

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

MARIJANA JANKOVIĆ DANOLIĆ

**ULOGA ADROPINA I HOMOCISTEINA U ATEROGENEZI BOLESNIKA
S PRIMARNIM SJÖGRENOVIM SINDROMOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

U Splitu, 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Marijana Janković Danolić

**ULOGA ADROPINA I HOMOCISTEINA U ATEROGENEZI BOLESNIKA
S PRIMARNIM SJÖGRENOVIM SINDROMOM**

Doktorska disertacija

Mentor:

prof. dr. sc. Dijana Perković, dr. med.

U Splitu, travanj 2023.

Ova doktorska disertacija izrađena je na Zavodu za reumatologiju, alergologiju i kliničku imunologiju, KBC Split pod mentorstvom pročelnice zavoda, prof.dr.sc.Dijane Perković.

Smatram se izuzetno sretnom što sam došla baš u njene ruke. Osim što je veliki medicinski stručnjak i izuzetni profesionalac, ona je čovjek! Definicija čovjeka bi za mene bila: empatija, razumjevanje, dubina u razmatranja svega u životu te razvijena svijest i savjest.

Bila je velika podrška i odličan učitelj.

Hvala.

Upisala sam EBM 2015 godine. Tada nisam znala što drugo raditi, osim educirati se. Nisam znala hoće li to imati smisla, uklopiti se u moju životnu priču i naći put do utilizacije. Danas, godinama nakon, još nisam pronašla sve odgovore, ali moj način razmišljanja, analitičan pristup, znanje i iskustvo te poznanstva koja mi je studij donio već su ogroman uspjeh i veliko intelektualno bogatstvo.

Zahvaljujem i svojoj sestri Josipi koja me gurala ohrabrenjima, roditeljima, Tereziji i Adamu, za koje bi bilo krivo da napišem 'da su vjerovali u mene. Ispravno bi bilo napisati da im je ovaj korak bio neupitan. Veliko hvala mojoj dječici, Magdaleni i Ivanu! Mojim učiteljima, o strpljenju, o polakšem načinu življenja života i uživanju u svim malenim koracima koji polako vode do velikih ciljeva. Uz njih, ostvarenje ovog cilja, ispunjuje još većim osjećajem zadovoljstva.

Posljednje, ali najbitnije, hvala Gospodinu što me vodio putevima znanja i što danas u ovom divnom okruženju voljenih ljudi, bogatija za predivno iskustvo te nešto i pametnija :) držim u rukama svoju doktorsku disertaciju.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA	3
1. UVOD	7
1.1. Definicija	8
1.2. Epidemiologija	8
1.3. Patofiziologija	9
1.4. Kliničke manifestacije	9
1.4.1. Kserostomija	9
1.4.2. Oteklina žlijezda slinovnica	10
1.4.3. Kseroftalmija	10
1.4.4. Izvanžlijezdane manifestacije SS-a	11
1.5. Dijagnostički kriteriji	14
1.5.1. Schirmerov test	15
1.5.2. Biopsija žlijezda slinovnica	16
1.5.3. Sijalometrija i sijalografija	16
1.5.4. Scintigrafija slinovnica	16
1.5.5. Serologija	17
1.6. Procjena aktivnosti bolesti i oštećenja u pSS-u	18
1.7. Ateroskleroza	23
1.8. Adropin	26
1.9. Homocistein	30
1.10. Debljina intime-medije karotidnih arterija	31
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	34
3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA	37
3.1. Ispitanici	38
3.2. Postupci	40
3.2.1. Klinički i laboratorijski nalazi	40
3.2.2. Definicija kardiovaskularnog rizika	41
3.2.3. Procjena aktivnosti bolesti i oštećenja u pSS-u	42
3.2.4. Određivanje CIMT-a	42
3.2.5. Statistička obrada podataka	43
4. ETIČKA NAČELA	44
5. REZULTATI	46

5.1. Rezultati za adropin.....	47
5.1.1. Osnovne karakteristike studijske populacije	47
5.1.2. Laboratorijski parametri studijske populacije	48
5.1.3. Serumske razine adropina u bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine	49
5.1.4. Korelacija adropina i drugih parametara	51
5.1.5. Multipla regresijska analiza.....	53
5.2. Rezultati za homocistein i CIMT	55
5.2.1. Osnovna obilježja bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine.....	55
5.2.2. Laboratorijski parametri	56
5.2.3. Razine homocisteina i max CIMT-a u bolesnika s pSS-om i u kontrolnoj skupini.....	57
5.2.4. Povezanost homocisteina i antropometrijskih, laboratorijskih i kliničkih parametara ...	59
5.2.5. Povezanost CIMT-a i antropometrijskih, laboratorijskih i kliničkih parametara	61
5.2.6. Multipla regresijska analiza.....	64
6. RASPRAVA	65
7. ZAKLJUČCI	73
8. POPIS LITERATURE.....	75
9. SAŽETAK.....	95
10. SUMMARY.....	98
11. ŽIVOTOPIS.....	101

POPIS OZNAKA I KRATICA

ANA	antinuklearna protutijela (engl. <i>antinuclear antibodies</i>)
AHA	Američko udruženje za srce (engl. <i>American Heart Association</i>)
Apoe ^{-/-}	apolipoprotein E-deficijentni miševi skloni aterosklerozi (engl. <i>atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient</i>)
BAFF	faktor aktivacije B stanica (engl. <i>B-cell activating factor</i>)
BD	Behcetova bolest (engl. <i>Behcet's disease</i>)
BP	krvni tlak (engl. <i>blood pressure</i>)
C3	komponenta komplementa 3 (engl. <i>complement component 3</i>)
C4	komponenta komplementa 4 (engl. <i>complement component 4</i>)
CH50	ukupna aktivnost komplementa (engl. <i>total complement activity</i>)
CIDP	kronična upalna demijelinizirajuća polineuropatija (engl. <i>chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy</i>)
CIMT	zadebljanje intime-medije karotide (engl. <i>carotide intima-media thickness</i>)
CK	kreatin kinaza (engl. <i>creatine kinase</i>)
CMIA	kemiluminiscentni imunotest mikročestica (engl. <i>chemiluminescence microparticle immunoassay</i>)
CNS	središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i>)
Cys	cistein (engl. <i>cysteine</i>)
DBP	dijastolički tlak (engl. <i>diastolic blood pressure</i>)
DL _{CO}	difuzijski kapacitet za ugljikov monoksid (engl. <i>diffusing capacity for carbon monoxide</i>)

ELISA	enzimska imunoanaliza (eng. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMG	elektromiografija (engl. <i>electromyography</i>)
EMNG	elektromioneurografija (engl. <i>electromyoneurography</i>)
ENHO	gen povezan s energetsom homeostazom (engl. <i>energy homeostasis-associated gene</i>)
eNOS	endotelna sintaza dušikovog oksida (engl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ERK1/2	kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>).
ESR	brzina sedimentacije eritrocita (engl. <i>erythrocyte sedimentation rate</i>)
ESSDAI	EULAR Sjögren-ov sindrom indeks aktivnosti bolesti (engl. <i>EULAR Sjögren syndrome disease activity index</i>)
FRS	Framinghamov rezultat rizika (engl. <i>Framingham risk score</i>)
FVC	forsirani vitalni kapacitet (engl. <i>forced vital capacity</i>)
GFR	Brzina glomerularne filtracije (engl. <i>glomerular filtration rate</i>)
HDL	lipoprotein visoke gustoće (engl. <i>high-density lipoprotein</i>)
HRCT	Kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije (engl. <i>high-resolution computed tomography</i>)
hsCRP	C-reaktivni protein visoke osjetljivosti (engl. <i>high-sensitivity C-reactive protein</i>)
IgG	imunoglobulin G (engl. <i>immunoglobulin G</i>)
ILD	intersticijska bolesti pluća (engl. <i>interstitial lung disease</i>)
ITM	indeks tjelesne mase
LDL	lipoprotein niske gustoće (engl. <i>low-density lipoprotein</i>)
MALT	ekstranodalni B-stanični limfomi marginalne zone vezan uz limfatično tkivo sluznice (engl. <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>).

MCP	metakarpofalangealni (engl. <i>metacarpophalangeal</i>)
MCV	prosječni volume eritrocita (engl. <i>mean corpuscular volume</i>)
Met	metionin (engl. <i>methionine</i>)
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
NHL	non-Hodgkinov limfom (engl. <i>non-Hodgkin lymphoma</i>)
NO	dušikov oksid (engl. <i>nitric oxide</i>)
NYHA	New York kardiološka asocijacije (engl. <i>New York Heart Association</i>)
PI3K-Akt	fosfoinozimid-3-kinaza-protein kinaza B (engl. <i>phosphoinositide-3-kinase–protein kinase B</i>)
PIP	proksimalni interfalangealni (engl. <i>proximal interphalangeal</i>)
PSN	periferna senzorna neuropatija (engl. <i>peripheral sensory neuropathy</i>)
PNS	periferni živčani sustav (engl. <i>peripheral nervous system</i>)
PPAR γ	receptor za aktivator proliferacije peroksisoma tip gama (engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>)
pSS	primarni Sjögrenov sindrom (engl. <i>primary Sjögren's syndrome</i>)
RA	reumatoidni artritis (engl. <i>rheumatoid arthritis</i>)
RF	reumatoidni faktor (engl. <i>rheumatoid factor</i>)
ROS	reaktivne vrste kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RTA	renalna tubularna acidoza (engl. <i>renal tubular acidosis</i>)
SAH	S-adenozil-L-homocistein (engl. <i>S-Adenosyl-L-homocysteine</i>)
SBP	sistolčki tlak (engl. <i>systolic blood pressure</i>)
SICCA	kohorta međunarodnog kliničkog kolaborativnog saveza Sjögrenovog sindroma (eng. <i>Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance</i>)

SS	Sjögrenov sindrom (engl. <i>Sjögren's syndrome</i>)
sSS	sekundarni Sjögrenov sindrom (engl. <i>secondary Sjögren's syndrome</i>)
SSc	sistemska skleroza (engl. <i>systemic sclerosis</i>)
SSDDI	indeks oštećenja bolesti u Sjögren-ovom sindrom (engl. <i>Sjögren syndrome disease damage index</i>)
SLE	sistemiški eritemski lupus (engl. <i>systemic lupus erythematosus</i>)
TC	totalni kolesterol (engl. <i>total cholesterol</i>)
TIN	tubularni intersticijski nefritis (engl. <i>tubulointerstitial nephritis</i>)
TLRs	toll-like receptori (engl. <i>toll-like receptors</i>)
TNF	čimbenik tumorske nekroze (engl. <i>tumor necrosis factor</i>)
TG	trigliceridi (engl. <i>triglycerides</i>)
VEGFR2	receptor faktora rasta vaskularnog endotela tipa 2 (engl. <i>vascular endothelial growth factor receptor type 2</i>)
VLDL	lipoproteina vrlo niske gustoće (engl. <i>very low-density lipoprotein</i>)
VSMC	vaskularne mišićne glatke stanice (engl. <i>vascular smooth muscle cells</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)

1. UVOD

1.1. Definicija

Sjögrenov sindrom (engl. *Sjögren's syndrome* - SS) je kronična, sporo napredujuća autoimuna bolest karakterizirana limfocitnom infiltracijom egzokrinih žlijezda što rezultira suhoćom usta (kserostomijom) i suhim očima (kseroftalmijom). Bolest ima široki klinički spektar, od ograničene autoimune egzokrinopatije do sistemske bolesti [1]. U sistemskom obliku bolesti mogu biti zahvaćena pluća, bubrezi, štitnjača, mišići, srce, živčani sustav i koža, a često su prisutni simptomi umora, depresije, kognitivnih poremećaja, kožnih lezija, boli i blagog artritisa [2]. Bolest se može javiti samostalno i tada se naziva primarnim Sjögrenovim sindromom (engl. *primary Sjögren's syndrome* - pSS). Kada se javlja u sklopu drugih autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa (engl. *rheumatoid arthritis* - RA), sistemskog eritemskog lupusa (engl. *systemic lupus erythematosus* - SLE) ili progresivne sistemske skleroze (engl. *systemic sclerosis* - SSc) naziva se sekundarnim Sjögrenovim sindromom (engl. *secondary Sjögren's syndrome* - sSS) [3].

Prvi opis ove bolesti dao je Mikulicz 1892. godine. Mikuliczov sindrom obuhvaćao je lokalizirano zahvaćanje žlijezda slinovnica bez sistemskih znakova bolesti što nije pružalo dovoljno dijagnostičkih i terapijskih informacija. Švedski oftalmolog Henrik Sjögren 1933. godine opisao je suhoću usta i očiju u 19 žena. Sjögren je također prvi uveo termin *keratokonjunktivitis sicca* [4].

1.2. Epidemiologija

Prevalencija pSS-a je ~ 0.5-1 %, a sekundarni se oblik razvija u 5-20 % bolesnika [1]. pSS se znatno češće razvija u žena u odnosu na muškarace; razlika u spolu kreće se u omjerima 9:1 i 19:1. Prosječna dob u vrijeme postavljanja dijagnoze pSS je 56 godina, dok se drugi vrhunac bolesti javlja između 20 i 40 godine. Međutim, prvi simptomi mogu se pojaviti godinama prije postavljanja dijagnoze [5]. Pojedina istraživanja ukazuju da omjer spolova i dobna raspodjela ovise o etničkoj pripadnosti i geografskom području ispitane populacije. SS rijetko se javlja u djece, no početak je moguć već u petoj godini života [6].

1.3. Patofiziologija

Patofiziologija SS-a vrlo je složena. Unatoč velikom napretku u razumijevanju autoimunih zbivanja, etiopatogeneza bolesti i dalje je nejasna. Smatra se da u bolesnika s genetskom predispozicijom kombinacija virusnih infekcija, hormona i okolišnih čimbenika vodi k aktivaciji epitelnih stanica i pojačanoj ekspresiji toll-like receptora (engl. *toll-like receptors* - TLRs). TLRs su transmembranski proteini uključeni u pokretanje imunološkog odgovora. Inicijalna faza bolesti obilježena je strukturalnim promjenama žlijezda što podrazumijeva izmjenu ekstracelularnog matriksa i promjenu međustanične komunikacije. Moguće je da te promjene uzrokuju epigenetičko reprogramiranje genske ekspresije. Pojačana ekspresija TLRs pobuđuje prirodni imunitet koji dovodi do aktivacije limfocita T i stvaranja proupalnih citokina. Osim što potiču aktivaciju i proliferaciju limfocita B, limfociti T izlučuju i citokine koji stimuliraju epitelne stanice. Rezultat te stimulacije je stvaranje proapoptotičnih molekula i ekspresija autoantigena koji dovode do aktivacije dendritičkih stanica. Ove stanice proizvode brojne citokine, uključujući i faktor aktivacije B stanica (eng. *B-cell activating factor* - BAFF) koji stimulira sazrijevanje promijenjenih B limfocita koji postaju autoreaktivni. Naposljetku, to dovodi do stvaranja specifičnih autoprotutijela koja na različite načine potiču oštećenje tkiva [7]. Najčešća autoprotutijela u SS-u su autoprotutijela na specifične ribonukleoproteine Ro i La. Postoje dokazi koji govore kako anti SSA/Ro i anti SSB/La protutijela igraju važnu ulogu u lokalnom autoimunom odgovoru, štoviše nađena su u žlijezdama slinovnica u oboljelih od SS-a [8].

1.4. Kliničke manifestacije

1.4.1. Kserostomija

Više od 90% bolesnika sa SS-om imaju simptome suhoće usne šupljine koji su posljedica funkcionalnih promjena žlijezda slinovnica. Simptomi uključuju suhoću usta, poteškoća u procesu žvakanja te potrebe unošenja više tekućine kako bi lakše progutali hranu. U ranoj fazi bolesti kserostomija je obično blaža, ali s progresijom bolesti i oštećenjem žlijezda slinovnica, kserostomija se pogoršava te je praćena stalnim osjećajem žarenja usta, izmjenama okusa, pojavom fisura na jeziku te angularnih heilitisa. Daljnjim napredovanjem kserostomija dovodi do brojnih komplikacija kao što su propadanje zubi, atrofija jezičnih papila, povećana učestalost infekcija sluznice usne šupljine, u prvom redu kandidijaze [9].

1.4.2. Oteklina žlijezda slinovnica

Oteklina parotida (Slika 1) i drugih većih žlijezda slinovnica obično je asimptomatski i obostran. Ako je otok izraženiji te praćen s boli i trizmusom potrebno je isključiti bakterijski sialodentis. Perzistentno, unilateralno povećanje žlijezda budi sumnju na limfom [10].



Slika 1. Povećana parotidna žlijezda; slika: vlastiti izvor

1.4.3. Kseroftalmija

Kseroftalmija ili suhoća očiju je često slabije izražena od kserostomije. Bolesnici najčešće navode osjećaj 'pijeska, odnosno stranog tijela u očima', ali i druge simptome kao što su fotofobija, žarenje, te nedostatak suza. Kseroftalmija nastaje zbog limfocitne infiltracije suznih žlijezda koja dovodi do destrukcije žlijezda i smanjenog stvaranja suza. Nedostatan protok suza dovodi do erozija rožnice i epitela spojnice, stanja poznatog kao *keratoconjunctivitis sicca* [9].

1.4.4. Izvanžlijezdane manifestacije SS-a

Muskuloskeletni sustav

Bolovi u zglobovima prisutni su u 30-60% bolesnika s pSS-om [11]. Često se može uočiti simetrični, periferni poliartritis malih zglobova šaka koji prethodi simptomima suhoće. Obično nije deformirajući niti erozivan, a zahvaća metakarpofalangealne (engl. *metacarpophalangeal* - MCP), proksimalne interfalangealne (engl. *proximal interphalangeal* - PIP) zglobove i zapešća [11,12]. Bolovi u mišićima, mišićna slabost i umor također su učestale tegobe ovih bolesnika [13].

Koža

Osim sindroma suhoće, kožne manifestacije SS-a uključuju i imunološki posredovana upalna stanja poput vaskulitisa te druge pridružene poremećaje kao što je Raynaudov fenomen. Vaskulitične promjene najčešće se javljaju na donjim udovima u obliku leukocitoklastičnog vaskulitisa [14]. Raynaudov fenomen vrlo je čest u pSS-u i obično prethodi simptomima suhoće. Suha koža zabilježena je u 50% bolesnika s SS-om, a nejasno je nastaje li uslijed limfocitne infiltracije žlijezda ili disfunkcionalnog znojenja [15, 16]. Ostale kožne manifestacije uključuju nodozni eritem, vitiligo i digitalne ulceracije [14].

Bubrezi

Učestalost zahvaćenosti bubrega u SS varira od 4 do 67% što se objašnjava razlikama u dijagnostičkim kriterijima i protokolima istraživanja. Tubularni intersticijski nefritis (engl. *tubulointerstitial nephritis* - TIN), koji je histopatološki obilježen peritubularnom infiltracijom limfocita i fibrozom, najčešća je bubrežna manifestacija u bolesnika sa SS-om. Glavna klinička prezentacija TIN-a je renalna tubularna acidoza (engl. *renal tubular acidosis* - RTA), a nastaje zbog oštećenja bubrežnih tubula. Posljedica RTA je zadržavanje kiselina ili gubitak bikarbonata te se očituje slabošću ili paralizom zbog gubitka kalija, bubrežnim kolikama zbog nefrokalcinoze te poliurijom/polidipsijom zbog nefrogenog dijabetesa insipidusa [16,17].

Distalna tubularna acidoza je također česta u bolesnika sa SS-om, a javlja se u otprilike oko 20% slučajeva. Najčešće je asimptomatska i bez kliničkog značenja. Glomerulonefritis je rijedak u SS-u, a manifestira se proteinurijom, nefrotskim sindromom, hematurijom,

arterijskom hipertenzijom i zatajivanjem funkcije bubrega [18]. Prisutnost glomerulonefritisa u bolesnika sa SS-om značajno pridonosi povećanju stope morbiditeta i mortaliteta te utječe na prognozu bolesti [19].

Respiratorni sustav

Zahvaćenost pluća se definira prisutnošću respiratornih simptoma potvrđenih dijagnostičkim testovima (funkcionalnim i radiografskim). Učestalost respiratornih simptoma u bolesnika s pSS-om varira od 9 do 75% dok se klinički značajne manifestacije pojavljuju u 9 do 12% bolesnika. [20].

Smanjena sekrecija nazalnih epitelnih stanica dovodi do stvaranja krasta u nosnicama, epistakse i recidivirajućih sinusitisa. Trahealna suhoća rezultira suhim neproduktivnim kašaljem i otežanim disanjem [21]. Često se uočava opstrukcija malih dišnih putova uslijed bronhijalne hiperreaktivnosti, dok teži oblici opstrukcije mogu nastati zbog limfocitne hiperplazije. Intersticijska bolesti pluća (*engl. interstitial lung disease - ILD*) je rjeđa manifestacija SS-a. Kliničke manifestacije ILD-a su suhi kašalj, dispneja u naporu, a radiološki se nalaze najčešće bilateralni plućni infiltrati. U kasnijim stadijima bolesti dolazi i do razvoja fibroze [22].

Probavni sustav

Gastrointestinalne manifestacije u bolesnika sa SS-om uključuju disfagiju, dispepsiju, mučninu i bol u epigastriju, što može biti povezano s hiposalivacijom, smanjenim motilitetom jednjaka, gastritisom te smanjenom proizvodnjom želučane kiseline. Bolesnici sa SS-om podložniji su nastanku gastroezofagealnog refluksa zbog sline koja ima neutralizirajući učinak na želučanu kiselinu [23]. Mogu biti prisutni nespecifični poremećaji jetrene funkcije, a česte pridružene bolesti su autoimuni hepatitis i primarna bilijarna ciroza [9].

Živčani sustav

Neurološke manifestacije se nalaze u oko 20 do 60% bolesnika sa SS-om. Spektar neuroloških poremećaja u sklopu SS-a je iznimno širok, od perifernih neuropatija do

poremećaja središnjeg živčanog sustava te mogu biti uzrokovane i vaskulitisom [24]. Najčešći oblik je periferna senzorna neuropatija (engl. *peripheral sensory neuropathy* - PSN) i smatra se karakterističnim neurološkim obilježjem SS-a. PSN obilježavaju klinički simptomi simetrične i distalne parestezije, neuropatska bol i osjećaj pečenja stopala, a kliničkim se pregledom mogu dokazati smanjeni ili odsutni duboki tetivni refleksi [25]. Uz PSN najčešće se mogu javiti optički mijelitis te neuralgija trigemina [26]. Zbog oštećenja živčanih vlakana (najčešće su zahvaćeni kranijalni živci: kohlearni živac, trigeminalni živac i lični živac) bolesnici s pSS-om često pokazuju kognitivne promjene kao što su poremećaji koncentracije i pamćenja te vizualno-prostorni poremećaji. Bolesnici opisuju i deficite kratkoročnog te dugoročnog pamćenja uz često prisutne depresivne poremećaje [24].

Hematološki sustav

Hematološki poremećaji su česti u bolesnika s pSS-om, te se u gotovo trećine razvija citopenija koja uključuje leukopeniju, anemiju i trombocitopeniju. Leukopenija se javlja u oko 20 do 60% bolesnika i povezana je s pozitivnim anti SSA protutijelima te većim žljezdanim oštećenjima. Anemije su najčešće blage i asimptomatske, a mogu se naći u oko 11 do 19% pSS bolesnika [27]. Poliklonska hipergamaglobulinemija nalazi se u 80 % bolesnika [9].

Bolesnici sa SS-om imaju 20 do 40 puta veći rizik za razvoj non-Hodgkinova limfoma (engl. *non-Hodgkin lymphoma* - NHL) u usporedbi s općom populacijom. NHL smatra se najtežom kliničkom manifestacijom SS-a, a prevalencija NHL u SS-u iznosi oko 4 % i javlja se u prosjeku 7,5 godina nakon postavljanja dijagnoze. Najučestaliji histološki tip NHL-a u bolesnika sa SS-om je ektranodalni B-stanični limfomi marginalne zone vezan uz limfatično tkivo sluznice - MALT limfom (engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*). Klinički je najčešće indolentan, a pored žlijezda slinovnica lokaliziran je i u izvan limfatičnim tkivima kao što je želudac ili bubreg. Na veći rizik razvoja HNL-a ukazuju niske razine C₄, mješana monoklonalna krioglobulinemija, visoke razine β₂-mikroglobulina, CD4 limfocitopenija, prisutnost monoklonalnih lanaca u serumu i u urinu, pezistentno povećanje parotide, palpabilna purpura, ulceracije na nogama i splenomegalija [28,29].

