8.
163. Rogers TJ (2012). "The molecular basis for neuroimmune receptor signaling". *J Neuroimmune Pharmacol*. 7: 722–724.
164. Rommelfanger, K.S., Weinshender, D. Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*. 2007; 74:177-190.
165. Roy HK, Iversen P, Hart J, et al. Down-regulation of SNAIL suppresses MIN mouse tumorigenesis: Modulation of apoptosis, proliferation, and fractal dimension. *Mol Cancer Ther* 2004; 3:1159-1165.
166. Schübler M, Sadek B, Kottke T, Weizel L, Stark H. Synthesis, Molecular Properties Estimations, and Dual Dopamine D(2) and D(3) Receptor Activities of Benzothiazole-Based Ligands. *Front Chem*. 2017;5:64.
167. Schwartzentruer J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DA, Tönjes M, Hovestadt V, Albrecht S, Kool M, Nantel A, Konermann C,

- Lindroth A, Jäger N, Rausch T, Ryzhova M, Korbel JO, Hielscher T, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Ebinger M, Schuhmann MU, Scheurlen W, Pekrun A, Frühwald MC, Roggendorf W, Kramm C, Dürken M, Atkinson J, Lepage P, Montpetit A, Zakrzewska M, Zakrzewski K, Liberski PP, Dong Z, Siegel P, Kulozik AE, Zapatka M, Guha A, Malkin D, Felsberg J, Reifenberger G, von Deimling A, Ichimura K, Collins VP, Witt H, Milde T, Witt O, Zhang C, Castelo-Branco P, Lichter P, Faury D, Tabori U, Plass C, Majewski J, Pfister SM, Jabado N. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 2012;482(7384):226-31.
168. Serra MP, Poddighe L, Pakkinson A, Boi M, Sanna F, Piludu MA, Corda MG, Giorgi O, Quartu M. Expression of BDNF and trkB in the hippocampus of a rat genetic model of vulnerability (Roman low-avoidance) and resistance (Roman high-avoidance) to stress-induced depression. *Brain Behav*. 2017; 7 (10): e00861
169. Shamir L, Wolkow CA and Goldberg IG . Quantitative measurement of aging using image texture entropy. *Bioinformatics* 2009; 25: 3060-3063
170. Sheelakumari R, Venkateswaran Rajagopalan, Chandran A, Varghese T, Zhang L, Yue GH, Mathuranath PS, Kesavadas C. Quantitative analysis of grey matter degeneration in FTD patients using fractal dimension analysis. *Brain Imaging Behav*. 2017 in press. doi: 10.1007/s11682-017-9784-x.
171. Shim GJ, Wang L, Andersson S, Nagy N, Kis LL, Zhang Q, Mäkelä S, Warner M, Gustafsson JA. Disruption of the estrogen receptor beta gene in mice causes myeloproliferative disease resembling chronic myeloid leukemia with lymphoid blast crisis. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A*. 2003;100(11):6694-9. 2003 May 9. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(21):8298.

172. Shimura Y, Kurosawa H, Tsuchiya M, Sawa M, Kaneko H, Liu L, Makino Y, Nojiri H, Iwase Y, Kaneko K, Ishijima M. Serum interleukin 6 levels are associated with depressive state of the patients with knee osteoarthritis irrespective of disease severity. *Clin Rheumatol*. 2017;36(12):2781-2787.
173. Shreif Z, Striegel DA, Periwal V. The jigsaw puzzle of sequence phenotype inference: Piecing together Shannon entropy, importance sampling, and Empirical Bayes. *J Theor Biol*. 2015;380:399-413.
174. Silva DA, Basso GG, Semenzim VL, Godoy MF, Taboga SR, Andrade AL, Luvizotto MC, Braile DM, Nery JG. Fractal dimension and Shannon's entropy analyses of the architectural complexity caused by the inflammatory reactions induced by highly crystalline poly (vinyl alcohol) microspheres implanted in subcutaneous tissues of the Wistar rats. *J Biomedical Matererial Res A*. 2012;12:1.
175. Singharoy A, Joshi H, Cheluvaraja S, Miao Y, Brown D, Ortoleva P. Simulating microbial systems: addressing model uncertainty/incompleteness via multiscale and entropy methods. *Methods Mol Biol*. 2012;881:433-67.
176. Sleckman BP. 2005. Lymphocyte antigen receptor gene assembly: multiple layers of regulation. *Immunol Res* 32: 253-8.
177. Smith, R. S. (1991). The macrophage theory of depression. *Med. Hypoth.*, 35, 298-306.
178. Sowa-Kućma M, Styczeń K, Siwek M, Misztak P, Nowak RJ, Dudek D, Rybakowski JK, Nowak G, Maes M. Lipid Peroxidation and Immune Biomarkers Are Associated with Major Depression and Its Phenotypes, Including Treatment-Resistant Depression and Melancholia. *Neurotox Res*. 2017a in press. Doi: 10.1007/s12640-017-9835-5.