Ostale izvanžlijezdane manifestacije

Endokrinološki poremećaji javljaju se u oko 20% bolesnika sa SS-om. Najčešći pridruženi poremećaj je hipotireoza [30]. Zahvaćen može biti i genitalni sustav. U mnogih premenopauzalnih žena oboljelih od SS-a javlja se vaginalna suhoća, posljedična dispareunija, te učestala endometrioza [31]. Trudnoća nema utjecaja na tijek bolesti, ali u djeteta postoji rizik od razvoja neonatalnog lupusa i prirođenog atrioventrikularnog bloka povezanog s visokim morbitetom i mortalitetom. Taj se rizik povećava uz prisutnost anti-SSA/Ro protutijela [32].

1.5. Dijagnostički kriteriji

Postavljanje dijagnoze SS-a se temelji na klasifikacijskim kriterijima za Sjögrenov sindrom: revidiranu verziju europskih kriterija predloženu od strane američko-europske konsenzusne grupe.

Klasifikacijski kriteriji SS-a prikazani su u Tablici 1 te uključuju subjektivne i objektivni znakove kserostomije i kseroftalmije, patohistološku analizu žlijezda slinovnica i prisutnost autoprotutijela [33].

Tablica 1. Revidirani međunarodni klasifikacijski kriteriji za Sjögrenov sindrom

I. Očni simptomi - potvdan odgovor na barem jedno od sljedećih pitanja: 1. Jeste li imali svakodnevno suhe oči dulje od 3 mjeseca? 2. Imate li povremeni osjet 'pijeska u očima'? 3. Upotrebljavate li umjetne suze više od 3 puta dnevno?
II. Oralni simptomi - potvdan odgovor na barem jedno od sljedećih pitanja: 1. Jeste li svakodnevno imali osjećaj suhих usta dulje od 3 mjeseca? 2. Jeste li imali povremeno ili stalno natečene žlijezde slinovnice kao odrasla osoba? 3. Pijete li često tekućinu kako biste lakše progutali hranu?
III. Očni znakovi - pokazatelji zahvaćenosti oka definirani kao pozitivan rezultat barem jednog od dvaju sljedećih testova: 1. Schirmerov test napravljen bez anestezije (≤ 5 mm u 5 minuta) 2. Rose bengal bodovna ljestvica ili neka druga očna bodovna ljestvica (\geq prema van Bijsterveldovu score sistemu)

<p>IV. Histopatologija malih žlijezda slinovnica (dobivena biopsijom bukalne sluznice koja izgleda normalno) pokazuje fokalni limfocitni sijaloadenitis, vrednuje se s focus scorom ≥ 1, a koji je definiran kao broj limfocitnih fokusa koji sadrže više od 50 limfocita na 4 mm² žljezdanog tkiva.</p>
<p>V. Zahvaćenost žlijezda slinovnica: objektivni dokaz zahvaćenosti žlijezda slinovnica definiran kao pozitivan rezultat barem jednog od sljedećih dijagnostičkih testova:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nestimulirano lučenje sline ($\leq 1,5$ ml u 15 minuta) 2. Sijalografija parotide kojom se uočavaju difuzne sijalektazije (punktiformni, kavitarni uzorak) bez znakova destrukcije u velikim vodovima 3. Scintigrafija slinovnica koja pokazuje odgođeni unos, smanjenu koncentraciju i/ili odgođeno izlučivanje kontrasta
<p>VI. Antitijela; prisutnost u serumu sljedećih antitijela: Antitijela na SSA/Ro ili SSB/La antigen ili oba</p>

U oboljelih koji nemaju povezanu bolest, primarni SS se definira kao:

- a) Prisutnost 4 od 6 kriterija uz obvezno pozitivne kriterije IV (histopatologija) ili VI (serologija)
- b) Prisutnost bilo koja 3 od 4 objektivna kriterija (III, IV, V, VI)

U oboljelih s povezanim bolestima (npr. druga dobro definirana bolest vezivnog tkiva) prisutnost kriterija I ili II uz prisutnost bilo koja 2 od III, IV i V kriterija su dovoljni za postavljanje dijagnoze sekundarnog SS [33].

1.5.1. Schirmerov test

Ovim testom određuje se vodena komponenta suznoga filma. Provodi se postavljanjem sterilnog filter-papira na prijelazu srednje i vanjske trećine donje vjeđe. Nakon pet minuta papir se ukloni i očita se dužina navlaženog dijela papira u milimetrima. Normalno se filter-papir navlaži 15 mm od ruba vjeđe u pet minuta. Ako je ona < 5 mm, test se smatra pozitivnim [34].

1.5.2. Biopsija žlijezda slinovnica

Biopsija žlijezda slinovnica dugo se smatrala zlatnim standardom u dijagnostici pSS. Međutim, u kliničkoj je praksi njezina primjena često rezervirana za bolesnike u kojih dijagnoza ostaje nejasna nakon temeljite kliničke i laboratorijske procjene. Izraz žarišni (fokalni) limfocitni sialoadenitis odnosi se na histopatološki obrazac prisutnosti jednog ili više upalnog žarišta u biopsiji, dok se okolno tkivo sastoji uglavnom od nepromijenjenog parenhima. S druge strane, žarište ili fokus definira se kao nakupina od ≥ 50 limfocita. Patohistološki nalaz smatra se pozitivnom ako je u preparatu prisutno ≥ 1 fokusa s više od 50 limfocita na 4 mm^2 tkiva [35].

1.5.3. Sijalometrija i sijalografija

Nestimularno lučenje sline (sijalometrija) jednostavan je, neinvazivan test koji mjeri ukupnu količinu sline koju bolesnik izbaci u mjernu epruvetu tijekom jedinice vremena u sjedećem položaju. Kod izvedbe testa važno je da ispitanik najmanje dva sata prije testa ništa ne jede, ne pije, ne puši i ne pere zube. Pozitivnim se testom smatra izlučenje > 1.5 ml sline u 15 minuta [36].

Sijalografija je kontrastno radiografsko snimanje slinovnica, obično parotide, nakon retrogradnog ubrizgavanja kontrastnog sredstva u izvodni kanal. Kontrast se distribuira kroz sustav kanala, što omogućuje analizu arhitekture i organizacije žljezdanih kanala. U bolesnika sa SS-om mogu se naći dilatirani i tortuozni kanalići, s neravnomjernom raspodjelom kontrastnog sredstva [37, 38].

1.5.4. Scintigrafija slinovnica

Scintigrafija pruža funkcionalnu procijenu svih žlijezda slinovnica analizom unosa i izlučivanja $^{99\text{mTc}}$ -pertehnata iz slinovnica 60 minuta nakon njegove intravenske aplikacije. U bolesnika sa SS-om se opisuje odgođeni unos, smanjena koncentracija i/ili odgođeno izlučivanje markera. Scintigrafija je visoko osjetljiva, ali slabije specifična metoda [39].

1.5.5. Serologija

Jedan od kriterija za dijagnozu pSS-a su pozitivna anti SSA/Ro i/ili pozitivna anti SSB/La antitijela. Ovisno o korištenoj laboratorijskoj metodi anti SSA/Ro i anti SSB/La antitijela mogu biti pozitivna u 50 do 70% bolesnika s pSS-om [40]. Anti SSA/Ro su neovisna od anti SSB/La antitijela [41], dok je obrnuta situacija rijetka što potvrđuje i nedavna analiza kohorte međunarodnog kliničkog kolaborativnog saveza Sjögrenovog sindroma (*engl. Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance - SICCA*) koja je zaključila da osobe s anti SSB/La, ali bez anti SSA/Ro nisu imale bolest [42]. S druge strane Venables i sur. su pokazali da su pozitivna anti SSB/La u prisutnosti anti SSA/Ro prediktor za prepoznavanje bolesnika sa SS-om [43].

Studija Theander-a i sur. usporedila je podatke iz registra primarnog Sjögrenovog sindroma u Malmou i 3 švedske biobanke zdravstvene skrbi. Uzorci seruma su analizirani na antinuklearna protutijela (*engl. antinuclear antibodies - ANA*), reumatoidni faktor te anti SSA/Ro60, anti SSA/Ro52 i anti SSB/La antitijela. Od 117 pSS bolesnika u registru koji su imali uzorke seruma u biobankama prije dijagnosticiranja bolesti, 81% ih je imalo pozitivna autoantitijela prije pojave simptoma bolesti. Pozitivna anti SSA/Ro i anti SSB/La autoantitijela pojavljuju se i 18 do 20 godina prije postavljanja dijagnoze [44, 45]. Prediktor za konačni razvoj bolesti su vrijednosti anti SSA/Ro60 i anti SSA/Ro52 antitijela [44].

Ro/La čestica je protein-RNA kompleks nastao spajanjem Ro60 i La proteina s malom citoplazmatskom RNA [46]. Ro52 i Ro60 su inče unutarstanični proteini. Ro52, poznat kao TRIM21, je ubikvitin E3 ligaza, uključena u regulaciju imunoloških odgovora posredovanih regulatornim faktorom interferona, koji je uglavnom izražen u imunološkim stanicama [47, 48].

Anti SSA/Ro i anti SSB/La autoantitijela su povezani s mlađom dobi u trenutku postavljanja dijagnoze, dužim trajanjem bolesti, težom disfunkcijom egzokrinih žlijezda, rekurentnim povećanjem parotidne žlijezde i obilnijim limfocitnim infiltratima u malim žlijezdama slinovnicama [49, 50]. Naime, Ramos-Casals M. i sur. pokazali su da bolesnici s pozitivnim anti SSA/Ro i anti SSB/La protutijelima imaju manje godina pri postavljanju dijagnoze pSS-a te imaju značajno veću vjerojatnost za razvoj svih kliničkih manifestacija bolesti. To uključuje povećanje parotida, Raynaud-ov sindrom, artritis, vaskulitis, bubrežnu tubularnu acidozu, perifernu neuropatiju, citopenije i pozitivan reumatoidni faktor [51].

Davidson i sur. su tijekom desetogodišnjeg praćenja 100 bolesnika s pSS-om utvrdili da su sistemske, izvanžljezdane manifestacije razvili samo bolesnici s pozitivnim anti SSA/Ro [52].

U bolesnika s pSS-om je često pozitivan reumatoidni faktor (engl. *rheumatoid factor* - RF) i povezan je s prisutnošću anti SSA/Ro i anti SSB/La te sistemskom bolešću [53]. Stoga je pozitivan RF prognostički pokazatelj u pSS-u, međutim nije dovoljno osjetljiv za pSS jer se često nalazi u drugim bolestima [54].

1.6. Procjena aktivnosti bolesti i oštećenja u pSS-u

Za procjenu aktivnosti bolesti u SS-u primjenjuje se EULAR indeks aktivnosti bolesti (engl. *EULAR Sjögren syndrome disease activity index* - ESSDAI), koji uključuje 12 domena: konstitucijsku, hematološku, biološku, žljezdanu, zglobnu, kožnu, plućnu, bubrežnu i mišićnu domenu, uključuje i limfadenopatiju te zahvaćenost perifernog i središnjeg živčanog sustava (Tablica 2) [55].

Stupanj kroničnog ireverzibilnog oštećenja u primarnom SS-u procijenjuje se pomoću indeksa oštećenja (engl. *Sjögren syndrome disease damage index* - SSDDI), koji se sastoji od tri domene: očne, oralne i sistemske domene. Sistemska domena uključuje neurološka, bubrežna, plućna, kardiovaskularna, gastrointestinalna, mišićno-koštana, endokrina i maligna oštećenja (Tablica 3) [56].

Tablica 2: EULAR Sjögren-ov sindrom indeks aktivnosti bolesti (ESSDAI)

Domena	Aktivnost	Opis
Konstitucijska <i>Isključenje temperature zbog infekcije ili samovoljnog gubljenja tjelesne težine</i>	Nema = 0	Odsutnost navedenih simptoma
	Niska = 1	Blaga do srednje povišena temperatura (37.5°–38.5°C)/noćno znojenje i/ili neželjeni gubitak tjelesne težine za 5 to 10%
	Umjerena = 2	Visoko povišena temperatura (>38.5°C)/noćno znojenje i/ili neželjeni gubitak tjelesne težine >10%
Limfadenopatija <i>Isključenje infekcija</i>	Nema = 0	Odsutnost navedenih značajki/obilježja
	Niska = 1	Limfadenopatija ≥ 1 cm u bilo kojoj nodalnoj regiji, ≥ 2 cm

Domena	Aktivnost	Opis
		u ingvinalnoj regiji
	Umjerena = 2	Limfadenopatija ≥ 2 cm u bilo kojoj nodalnoj regiji, ili ≥ 3 cm u ingvinalnoj regiji i/ili splenomegalija (klinički jasna/opipljiva ili utvrđena slikovnom metodom)
	Visoka = 3	Trenutni maligni poremećaj proliferacije B-stanica
Žljezdana <i>Isključenje litijaze ili infekcija slinovnica</i>	Nema = 0	Odsutnost oteklina žljezda
	Niska = 1	Mala oteklina žlijezda s povećanom parotidom (≤ 3 cm), ili limitirano/ograničeno submandibularno ili lakrimalno oteknuće
	Umjerena = 2	Velika oteklina žlijezda s povećanom parotidom (> 3 cm), ili značajno submandibularno ili lakrimalno oteknuće
Zglobna <i>Isključenje osteoartritisa</i>	Nema = 0	Odsutnost trenutno aktivnih zglobnih promjena
	Niska = 1	Artralgijska u rukama, šakama, zglobovima i stopalima popraćena jutarnjom ukočenošću (>30 min)
	Umjerena = 2	1 do 5 (od 28) zglobova sa sinovitisom
	Visoka = 3	≥ 6 (od 28) zglobova sa sinovitisom
Kožna	Nema = 0	Odsutnost trenutnih kožnih promjena
	Niska = 1	Erythema multiforme
	Umjerena = 2	Ograničeni kožni vaskulitis, uključujući urtikarijalni vaskulitis ili purpura ograničena na stopala i gležnjeve, ili subkutni kožni lupus
	Visoka = 3	Difuzni kožni vaskulitis, uključujući urtikarijalni vaskulitis ili difuzna purpuru, ili ulceracije povezane s vaskulitisom
Pulmološka <i>Označiti kao "Bez aktivnosti" stabilne dugotrajne značajke povezane s oštećenjem, ili respiratornim</i>	Nema = 0	Odsutnost pulmoloških promjena
	Niska = 1	Perzistentni kašalj ili bronhijalni događaji bez radiografskih abnormalnosti ili radioloških ili HRCT dokaza intersticijske plućne bolesti bez zaduhe i s normalnom plućnom funkcijom
	Umjerena = 2	Umjereno aktivni pulmološki događaj, kao intersticijska

Domena	Aktivnost	Opis
<i>dogadajima ne vezanim za samu bolest (konzumacija duhana)</i>		plućna bolest dokazana HRCT-om sa kratkoćom udaha tijekom vježbe (NHYA II) ili patološke vrijednosti testova plućne funkcije: 70% >DL _{CO} ≥ 40% or 80%>FVC≥60%
	Visoka = 3	Teške plućne promjene, kao intersticijska plućna bolest dokazana HRCT sa skraćanjem udaha u mirovanju (NHYA III, IV) ili patološke vrijednosti testova plućne funkcije: DL _{CO} < 40% or FVC< 60%
Bubrežna <i>Označiti kao "Bez aktivnosti" stabilne dugotrajne značajke povezane s oštećenjem I bubrežnim događajima nevezanim za samu bolest. Ako je napravljena biopsija, aktivnost se određuje na temelju histoloških promjena</i>	Nema = 0	Odsutnost trenutnih bubrežnih promjena s proteinurijom< 0.5 g/d, bez hematurije, bez leukociturije, bez acidoze i bez dugotrajne stabilne proteinurije povezane s oštećenjem
	Niska = 1	Blaže bubrežno oštećenje, ograničeno na tubularnu acidozu bez bubrežnog zatajenja ili glomerularnih promjena s proteinurijom (između 0.5 i 1 g/d) i bez hematurije i bubrežnog zatajenja (GFR ≥60 ml/min)
	Umjerena = 2	Umjereno bubrežno oštećenje, kao tubularna acidoza s bubrežnim zatajenjem (GFR <60 ml/min) ili glomerularno oštećenje s proteinurijom između 1 and 1.5 g/d i bez hematurije i renalnog zatajenja (GFR ≥60 ml/min) ili histološki dokaz izvanmembranskog glomerulonefritisa ili tubulointersticijskog nefritisa
	Visoka = 3	Teško oštećenje glomerularne filtracije s proteinurijom >1.5 g/d hematurijom ili bubrežnim zatajenjem (GFR <60 ml/min), ili histološki dokaz proliferativnog glomerulonefritisa ili krioglobulinemija povezana s bubrežnim oštećenjem
Mišićna <i>Isključiti slabost zbog kortikosteroida</i>	Nema = 0	Odsutnost aktivnih mišićnih promjena
	Niska = 1	Blago aktivni miozitis dokazan patološkim EMG-om ili biopsijom bez pojave slabosti i kreatin kinaze (N <CK ≤ 2N)
	Umjerena = 2	Umjereno aktivni miozitis dokazan patološkim EMG-om ili biopsijom uz pojavu slabosti (maximal deficit of 4/5), ili

Domena	Aktivnost	Opis
		povišenom kreatinin kinazom ($2N < CK \leq 4N$),
	Visoka = 3	Visoko aktivan miozitis dokazan patološkim EMG-om ili ili biopsijom uz pojavu slabosti ($\text{deficit} \leq 3/5$) i povišena kreatinin kinaza ($>4N$)
Periferni živčani sustav (engl. <i>peripheral nervous system</i> – PNS) Označiti kao “Bez aktivnosti” stabilne dugotrajne značajke povezane s oštećenjem ili PNS poremećaj nevezan s bolešću	Nema = 0	Odsutnost aktivnih PNS promjena
	Niska = 1	Blago aktivni poremećaj perifernog živčanog sustava, kao aksonalna senzorna polineuropatija dokazana EMNG-om ili trigeminalna (V) neuralgija
	Umjerena = 2	Umjereno aktivni poremećaj perifernog živčanog sustava dokazan EMNG-om, kao aksonalna senzorno-motorna polineuropatija s maksimalnim motoričkim deficitom 4/5, senzorna neuropatija s prisutnim krioglobulinemijskim vaskulitisom, ganglionopatija sa simptomima ograničenim na na blagu do umjerenu ataksiju, upalna demijelinizacijska polineuropatija (CIDP) s umjerenim funkcionalnim oštećenjima (maksimalni motorički deficit 4/5 ili blaga ataksija) ili kranijalni živčani poremećaj perifernog podrijetla (osim trigeminalne (V) neuralgije)
	Visoka = 3	Visoko aktivan PNS poremećaj dokazan EMNG-om, kao aksonalna senzorno-motorna neuropatija s motoričkim deficitom $\leq 3/5$, periferni živčani poremećaj uslijed vaskulitisa (multipli mononeuritis, itd.), ozbiljna ataksija zbog ganglionopatije, upalne demijelinizacijska polineuropatije (CIDP) sa ozbiljnim funkcionalnim oštećenjima: motorički deficit $\leq 3/5$ ili ozbiljna ataksija
Središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i> – CNS) Označiti kao “Bez aktivnosti” stabilne dugotrajne značajke	Nema = 0	Odsutnost aktivnih CNS promjena
	Niska = 1	Umjereno aktivne CNS značajke, kranijalni ili središnji živčani poremećaj, optički neuritis ili sindrom sličan multiploj sklerozi sa simptomima ograničenim na senzorna oštećenja ili dokazana kognitivna oštećenja
	Visoka = 3	Visoko aktivne CNS značajke, kao cerebralni vaskulitis s

Domena	Aktivnost	Opis
<i>povezane s oštećenjem ili CNS poremećaj nepovezan s bolešću</i>		cerebrovaskularnim događajem ili tranzitnom ishemijskom atakom, napadajima, transverzalni mijelitis limfocitni meningitis, sindrom sličan multiploj sklerozi s motoričkim defecitima
Hematološka <i>Za anemiju, neutropeniju i trombopeniju, u razmatranje se uzima samo autoimuna citopenija, Izuzima se deficijencija željeza i citopenija izazvana lijekovima</i>	Nema = 0	Odsutnost autoimune citopenije
	Niska = 1	Citopenija autoimunog podrijetla s neutropenijom (1000 < neutrofili < 1500/mm ³), i/ili anemija (10 < hemoglobin < 12 g/dl), i/ili trombocitopenija (100,000 < trombociti < 150,000/mm ³) ili limfopenija (500 < limfociti < 1000/mm ³)
	Umjerena = 2	Citopenija autoimunog podrijetla s neutropenijom (500 ≤ neutrofili ≤ 1000/mm ³), i/ili anemija (8 ≤ hemoglobin ≤ 10 g/dl), i/ili trombocitopenija (50,000 ≤ trombociti ≤ 100,000/mm ³) ili limfopenija (≤500/mm ³)
	Visoka = 3	Citopenija autoimunog podrijetla s neutropenijom (neutrofili < 500/mm ³), ili/i anemija (hemoglobin < 8 g/dl) i/ili trombocitopenija (trombociti <50,000/mm ³)
Biološka	Nema = 0	Odsutnost bioloških značajki
	Niska = 1	Klonalna komponenta i/ili hipokomplementemija (nizak C4 ili C3 ili CH50) i/ili hipergamaglobulinemija ili visoke IgG vrijednosti između 16 and 20 g/L
	Umjerena = 2	Prisutnost krioglobulinemije i/ili hipergamaglobulinemije ili visokih IgG vrijednosti > 20 g/L, i/ili nedavno otkrivena hipogamaglobulinemija ili nedavno sniženje IgG vrijednosti (<5 g/L)

Kratice: HRCT=kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije; NHYA=New York kardiološka asocijacija; DL_{co}=difuzijski kapacitet za ugljikov monoksid; FVC= forsirani vitalni kapacitet; GFR= brzina glomerularne filtracije; EMG= elektromiografija; CK= kreatin kinaza; EMNG= elektromioneurografija; CIDP= kronična upalna demijelinizirajuća polineuropatija; C3=komponenta komplement 3; C4=komponenta komplement 4; CH50=ukupna aktivnost komplementa; IgG= imunoglobulin G;

Tablica 3. Indeks oštećenja bolesti u Sjögren-ovom sindromu (SSDDI)

Oštećenja usne šupljine/slinovnica	Bodovi
Sijalometrija < 1.5 ml/15 min	1
Gubitak zubi	1
Okularna oštećenja	
Schirmer-ov test < 5 mm u 5 min	1
Ulceracija rožnice, katarakta, kronični blefaritis	1
Neurološka oštećenja	
Promjene u središnjem živčanom sustavu	2
Periferna neuropatija	1
Pleuropulmološka oštećenja	
Pleuralna ili intersticijska fibroza ili funkcionalno oštećenje	2
Bubrežna oštećenja	
bilo što od: povećane razine serumskog kreatinina, smanjena glomerularna filtracija, tubularna acidoza, nefrokalcinoza	2
Limfoproliferativne bolesti	
bilo što od: limfom B stanica, multipli mjelom, Waldenströmova makroglobulinemija	5

* trebalo bi biti ≤ 5 mm po Američko-Europskim kriterijima

1.7. Ateroskleroza

Ateroskleroza je kronična upalna, fibroproliferativna bolest velikih i srednjih arterija koju pokreću lipidi. Osnovni patološki proces u aterosklerozi je taloženje lipida u stijenci arterije uz proliferaciju glatkih mišićnih stanica i fibroznog matriksa. Napredovanje procesa dovodi do stvaranja aterosklerotskog plaka. Ruptura nestabilnog aterosklerotskog plaka i

agregacija trombocita uzrokuje stenozu ili okluziju krvnih žila, što dovodi do akutne kardiovaskularne bolesti [57,58].

Posljednjih desetljeća ateroskleroza se smatra kroničnom upalnom bolešću [59] jer upala igra važnu ulogu u svim fazama aterosklerotskog procesa [60]. Ateroskleroza može zahvatiti sve velike i srednje velike arterije, uključujući koronarne, karotidne i cerebralne arterije te glavne arterije ekstremiteta. Vodeći je uzrok morbiditeta i mortaliteta u većini razvijenih zemalja. Smrtnost u starijoj životnoj dobi koja se može pripisati aterosklerozi je u padu. No, unatoč tome u 2019. godini kardiovaskularne bolesti, prvenstveno koronarna i cerebrovaskularna bolest su uzrokovale oko 18 milijuna smrti diljem svijeta (> 30% svih smrti) [61]. Prevalencija ateroskleroze brzo raste u zemljama s niskim i srednjim prihodima. Na porast arterioskleroze, uz čimbenike kao što su pušenje, hipertenzija i dijabetes utječe i produženje životnog vijeka. Dakle, može se reći da je ateroskleroza još uvijek vodeći uzrok smrti u svijetu [62].

Među mnogim čimbenicima kardiovaskularnog rizika, povišena razina kolesterola u plazmi je dovoljna da potakne razvoj ateroskleroze, čak i u odsutnosti drugih poznatih čimbenika rizika. Čini se da drugi čimbenici rizika, kao što su hipertenzija, dijabetes, pušenje, muški spol i upalni parametri (npr. C reaktivni protein, citokini) ubrzavaju bolest potaknutu aterogenim lipoproteinima. Najvažniji lipoprotein u tom procesu je lipoprotein niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein* - LDL). Mehanizam djelovanja aterogenih lipoproteina nije potpuno jasan. Moguće je da povećavaju aterogenost LDL-a (npr. veličinu čestica, broj i sastav) ili povećavaju osjetljivost arterijske stijenke (npr. propusnost, glikaciju, upalu). No, važnost drugih čimbenika rizika, osim kolesterola, jasno je dokumentirana velikim razlikama u izraženosti bolesti među pojedincima s istom razinom kolesterola [63].

Ranije spomenuti čimbenici rizika ateroskleroze (dislipidemija, dijabetes, pušenje cigareta, hipertenzija) te uzročnici oksidativnog stresa (superoksidni radikali), angiotenzin II te sistemska upala inhibiraju proizvodnju dušikovog oksida (engl. *nitric oxide* - NO) i stimuliraju proizvodnju adhezijskih molekula, proupalnih citokina, kemotaktičkih proteina i vazokonstriktora. Konačni učinak je endotelno vezanje monocita i T stanica, migracija tih stanica u subendotelni prostor te započinjanje i održavanje lokalnog vaskularnog upalnog odgovora [64].

Monociti u subendotelu pretvaraju se u makrofage. Lipidi u krvi, osobito LDL kolesterol i kolesterol lipoproteina vrlo niske gustoće (engl. *very low density lipoprotein* - VLDL), također se vežu za endotelne stanice i oksidiraju se u subendotelu. Unos oksidiranih lipida i transformacija makrofaga u pjenaste stanice prepune lipida rezultiraju tipičnim ranim aterosklerotskim lezijama koje se nazivaju masne pruge. Raspadnute membrane eritrocita koje su rezultat rupture vasa vasorum i krvarenja unutar plaka mogu biti važan dodatni izvor lipida [65]. Makrofazi stvaraju proupalne citokine koji potiču migraciju glatkih mišićnih stanica iz medije. Nastali citokini dalje privlače i stimuliraju rast makrofaga. Razni čimbenici potiču umnažanje glatkih mišićnih stanica i povećanje stvaranja gustog izvanstaničnog matriksa. Rezultat je subendotelni plak s fibroznom kapom, građen od glatkih mišićnih stanica okruženih vezivnim tkivom te unutarstaničnim i izvanstaničnim lipidima. Proces sličan stvaranju kosti uzrokuje kalcifikaciju unutar plaka [66]. Vaskularna kalcifikacija obilježena je taloženjem minerala hidroksiapatita u obliku kalcij-fosfatnih kompleksa u arterijama. Transdiferencijacija između vaskularnih glatkih mišićnih stanica i stanica sličnih osteoblastima smatra se bitnom u nastanku i napredovanju ateroskleroze [67].

Disfunkcija endotelnih stanica arterija je najranija promjena u procesu ateroskleroze [68]. Nedostatak endotelne proizvodnje NO ili njegove bioraspoloživosti, kako u ljudi tako i u životinja, može prethoditi stvaranju klinički značajnih aterosklerotskih lezija [69]. Kako bi sintetizirale NO, endotelne stanice metaboliziraju L-arginin pomoću endotelne izoforme sintaze dušikovog oksida (engl. *endothelial nitric oxide synthase* - eNOS) [70, 71]. Bazalna razina stvaranja NO od strane endotelnih stanica doprinosi regulaciji vazomotornog tonusa i očuvanju netrombogene uloge vaskularne ovojnice. Sintezu NO stimuliraju receptorski ovisni agonisti acetilkolin i bradikinin, receptorski neovisni agonisti poput kalcijevih ionofora, kao i različite promjene u krvotoku [72]. Posebno značajno za vaskularnu homeostazu je djelovanje NO na glatke mišićne stanice, trombocite i leukocite [68]. Klinički značaj NO kod aterosklerozom uzrokovane kardiovaskularne bolesti prvi su pokazali Ludmer i suradnici koristeći koronarnu angiografiju [73].

1.8. Adropin

Godine 2008. Kumar i sur. identificirali su novi peptid nazvan adropin [74] koji se sastoji od 43 aminokiseline, a nastaje proteolitičkim cijepanjem prekursora od 76 aminokiselina. Naime, aminokiselinska sekvenca adropina visoko je očuvana među vrstama te je identična u štakora, miša, čovjeka i svinje [74]. Adropin je kodiran genom povezanim s energetsom homeostazom (engl. *energy homeostasis-associated gene* - ENHO), koji se uglavnom eksprimira u mozgu i jetri. Međutim, nalazi se i u perifernim tkivima kao što su srce, pluća, medula bubrega, mišići, mononuklearne stanice periferne krvi i stanice karcinoma dojke [74-76]. Nadalje, adropin je prisutan u cirkulacijskom sustavu životinja i ljudi [74,77].

Osim dobro utvrđene uloge adropina u metaboličkoj regulaciji, osobito učinka na metabolizam glukoze i inzulinsku osjetljivost u srcu, jetri i skeletnim mišićima, podaci pokazuju da adropin ima važan utjecaj na kardiovaskularne procese [75-79]. Naime, pokazalo se da stimulacija putova posredovanih adropinom poboljšava endotelnu funkciju i smanjuje upalu, čime se ublažavaju njezini štetni učinci. Unatoč tome, još smo daleko od implementacije adropina u rutinsku kliničku praksu, posebice u smislu terapije, budući da je terapijska uloga peptidnih hormona ograničena njihovim farmakokinetičkim svojstvima [80].

Na razine adropina u serumu utječe prehrana te ovise o prisutnosti metaboličke bolesti. Miševima koji su hranjeni hranom bogatom mastima tijekom 48 sati razine adropina u serumu su bile povišene [81]. Nasuprot tome, u miševa s pretilošću izazvanom prehranom s visokim udjelom masti, razine adropina u serumu su niske (<1 ng/mL). Negativna korelacija između razine adropina i indeksa tjelesne mase (ITM) također je potvrđena u studijama na ljudima [82-86], što upućuje da je niska razina adropina znak pretilosti.

Štoviše, čini se da adropin sudjeluje u održavanju energetske homeostaze i inzulinskog odgovora te je usko povezan s razvojem i progresijom aterogeneze [74]. Niže razine adropina dovode do oštećenja i disfunkcije endotela [87]. Dakle, smanjene razine adropina u serumu slabe endotelnu zaštitu i mogu potaknuti ili ubrzati aterosklerozu [88-90] zbog utjecaja na homeostazu lipida. U bolesnika na hemodijalizi je utvrđeno da adropin ima negativnu korelaciju s trigliceridima (engl. *triglycerides* – TG), LDL-om i totalnim kolesterolom (engl. *total cholesterol* - TC), dok ima značajnu pozitivnu korelaciju s lipoproteinom visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein* – HDL) tj. HDL kolesterolom [91]. Negativna korelacija između LDL-a i adropina utvrđena je u studiji Ghoshal i sur. koja je pokazala da niske razine

adropina mogu biti koristan biomarker za prepoznavanje pretelih bolesnika s povišenim LDL-om [92]. Spomenuta veza lipida i adropina otkrivena je u još nekoliko istraživanja [93,81]. Adropin modulira metabolizam lipida reguliranjem ekspresije jetrenih lipogenih gena i receptora za aktivator proliferacije peroksisoma tip gama (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* - PPAR γ), glavnog regulatora lipogeneze. Stoga bi primjena adropina mogla postati nova linija terapije protiv bolesti povezanih s poremećajem metabolizma glukoze i lipida [94]. Naime, studija na životinjama koju su proveli Akcilar i sur. pokazala da je intraperitonealna primjena niske doze adropina štakorima s hiperlipidemijom je bila iznimno učinkovita u smanjenju razina serumskih TG, TC i LDL kolesterola te povećanju razine HDL kolesterola [95].

Endotel ima središnju ulogu u održavanju vaskularne homeostaze, a oštećenje endotelne funkcije pridonosi razvoju i napredovanju različitih poremećaja. Najznačajniji poremećaji su oni u kardiovaskularnom sustavu te započinju s oštećenjem stanica endotela i razvojem ateroskleroze [96]. NO je najbitniji faktor za održavanje vaskularne homeostaze, a nastaje u endotelnim stanicama za vrijeme pretvorbe L-arginina u L-citrulin uz pomoć eNOS-a. [97]. NO difuzijom ulazi u vaskularne mišićne glatke stanice (engl. *vascular smooth muscle cells* – VSMC) te unutarstaničnim procesima uzrokuje relaksaciju VSMC [98]. Dodatno, NO sprječava migraciju i adheziju leukocita, proliferaciju glatkih mišićnih stanica, adheziju i agregaciju trombocita, te se suprotstavlja apoptozi i upali s ukupnim antiaterogenim učinkom [99]. Bioraspoloživost eNOS-a najvažniji je predstavnik endotelne funkcije. Reguliran je s najmanje tri različita mehanizma: transkripcijskom regulacijom eNOS-a, posttranskripcijskom aktivacijom eNOS-a i smanjenjem razgradnje NO posredovane reaktivnim vrstama kisika (engl. *reactive oxygen species* – ROS) [100].

Prvu studiju koja se bavila ulogom adropina u mogućoj zaštiti endotela proveli su Lovren i sur. [87]. Autori su pretpostavili da bi adropin mogao imati protektivnu ulogu u kardiometaboličkim bolestima. Njihovi rezultati impliciraju da adropin utječe na endotelnu sintezu NO posttranskripcijskom stimulacijom eNOS-a preko dva različita puta – preko fosfoinozimid-3-kinaza-protein kinaza B (engl. *phosphoinositide-3-kinase-protein kinase B* - PI3K-Akt) i kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase* - ERK1/2). Ova dva puta aktiviraju se s istim regulatorom, adropinskim receptorom - receptor faktora rasta vaskularnog endotela tipa 2 (engl. *vascular endothelial growth factor receptor type 2* - VEGFR2). Osim toga, adropin također može uključiti nekoliko putova

neovisnih o NO, pridonoseći regulaciji funkcije endotela putem VEGFR2-PI3K-Akt sustava. Lovren i sur. pokazali su da adropin potiče endotelne funkcije kao što su proliferacija, migracija, formiranje kapilarnih cjevčica, smanjena propusnost i apoptoza, kao i poboljšani angiogenetski potencijal [87]. Nadalje, autori su pokazali da adropin smanjuje upalni odgovor endotelnih stanica i makrofaga porijeklom iz monocita te smanjuje adheziju endotelnih stanica. Konačno, pokazali su da adropin potiskuje proliferaciju VSMC i povećava ekspresiju fibronektina i elastina u VSMC regulacijom PI3K-Akt puta, modulirajući tako stabilnost plaka i vaskularnu elastičnost. U in vivo dijelu gore navedene studije, autori su pokazali da je infuzija adropina značajno smanjila razvoj aterosklerotskih lezija u Apoe^{-/-} (engl. *atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient*) miševa [87]. Apoe^{-/-} miševi su miševi koji imaju slab klirens lipoproteina s naknadnim nakupljanjem čestica obogaćenih esterima kolesterola u krvi, što potiče razvoj aterosklerotskih plakova [87]. Rezultati nedavnog istraživanja pokazuju pokazali da adropin ublažava vaskularnu kalcifikaciju in vivo. Adropin je također inhibirao osteogenu diferencijaciju i kalcifikaciju VSMC in vitro. Lentivirusna transfekcija i mala interferirajuća RNA korištene su za prekomjernu ekspresiju adropina [67].

Klinički aspekt uloge adropina u endotelnoj disfunkciji također se istražuje posljednjih godina. S obzirom na učinke adropina na metabolizam NO, bila je upitna njegova uloga u regulaciji krvnog tlaka. Neki autori su utvrdili niže razine adropina u bolesnika s arterijskom hipertenzijom u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika koji su bili normotenzivni [101,102]. Gu i sur su pokazali da adropin može biti neovisni prediktor hipertenzije, a također negativno korelira s krvnim tlakom te utječe na njega štiteći endotelnu funkciju [101]. Nasuprot tome, Celik i sur. su pokazali da hipertenzivni bolesnici imaju visoke razine adropina [103]. Nadalje, liječenje hipertenzivnih bolesnika s antihipertenzivima kao što su valsartan i amlodipin dovodi do povećanja razine adropina u serumu [103]. Utvrđena je značajna negativna korelacija između razine adropina i predijaliznog sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka u bolesnika na kroničnoj hemodijalizi [91].

Sato i sur. proveli su studiju gdje je adropin, primjenjen subkutanom intraperitonejskom infuzijom u dozama od 5 do 10 µg/kg/h, pokazao je značajne učinke na krvni tlak u Apoe^{-/-} miševa [104]. Infuzija adropina od 5 µg/kg/h nije značajno spriječila povećanje aterosklerotske lezije aorte i promjenu veličine aterosklerotskog plaka u navedenoj studiji. Međutim infuzija adropina od 10 µg/kg/h značajno je smanjila područje aterosklerotične lezije aorte s tendencija smanjenja veličine plaka. Infuzija adropina od 10

$\mu\text{g/kg/h}$ značajno je smanjila i sadržaj monocita-makrofaga te VSMC unutar plaka. Zapravo, studija je pokazala da adropin ima višestruke učinke na najvažnije vaskularne stanice koje sudjeluju u patogenezi ateroskleroze (endotelne stanice, makrofage i VSMC). Isto tako, Sato i sur. su prvi pokazali da adropin suzbija aterosklerozu neovisno o metabolizmu glukoze i lipida te krvnom tlaku [104].

Fujie i sur. su potvrdili povezanost razina adropina s povišenim razinama nitrita/nitrata u krvi te smanjenom krutošću arterija. Pokazali su da aerobni trening povećava razine adropina i nitrita/nitrata što posljedično snižava krutost arterija. Povećanje serumskih razina adropina uslijed aerobnog treninga najvjerojatnije dovodi do smanjenja arterijske krutosti posredovane NO biodostupnošću. Stoga je moguće da adropin potiče smanjenje arterijske krutosti preko NO-ovisne signalizacije. [105]. U skladu s ovim podacima, tjelesna vježba regulira cirkulirajući adropin u ljudi, što je popraćeno poboljšanom funkcijom endotela krvnih žila [106].

Uloga adropina u autoimunim bolestima je popuno neistražena. Yolbas i sur. nisu pokazali značajnu razliku u razinama adropina u serumu bolesnika s RA i SLE i zdravih kontrola. Ekspresija gena ENHO bila je značajno veća u bolesnika s RA u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom, no to nije bilo praćeno povišenim razinama adropina u serumu [107]. S druge strane, povećana razina adropina u serumu nađena je u kohorti bolesnika sa SSc i Behcetovom bolešću (engl. *Behcet's disease* - BD) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Povećanje razine adropina u SSc i BD bi se moglo objasniti upalnim procesima na krvnim žilama koji su sastavni dio ovih bolesti [76, 95]. Za razliku od Yolbas-a i sur., studija Šimac i sur. je našla niže razine adropina u bolesnika s uznapredovalim RA [108].

Ukratko, na temelju dosadašnjih istraživanja se može pretpostaviti da su razine adropina u krvožilnom sustavu smanjene u bolesnika s kardiovaskularnim bolestima te da bi mogle biti prediktori kasnih komplikacija povezanih s kardiovaskularnim bolestima [109]. Dakle, adropin je važan čuvar vaskularnog zdravlja i budući da razine adropina u plazmi koreliraju s indeksima endotelne disfunkcije mogao bi poslužiti kao koristan biomarker kardiovaskularne patologije u nadolazećoj budućnosti [110]. Ulogu adropina u autoimunim bolestima je potrebno još istražiti.

1.9. Homocistein

Homocistein je neesencijalna aminokiselina koja nastaje biosintezom i metabolizmom metionina (engl. *methionine* - Met). Unutar Met metaboličkog puta, homocistein se može nepovratno razgraditi u cistein (engl. *cysteine* - Cys) putem transsulfuracije ili ponovno metilirati natrag u Met. Homocistein je izuzetno važan za homeostazu stanice, iako je njegova fiziološka aktivnost ključna za Met koji igra vitalnu ulogu za održivost stanice [111].

Hiperhomocisteinemija se smatra biomarkerom za nekoliko patoloških poremećaja u kojima se visoke razine homocisteina u plazmi mogu jednostavno pratiti testiranjem krvi [112]. Fiziološke razine homocisteina se kreću između 5 i 15 $\mu\text{mol/l}$, dok se hiperhomocisteinemija smatra blagom kada su vrijednosti u rasponu od 15 do 30 $\mu\text{mol/l}$, umjerenom za vrijednosti između 30 i 100 $\mu\text{mol/l}$ i teškom za vrijednosti veće od 100 $\mu\text{mol/l}$ [113]. Trajno povišeni homocistein potiče stvaranje aterosklerotskih plakova, aterotrombotičkih događaja usljed endotelne disfunkcije. Također dijeluje prouplano i pokazuje tzv. trombofilni profil [112]. Uz tradicionalne čimbenike rizika, prepoznata je uloga homocisteina u procesu aterogeneze. Stoga su se Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization* - WHO) i Ministarstvo zdravstva odlučili razmotriti homocistein kao značajni rizik kardiovaskularnih bolesti [114].

Homocistein doprinosi razvoju kardiovaskularnih bolesti inducirajući endotelnu disfunkciju smanjenjem NO, najsnažnijeg vazodilatatora kojeg proizvodi endotel, te oksidativnim stresom uslijed povećanog stvaranja ROS-a [112,115]. Osim toga, homocistein mijenja metabolizam lipida pokretanjem procesa oksidativne razgradnje lipida endotelne membrane, što dovodi do gubitka funkcije staničnih membrana [116]. Homocistein inhibira proizvodnju NO na dva načina, inhibicijom razine ekspresije eNOS-a podržavajući prekomjernu ekspresiju caveolina-1 koji veže i inaktivira eNOS [117,118] ili smanjenjem kationskog transportera aminokiselina koji arginin čini dostupnim za sintezu NO putem eNOS-a [119]. Homocistein može potaknuti progresiju ateroskleroze povećanjem ekspresije kemokina i adhezijskih molekula koje induciraju nakupljanje cirkulirajućih upalnih krvnih stanica što u konačnici dovodi do endotelne disfunkcije. Nadalje, pokazalo se da je visoka cirkulirajuća koncentracija homocisteina u endotelu odgovorna za povećanu proliferaciju glatkih mišićnih stanica koje, zajedno s promjenom normalne funkcije trombocita, mogu doprinijeti početku stvaranja aterosklerotskog plaka [115]. Štoviše, čini se da homocistein

pogoduje proliferaciji i aktivaciji monocita što dovodi do veće proizvodnje upalnih citokina [120].

Mnoge novije studije poduprle su teoriju o korelaciji između povišenih razina homocisteina i visokog krvnog tlaka, oba neovisna čimbenika rizika za kardiovaskularne bolesti [121,122].

Pokazalo se da su povišene razine homocisteina umjereno jak i neovisan čimbenik kardiovaskularnog rizika u zdravoj populaciji. Također su se pokazale kao faktor rizika za arterijsku hipertenziju [123].

Reumatske bolesti često su povezane s visokom prevalencijom koronarnih događaja [124]. Štoviše, bolesnici s RA i SLE razvijaju preuranjenu aterosklerozu i imaju povećanu smrtnost [125].

Sabio i sur. pokazali su da je homocistein neovisno povezan sa SBP-om i hipertenzijom u žena sa SLE-om, ali ne i u kontrolnoj skupini. Povišene razine homocisteina mogu povećati rizik za arterijsku hipertenziju u SLE-u, a također je utvrđeno da su nezavisni čimbenici rizika za progresiju ateroskleroze [123]. Studija provedena na bolesnicima s RA također je pronašla povezanost arterijske hipertenzije s povišenim koncentracijama homocistein [126].

Pokazano je da bolesnici s RA imaju značajno veće vrijednosti homocisteina u odnosu na kontrolnu skupinu [127], dok je objavljeno da bolesnici sa SLE imaju prevalenciju infarkta miokarda u rasponu od 4 do 45% ovisno o vrijednostima njihovog homocisteina. Što je homocistein veći, postotak infarkta miokarda u ovih bolesnika raste [128]. Dakle, homocistein se pokazao faktorom rizika za kardiovaskularne bolesti u bolesnika s RA i SLE. Kao što je prije pokazano, povećanje razine homocisteina ima izravno toksično djelovanje na endotelne stanice i potiče oksidaciju LDL te ima protrombotičke učinke [128].

1.10. Debljina intime-medije karotidnih arterija

Postoje mnoge metode za praćenje i mjerenje ateroskleroze i subkliničke ateroskleroze. Po preporuci Američkog udruženja za srce (engl. *American Heart Association*

– AHA), ne-invazivna metoda kojima subklinička ateroskleroza može biti potvrđena i praćena je ultrazvuk karotidnih arterija na nekoliko razina kroz dva bitna parametra, debljina intime-medije karotidne arterije (engl. *carotide intima-media thickness* – CIMT) i postojanje plakova [129].

Doppler karotidnih arterija je neinvazivna tehnika koja koristi ultrazvuk u procjeni prohodnosti karotidne arterije. Debljina intime-medije karotidne arterije je indikator kardiovaskularnog rizika i odlična mjera za praćenje vaskularnog oštećenja [130], te se koristi kao surogat marker za aterosklerozu [131].

Ultrasonografijom se može odrediti zajednička debljina arterijskog intimalnog i medijalnog sloja, koja se obično mjeri u zajedničkoj karotidnoj arteriji [132]. Debljina karotidne intime-medije odražava difuzno zadebljanje sloja intime koje se vidi kod ateroskleroze i potvrđena je kao mjera rizika za kardiovaskularne događaje [133] i opterećenje aterosklerotskom bolešću [134].

CIMT je valjani surogat marker vaskularne bolesti u populaciji bolesnika ali i u općoj populaciji. Povećani CIMT predviđa morbiditet i rizik smrtnosti od vaskularne bolesti [135].