179. Sowa-Kućma M, Styczeń K, Siwek M, Misztak P, Nowak RJ, Dudek D, Rybakowski JK, Nowak G, Maes M. Are there differences in lipid peroxidation and immune biomarkers between major depression and bipolar disorder: Effects of melancholia, atypical depression, severity of illness, episode number, suicidal ideation and prior suicide attempts. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018;81:372-383.
180. Sperner-Unterweger B. Immunological Aetiology of Major Psychiatric Disorders. Evidence and Therapeutic Implications. *Drugs* 2005; 65: 1493-1520
181. Sun L, Brown R, Chen S, Zhuge Q, Su DM. Aging induced decline in T-lymphopoiesis is primarily dependent on status of progenitor niches in the bone marrow and thymus. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(9):606-19.
182. Takayanagi, Y., Osawa, S., Ikuma, M., Takagaki, K., Zhang, J., Jamaya, Y., Yamada, T., Sugimoto M., Furuta, T., Miyajima, H., Sugimoto, K. (2012). Norepinephrine suppresses INF- γ and TNF- α production by murine intestinal intraepithelial lymphocytes via the β 1 adrenoceptor. *Journal of Neuroimmunology*, 245:66-74.
183. Talbert PB, Ahmad K, Almouzni G, Ausió J, Berger F, Bhalla PL, Bonner WM, Cande WZ, Chadwick BP, Chan SW, Cross GA, Cui L, Dimitrov SI, Doenecke D, Eirin-López JM, Gorovsky MA, Hake SB, Hamkalo BA, Holec S, Jacobsen SE, Kamieniarz K, Khochbin S, Ladurner AG, Landsman D, Latham JA, Loppin B, Malik HS, Marzluff WF, Pehrson JR, Postberg J, Schneider R, Singh MB, Smith MM, Thompson E, Torres-Padilla ME, Tremethick DJ, Turner BM, Waterborg JH, Wollmann H, Yelagandula R, Zhu B, Henikoff S. A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics Chromatin*. 2012;5:7.

184. Thor M, Tyagi N, Hatzoglou V, Apte A, Saleh Z, Riaz N, Lee NY, Deasy JO. A Magnetic Resonance Imaging-based approach to quantify radiation-induced normal tissue injuries applied to trismus in head and neck cancer. *Phys Imaging Radiat Oncol.* 2017;1:34-40.
185. Thurman RE, Rynes E, Humbert R, Vierstra J, Maurano MT, Haugen E, Sheffield NC, Stergachis AB, Wang H, Vernot B, Garg K, John S, Sandstrom R, Bates D, Boatman L, Canfield TK, Diegel M, Dunn D, Ebersol AK, Frum T, Giste E, Johnson AK, Johnson EM, Kuttyavin T, Lajoie B, Lee BK, Lee K, London D, Lotakis D, Neph S, Neri F, Nguyen ED, Qu H, Reynolds AP, Roach V, Safi A, Sanchez ME, Sanyal A, Shafer A, Simon JM, Song L, Vong S, Weaver M, Yan Y, Zhang Z, Zhang Z, Lenhard B, Tewari M, Dorschner MO, Hansen RS, Navas PA, Stamatoyannopoulos G, Iyer VR, Lieb JD, Sunyaev SR, Akey JM, Sabo PJ, Kaul R, Furey TS, Dekker J, Crawford GE, Stamatoyannopoulos JA. The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature.* 2012;489(7414):75-82.
186. Tian, Li; Ma, Li; Kaarela, Tiina; Li, Zhilin (2012). "Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases". *J Neuroinflamm* 9:155.
187. Treisman, GJ; Soudry, O (2016). Neuropsychiatric Effects of HIV Antiviral Medications. *Drug Safety.* 39 : 945–957.
188. Urigüen JA, García-Zapirain B, Artieda J, Iriarte J, Valencia M. Comparison of background EEG activity of different groups of patients with idiopathic epilepsy using Shannon spectral entropy and cluster-based permutation statistical testing. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184044.
189. van Holst RJ, Sescousse G, Janssen LK, Janssen M, Berry AS, Jagust WJ, Cools Increased Striatal Dopamine Synthesis Capacity in Gambling Addiction. *Biol Psychiatry.* 2017 in press. Doi: 10.1016/j.biopsych.2017.06.010.

190. Vido JR, Adam RL, Lorand-Metze IG, Metze K. Computerized texture analysis of atypical immature myeloid precursors in patients with myelodysplastic syndromes: an entity between blasts and promyelocytes. *Diagn Pathol.* 2011;6:93.
191. Vivier E, Tomasello E, Baratin M. Function of natural killer cells. *Nature Rev Immunol* 9:503-510, 2008.
192. Von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature Rev Immunol* 3:867-878, 2003.
193. Waliszewski P. The Quantitative Criteria Based on the Fractal Dimensions, Entropy, and Lacunarity for the Spatial Distribution of Cancer Cell Nuclei Enable Identification of Low or High Aggressive Prostate Carcinomas. *Front Physiol.* 2016;7:34.
194. Warnick RM, Brewer K, Megown K, Finco M, Schwind B. (2006) Texture Metric Comparison of Manual Forest Stand Delineation and Image Segmentation. www.fs.fed.us/eng/rsac/RS2006/presentations/warnick.ppt
195. Wu W, Zheng YL, Tian LP, Lai JB, Hu CC, Zhang P, Chen JK, Hu JB, Huang ML, Wei N, Xu WJ, Zhou WH, Lu SJ, Lu J, Qi HL, Wang DD, Zhou XY, Duan JF, Xu Y, Hu SH. Circulating T lymphocyte subsets, cytokines, and immune checkpoint inhibitors in patients with bipolar II or major depression: a preliminary study. *Sci Rep.* 2017 ;7:40530.
196. Yasar F, Akgünlü F. Fractal dimension and lacunarity analysis of dental radiographs. *Dentomaxillofac Radiol.* 2005;34(5):261-7.
197. Yirmiya, R. (1996). Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Res*, 711, 163–174.
198. Yogesan K, Jørgensen T, Albregtsen F, Tveter KJ, Danielsen HE. Entropy-based texture analysis of chromatin

- structure in advanced prostate cancer. *Cytometry*. 1996;24:268-76.
199. Yroni A, Sporer M, Péran P, Schmitt L, Arbus C, Sauvaget A. Electroconvulsive therapy, depression, the immune system and inflammation: A systematic review. *Brain Stimul*. 2017 Oct 19.
200. Zhang L, Dean D, Liu JZ, Sahgal V, Wang X, Yue GH. Quantifying degeneration of white matter in normal aging using fractal dimension. *Neurobiol Aging* 2007; 28(10):1543-55
201. Zhou W, Otto EA, Cluckey A, Airik R, Hurd TW, Chaki M, Diaz K, Lach FP, Bennett GR, Gee HY, Ghosh AK, Natarajan S, Thongthip S, Veturi U, Allen SJ, Janssen S, Ramaswami G, Dixon J, Burkhalter F, Spoendlin M, Moch H, Mihatsch MJ, Verine J, Reade R, Soliman H, Godin M, Kiss D, Monga G, Mazzucco G, Amann K, Artunc F, Newland RC, Wiech T, Zschiedrich S, Huber TB, Friedl A, Slaats GG, Joles JA, Goldschmeding R, Washburn J, Giles RH, Levy S, Smogorzewska A, Hildebrandt F. FAN1 mutations cause karyomegalic interstitial nephritis, linking chronic kidney failure to defective DNA damage repair. *Nat Genet*. 2012;44(8):910-5.
202. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 2012;36:705-716.
203. Zubkova I, Mostowski H, Zaitseva M. Up-regulation of IL-7, stromal-derived factor-1 alpha, thymus-expressed chemokine, and secondary lymphoid tissue chemokine gene expression in the stromal cells in response to thymocyte depletion: implication for thymus reconstitution. *J Immunol*. 2005;175(4):2321-30. Erratum in: *J Immunol*. 2006;177(4):2728.
204. Zuklys S, Mayer CE, Zhanybekova S, Stefanski HE, Nusspaumer G, Gill J, Barthlott T, Chappaz S, Nitta T, Dooley J, Nogales-Cadenas R, Takahama Y, Finke D, Liston A, Blazar BR,