Belibou i sur. dobili su rezultate koji podržavaju vrijednosti CIMT-a i postojanje karotidnog plaka kao surogat biomarkere ateroskleroze u žena sa SLE-om. Ultrazvuk karotida pokazao je zadebljanje intime-medije u više od polovice žena (51,4%), a karotidni plakovi zabilježeni su u 31,4% bolesnica sa SLE-om [129]. Više studija istraživalo je subkliničku aterosklerozu i u bolesnika s pSS-om mjerenjem vrijednosti CIMT-a. Vaudo i sur. bili su prvi koji su proučavali subkliničko kardiovaskularno oštećenje organa u pSS-u. Više od polovice bolesnica imalo je zadebljanje intime-medije karotide. Pacijentice sa zadebljanjem intime-medije karotide su imale povećanu vrijednost cirkulirajućih anti SSA antitijela, a multivarijantna analiza rezultata je pokazala da su anti SSA antitijela neovisni prediktori zadebljanja karotidne arterije [136]. Još su dvije studije pokušale dokazati subkliničku aterosklerozu u bolesnika s pSS-om mjerenjem debljine intime-medije karotidne arterije ali poveznicu nisu uspjeli dobiti [137, 138]. Nadalje, Zaradi i sur. proveli su *duplex doppler* sonografsku studiju karotida kako bi se procijenila debljina intime-medije. Nije pronađena značajna razlika u CIMT-u između pSS-a i kontrolne skupine. Nedostatak značajne razlike u subkliničkoj aterosklerozi između starijih bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine ispitanika, ukazuje na to da tradicionalni kardiovaskularni čimbenici rizika, imunološke promjene i

kronična upala ne utječu na napredovanje vaskularnog oštećenja u karotidnoj cirkulaciji bolesnika s medijanom trajanja bolesti od 6,5 godine [138]. Potom je 2015. godine Gavrani i sur. pokazao da 2/3 bolesnika s pSS-om imaju zadebljanje intime-medije karotide te je pSS sam po sebi identificiran kao nezavisni faktor rizika za zadebljanje arterijskog zida [139].

U općoj populaciji prijavljena je slaba povezanost ili odsutnost veze između vrijednosti homocisteina i CIMT-a [131, 140-142]. Međutim, općenito je nedovoljno dokaza o vezi između homocisteina i debljine intime-medie karotidne arterije, a kao takvi uopće ne postoje u bolesnika s pSS-om [139].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi serumske vrijednosti adropina u bolesnika s pSS-om i kontrolnoj skupini ispitanika
2. Utvrditi serumske vrijednosti homocisteina te promjene CIMT-a u oboljelih od pSS-a u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika

Sporedni ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi povezanost razine adropina s anti SSA/Ro i anti SSB/La proutijelima
2. Utvrditi povezanost adropina s aktivnošću bolesti mjerenom ESSDAI upitnikom i s kroničnim oštećenjem mjerenim s SSDDI upitnikom u oboljelih od pSS-a
3. Utvrditi povezanost homocisteina i CIMT-a
4. Utvrditi povezanost homocisteina i CIMT-a s anti SSA/Ro i anti SSB/La proutijelima
5. Utvrditi povezanost homocisteina i CIMT-a s aktivnošću bolesti mjerenom ESSDAI upitnikom i s kroničnim oštećenjem mjerenim s SSDDI upitnikom u oboljelih od pSS-a

Hipoteze:

1. Serumske razine adropina i homocisteina te promjene CIMT-a u bolesnika s pSS-om se značajno razlikuju u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika
2. Promjene CIMT-a u bolesnika s pSS-om su značajno veće u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika
3. Serumske razine adropina su pozitivno povezani s anti SSA/Ro i anti SSB/La proutijelima
serumske razine adropina su negativno povezane sa zbrojem ESSDAI i SSDDI upitnika
4. Serumske razine homocisteina i CIMT su pozitivno povezane sa zbrojem ESSDAI i SSDDI upitnika
5. Serumske razine homocisteina te CIMT su negativno povezane s anti SSA/Ro i anti SSB/La proutijelima
6. Serumske razine homocisteina su pozitivno povezane sa CIMT-om

Ustroj istraživanja:

Ovo istraživanje je po pristupu kliničko, po razini i namjeni primjenjeno, po načinu dobivanja podataka opservacijsko, a po specifičnom ustroju presječno korelacijsko.

Glavni ishodi istraživanja:

1. Razlike u serumskim razinama adropina u bolesnika s pSS i kontrolnom skupinom izražene u mjernoj jedinici ng/ml,
2. Razlike u serumskim razinama homocisteina izražene u mjernoj jedinici $\mu\text{mol/L}$ t
3. CIMT-a u bolesnika s pSS-om i kontrolnoj skupini izražena u mm.

Sporedni ishodi istraživanja:

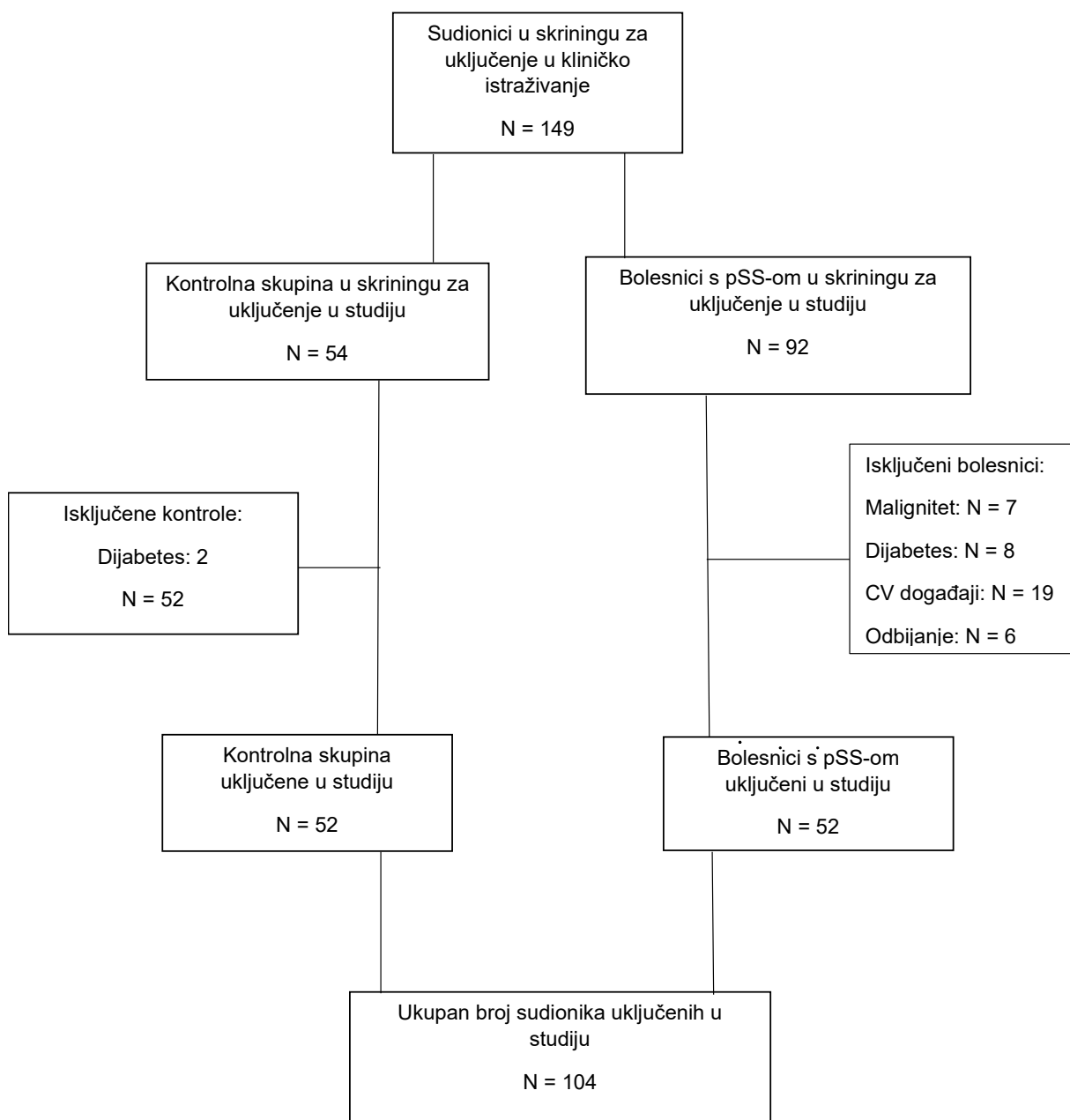
1. Povezanost adropina s HDL-om (izražen u mmol/L)
2. Povezanost adropina s anti SSA/Ro i anti SSB/La protutijelima (izražene u jedinici AU/ml)
3. Povezanost adropina s vrijednošću SSDDI upitnika (izraženi zbrojem bodova u upitniku)
4. Povezanost homocisteina s TG i CIMT-om
5. Povezanost CIMTA-a s anti SSA/Ro i anti SSB/La protutijelima (izražene u jedinici AU/ml)
6. Povezanost CIMT-a s vrijednošću SSDDI upitnika (izraženi zbrojem bodova u upitniku)

3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

3.1. Ispitanici

Istraživanje serumskih razina adropina provedeno je na 52 bolesnika s pSS-om koji su kontrolirani i liječeni na Zavodu za reumatologiju i kliničku imunologiju KBC Split, od siječnja 2018. do veljače 2019. godine. Svi bolesnici ispunjavaju kriterije Američko-europske konsenzus grupe za klasifikaciju pSS [33]. Kriteriji za uključivanje bolesnika u istraživanje bila je dob iznad 18 godina i trajanje bolesti duže od godinu dana. Kriteriji za isključenje bili su prisutnost drugih upalnih reumatskih bolesti (RA, SLE, SSc, vaskulitis), esencijalna mješovita krioglobulinemija, IgG4 sindrom, šećerna bolest, kronično zatajenje bubrega, zloćudni tumori hematopoeze ili kardiovaskularne bolesti (akutni infarkt miokarda, angina pectoris, moždani udar ili periferna arterijska bolest). Kontrolna skupina je uključivala 52 ispitanika koji su po spolu, dobi, pušenju i indeksu tjelesne mase bili podudarni s pSS bolesnicima (Slika 2).

Iz daljnjeg istraživanja isključena su 4 bolesnika s pSS-om i 6 kontrolnih ispitanika jer nisu imali nalaze ultrazvuka. Stoga je u istraživanju serumskih razina homocisteina i promjena CIMT-a bilo uključeno 48 bolesnika s pSS-om. Kriteriji uključivanja i isključenja bili su identični kao u istraživanju s adropinom. Kontrolna skupina je uključivala 46 ispitanika koji su po spolu, dobi, pušenju i ITM bili podudarni s bolesnicima s pSS-om.



Slika 2. Hodogram dizajna kliničkog istraživanja

3.2. Postupci

3.2.1. Klinički i laboratorijski nalazi

Sudionici su ispitani pomoću standardiziranog kliničkog intervjua. Zabilježeni su sociodemografski, antropometrijski i klinički podaci; tradicionalni čimbenici KV rizika; komorbiditeti i trenutni lijekovi. Klinički podaci bolesnika kao trajanje bolesti, Schirmerov test, scintigram slinovnica i nalazi biopsije dobiveni su iz medicinske dokumentacije i elektroničkog kartona pacijenata. Nakon detaljnog fizičkog pregleda, uzeti su uzorci krvi. Uzorci krvi za biokemijske i imunološke pretrage su uzimani natašte, a analizirao ih je iskusni medicinski biokemičar koji nije bio upoznat s kliničkim podacima ispitanika prema standardnoj laboratorijskoj praksi od strane središnjeg laboratorija našeg centra. Analizirani su standardni laboratorijski parametri, komponente komplementa i adropin bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine. Autoantitijela su određena samo u bolesnika s pSS-om.

Uzorci za analizu razine adropina u serumu centrifugirani su i pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, dok su hematološki i biokemijski parametri bili analizirani istog dana standardnim laboratorijskim postupcima. Razine adropina u serumu utvrđene su korištenjem dvostruke enzimske imunoanalize (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) (marka uređaja: Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, SAD) prema uputama proizvođača. Kalibracije su dvostruko izmjerene, a vrijednosti optičke gustoće (OD) bile su u skladu s unaprijed definiranim vrijednostima OD navedenim u uputama proizvođača, a koeficijent varijabilnosti uparenih kalibracija bio je $<15\%$. Linearni raspon testa iznosio je $0,3\text{-}8,2\text{ ng/mL}$, a osjetljivost $0,3\text{ ng/mL}$, dok je koeficijent varijabilnosti unutar sonde bio manji od 10%

Uzorci krvi za mjerenje homocisteina stavljeni su na led nakon prikupljanja i prije centrifugiranja kako bi se smanjilo potencijalno povećanje razine homocisteina prouzročeno sintezom crvenih krvnih stanica. Nakon centrifugiranja uzorci seruma su odvojeni od stanica prijenosom u sekundarne epruvete prije analize. Koncentracija homocisteina u serumu mjerena je kemiluminiscentnim imunotestom mikročestica (engl. *chemiluminescence microparticle immunoassay* - CMIA) na analizatoru Architect (Abbott Laboratories, Chicago, IL, SAD). U ovoj kompetitivnoj CMIA metodi vezani ili dimerizirani homocistein (oksidirani oblik) se reducira u slobodni homocistein i pretvara u S-adenozil-L-homocistein (engl. *S-Adenosyl-L-homocysteine* - SAH). SAH se natječe s akridinijem obilježenim S-adenozil cisteinom iz reagensa za monoklonska detekcijska protutijela vezana na čestice. Nakon

ispiranja i odvajanja, započinje kemiluminiscentna reakcija i konačni signal se mjeri u relativnim svjetlosnim jedinicama.

Antinuklearna protutijela (ANA) detektirana su neizravnom imunofluorescencijom test na supstratu stanica HEp-2 (Inova Diagnostics, San Diego, CA, SAD). Rezultati ANA IFA su navedene s titrom i uzorkom fluorescencije. Titar za pozitivne rezultate bio je postavljen na 1:160, a titar 1:80 je definiran kao granično pozitivan. Specifična antitijela uključujući anti SSA/Ro60, anti SSA/Ro52 i anti SSB/La su mjerena pomoću testa Fidis Connective Profile 14 (Theradiag, Marne-la-Vallée, Francuska) na Luminex analizatoru 100/200. Ovaj polukvantitativni adresabilni imunološki test s laserskim kuglicama omogućuje istovremeno otkrivanje 14 različitih ANA specifičnih protutijela s razlikom između anti SSA/Ro60 i anti SSA/Ro52 antitijela. ANA i anti SSA/Ro 60, anti SSA/Ro 52, i anti SSB/La analizirani su samo u bolesnika s pSS-om. Ostali biokemijski parametri bili su analizirati prema standardnim laboratorijskim postupcima.

3.2.2. Definicija kardiovaskularnog rizika

Krvni tlak (*engl. blood pressure* - BP) mjeren je dva puta, u razmaku od 5 minuta, na dominantnoj ruci, u sjedećem položaju ispitanika nakon najmanje 5 minuta odmora, a srednja vrijednost je izračunata kako bi se postigla preciznija vrijednost. BP je mjerio isti liječnik s validiranim automatskim oscilometrijskim uređajem (Rudolf Riester GmbH, Jungingen, Njemačka). Hipertenzija je definirana kao sistolički tlak (*engl. systolic blood pressure* - SBP) ≥ 140 mm Hg, dijastolički tlak (*engl. diastolic blood pressure* - DBP) ≥ 90 mm Hg, ili normalne vrijednosti krvnog tlaka u bolesnika koji se liječe antihipertenzivima. Hiperkolesterolemija je definirana kao TC $> 5,0$ mmol/L ili primjena statina, dok TG $> 1,7$ mmol/L ukazuju na hipertrigliceridemiju. Tjelesna visina i težina bile su određene pomoću medicinske vage s ugrađenim visinama (Seca, Birmingham, UK). Indeks tjelesne mase izračunat je po formuli = tjelesna masa/visina² (kg/m²). Pretilost je bila definirana kao ITM ≥ 30 kg/m². Sudionici su se smatrali pušačima ako su tijekom godine prije uključivanja u studiju pušili barem jednu cigaretu dnevno. Niska tjelesna aktivnost definirana je kao izostanak aktivnosti od najmanje 45 minuta umjerenom intenzivne aerobne tjelesne vježbe manje od 3 dana tjedano. Menopauza je definirana izostankom menstruacije više od godinu dana. Framinghamov rezultat rizika (*engl. Framingham risk score* - FRS) izveden je za svakog ispitanika primjenom rodno specifične formule predviđanja koje su predložili Wilson i

sur. na temelju konvencionalnih kardiovaskularnih čimbenika rizika (dob, TC i HDL kolesterol krvni tlak, dijabetes i pušački status) [143]. Za ovu studiju, automatski je izračunat pomoću kalkulatora s web stranice: <https://www.mdcalc.com/framingham-risk-score-hard-coronary-heart-disease> (pristupljeno 26. svibnja 2018.).

3.2.3. Procjena aktivnosti bolesti i oštećenja u pSS-u

Aktivnost pSS mjerena je pomoću EULAR indeksa aktivnosti Sjögrenovog sindroma (ESSDAI), koji uključuje 12 domena: konstitucionalnu, limfadenopatiju, žljezdanu, zglobnu, kožnu, plućnu, bubrežnu, mišićnu, periferni živčani sustav, središnji živčani sustav, hematološku i biološku domenu [55]. Ireverzibilna oštećenja u pSS-u procijenjena su pomoću indeks oštećenja Sjögrenovog sindroma (SSDDI), koji se sastoji od sljedećih domena: očne, oralne i sistemske (neurološka, bubrežna, plućna, kardiovaskularna, gastrointestinalna, mišićno-koštana, endokrina i maligna) [56].

3.2.4. Određivanje CIMT-a

Kolor doppler ultrazvuk (GE Logiq P9) obavio je isti ispitivač; mjerenja su uključivala debljinu karotidne intime-medije (CIMT) i karotidne plakove. CIMT je procijenjen na tri razine na svakoj strani: zajednička karotidna arterija (10 mm prije bulbosa), bulbus (5-10 mm kranijalno do početka bulbosa) i unutarnja karotidna arterija (10 mm nakon razdjelnika protoka). Prema trenutnim sonografskim kriterijima, govorimo o "normalnom" CIMT-u kada je intima medija $\leq 0,9$ mm; CIMT $> 0,9$ mm smatrao se pokazateljem zadebljane intime, a CIMT $> 1,3$ mm pokazateljem aterosklerotskog plaka [144]. Osim toga, procijenjen je broj i veličina karotidnih aterosklerotskih plakova. Formiranje plakova definirano je kao žarišna izbočina više od 50% okolne stijenke [144, 145]. Maksimalni (max) CIMT je najveća vrijednost mjerena na tri razine karotidne arterije. Radiolog zadužen za ultrazvučni pregled nije bio upoznat s kliničkim pokazateljima ispitanika.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Statistička analiza provedena je pomoću MedCalc paketa, verzija 19.1.2 (MedCalc Soft ware, Ostend, Belgija). Kategoričke varijable izražene su cijelim brojevima (N) i postotcima (%) a kontinuirane varijable kao srednja vrijednost i standardna devijacija ili medijan i interkvartilni raspon, prema normalnosti distribucije podataka koja je procijenjena s Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Sukladno tome, statističke razlike između kategoričkih varijabli utvrđene su Hi-kvadrat testom, dok su razlike između kontinuirane varijable su određene t-testom za neovisne uzorke i Mann-Whitneyjevim U testom. Nadalje, procijenjene su korelacije između adropina i drugih parametara s Pearsonovim i Spearmanovim koeficijentima korelacije. Konačno, faktori neovisno povezani s razinama adropina određeni su korištenjem analize višestruke linearne regresije. Prijavljeni su nestandardizirani beta koeficijenti (β), standardna pogreška (SE), t i p-vrijednosti. Statistička značajnost postavljena je na $p < 0,05$.

Veličina uzorka određena je statističkim paketom MedCalc, korištenjem t-testa za nezavisne uzorke. U pilot studiji na 15 nasumično odabranih sudionika s pSS-om i 15 kontrolnih sudionika procijenjene su razine adropina. Razlika između dva sredstva za razinu adropina bila je 0,43, a standardna devijacija 0,59. S α pogreškom postavljenom na 0,05 i β pogreškom od 0,1, izračunata potrebna veličina uzorka bila je 40 ispitanika po skupini.

4. ETIČKA NAČELA

Svi postupci kojima su ispitanici u ovom istraživanju bili podvrgnuti koriste se u rutinskom dijagnostičkom postupku, praćenju i liječenju bolesnika s primarnim Sjogrenovim sindromom.

Tijekom istraživanja poštovani su etički i bioetički principi – osobni integritet, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost u skladu s nurnberskim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije (World Medical Association Declaration of Helsinki – 52nd WMA Annual assembly, Edinburgh, Scotland, October, 2000.) te u skladu s hrvatskim zakonima (Hrvatski liječnički zbor – kodeks medicinske etike i deontologije, Zagreb, 2002.).

Dobivena je privola Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split (date of approval: 25/10/2017) i Medicinskog fakulteta, Sveučilište u Splitu (date of approval: 27/10/2017). U istraživanje su bili uključeni samo oni ispitanici koji su prethodno potpisali informirani pristanak nakon što su bili informirani o procedurama i svrsi planiranog istraživanja. Rezultati će se koristiti isključivo za dobivanje znanstvenih rezultata i oblikovanje znanstvenog mišljenja, a neće se koristiti u svrhu stjecanja materijalne dobiti.

5. REZULTATI

5.1. Rezultati za adropin

5.1.1. Osnovne karakteristike studijske populacije

U istraživanje smo uključili 52 bolesnika s pSS i 52 kontrolna ispitanika koji se podudaraju po spolu, godinama, pušenju i indeksu tjelesne mase. Srednja dob bolesnika s pSS i kontrola bila je 59.3 ± 11.1 vs. 57.8 ± 10.5 (Tablica 4). Bolesnici su imali stabilnu bolest, s medijanom indeksa aktivnosti bolesti ESSDAI 2 (IQR 1-3), medijan indeksa oštećenja SSDDI 2 (IQR 2-3) i medijana trajanja bolesti 6 godina (IQR 3.5-10). Sistolički i dijastolički krvni tlak su bili statistički značajno veći u ispitivanoj grupi naspram kontrolne skupine (126.2 ± 16.8 vs. 118.9 ± 13.2 mmHg, $p = 0.015$ i 81.4 ± 7.6 vs. 77.6 ± 8.1 mmHg, $p = 0.014$) (Tablica 4). Bolesnici s pSS-om su imali veći desetogodišnji rizik za kardiovaskularne bolesti koji je iznosio 3.4 (IQR 1.3-5.5) vs. 2.1 (IQR 1.0-3.3), $p = 0.042$, iako je većina sudionika imala niski desetogodišnji rizik prema FRS.

Tablica 4. Osnovna obilježja bolesnika s pSS i kontrolne skupine.

Parametar	pSS grupa (N=52)	Kontrolna grupa (N=52)	p^*
Muški rod (N, %)	4 (7.7)	3 (5.8)	0.718
Starost (godine)	59.3 ± 11.1	57.8 ± 10.5	0.477
Težina (kg)	70.9 ± 11.6	71.9 ± 10.1	0.654
Visina (cm)	168.8 ± 7.1	168.3 ± 6.8	0.715
Indeks tjelesne mase (kg/m^2)	24.8 ± 3.4	25.4 ± 3.1	0.418
SBP (mmHg)	126.2 ± 16.8	118.9 ± 13.2	0.015
DBP (mmHg)	81.4 ± 7.6	77.6 ± 8.1	0.014
FRS (%)	3.4 (1.3-5.5)	2.1 (1.0-3.3)	0.042
Pušenje (N, %)	9 (17.3)	8 (15.4)	0.792
Dužina bolesti (godine) [†]	6 (3.5-10)	-	-
ESSDAI	2 (1-3)	-	-
SSDDI	2 (2-3)	-	-

Kratice: SBP: Sistolički krvni tlak; DBP: Dijastolički krvni tlak; FRS: Framingham rezultat rizika za koronarne srčane bolesti; ESSDAI: EULAR Primary Sjögren's Syndrome Disease Activity Index; SSDDI: Sjögren's Syndrome Disease Damage Index

Podaci su prikazani kao cijeli broj (postotak), srednja vrijednost \pm standardna devijacija ili medijan (IQR)

* hi-kvadrat test (Fisherov egzaktni test), t-test za neovisne uzorke ili Mann-Whitney U test

† vremensko razdoblje od početne dijagnoze

5.1.2. Laboratorijski parametri studijske populacije

Bolesnici s pSS su imali značajno niže razine hemoglobina ($p < 0.001$), leukocita ($p = 0.001$) i više vrijednosti sedimentacije eritrocita [ESR ($p = 0.006$)], dok je kontrolna skupina imala značajno više razine totalnog kolesterola ($p = 0.010$). Drugi parametri se nisu značajno razlikovali između ispitivanih skupina. (Tablica 5). Anti SSB/La antitijela bila su negativna u 25 pSS bolesnika (48,1%), pozitivna u 23 (44,2%) i granična u 4 (7,7%) bolesnika s pSS. Anti SSA/Ro52 antitijela bila su negativna u 15 bolesnika (28,8%) i pozitivna u 37 (71,2%) bolesnika s pSS. Anti SSA/Ro60 antitijela bila su negativna u 11 (21,2%) i pozitivna u 41 (78,8%) bolesnika s pSS.

Tablica 5. Laboratorijski parametri bolesnika s pSS i kontrolne skupine

Parametar	pSS grupa (N=52)	Kontrolna grupa (N=52)	p^*
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	4.37 \pm 0.42	4.52 \pm 0.32	0.047
Hemoglobin (g/L)	130.5 \pm 11.0	138.4 \pm 11.5	<0.001
MCV (fL)	87.1 \pm 12.8	93.1 \pm 16.1	0.034
Leukociti ($\times 10^{12}/L$)	4.88 \pm 1.38	5.94 \pm 1.81	0.001
Trombociti ($\times 10^9/L$)	230.8 \pm 52.1	244.1 \pm 47.9	0.179
Urea (mmol/L)	5.51 \pm 1.65	5.47 \pm 1.44	0.915
Kreatinin (mmol/L)	65.9 \pm 18.5	63.1 \pm 14.6	0.378
ESR (mm/h)	16.5 (8.0-27.5)	10.0 (6.0-16.0)	0.006
hsCRP (mg/L)	1.30 (0.8-3.8)	1.15 (0.7-3.3)	0.767
TC (mmol/L)	5.60 \pm 1.12	6.13 \pm 0.93	0.010
LDL (mmol/L)	3.56 \pm 0.96	3.91 \pm 1.15	0.093
TG (mmol/L)	1.18 \pm 0.42	1.42 \pm 0.85	0.072
HDL (mmol/L)	1.52 \pm 0.37	1.57 \pm 0.32	0.436

C3 (g/L)	1.21 ± 0.22	1.19 ± 0.17	0.567
C4 (g/L)	0.26 ± 0.19	0.31 ± 0.09	0.197
Anti SSB/La (AU/ml)	33.5 (2.5-81.5)	-	-
Anti SSA/Ro52 (AU/ml)	91.0 (16.5-162.0)	-	-
Anti SSA/Ro60 (AU/ml)	103.0 (56.5-117.0)	-	-

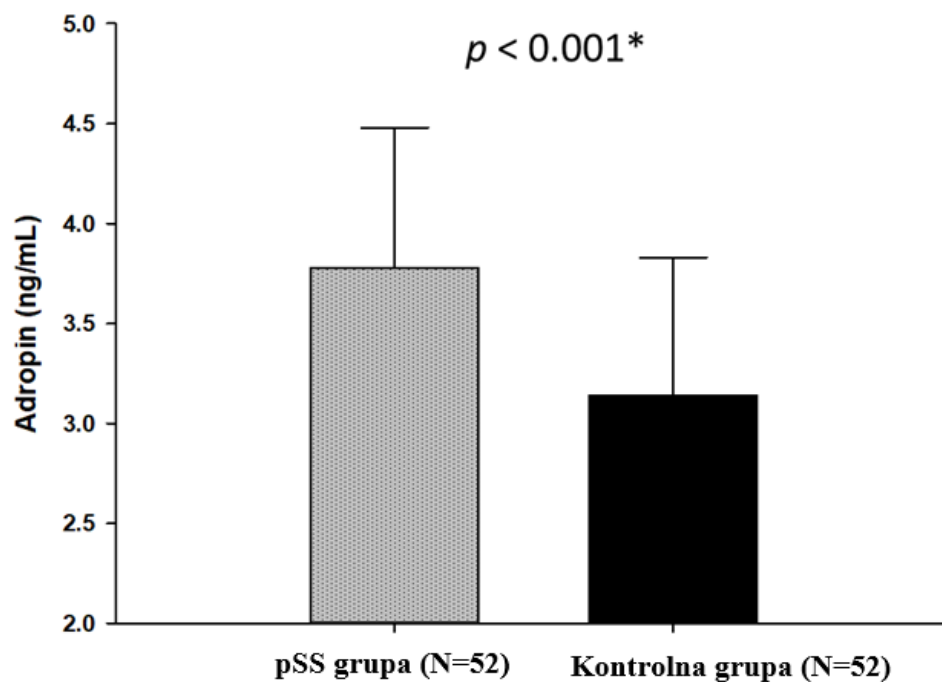
Kratice: MCV: Prosječni volumen eritrocita; ESR: Brzina sedimentacije eritrocita; hsCRP: C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; TC: ukupni kolesterol; LDL: lipoprotein niske gustoće; TG: trigliceridi; HDL: lipoprotein visoke gustoće; C3: komponenta komplementa C3; C4: komponenta komplementa C4;

Podaci su prikazani kao cijeli broj (postotak), srednja vrijednost ± standardna devijacija ili medijan (IQR)

* t-test za neovisne uzorke ili Mann-Whitney U test

5.1.3. Serumske razine adropina u bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine

Serumske razine adropina bile su statistički značajno veće u bolesnika s pSS u usporedbi a kontrolnom skupinom (3.76 ± 0.68 vs 3.14 ± 0.69 ng/ml, $p < 0,001$) (Slika 3). Nadalje, nakon podijele bolesnika s pSS-om u dvije skupine; skupinu s nižim vrijednostima adropina ($<3,73$ ng/ml) i skupinu s višim vrijednostima adropina ($>3,73$ ng/ml) pronađena je značajna statistička razlika u vrijednostima SSDDI skora 3.0 ($2.0-4.0$) vs. 2.0 ($1.0-2.0$), $p < 0,001$. Skupina bolesnika s pSS-om s nižim vrijednostima adropina ($<3,73$ ng/ml) imala je viši SSDDI (Tablica 6).



Slika 3. Serumske vrijednosti adropina u bolesnika s pSS-om-i u kontrolnoj skupini. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. * t-test za neovisne uzorke

Tablica 6. Obilježja bolesnika s pSS-om na temelju vrijednosti serumskih razina adropina

Parametar	Niže vrijednosti adropina (<math>< 3.73 \text{ ng/mL}</math> (N=26)	Više vrijednosti adropina (>math>> 3.73 \text{ ng/mL}</math> (N=26)	p^*
Dob (godine)	51.0 \pm 9.83	57.6 \pm 12.3	0.284
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	24.8 \pm 4.1	24.83 \pm 2.5	0.978
SBP (mmHg)	123.6 \pm 18.46	128.8 \pm 14.9	0.270
DBP (mmHg)	79.6 \pm 8.8	80.8 \pm 5.9	0.086
TC (mmol/L)	5.56 \pm 1.08	5.76 \pm 1.21	0.535
HDL (mmol/L)	1.46 \pm 0.36	1.56 \pm 0.38	0.362
LDL (mmol/L)	3.35 \pm 0.89	3.76 \pm 0.99	0.119
TG (μ mol/L)	1.15 \pm 0.43	1.20 \pm 0.40	0.694

hsCRP (mg/L)	1.35 (0.9-2.7)	1.15 (0.80-5.6)	0.869
Anti SSB/La (AU/ml)	36.0 (7.0-79.0)	9.5 (2.0-88.0)	0.734
Anti SSA/Ro52 (AU/ml)	73.0 (12.0-125.0)	109.0 (17.0-172.0)	0.272
Anti SSA/Ro60 (AU/ml)	101.0 (60.0-116.0)	107.5 (52.0-118.0)	0.963
Dužina bolesti (godine) [†]	6 (4.0-12.0)	6 (3.0-10.0)	0.607
ESSDAI	2.0 (1.0-3.0)	2.5 (1.0-3.0)	0.641
SSDDI	3.0 (2.0-4.0)	2.0 (1.0-2.0)	<0.001
FRS (%)	4.25 (1.2-6.2)	2.3 (1.4-5.2)	0.374

Kratice: SBP: sistolički krvni tlak; DBP: dijastolički krvni tlak; TC: ukupni kolesterol; HDL: lipoprotein visoke gustoće; LDL: lipoprotein niske gustoće; TG: trigliceridi; hsCRP: C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; ESSDAI: EULAR primarni indeks aktivnosti bolesti Sjögrenovog sindroma; SSDDI: Sjögrenov sindrom Indeks oštećenja bolesti, FRS: Framinghamov rezultat rizika za koronarnu bolest srca;

Podaci su prikazani kao cijeli broj (postotak), srednja vrijednost ± standardna devijacija ili medijan (IQR)

* t-test za neovisne uzorke ili Mann-Whitney U test

† vremensko razdoblje od početne dijagnoze

5.1.4. Korelacija adropina i drugih parametara

Korelacijska analiza je pokazala da serumske vrijednosti adropina u bolesnika s pSS-om značajno pozitivno koreliraju s HDL ($r=0.290$, $P=0.036$) i anti SSA/Ro52 antitijelima ($r=0.307$, $P=0.026$). SSDDI negativno korelira s razinama adropina ($r = -0.401$, $P=0.003$) (Tablica 7) (Slika 4).

Tablica 7. Korelacijska analiza između serumskih razina adropina i biokemijskih, kliničkih i antropometrijskih parametara.

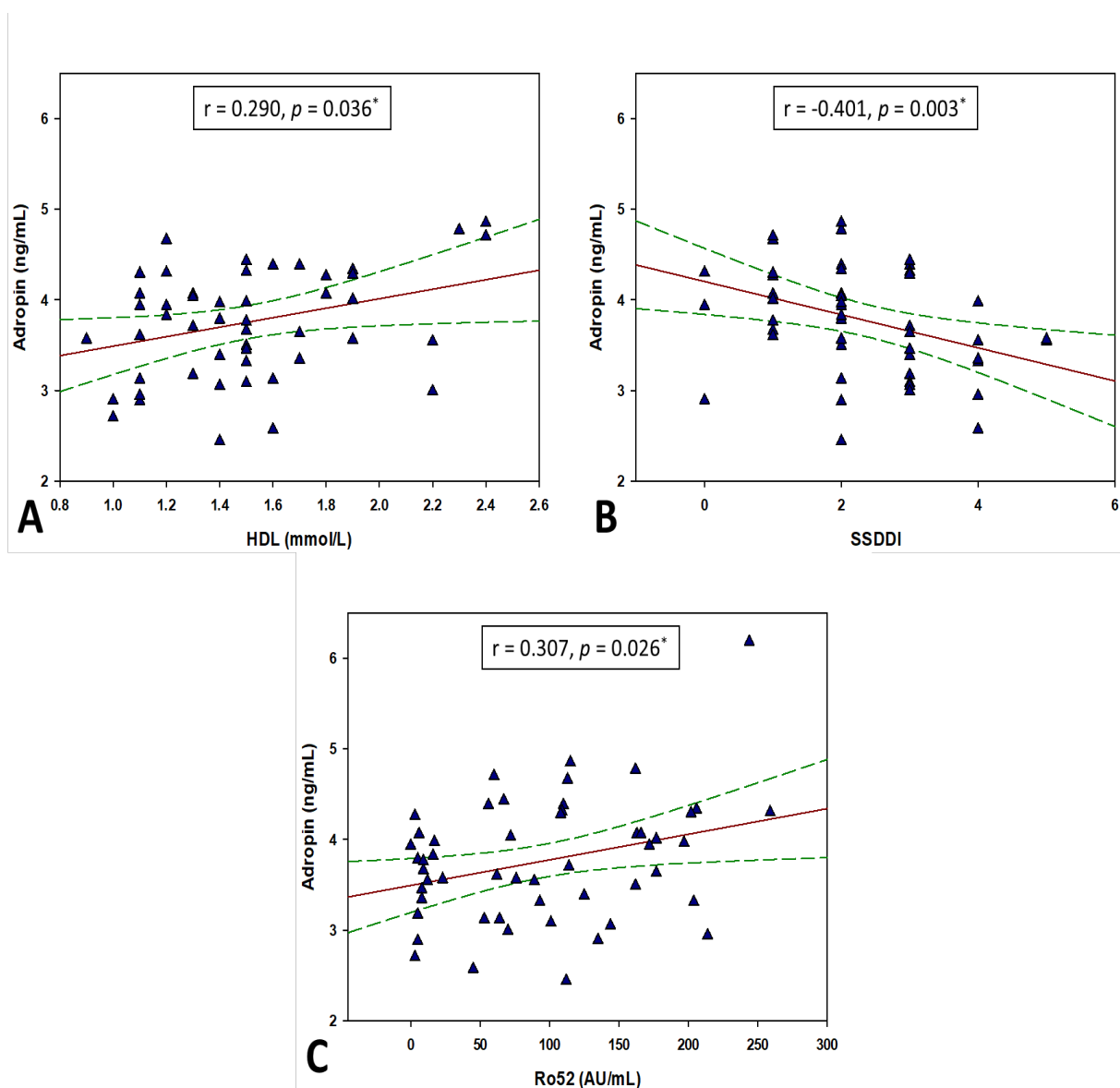
Parametar	r^*	p
Starost (godine)	-0.133	0.345
Indeks tjelesne mase (kg/m^2)	-0.133	0.348
hsCRP (mg/L)	0.158 [†]	0.262
TC (mmol/L)	0.224	0.109
TG (mmol/L)	-0.083	0.557
HDL (mmol/L)	0.290	0.036

LDL (mmol/L)	0.178	0.206
SBP (mmHg)	0.118	0.404
DBP (mmHg)	0.155	0.271
Anti SSA/Ro60 (AU/ml)	0.123 [†]	0.385
Anti SSA/Ro52 (AU/ml)	0.307 [†]	0.026
Anti SSB/La (AU/ml)	-0.009 [†]	0.946
ESSDAI	0.051 [†]	0.721
SSDDI	-0.401 [†]	0.003
Dužina bolesti (godine)	-0.041 [†]	0.770

Kratice: hsCRP: C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; TC: Ukupni kolesterol; TG: trigliceridi; HDL: lipoprotein visoke gustoće; LDL: lipoprotein niske gustoće; SBP: sistolički krvni tlak; DBP: dijastolički krvni tlak; ESSDAI: EULAR primarni indeks aktivnosti bolesti Sjögrenovog sindroma; SSDDI: Indeks oštećenja bolesti Sjögrenovog sindroma

* Pearsonov koeficijent korelacije

† Spearmanov koeficijent korelacije ranga



Slika 4. Korelacijska analiza serumskih razina adropina s HDL (A), SSDDI (B) i anti SSA/Ro52 antitijela (C) u ukupnoj populaciji ispitanika (N = 104).

* Pearsonov koeficijent korelacije

5.1.5. Multipla regresijska analiza

Nadalje, multipla linearna regresija je pokazala da serumske vrijednosti adropina imaju statistički značajnu poveznicu s HDL ($\beta \pm SE$, 0.903 ± 0.283 , $P = 0.002$) i SSDDI ($\beta \pm SE$, -0.202 ± 0.073 , $P = 0.008$) nakon prilagodbe statističkog modela za godine, indeks tjelesne mase i spol te serumske razine adropina kao ovisne varijable (Tablica 8).

Tablica 8. Multipli linearni regresijski model neovisnih prediktora za vrijednosti serumskih razina adropina

Varijable	β^1	SE ²	t-vrijednost	p
Starost (godine)	-0.013	0.011	-1.134	0.263
Spol	0.220	0.367	0.602	0.550
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	-0.007	0.002	-0.268	0.794
Anti SSA/Ro52	0.001	0.001	1.551	0.128
HDL	0.903	0.283	3.191	0.002
FRS	0.025	0.032	0.768	0.447
Dužina bolesti (godine) [†]	0.006	0.015	0.394	0.695
ESSDAI	0.044	0.061	0.718	0.476
SSDDI	-0.202	0.073	-2.754	0.008

Kratice: HDL: lipoprotein visoke gustoće; FRS: Framinghamov rezultat rizika za koronarnu bolest srca; ESSDAI: EULAR primarni indeks aktivnosti bolesti Sjögrenovog sindroma; SSDDI: Indeks oštećenja bolesti Sjögrenovog sindroma

¹ nestandardizirani koeficijent β

² standardna pogreška

[†] vremensko razdoblje od početne dijagnoze

5.2. Rezultati za homocistein i CIMT

5.2.1. Osnovna obilježja bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine

U studiju je bilo uključeno 48 bolesnika s pSS i 46 kontrola podudarnih po spolu, godinama, pušenju i indeksu tjelesne mase (Tablica 9) Prosječna dob bolesnika s pSS-om bila je 60.5 ± 9.6 vs. 57.4 ± 9.9 godina za kontrolnu skupinu. Bolesnici su imali stabilnu bolest sa srednjom vrijednošću indeksa aktivnosti bolesti, ESSDAI skor je iznosio 2 (IQR 1–3). Srednja vrijednost indeksa oštećenja specifičnog za bolest – SSDDI skor – je bio (IQR 2–3), a prosječno trajanje bolesti je bilo 6.5 godina (IQR 4.0–11.0). Sistolički i dijastolički tlak je bio značajno veći u bolesnika s pSS-om u usporedbi s kontrolnom skupinom (127.8 ± 16.8 vs. 119.2 ± 13.4 mmHg, $p = 0.007$ and 81.6 ± 7.4 vs. 77.8 ± 8.0 mmHg, $p = 0.018$) (Tablica 9) unatoč činjenici da je korištenje antihipertenzivnih lijekova bilo značajnije u bolesnika s pSS-om u odnosu na kontrolnu skupinu (21 (43.7%) vs 8 (17.4%), $p = 0.006$).

Tablica 9. Osnovna obilježja bolesnika s pSS i kontrolne skupine

Parametar	Bolesnici s pSS-om (N=48)	Kontrolna skupina (N=46)	<i>p</i> *
Muškarci (N, %)	4 (8.3)	3 (6.5)	0.953
Dob (godine)	60.5 ± 9.6	57.4 ± 9.9	0.129
Težina (kg)	70.9 ± 11.6	71.9 ± 10.1	0.654
Visina (cm)	168.3 ± 6.9	168.0 ± 6.7	0.837
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	24.8 ± 3.4	25.4 ± 3.1	0.418
SBP (mmHg)	127.8 ± 16.8	119.2 ± 13.4	0.007
DBP (mmHg)	81.6 ± 7.4	77.8 ± 8.0	0.018
Pušenje (N, %)	8 (16.7)	7 (15.2)	0.928
Dužina bolesti (godine) [†]	6.5 (4.0-11.0)	-	-
ESSDAI	2 (1-3)	-	-
SSDDI	2 (1.5-3.0)	-	-

Kratice: SBP: Sistolički krvni tlak; DBP: dijastolički krvni tlak; ESSDAI: EULAR indeks aktivnosti bolesti primarnog Sjögrenovog sindroma; SSDDI: Indeks oštećenja bolesti Sjögrenovog sindroma.

Podaci su prikazani kao cijeli broj (postotak), srednja vrijednost \pm standardna devijacija ili medijan (IQR)

* hi-kvadrat test (Fisherov egzaktni test), t-test za neovisne uzorke

† vremensko razdoblje od početne dijagnoze

5.2.2. Laboratorijski parametri

Bolesnici s pS-omS imali su značajno niže razine hemoglobina ($p=0,001$) i više razine SE ($p=0,006$) dok je kontrolna skupina imala značajno više razine ukupnog kolesterola ($p=0,047$). Primjena hipolipidemičnih lijekova bila je slična u obje skupine 7 (14,6%) prema 3 (6,5%), $p = 0,317$). Anti SSB/La antitijela, anti SSA/Ro52 i anti SSA/Ro60 antitijela mjerena su samo u bolesnika s pSS-om (Tablica 10).

Tablica 10. Laboratorijski parametri pSS pacijenata i kontrola

Parametar	pSS skupina (N=48)	Kontrolna skupina (N=46)	P^*
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	4.39 \pm 0.41	4.53 \pm 0.32	0.072
Hemoglobin (g/L)	131.1 \pm 10.5	138.8 \pm 11.9	0.001
Trombociti ($\times 10^9/L$)	227.0 \pm 51.95	246.7 \pm 49.4	0.064
Ureja (mmol/L)	5.53 \pm 1.65	5.42 \pm 1.41	0.720
Kreatinin (mmol/L)	66.3 \pm 19.1	62.3 \pm 14.6	0.260
ESR (mm/h)	16.5 (8.0-27.5)	10.0 (6.0-16.0)	0.006
hsCRP (mg/L)	1.30 (0.8-3.8)	1.15 (0.75-3.35)	0.767
TC (mmol/L)	5.7 \pm 1.1	6.2 \pm 0.8	0.047
LDL (mmol/L)	3.6 \pm 0.9	3.9 \pm 1.1	0.111
TG (mmol/L)	1.2 \pm 0.4	1.4 \pm 0.8	0.108
HDL (mmol/L)	1.5 \pm 0.4	1.5 \pm 0.3	0.888
C3	1.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	0.586
C4	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	0.447
Anti SSB/La (AU/mL)	26.5 (2.0-81.5)	-	-
Anti SSA/Ro52 (AU/mL)	97.0 (20.0 – 162.0)	-	-
Anti SSA/Ro60 (AU/mL)	100.0 (56.5-116.0)	-	-

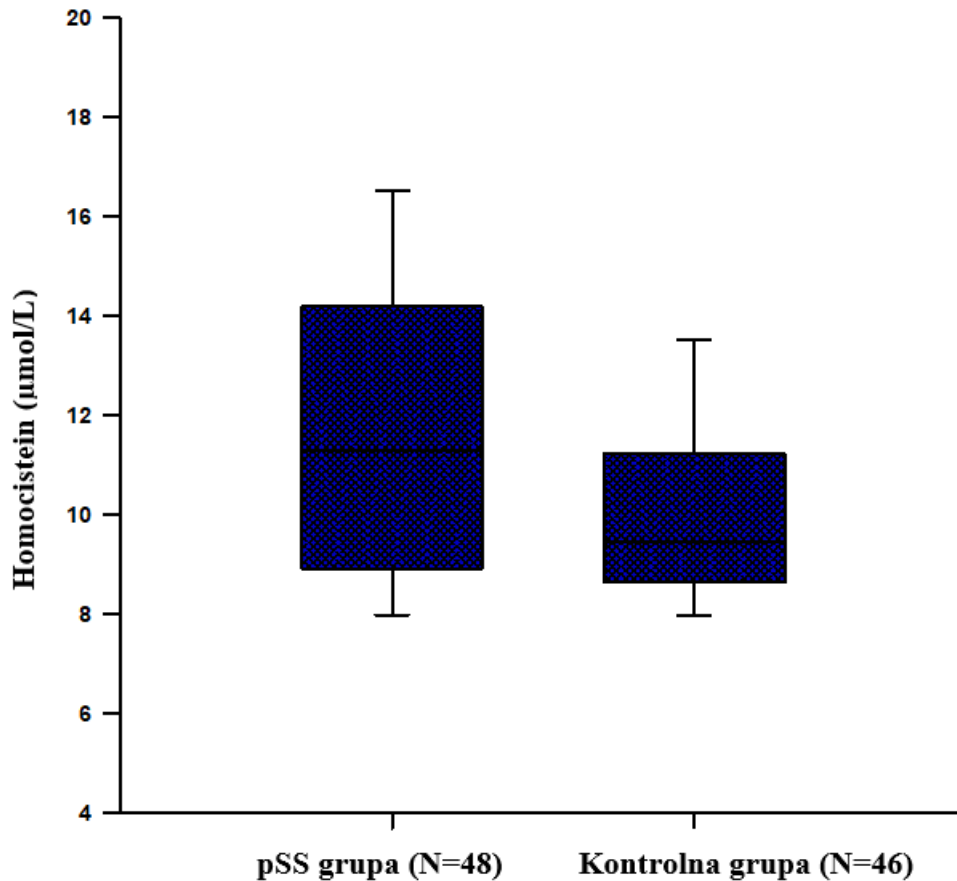
Kratice: ESR: brzina sedimentacije eritrocita; hsCRP: C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; TC: ukupni kolesterol; LDL: lipoprotein niske gustoće; TG: trigliceridi; HDL: lipoprotein visoke gustoće; C3: komponenta komplementa C3; C4: komponenta komplementa C4

Podaci su prikazani kao cijeli broj (postotak), srednja vrijednost \pm standardna devijacija ili medijan (IQR)

* t-test za neovisne uzorke ili Mann-Whitney U test

5.2.3. Razine homocisteina i max CIMT-a u bolesnika s pSS-om i u kontrolnoj skupini

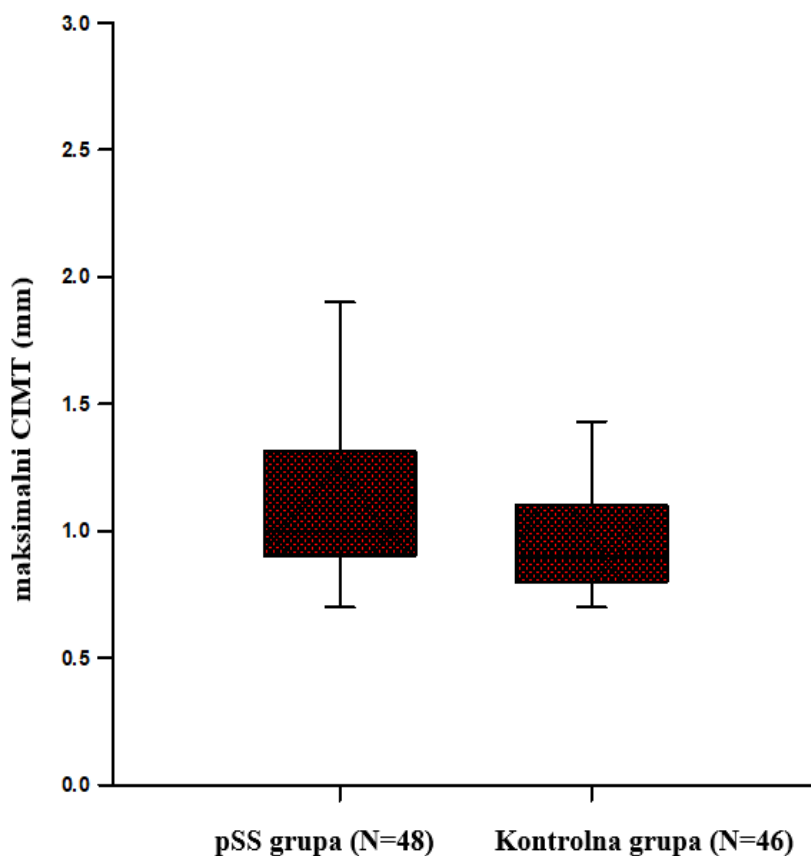
Razine homocisteina u serumu bile su značajno više u bolesnika s pSS-om u usporedbi s kontrolnom skupinom [medijan (IQR)]: 11.28 (8.93-14.06) vs. 9.46 (8.64-10.98), $p=0.015$ (Slika 5).