Pascual-Montano A, Holländer GA. MicroRNAs Control the Maintenance of Thymic Epithelia and Their Competence for T Lineage Commitment and Thymocyte Selection. *J Immunol.* 2012;21:12-32

Spisak skraćenica

FD – Fraktalna dimenzija

ENT – Entropija

LAC - Lakunarnost

ADM – Angularni drugi momenat

IMR – Inverzni momenat razlike

IL – Interleukin

IFN- γ – Interferon- γ

DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina

BMI – Body Mass Index

ICAM1 – Intercellular Adhesion Molecule-1

LFA-1 – Lymphocyte Function-Associated Antigen-1

MCP-1 – Monocyte Chemotatic and Activating Factor-1

PAI-1 – Plasminogen Activator Inhibitor type 1

Biografija autora

Draga Dimitrijević, rođena 24.7.1967. god. u Jagodini, završila osnovnu i srednju školu i gimnaziju. Upisala Medicinski fakultet u Beogradu 1986. godine. Diplomirala 1995. godine. Obavila opšti lekarski staž u Spec. bolnici za psihijatrijske bolesti „Dr Laza Lazarević“. Položila stručni ispit 26.12.1996. godine. Nastavila volonterski staž u istoj ustanovi.

Školske 1996/1997. upisala magistarske studije na Univerzitetu u Beogradu, a odbranila magistarsku tezu pod nazivom „Značaj komorbiditeta i crte ličnosti za suicidalnost psihijatrijskih pacijenata“ 4.3.2004. godine. Školske 1996/1997, započela volontersku specijalizaciju iz psihijatrije. Od juna 1998. god. stalno zaposlena u Institutu za psihijatrijske bolesti „Dr Laza Lazarević“. Dana 11.12.2001. položila specijalistički ispit iz psihijatrije. Sa zvanjem specijaliste psihijatrije radila na odeljenju akutnih psihoza, potom u Dnevnoj bolnici, gde i sada radi. U međuvremenu učestvovala u izradi više stručnih i naučnih radova iz oblasti psihijatrije. Školske 2012/2013 upisala užu specijalizaciju iz oblasti sudske psihijatrije.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Draga Dimitrijević

broj upisa _____

Izjavljujem

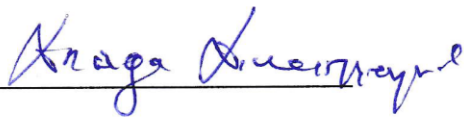
da je doktorska disertacija pod naslovom

FRAKTALNA I TEKSTURALNA ANALIZA STRUKTURE HROMATINA LIMFOCITA KRVI KOD
PACIJENATA SA RAZLIČITIM STEPENOM DEPRESIJE

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19.01.2018.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora dr Draga Dimitrijević

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada FRAKTALNA I TEKSTURALNA ANALIZA STRUKTURE HROMATINA LIMFOCITA KRVI
KOD PACIJENATA SA RAZLIČITIM STEPENOM DEPRESIJE

Mentor Doc. dr Igor Pantić

Potpisani dr Draga Dimitrijević

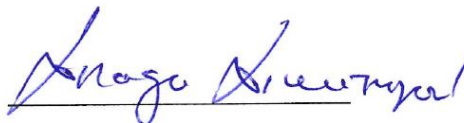
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19.01.2018.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

FRAKTALNA I TEKSTURALNA ANALIZA STRUKTURE HROMATINA LIMFOCITA KRVI
KOD PACIJENATA SA RAZLIČITIM STEPENOM DEPRESIJE

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

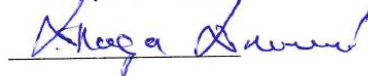
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 19.01.2018.

Potpis doktoranda



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo - nekomercijalno** – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.