Slika 5. Razine homocisteina u plazmi u bolesnika s pSS-om i kontrolnoj skupini.

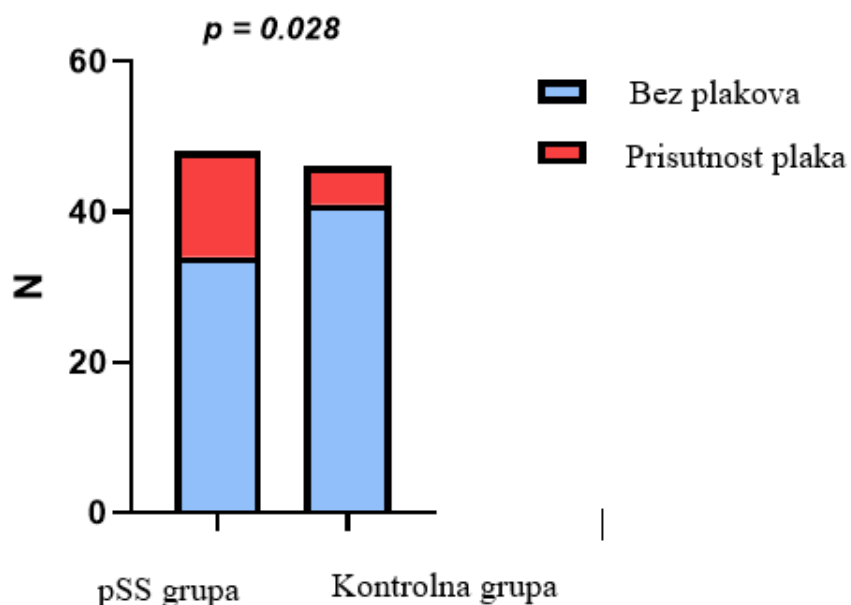
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. * t-test za neovisne uzorke

Bolesnici s pSS-om također su imali statistički značajno više vrijednosti CIMT ($p>0,05$) u usporedbi s kontrolnom skupinom [medijan (IQR)]: 1 (0.90-1.31) vs. 0.9 (0.80-1.10), $p=0.0372$ (Slika 6).



Slika 6. Maksimalni CIMT (mm) u bolesnika s pSS-om i kontrolnoj skupini. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. * t-test za neovisne uzorke

Udio bolesnika s utvrđenim karotidnim plakovima bio je 29,2%, a u kontrolnoj skupini bio je 10,9%. Bolesnici s pSS-om imali su statistički značajno veći broj plakova u usporedbi s kontrolnom skupinom 14 u odnosu na 5, $p=0.028$ (Slika 7).



Slika 7. Omjer broja bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine s prisutnim plakom i bez plaka

5.2.4. Povezanost homocisteina i antropometrijskih, laboratorijskih i kliničkih parametara

Korelacijska analiza pokazala je da razine homocisteina pozitivno koreliraju s trigliceridima ($r = 0,204$, $p = 0,048$) i maksimalnim CIMT-om ($r = 0,231$, $p = 0,046$). (Tablica 11) (Slika 8). Nije otkrivena povezanost s anti SSA/Ro antitijelima, anti SSB/La antitijelima te s indeksom aktivnosti ESSDAI i indeksom oštećenja SSDDI.

Tablica 11. Korelacija homocisteina s antropometrijskim, laboratorijskim i kliničkim parametrima u cijeloj ispitivanoj populaciji.

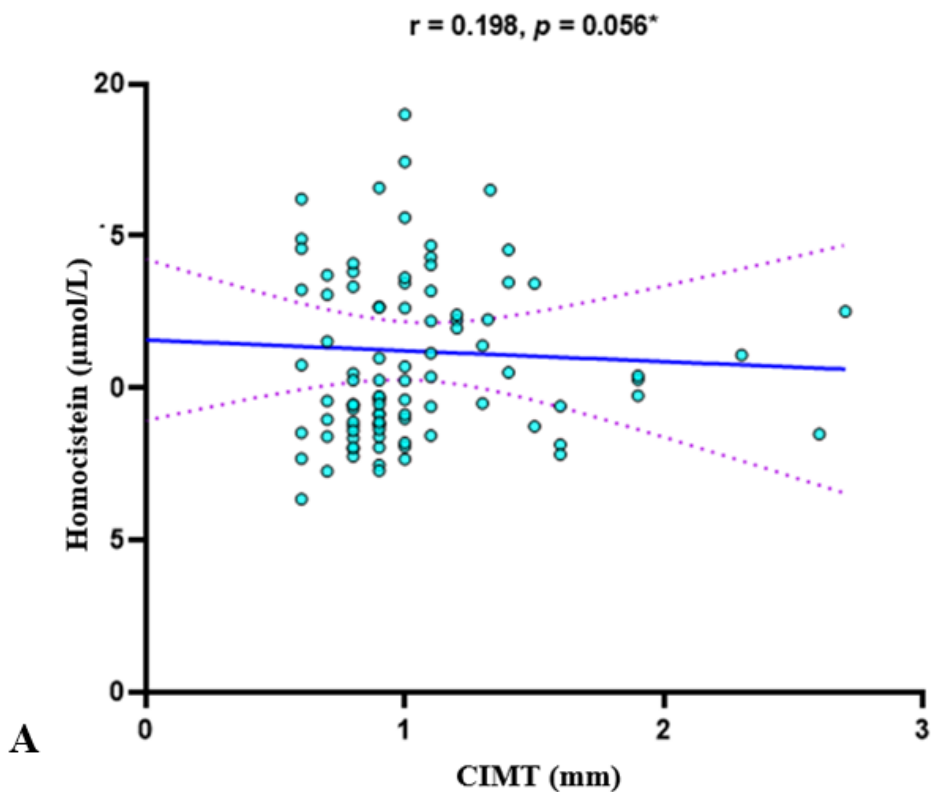
Parametar	r^*	p
Dob (godine)	0.093	0.371
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	-0.001	0.995
hsCRP (mg/L)	0.061	0.556
TG (mmol/L)	0.204	0.048
TC (mmol/L)	0.002	0.986

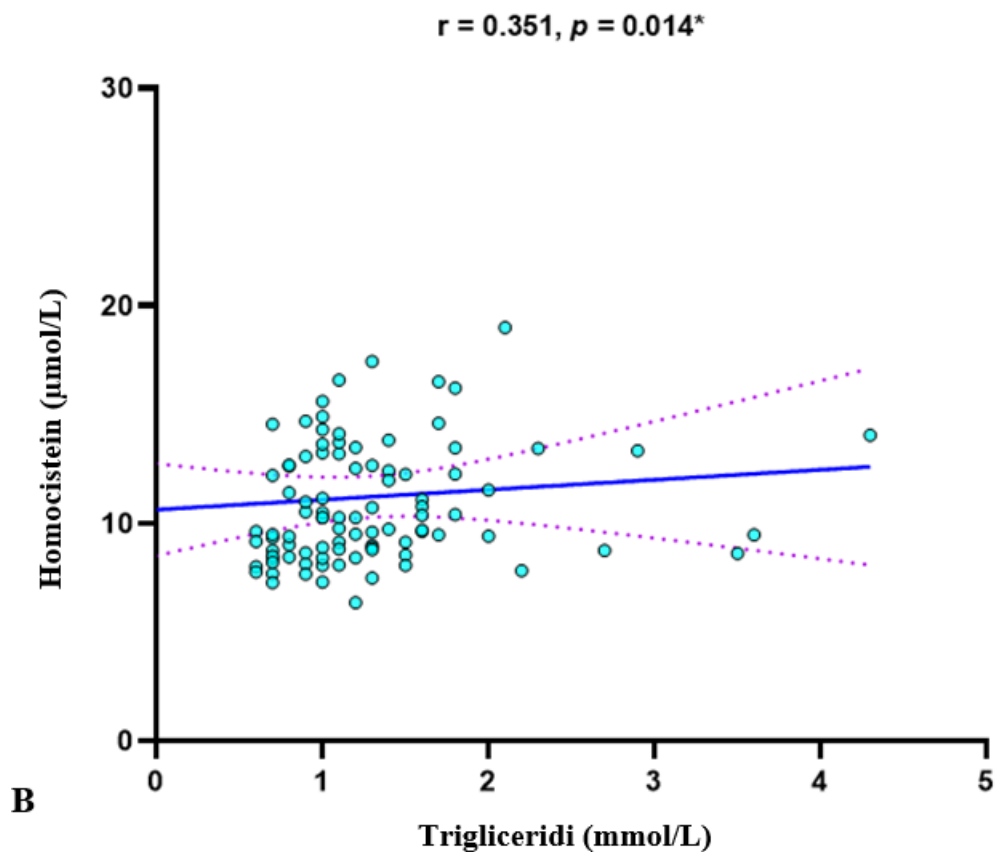
HDL (mmol/L)	-0.085	0.417
LDL (mmol/L)	-0.035	0.734
SBP (mmHg)	-0.033	0.754
DBP (mmHg)	-0.069	0.507
Maksimalni CIMT	0.231	0.046
Anti SSA/Ro60 (AU/mL)	0.056	0.705 [†]
Anti SSA/Ro52 (AU/mL)	0.190	0.194 [†]
Anti SSB/La (AU/mL)	0.004 [†]	0.980 [†]
ESSDAI	0.149 [†]	0.312 [†]
SSDDI	0.155 [†]	0.292 [†]
Dužina bolesti (godine) [†]	-0.195 [†]	0.183 [†]

Kratice: hsCRP: C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; TG: trigliceridi; TC: ukupni kolesterol; HDL: lipoprotein visoke gustoće; LDL: lipoprotein niske gustoće; SBP: Sistolički krvni tlak; DBP: dijastolički krvni tlak; ESSDAI: EULAR indeks aktivnosti bolesti primarnog Sjögrenovog sindroma; SSDDI: Indeks oštećenja bolesti Sjögrenovog sindroma

* Spearmanov koeficijent korelacije

† pSS grupa





Slika 8. Korelacijska analiza serumskih razina homocisteina s CIMT-om (A) i trigliceridima (B) u ukupnoj populaciji ispitanika (N = 94).

* Pearsonov koeficijent korelacije

5.2.5. Povezanost CIMT-a i antropometrijskih, laboratorijskih i kliničkih parametara

Korelacijska analiza je pokazala da je CIMT-a pozitivno povezan sa starosti ($r=0.416$, $P<0.0001$), a utvrđena je negativna korelacija CIMT-a s anti SSA/Ro60 antitijelima ($r = -0.431$, $P=0.002$) i anti SSB/La antitijelima ($r = -0.346$, $P=0.016$). Također je utvrđena i statistički značajna pozitivna korelacija CIMT-a sa SSDDI ($r=0.351$, $P=0.014$) (Tablica 12) (Slika 9).

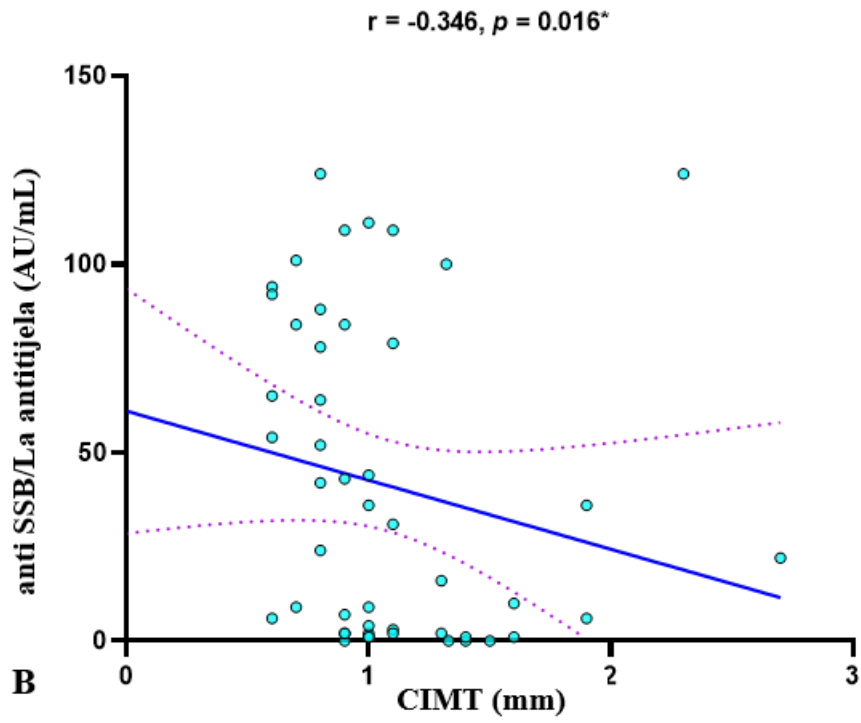
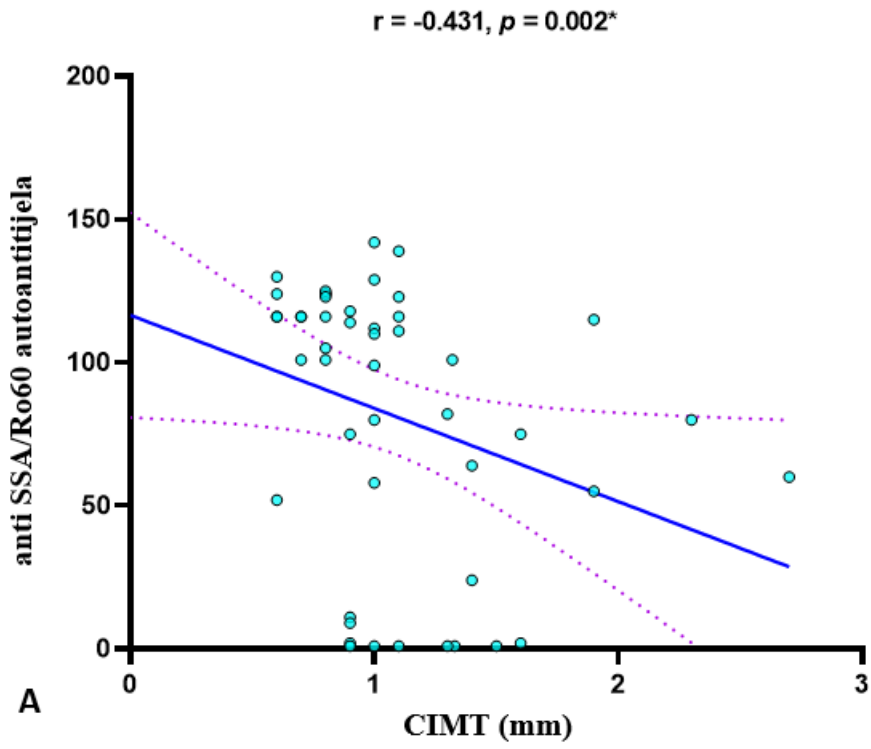
Tablica 12. Korelacija CIMT-a i antropometrijskih, laboratorijskih i kliničkih parametara

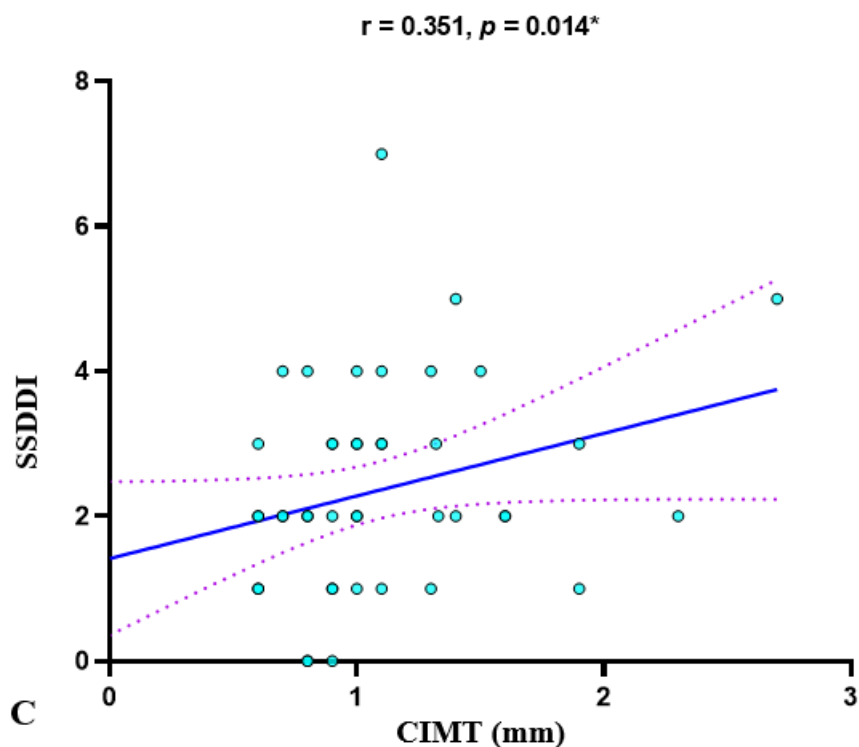
Parametar	r^*	p
Starost (godine)	0.416	<0.0001
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	0.108	0.300
hsCRP (mg/L)	0.020	0.845
TG (μmol/L)	0.064	0.538
TC (μmol/L)	0.127	0.224
HDL (μmol/L)	0.060	0.567
LDL (μmol/L)	0.151	0.146
SBP (mmHg)	0.293	0.004
DBP (mmHg)	0.058	0.576
Homocistein	0.198	0.056
Anti SSA/Ro60 (AU/mL)	-0.431	0.002 [†]
Anti SSA/Ro52 (AU/mL)	-0.266	0.067 [†]
Anti SSB/La (AU/mL)	-0.346 [†]	0.016 [†]
ESSDAI	-0.189 [†]	0.198 [†]
SSDDI	0.351 [†]	0.014 [†]
Dužina bolesti (godine) [†]	0.117 [†]	0.428 [†]

Kratice: hsCRP: C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; TG: trigliceridi; TC: ukupni kolesterol; HDL: lipoprotein visoke gustoće; LDL: lipoprotein niske gustoće; SBP: Sistolički krvni tlak; DBP: dijastolički krvni tlak; ESSDAI: EULAR indeks aktivnosti bolesti primarnog Sjögrenovog sindroma; SSDDI: Indeks oštećenja bolesti Sjögrenovog sindroma

* Spearmanov koeficijent korelacije

[†] pSS group





Slika 9. Korelacijska analiza vrijednosti CIMT-a s anti SSA/Ro60 antitijelima (A), anti SSB/La antitijelima (B) i SSDDI (C) u ukupnoj populaciji ispitanika (N = 94).

* Pearsonov koeficijent korelacije

5.2.6. Multipla regresijska analiza

Višestruka regresijska analiza pokazala je da su razine homocisteina neovisni prediktor Sjögrenova sindroma.

Tablica 13. Multivarijantni logistički regresijski model za predviđanje Sjögrenovog sindroma.

Varijable	OR	95% CI	<i>p</i>
Godine	1.027	0.977 to 1.081	0.287
Muški spol ¹	0.907	0.129 to 6.373	0.922
ITM	0.952	0.828 to 1.095	0.496
hsCRP	1.067	0.975 to 1.169	0.156
Max_CIMT	2.23	0.663 to 7.517	0.194
Homocistein	1.28	1.069 to 1.545	0.007

¹ ženski spol je referentna grupa

ITM - indeks tjelesne mase, hsCRP - C-reaktivni protein visoke osjetljivosti

6. RASPRAVA

6.1. Rasprava

Ovo istraživanje u sklopu doktorske disertacije je provedeno u dva dijela s ciljem utvrđivanja uloge adropina i homocisteina kao rizičnih čimbenika ubrzane ateroskleroze u bolesnika s pSS-om. Prvim dijelom ovog istraživanja je ispitivana razina adropina i njegova povezanost s kliničkim i laboratorijskim parametrima pSS-a. Koliko znamo, ovo je prva klinička studija koja je istraživala razine adropina u serumu u bolesnika s pSS-om. Naša je studija pokazala da bolesnici s pSS-om imaju značajno više razine adropina u serumu u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nadalje, pokazalo se da razine adropina u bolesnika s pSS-om pozitivno koreliraju s HDL i anti SSA/Ro52 antitijelima te negativno sa SSDDI.

Poznato je da adropin sudjeluje u regulaciji energetske homeostaze i inzulinskog odgovora te da je usko povezan s razvojem i napredovanjem aterogeneze, pozitivno utječući na endotelnu disfunkciju [74, 87, 146]. Endotel ima središnju ulogu u održavanju vaskularne homeostaze, a poremećena funkcija endotela doprinosi razvoju i napredovanju različitih kardiovaskularnih, upalnih, metaboličkih, infektivnih i bubrežnih bolesti. Naime, oštećenje endotela pokreće aterosklerotične i trombotske procese koji imaju značajan utjecaj u ovim stanjima [147, 148]. NO, snažan endogeni vazodilatator kojeg u endotelu stvara endotelna izoforma NO sintaze igra važnu ulogu u održavanju endotelne homeostaze. NO također inhibira adheziju monocita i leukocita na endotel, agregaciju trombocita, oksidaciju LDL-a i proliferaciju glatkih mišićnih stanica [104]. Nadalje, postoje dokazi da je proizvodnja NO povećana u bolesnika s pSS-om [149]. Aktivacija neurona i eNOS-a opisana je u ispitanika s primarnim SS-om kao posljedica povećane proizvodnje protutijela protiv muskarinskih acetilkolinских receptora [150-152].

Adropin bi mogao pojačati ekspresiju eNOS, odgovornog za proizvodnju vaskularnog NO, u endotelu, tako da je nedostatak adropina povezan sa smanjenom bioraspoloživošću NO u endotelu [83, 153]. Lovren i sur. su pokazali da adropin može ispoljiti zaštitne učinke na endotelnu funkciju vjerojatno posredovane regulacijom ekspresije eNOS-a putem receptora vaskularnog endotelnog faktora rasta 2 (VEGFR2), PI3K-Akt i putem ERK1/2 [87]. Pokazano je da adropin potiče kritičnu funkciju endotelnih stanica kao što je proliferacija, migracija, formiranje kapilarnih cjevčica i smanjena propusnost. Također, potiče apoptozu induciranu čimbenikom tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor* - TNF). Štoviše, pojačava aktivaciju eNOS, PI3K-Akt i ERK 1/2. Na taj način, putem inducibilne ekspresije NOS,

adropin smanjuje ekspresiju glasničke RNA (engl. *messenger RNA* - mRNA) proupalnih citokina, kao što su TNF-alfa i interleukin 6, smanjujući upalu [107, 154].

Svega je nekoliko studija koje su istraživale adropin u autimunim bolestima. Yolbas i sur. nisu pokazali značajnu razliku u serumskim razinama adropina između bolesnika s RA i SLE te zdravih kontrola. Ekspresija gena ENHO bila je značajno veća u skupini s RA u usporedbi sa kontrolnom skupinom, ali nije bila praćena povišenom razinom adropina u serumu [76]. Nadalje, povećana razina adropina u serumu primijećena je u kohorti bolesnika sa sistemskom sklerozom (SSc) i Behcetovom bolešću (BD) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Ovi rezultati upućuju da se razine adropina povećavaju u SSc i BD zbog upalnih procesa kojima su ove bolesti obilježene [95]. U obje bolesti se promjene javljaju na razini krvnih žila što bi se moglo povezati s povećanjem razina adropina kao zaštitnim čimbenikom. Ovi su nalazi u skladu s rezultatima naše studije, tim više što su vaskulitisi jedna od najčešćih klinička manifestacija pSS [155].

Najnovije studije povezuju adropin s kroničnim upalnim stanjima i pripisuju mu mogući imunomodulatorni učinak. Pokazalo se da bolesnici s opstruktivnom apnejom u snu, upalnim bolestima crijeva, sindromom policističnih jajnika i dijabetesom imaju značajno niže razine adropina u serumu [156-159].

U našem istraživanju adropin je pokazao značajnu pozitivnu korelaciju s anti SSA/Ro52 protutijelima. Anti SSA/Ro i anti SSB/La antitijela bila su usko povezana s glavnim kliničkim, histopatološkim i imunološkim značajkama pSS-a. Određivanje anti SSA/Ro52 autoantitijela može pomoći u identificiranju specifične podskupine SS bolesnika s agresivnijom bolešću i rizikom od određenih sistemskih manifestacija bolesti [160]. Pozitivna korelacija anti SSA/Ro52 antitijela i adropina u našoj studiji u skladu je s nekim ranijim istraživanjima koja su pokazala da su bolesnici s pozitivnim anti SSA/Ro imali manju učestalost arterijske hipertenzije, hiperkolesterolemije i hipertrigliceridemije u usporedbi s bolesnicima koji su imali negativna anti-SSA/Ro i SSB/La antitijela [161]. Stoga bi pozitivna povezanost adropina i anti SSA/Ro52 antitijela mogla ukazivati na potencijalnu zaštitnu ulogu anti SSA/Ro52 antitijela u aterogenezi bolesnika s pSS-om. S druge strane, Vaudo et al. su pokazali značajnu povezanost anti SSA/Ro antitijela s arterijskim zadebljanjem kao pokazateljem subkliničke ateroskleroze [136]. Dakle, uloga ovih autoantitijela, kao i adropina u procesu aterogeneze u ovih bolesnika je kontroverzna i zahtijeva daljnja istraživanja.

Zanimljivo je da smo utvrdili negativnu povezanost sa SSDDI rezultatom. Štoviše, multivarijantna linearna regresija pokazala je da je SSDDI također snažan prediktor za razine adropina u serumu. Dakle, ustanovili smo da je kumulativno oštećenje mjereno pomoću SSDDI neovisno povezano sa smanjenim adropinom u pSS-u. Kada su bolesnici s pSS-om podijeljeni prema vrijednosti adropina u dvije skupine, oni s nižim razinama adropina u serumu imali su viši SSDDI rezultat. Kumulativno oštećenje odražava učinak ozbiljnije bolesti tijekom vremena, a viši SSDDI rezultati mogu identificirati one pacijente koji su u prošlosti imali više sistemskih upala i veće imunološke poremećaje, i kojima je najvjerojatnije bilo potrebno intenzivnije liječenje [162, 163]. Ovi nalazi mogu upućivati na zaštitnu protuupalnu ulogu adropina u početnim fazama i prvim godinama bolesti. Štoviše, čini se da zaštitna uloga opada s trajanjem bolesti i većim oštećenjem krvnih žila i organa.

Činjenica da aktivnost bolesti (ESSDAI) nije bila u korelaciji s adropinom je očekivana, budući da je većina naših pacijenata u trenutku ispitivanja imala stabilnu bolest. Samo su dvije studije u pSS-u procjenjivale aktivnost bolesti pomoću ESSDAI i nisu pronašle povezanost sa subkliničkim kardiovaskularnim oštećenjem, što je u skladu s našim rezultatima [164, 139].

Bolesnici s pSS-om imali su viši sistolički i dijastolički krvni tlak i veći 10-godišnji rizik za kardiovaskularne događaje prema Framingham izračunima u usporedbi sa zdravim kontrolama, ali su i bolesnici i kontrolna skupina klasificirani kao oni s niskim 10-godišnjim rizikom prema FRS-u. Nekoliko je studija procijenilo odnos između razine adropina i krvnog tlaka. Gu i sur. izvijestili su o nižim razinama adropina u odraslih s arterijskom hipertenzijom [101]. Niske razine adropina u hipertenzivnih bolesnika također su izvijestili Gulen i sur. [102]. Nasuprot tome, Celik i sur. pokazalo je da hipertenzivni pacijenti imaju visoke razine adropina [103]. Također je zanimljivo da su naši bolesnici s pSS-om imali niže razine TC u usporedbi sa kontrolnom skupinom. To je u skladu s dostupnim podacima koji naglašavaju utjecaj adropina na homeostazu lipida.

U bolesnika na hemodijalizi utvrđeno je da adropin ima negativnu korelaciju s TG, LDL i TC dok ima značajnu pozitivnu korelaciju s HDL kolesterolom [91]. Iste korelacije između lipida i adropina pronađene su u nekoliko drugih studija [74,81,93,165]. Naša studija nije potvrdila povezanost između razine adropina u serumu i TC-a, no potrebno je naglasiti da su naši bolesnici imali su niže razine TC-a u usporedbi s kontrolnom skupinom. Međutim, u

naših bolesnika s pSS-om razine adropina u serumu su pozitivno korelirale s HDL kolesterolom. Nadalje, kada je provedena multivarijantna linearna regresija, HDL kolesterol identificiran je kao neovisni prediktor za razine adropina, što dodatno potvrđuje njegov učinak u održavanju homeostaze lipida. Naime, studija na životinjama koju su proveli Akcilar i sur. utvrdili su da je intraperitonealna primjena niske doze adropina štakorima s hiperlipidemijom bila iznimno učinkovita u smanjenju razine serumskog TG, TC, LDL kolesterola i povećanja razine HDL kolesterola [154]. Dakle, možemo zaključiti da je naša studija potvrdila povezanost adropina s metabolizmom lipida, ali isto tako pokazala značajnu ulogu u upalnom procesu u pSS-a.

Drugi dio istraživanja se odnosio na homocistein i CIMT u bolesnika s pSS-om. Ovo je prva studija koja je istraživala povezanost između razine homocisteina i CIMT-a, dvaju biomarkera subkliničke ateroskleroze, u bolesnika s pSS-om. Već dugo je prepoznat povećani rizik od kardiovaskularnih bolesti među osobama s autoimunim bolestima. Još uvijek je otvoreno pitanje uloge pojedinih čimbenika na povećanje rizika, odnosno kolika je uloga primjenjene terapije, osobito steroida, a koliko je posljedica samog autoimunog procesa s posljedičnom upalom. PSS je sustavna bolest koju obilježava kronični autoimuni upalni proces. Stoga se, analogno sličnim bolestima kao što su SLE i RA, očekuje povećana učestalost subkliničke ateroskleroze. Tome u prilog govore rezultati naše studije. Naime, utvrdili smo značajno povećane razine homocisteina u bolesnika s pSS-om u usporedbi s kontrolnom populacijom. Nadalje, pokazali smo da je homocistein neovisan čimbenik za predviđanje primarnog Sjogren-ovog sindroma. Ranija istraživanja su dokazala da su povišene razine homocisteina umjereno jak i neovisan čimbenik kardiovaskularnog rizika u zdravoj populaciji [123]. Također, povišene razine homocisteina identificirane su kao faktor rizika za hipertenziju [166-168]. Sabio i sur. su pokazali da je homocistein neovisno povezan sa SBP-om i hipertenzijom u žena sa SLE-om te da je neovisni čimbenik rizika za progresiju ateroskleroze [123].

U našem istraživanju nismo pronašli povezanost između homocisteina te SBP-a i DBP-a, iako su bolesnici s pSS-om imali više razine SBP-a i DBP-a od kontrolne skupine. Treba naglasiti da su hipertenzivni bolesnici s pSS-om liječeni s antihipertenzivima, ali nijedan bolesnik nije uzimao tiazidni diuretik koji bi mogao utjecati na razinu homocisteina. Povišene razine homocisteina mogu pridonijeti endotelnoj disfunkciji različitim mehanizmima, kao što je oksidativni stres ili vazodilatacija ovisna o dušikovom oksidu,

poticanje apoptoze endotelnih stanica ili smanjenje proizvodnje sumporovodika (H₂S), koji je snažan antioksidans i čimbenik vazorelaksacije [169-170]. Homocistein može povećati vaskularnu krutost oštećivanjem elastinskih vlakana, povećanjem proizvodnje kolagena putem aktivacije metaloproteinaza i stimuliranjem proliferacije stanica glatkih mišića [171-172].

Nije utvrđena povezanost homocisteina s parametrima oštećenja i aktivnosti pSS-a te specifičnim autoantitijelima u pSS. U našem istraživanju bolesnici s pSS-om imali su značajno niže razine ukupnog kolesterola u odnosu na kontrolnu skupinu, iako nisu uočene razlike u vrijednostima LDL, HDL kolesterola i triglicerida. Bez obzira na to što je kontrolna skupina imala višu razinu ukupnog kolesterola u odnosu na bolesnike s pSS-om, to nije bilo praćeno značajnijim zadebljanjem arterijske stijenke. Ovaj rezultat ukazuje da zadebljanje arterijske stijenke nije samo posljedica hiperkolesterolemije već djelovanja i drugih čimbenika. Također je potrebno razmotriti mogućnost promjenjenog lipidnog profila u bolesnika s pSS-om. Važno je naglasiti da naši bolesnici nisu bili liječeni većom dozom kortikosteroida, a primjena statina bila je slična u obje skupine [7 (14,6%) naspram 3 (6,5%), $p = 0,317$], tako da nije bilo značajnog farmakološkog utjecaja na razlike u lipidogramu među skupinama. Ovo potvrđuje rezultate Dayla i sur. da niže razine kolesterola nemaju zaštitni učinak na rizike ateroskleroze povezane s razinama homocisteina [173].

Također, homocistein je pozitivno korelirao s trigliceridima i s maksimalnim CIMT-om kao surogatnim biomarkerom ateroskleroze u bolesnika s pSS-om. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima koji su pokazali da su bolesnici s višim razinama triglicerida imali više razine homocisteina te veću prevalenciju zadebljanja arterijske stijenke [139]. Najnovija studija također je potvrdila progresivno povećanje prevalencije ateroskleroze karotidne arterije i debljine karotidne intime-medije ovisne o razinama homocisteina [174]. Naše je istraživanje pokazalo da je CIMT bio značajno viši u bolesnika s pSS u usporedbi s kontrolnom skupinom. Vadu i sur. te Gavrani i sur. Su također pokazali slične rezultate. Vadu i sur. su prvi uočili subklinička oštećenja kardiovaskularnih organa u pSS-u. Bolesnici s pSS-om imali su veću debljinu intime medija u odnosu na kontrolne ispitanike iste dobi. Gotovo polovica bolesnika je imala zadebljanje karotidne intime medija [136]. Gavrani i sur. našli su povećano zadebljanje arterijske stijenke u dvije trećine bolesnika s primarnim pSS-om, a prisutnost pSS-a bila je neovisni čimbenik rizika za zadebljanje arterijske stijenke [139].

Očekivano, CIMT je pozitivno korelirao sa SBP, što se može objasniti poznatim i prethodno opisanim učinkom SBP na endotel i proces ateroskleroze. Također je nađena

pozitivna korelacija s SSDDI i dobi. Očekujemo veći SSDDI u bolesnika s duljim trajanjem bolesti i težim kliničkim tijekom. Stoga bi ovaj podatak mogao značiti da duljina bolesti i klinički tijek, odnosno intenzivniji upalni proces, ubrzavaju razvoj ateroskleroze u bolesnika s pSS-om. Naime, poznato je da je u osoba s autoimunim bolestima odavno prepoznat povećan rizik od kardiovaskularnih bolesti što dodatno potkrepljuje naš zaključak. S druge strane, utvrđena je negativna korelacija CIMT sa specifičnim autoantitijelima Ro60 i autoantitijelima La. To bi govorilo u prilog protektivnoj ulozi spomenutih protutijela u razvoju ateroskleroze u bolesnika s pSS. Ovaj bi rezultat bio u skladu s istraživanjem koje je pokazalo da su anti-SSA/Ro pozitivni pacijenti imali manju učestalost arterijske hipertenzije, hiperkolesterolemije i hipertrigliceridemije u usporedbi s anti-SSA/Ro i SSB/La negativnim bolesnicima [161]. S druge strane, Vaudo et al. pokazali su značajnu povezanost anti SSA/Ro antitijela s arterijskim zadebljanjem [136] kao pokazateljem subkliničke ateroskleroze. Međutim, uloga ovih protutijela u procesu aterogeneze u ovih bolesnika je kontroverzna i zahtijeva daljnja istraživanja.

Budući da je ateroskleroza sustavna bolest, karotidna arterija također može poslužiti kao ‘prozor’ u stanje ateroskleroze [175]. Dakle, naši rezultati upućuju na to da bi se mjerenje CIMT-a moglo koristiti kao jednostavna i dostupna metoda za otkrivanje asimptomatske subkliničke sistemske ateroskleroze i na taj način spriječiti njezino napredovanje i fatalne KV ishode. Osim toga, homocistein se također može koristiti za otkrivanje subkliničke ateroskleroze, odnosno pokazuje potencijal kao jeftini marker za stratifikaciju rizika asimptomatskih bolesnika, a poznato je da pravovremenim preventivnim mjerama možemo smanjiti učestalost kardiovaskularnih incidenata i njihovih posljedica. S obzirom na korelaciju homocisteina i CIMT-a, to bi moglo poslužiti kao probir za upućivanje na daljnju ultrazvučnu procjenu. Primjena jeftinih i neinvazivnih metoda poput određivanja razine homocisteina i mjerenja CIMT-a omogućile bi prevenciju mortaliteta i morbiditeta povezanih s kardiovaskularnim bolestima. Međutim, za konačne zaključke potrebne su multicentrične studije na većem broju bolesnika.

Provedena istraživanja na kojima se temelji ova doktorska disertacija imaju nekoliko ograničenja. Prvo, relativno mala veličina uzorka može utjecati na rezultate. Međutim, treba uzeti u obzir da veličinu uzorka određuje ograničenost populacije bolesnika s dijagnosticiranim primarnim Sjögrenovim sindromom. Istraživanje se provelo u jednom kliničkom centru. Dakle, radi se o monocentričnom istraživanju. Nadalje, nije bilo moguće u

potpunosti isključiti sve zbunjujuće čimbenike koji bi mogli interferirati s dobivenim rezultatima a koji uključuju terapiju antihipertenzivima i hipolipemicima. Konačno, dizajn presječnog istraživanja sprječava nas u donošenju uzročno-posljedičnih zaključaka.

7. ZAKLJUČCI

Ovo je prva studija o adropinu u bolesnika s pSS-om koja je pokazala povećane razine adropina u serumu ovih bolesnika. Nadalje, razine adropina su bile negativno povezane sa stupnjem oštećenja u pSS-u. Što su niže bile vrijednosti adropina to je bilo veće oštećenje, odnosno SSDDI. Ova otkrića upućuju na to da pojačano oslobađanje adropina može biti uključeno u patogenezu pSS-a te da bi mogao imati zaštitnu ulogu u upalnom okruženju koje je sastavni dio svih autoimunih bolesti. Adropin je pokazao pozitivnu povezanost s anti SSA/Ro52 antitijelima što potkrepljuje imunomodulatorne učinke ovog peptida. Osim imunomodulatorne uloge, povezanost adropina s HDL-om nedvojbeno potvrđuje njegovu značajnu ulogu u metabolizmu lipida. Unatoč tome, potrebna su daljnja istraživanja s većim brojem ispitanika kako bi se utvrdila točna uloga adropina u pSS-u.

Također, ovo je prvo istraživanje koje je pokazalo da je homocistein, kao poznati čimbenik povećanog rizika ateroskleroze, neovisan čimbenik predviđanja pSS-a. Bolesnici s pSS-om imaju značajno veće razine homocisteina u usporedbi s kontrolnom skupinom, a homocistein je pozitivno povezan sa CIMT-om, ali i s trigliceridima. Ovi podatci nedvojbeno ukazuju na povećani rizik ateroskleroze a time i kardiovaskularnih događanja u bolesnika s pSS-om. Budući da su oba parametra biomarkeri (surogati) subkliničke ateroskleroze, njihova bi rutinska primjena u praćenju bolesnika s pSS-om mogla pomoći u ranoj dijagnozi ateroskleroze. To bi ujedno omogućilo pravovremeno poduzimanje preventivnih mjera s ciljem sprječavanja kroničnih oštećenja uzrokovanih ovim poremećajem. O međudjelovanju rizičnih čimbenika subkliničke ateroskleroze i autoimunih procesa ukazuje povezanost CIMT-a sa anti/SSA i anti/SSB antitijelima. Pored toga, bolesnici s pSS su imali veći broj aterosklerotskih plakova u odnosu na kontrolnu skupinu. No za konačne zaključke o ulozi homocisteina u pSS-u nužna su daljnja multicentrična istraživanja na većem broju bolesnika.

8. POPIS LITERATURE

1. Feltsan T, Stanko P, Mracna J. Sjögren's syndrome in present. Bratisl Lek Listy. 2012;113(8):514-6.
2. Brandt JE, Priori R, Valesini G, Fairweather D. Sex differences in Sjögren's syndrome: a comprehensive review of immune mechanisms. Biol Sex Differ. 2015;6:19.
3. Venables PJ. Sjögren's syndrome. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2004;18(3):313-29.
4. Daniels TE, Fox PC. Salivary and oral components of Sjogren's syndrome. Rheum Dis Clin North Am. 1992;18(3):571-89.
5. Stefanski AL, Tomiak C, Pleyer U, Dietrich T, Burmester GR, Dörner T. The Diagnosis and Treatment of Sjögren's Syndrome. Dtsch Arztebl Int. 2017;114(20):354-361.
6. Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR. Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. 10. izdanje. Philadelphia: Elsevier; 20173.
7. Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. J Autoimmun. 2010;35(3):219-24
8. Hammi AR, Al-Hashimi IH, Nunn ME, Zipp M. Assessment of SS-A and SS-B in parotid saliva of patients with Sjogren's syndrome. J Oral Pathol Med. 2005;34(4):198-203.
9. Fox RI. Sjogren's syndrome. Lancet. 2005;366(9482):321-31.
10. Kassan SS, Moutsopoulos HM. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjogren syndrome. Arch Intern Med. 2004;164(12):1275-84
11. Carubbi F, Alunno A, Conforti A, Riccucci I, Di Cola I, Bartoloni E, Gerli R. Characterisation of articular manifestations in primary Sjögren's syndrome: clinical and imaging features. Clin Exp Rheumatol. 2020;38 Suppl 126(4):166-173.
12. Haga HJ, Peen E. A study of the arthritis pattern in primary Sjogren's syndrome. Clin Exp Rheumatol. 2007;25(1):88-91.

13. Vitali C, Tavoni A, Neri R, Castrogiovanni P, Pasero G, Bombardieri S. Fibromyalgia features in patients with primary Sjögren's syndrome. Evidence of a relationship with psychological depression. *Scand J Rheumatol*. 1989;18(1):21-7.
14. Kittridge A, Routhouska SB, Korman NJ. Dermatologic manifestations of Sjögren syndrome. *J Cutan Med Surg*. 2011;15(1):8-14.
15. Rostron J, Rogers S, Longman L, Kaney S, Field EA. Health-related quality of life in patients with primary Sjögren's syndrome and xerostomia: a comparative study. *Gerodontology*. 2002;19(1):53-9.
16. Borić K, Perković D. Systemic manifestations of Sjögren's syndrome. *Reumatizam* [Internet]. 2021 [pristupljeno 01.03.2023.];68(2):61-68.
17. Maripuri S, Grande JP, Osborn TG, Fervenza FC, Matteson EL, Donadio JV, Hogan MC. Renal involvement in primary Sjögren's syndrome: a clinicopathologic study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(9):1423-31.
18. Aasarød K, Haga HJ, Berg KJ, Hammerstrøm J, Jørstad S. Renal involvement in primary Sjögren's syndrome. *QJM*. 2000;93(5):297-304.
19. Brito-Zerón P, Kostov B, Solans R, Fraile G, Suárez-Cuervo C, Casanovas A, Rascón FJ, Qanneta R, Pérez-Alvarez R, Ripoll M, Akasbi M, Pinilla B, Bosch JA, Nava-Mateos J, Díaz-López B, Morera-Morales ML, Gheitasi H, Retamozo S, Ramos-Casals M; SS Study Group, Autoimmune Diseases Study Group (GEAS), Spanish Society of Internal Medicine (SEMI). Systemic activity and mortality in primary Sjögren syndrome: predicting survival using the EULAR-SS Disease Activity Index (ESSDAI) in 1045 patients. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(2):348-55.
20. Flament T, Bigot A, Chaigne B, Henique H, Diot E, Marchand-Adam S. Pulmonary manifestations of Sjögren's syndrome. *Eur Respir Rev*. 2016;25(140):110-23.
21. Parke AL. Pulmonary manifestations of primary Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(4):907-20.
22. Parambil JG, Myers JL, Lindell RM, Matteson EL, Ryu JH. Interstitial lung disease in primary Sjogren syndrome. *Chest*. 2006;130(5):1489-95.

23. Mandl T, Ekberg O, Wollmer P, Manthorpe R, Jacobsson LT. Dysphagia and dysmotility of the pharynx and oesophagus in patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol*. 2007;36(5):394-401.
24. Delalande S, de Seze J, Fauchais AL, Hachulla E, Stojkovic T, Ferriby D, Dubucquoi S, Pruvo JP, Vermersch P, Hatron PY. Neurologic manifestations in primary Sjögren syndrome: a study of 82 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2004;83(5):280-291.
25. Fauchais AL, Magy L, Vidal E. Central and peripheral neurological complications of primary Sjögren's syndrome. *Presse Med*. 2012;41(9 Pt 2):e485-93.
26. Segal B, Carpenter A, Walk D. Involvement of nervous system pathways in primary Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(4):885-906.
27. Wu J, Chang X, Zhang J, Liu C, Liu M, Chen W. Clinical and laboratory features of primary Sjögren's syndrome complicated with mild to severe thrombocytopenia. *Ann Transl Med*. 2022;10(6):300.
28. Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in Sjögren's syndrome: risks, management, and prognosis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(4):921-33, viii.
29. Nishishinya MB, Pereda CA, Muñoz-Fernández S, Pego-Reigosa JM, Rúa-Figueroa I, Andreu JL, Fernández-Castro M, Rosas J, Loza Santamaría E. Identification of lymphoma predictors in patients with primary Sjögren's syndrome: a systematic literature review and meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2015;35(1):17-26.
30. Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Cervera R, Gaya J, Halperin I, Ubieta I, et al. Thyroid disease in primary Sjogren syndrome. Study in a series of 160 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79(2):103-8.
31. Marchesoni D, Mozzanega B, De Sandre P, Romagnolo C, Gambari P, Maggino T. Gynaecological aspects of primary Sjogren's syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1995;63(1):49-53.
32. Picone O, Alby C, Frydman R, Mariette X. [Sjögren syndrome in Obstetric and Gynecology: literature review]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2006;35(2):169-75.

33. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(6):554-8.
34. Lemp MA. Evaluation and differential diagnosis of keratoconjunctivitis sicca. *J Rheumatol Suppl.* 2000;61:11-4.
35. Kroese FGM, Haacke EA, Bombardieri M. The role of salivary gland histopathology in primary Sjögren's syndrome: promises and pitfalls. *Clin Exp Rheumatol.* 2018;36 Suppl 112(3):222-233.
36. Kalk WW, Vissink A, Spijkervet FK, Bootsma H, Kallenberg CG, Nieuw Amerongen AV. Sialometry and sialochemistry: diagnostic tools for Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(12):1110-6.
37. Kalk WW, Vissink A, Spijkervet FK, Bootsma H, Kallenberg CG, Roodenburg JL. Parotid sialography for diagnosing Sjogren syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(1):131-7.
38. Aoun G, Nasseh I, Berberi A. Evaluation of the oral component of Sjögren's syndrome: An overview. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016;6(4):278-84.
39. Vinagre F, Santos MJ, Prata A, da Silva JC, Santos AI. Assessment of salivary gland function in Sjogren's syndrome: the role of salivary gland scintigraphy. *Autoimmun Rev.* 2009;8(8):672-6.
40. Vitali C, Bootsma H, Bowman SJ, Dorner T, Gottenberg JE, Mariette X, Ramos-Casals M, Ravaud P, Seror R, Theander E, Tzioufas AG. Classification criteria for Sjogren's syndrome: we actually need to definitively resolve the long debate on the issue. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(4):476-8.
41. Elkon KB, Gharavi AE, Hughes GR, Moutsopoulos HM. Autoantibodies in the sicca syndrome (primary Sjögren's syndrome). *Ann Rheum Dis.* 1984;43(2):243-5.
42. Baer AN, McAdams DeMarco M, Shiboski SC, Lam MY, Challacombe S, Daniels TE, Dong Y, Greenspan JS, Kirkham BW, Lanfranchi HE, Schiødt M, Srinivasan M, Umehara H, Vivino FB, Vollenweider CF, Zhao Y, Criswell LA, Shiboski CH; Sjögren's International

Collaborative Clinical Alliance (SICCA) Research Groups. The SSB-positive/SSA-negative antibody profile is not associated with key phenotypic features of Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(8):1557-61.

43. Venables PJ, Shattles W, Pease CT, et al. Anti-La (SS-B): a diagnostic criterion for Sjögren's syndrome? *Clin Exp Rheumatol*. 1989;7(2):181-184.

44. Theander E, Jonsson R, Sjöström B, Brokstad K, Olsson P, Henriksson G. Prediction of Sjögren's Syndrome Years Before Diagnosis and Identification of Patients With Early Onset and Severe Disease Course by Autoantibody Profiling. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(9):2427-36.

45. Jonsson R, Theander E, Sjöström B, Brokstad K, Henriksson G. Autoantibodies present before symptom onset in primary Sjögren syndrome. *JAMA*. 2013;310(17):1854-5.

46. Keene JD. Molecular structure of the La and Ro autoantigens and their use in autoimmune diagnostics. *J Autoimmun*. 1989;2(4):329-34.

47. Espinosa A, Zhou W, Ek M, Hedlund M, Brauner S, Popovic K, et al. The Sjogren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death. *J Immunol*. 2006;176(10):6277-85.

48. Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, Ambrosi A, Higgs R, Quintana FJ, Sjöstrand M, et al. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by disregulating the IL-23-Th17 pathway. *J Exp Med*. 2009;206(8):1661-71.

49. Manoussakis MN, Pange PJ, Moutsopoulos HM. Profil' autoantitel pri sindrome Shegrena [The autoantibody profile in Sjögren's syndrome. *Ter Arkh*. 1988;60(4):17-20.

50. Mavragani CP, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoantibodies to cellular antigens. Clinical and molecular aspects. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;123(1):46-57.

51. Ramos-Casals M, Solans R, Rosas J, Camps MT, Gil A, Del Pino-Montes J, Calvo-Alen J, Jiménez-Alonso J, Micó ML, Beltrán J, Belenguier R, Pallarés L; GEMESS Study Group. Primary Sjögren syndrome in Spain: clinical and immunologic expression in 1010 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2008;87(4):210-219.

52. Davidson BK, Kelly CA, Griffiths ID. Primary Sjögren's syndrome in the North East of England: a long-term follow-up study. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38(3):245-53.
53. Bournia VK, Vlachoyiannopoulos PG. Subgroups of Sjögren syndrome patients according to serological profiles. *J Autoimmun*. 2012;39(1-2):15-26.
54. Fayyaz A, Kurien BT, Scofield RH. Autoantibodies in Sjögren's Syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2016;42(3):419-34.
55. Seror R, Ravaud P, Bowman SJ, Baron G, Tzioufas A, Theander E, Gottenberg JE, Bootsma H, Mariette X, Vitali C; EULAR Sjögren's Task Force. EULAR Sjogren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(6):1103-9.
56. Vitali C, Palombi G, Baldini C, Benucci M, Bombardieri S, Covelli M, Del Papa N, De Vita S, Epis O, Franceschini F, Gerli R, Govoni M, Bonghi SM, Maglione W, Migliaresi S, Montecucco C, Orefice M, Priori R, Tavoni A, Valesini G. Sjögren's Syndrome Disease Damage Index and disease activity index: scoring systems for the assessment of disease damage and disease activity in Sjögren's syndrome, derived from an analysis of a cohort of Italian patients. *Arthritis Rheum*. 2007;56(7):2223-31.
57. Kanter JE, Kramer F, Barnhart S, Averill MM, Vivekanandan-Giri A, Vickery T, Li LO, Becker L, Yuan W, Chait A, Braun KR, Potter-Perigo S, Sanda S, Wight TN, Pennathur S, Serhan CN, Heinecke JW, Coleman RA, Bornfeldt KE. Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(12):E715-24.
58. Zhu Y, Xian X, Wang Z, Bi Y, Chen Q, Han X, Tang D, Chen R. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules*. 2018;8(3):80.
59. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
60. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-25.
61. [Global Health Estimates 2020](#): Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2019. Geneva, World Health Organization, 2020

62. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, et al: American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2021;143(8):e254-e743.
63. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104(4):503-16.
64. White J, Swerdlow DI, Preiss D, Fairhurst-Hunter Z, Keating BJ, Asselbergs FW, Sattar N, Humphries SE, Hingorani AD, Holmes MV. Association of Lipid Fractions With Risks for Coronary Artery Disease and Diabetes. *JAMA Cardiol*. 2016;1(6):692-9.
65. Emerging Risk Factors Collaboration; Erqou S, Kaptoge S, Perry PL, Di Angelantonio E, Thompson A, White IR, Marcovina SM, Collins R, Thompson SG, Danesh J. Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA*. 2009;302(4):412-23.
66. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, et al: CHARGE Extracoronary Calcium Working Group. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2013;368(6):503-12.
67. Wang L, Jin F, Wang P, Hou S, Jin T, Chang X, Zhao L. Adropin Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Osteogenic Differentiation to Alleviate Vascular Calcification via the JAK2/STAT3 Signaling Pathway. *Biomed Res Int*. 2022;2022:9122264.
68. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1177-8.
69. Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36.
70. Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1992;267(22):15274-6.

71. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1992;90(5):2092-6.
72. Kuchan MJ, Frangos JA. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol.* 1994;266(3 Pt 1):C628-36.
73. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986;315(17):1046-51.
74. Kumar KG, Trevaskis JL, Lam DD, Sutton GM, Koza RA, Chouljenko VN, Kousoulas KG, Rogers PM, Kesterson RA, Thearle M, Ferrante AW Jr, Mynatt RL, Burris TP, Dong JZ, Halem HA, Culler MD, Heisler LK, Stephens JM, Butler AA. Identification of adropin as a secreted factor linking dietary macronutrient intake with energy homeostasis and lipid metabolism. *Cell Metab.* 2008;8(6):468-81.
75. Butler AA, Zhang J, Price CA, Stevens JR, Graham JL, Stanhope KL, King S, Krauss RM, Bremer AA, Havel PJ. Low plasma adropin concentrations increase risks of weight gain and metabolic dysregulation in response to a high-sugar diet in male nonhuman primates. *J Biol Chem.* 2019;294(25):9706-9719.
76. Yolbas S, Kara M, Kalayci M, Yildirim A, Gundogdu B, Aydin S, Koca SS. ENHO gene expression and serum adropin level in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Adv Clin Exp Med.* 2018;27(12):1637-1641.
77. Butler AA, Tam CS, Stanhope KL, Wolfe BM, Ali MR, O'Keeffe M, St-Onge MP, Ravussin E, Havel PJ. Low circulating adropin concentrations with obesity and aging correlate with risk factors for metabolic disease and increase after gastric bypass surgery in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(10):3783-91.
78. Ali II, D'Souza C, Singh J, Adeghate E. Adropin's Role in Energy Homeostasis and Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci.* 2022;23(15):8318.
79. Banerjee S, Ghoshal S, Girardet C, DeMars KM, Yang C, Niehoff ML, Nguyen AD, Jayanth P, Hoelscher BA, Xu F, Banks WA, Hansen KM, Zhang J, Candelario-Jalil E, Farr

- SA, Butler AA. Adropin correlates with aging-related neuropathology in humans and improves cognitive function in aging mice. *NPJ Aging Mech Dis.* 2021;7(1):23.
80. Mushala BAS, Scott I. Adropin: a hepatokine modulator of vascular function and cardiac fuel metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021;320(1):H238-H244.
81. Ganesh Kumar K, Zhang J, Gao S, Rossi J, McGuinness OP, Halem HH, Culler MD, Mynatt RL, Butler AA. Adropin deficiency is associated with increased adiposity and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20(7):1394-402.
82. Sayegh M, Farquharson A, Horgan G, Gray SR, Thies F, Ranawana V, et al. Determinants of plasma adropin associated with metabolic control and links to lipid and glucose homeostasis. *Proceedings of the Nutrition Society. Cambridge University Press;* 2020;79(OCE3):E745
83. Yu HY, Zhao P, Wu MC, Liu J, Yin W. Serum adropin levels are decreased in patients with acute myocardial infarction. *Regul Pept.* 2014;190-191:46-9.
84. Yosae S, Khodadost M, Esteghamati A, Speakman JR, Shidfar F, Nazari MN, Bitarafan V, Djafarian K. Metabolic Syndrome Patients Have Lower Levels of Adropin When Compared With Healthy Overweight/Obese and Lean Subjects. *Am J Mens Health.* 2017;11(2):426-434.
85. Zang H, Jiang F, Cheng X, Xu H, Hu X. Serum adropin levels are decreased in Chinese type 2 diabetic patients and negatively correlated with body mass index. *Endocr J.* 2018;65(7):685-691.
86. Choi HN, Yim JE. Plasma Adropin as a Potential Marker Predicting Obesity and Obesity-associated Cancer in Korean Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *J Cancer Prev.* 2018;23(4):191-6.
87. Lovren F, Pan Y, Quan A, Singh KK, Shukla PC, Gupta M, Al-Omran M, Teoh H, Verma S. Adropin is a novel regulator of endothelial function. *Circulation.* 2010;122(11 Suppl):S185-92.
88. Niepolski L, Grzegorzewska AE. Salusins and adropin: New peptides potentially involved in lipid metabolism and atherosclerosis. *Adv Med Sci.* 2016;61(2):282-7.

89. Zhao LP, You T, Chan SP, Chen JC, Xu WT. Adropin is associated with hyperhomocysteine and coronary atherosclerosis. *Exp Ther Med*. 2016;11(3):1065-1070.
90. Wu L, Fang J, Chen L, Zhao Z, Luo Y, Lin C, Fan L. Low serum adropin is associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetic and non-diabetic patients. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(5):751-8.
91. Boric-Skaro D, Mizdrak M, Luketin M, Martinovic D, Tokic D, Vilovic M, Supe-Domic D, Kurir TT, Bozic J. Serum Adropin Levels in Patients on Hemodialysis. *Life (Basel)*. 2021;11(4):337.
92. Ghoshal S, Stevens JR, Billon C, Girardet C, Sitaula S, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Rankinen T, Bouchard C, et al. Adropin: An endocrine link between the biological clock and cholesterol homeostasis. *Mol Metab*. 2018;8:51-64.
93. Aydin S. Three new players in energy regulation: preptin, adropin and irisin. *Peptides*. 2014; 56:94-110.
94. Ali II, D'Souza C, Singh J, Adeghate E. Adropin's Role in Energy Homeostasis and Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15):8318.
95. Yolbas S, Kara M, Yilmaz M, Aydin S, Koca SS. Serum adropin level and ENHO gene expression in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2016;35(6):1535-40.
96. Sena CM, Pereira AM, Seiça R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(12):2216-31.
97. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*. 2001;85(3):342-50.
98. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Lüscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91(5):1314-9.
99. Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, Kearney MT. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med*. 2003;20(4):255-68.

100. Daiber A, Xia N, Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, Münzel T, Li H. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(1):187.
101. Gu X, Li H, Zhu X, Gu H, Chen J, Wang L, Harding P, Xu W. Inverse Correlation Between Plasma Adropin and ET-1 Levels in Essential Hypertension: A Cross-Sectional Study. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(40):e1712.
102. Gulen B, Eken C, Kucukdagli OT, Serinken M, Kocyigit A, Kılıc E, Uyarel H. Adropin levels and target organ damage secondary to high blood pressure in the ED. *Am J Emerg Med.* 2016;34(11):2061-2064.
103. Çelik HT, Akkaya N, Erdamar H, Gok S, Kazanci F, Demircelik B, Cakmak M, Yigitoglu R. The Effects of Valsartan and Amlodipine on the Levels of Irisin, Adropin, and Perilipin. *Clin Lab.* 2015;61(12):1889-95.
104. Sato K, Yamashita T, Shirai R, Shibata K, Okano T, Yamaguchi M, Mori Y, Hirano T, Watanabe T. Adropin Contributes to Anti-Atherosclerosis by Suppressing Monocyte-Endothelial Cell Adhesion and Smooth Muscle Cell Proliferation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5):1293.
105. Fujie S, Hasegawa N, Sato K, Fujita S, Sanada K, Hamaoka T, Iemitsu M. Aerobic exercise training-induced changes in serum adropin level are associated with reduced arterial stiffness in middle-aged and older adults. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(10):H1642-7.
106. Zhang H, Jiang L, Yang YJ, Ge RK, Zhou M, Hu H, Liu H, Cui J, Li LL, Dong YF, Cheng XS, Chen R, Li P. Aerobic exercise improves endothelial function and serum adropin levels in obese adolescents independent of body weight loss. *Sci Rep.* 2017;7(1):17717.
107. Akcilar R, Kocak FE, Simsek H, Akcilar A, Bayat Z, Ece E, Kokdasgil H. Antidiabetic and hypolipidemic effects of adropin streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Bratisl Lek Listy.* 2016;117(2):100-5.
108. Simac P, Perkovic D, Bozic I, Bilopavlovic N, Martinovic D, Bozic J. Serum Adropin Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Life (Basel).* 2022;12(2):169.

109. Jaszszwili M, Billert M, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Adropin as A Fat-Burning Hormone with Multiple Functions-Review of a Decade of Research. *Molecules*. 2020;25(3):549.
110. Bozic J, Kumric M, Ticinovic Kurir T, Males I, Borovac JA, Martinovic D, Vilovic M. Role of Adropin in Cardiometabolic Disorders: From Pathophysiological Mechanisms to Therapeutic Target. *Biomedicines*. 2021;9(10):1407.
111. Fowler B. Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Semin Vasc Med*. 2005;5(2):77-86.
112. Bendini MG, Lanza GA, Mazza A, Giordano A, Leggio M, Menichini G, De Cristofaro R, Moriconi E, Cozzari L, Farina SM, Giordano G Fattori di rischio delle malattie cardiovascolari: esiste ancora un ruolo per l'omocisteina? *G Ital Cardiol* 2007;8(3):148-160.
113. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr*. 1992;12:279-98.
114. World Health Organization. Prevention of Cardiovascular Disease Guidelines for Assessment and Management of Cardiovascular Risk WHO Library Cataloguing-in-Publication Dana; 2007 (ažurirano 2012; citirano 23. veljače 2023) Dostupno.
115. Weiss N, Keller C, Hoffmann U, Loscalzo J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med*. 2002;7(3):227-39.
116. Eren E, Yilmaz N, Aydin O. High density lipoprotein and it's dysfunction. *Open Biochem J*. 2012; 6:78-93.
117. Nedvetsky PI, Sessa WC, Schmidt HH. There's NO binding like NOS binding: protein-protein interactions in NO/cGMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):16510-2.
118. Goligorsky MS, Li H, Brodsky S, Chen J. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283(1):F1-10.
119. Jin L, Abou-Mohamed G, Caldwell RB, Caldwell RW. Endothelial cell dysfunction in a model of oxidative stress. *Med Sci Monit*. 2001;7(4):585-91.

120. Su SJ, Huang LW, Pai LS, Liu HW, Chang KL. Homocysteine at pathophysiologic concentrations activates human monocyte and induces cytokine expression and inhibits macrophage migration inhibitory factor expression. *Nutrition*. 2005;21(10):994-1002.
121. Wilson CP, McNulty H, Scott JM, Strain JJ, Ward M. Postgraduate Symposium: The MTHFR C677T polymorphism, B-vitamins and blood pressure. *Proc Nutr Soc*. 2010;69(1):156-65.
122. Wald DS, Wald NJ, Morris JK, Law M. Folic acid, homocysteine, and cardiovascular disease: judging causality in the face of inconclusive trial evidence. *BMJ*. 2006;333(7578):1114-7.
123. Sabio JM, Vargas-Hitos JA, Martinez-Bordonado J, Navarrete-Navarrete N, Díaz-Chamorro A, Olvera-Porcel C, Zamora-Pasadas M, Jiménez-Alonso J. Relationship between homocysteine levels and hypertension in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66(10):1528-35.
124. Van Doornum S, McColl G, Wicks IP. Accelerated atherosclerosis: an extraarticular feature of rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum*. 2002;46(4):862-73.
125. Roman MJ, Shanker BA, Davis A, Lockshin MD, Sammaritano L, Simantov R, Crow MK, Schwartz JE, Paget SA, Devereux RB, Salmon JE. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2003;349(25):2399-406.
126. Manavathongchai S, Bian A, Rho YH, Oeser A, Solus JF, Gebretsadik T, Shintani A, Stein CM. Inflammation and hypertension in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2013;40(11):1806-11.
127. Hernanz A, Plaza A, Martín-Mola E, De Miguel E. Increased plasma levels of homocysteine and other thiol compounds in rheumatoid arthritis women. *Clin Biochem*. 1999;32(1):65-70.
128. Hahn BH. Systemic lupus erythematosus and accelerated atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2003;349(25):2379-80.

129. Belibou C, Ancuța C, Ancuța E, Filoș C, Chirieac R. Carotid intima-media thickness and plaque as surrogate biomarkers of atherosclerosis among consecutive women with systemic lupus erythematosus. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(1):29-34.
130. Bots ML, Dijk JM, Oren A, Grobbee DE. Carotid intima-media thickness, arterial stiffness and risk of cardiovascular disease: current evidence. *J Hypertens.* 2002;20(12):2317-25.
131. Durga J, Verhoef P, Bots ML, Schouten E. Homocysteine and carotid intima-media thickness: a critical appraisal of the evidence. *Atherosclerosis.* 2004;176(1):1-19.
132. Heiss G, Sharrett AR, Barnes R, Chambless LE, Szklo M, Alzola C. Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: associations with cardiovascular risk factors in the ARIC study. *Am J Epidemiol.* 1991;134(3):250-6.
133. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2007;115(4):459-67.
134. Taylor AJ, Kent SM, Flaherty PJ, Coyle LC, Markwood TT, Vernalis MN. ARBITER: Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol: a randomized trial comparing the effects of atorvastatin and pravastatin on carotid intima medial thickness. *Circulation.* 2002;106(16):2055-60.
135. Bots ML, Dijk JM, Oren A, Grobbee DE. Carotid intima-media thickness, arterial stiffness and risk of cardiovascular disease: current evidence. *J Hypertens.* 2002;20(12):2317-25.
136. Vaudo G, Bocci EB, Shoenfeld Y, Schillaci G, Wu R, Del Papa N, Vitali C, Delle Monache F, Marchesi S, Mannarino E, Gerli R. Precocious intima-media thickening in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2005;52(12):3890-7.
137. Akyel A, Tavil Y, Yayla C, Tufan A, Kaya A, Tezcan ME, Ozturk MA, Boyaci B. Endothelial dysfunction in primary Sjögren syndrome. *West Indian Med J.* 2012;61(9):870-2.

138. Zardi EM, Sambataro G, Basta F, Margiotta DP, Afeltra AM. Subclinical carotid atherosclerosis in elderly patients with primary Sjögren syndrome: a duplex Doppler sonographic study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014;27(4):645-51.
139. Gravani F, Papadaki I, Antypa E, Nezos A, Masselou K, Ioakeimidis D, Koutsilieris M, Moutsopoulos HM, Mavragani CP. Subclinical atherosclerosis and impaired bone health in patients with primary Sjogren's syndrome: prevalence, clinical and laboratory associations. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):99.
140. Markus H, Kapozsta Z, Ditrich R, Wolfe C, Ali N, Powell J, Mendell M, Cullinane M. Increased common carotid intima-media thickness in UK African Caribbeans and its relation to chronic inflammation and vascular candidate gene polymorphisms. *Stroke*. 2001;32(11):2465-71.
141. Durga J, Bots ML, Schouten EG, Kok FJ, Verhoef P. Low concentrations of folate, not hyperhomocysteinemia, are associated with carotid intima-media thickness. *Atherosclerosis*. 2005;179(2):285-92.
142. Inamoto N, Katsuya T, Kokubo Y, Mannami T, Asai T, Baba S, Ogata J, Tomoike H, Ogiwara T. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism with carotid atherosclerosis depending on smoking status in a Japanese general population. *Stroke*. 2003;34(7):1628-33.
143. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-47.
144. European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens*. 2003;21(6):1011-53.
145. Stergiou GS, Salgami EV; World Health Organization-International Society of Hypertension (WHO-ISH); USA Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC-7); European Society of Hypertension-European Society of Cardiology (ESH-ESC). New European, American and

International guidelines for hypertension management: agreement and disagreement. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2004;2(3):359-68.

146. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 2011;8(10):785-6.

147. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation.* 2003;108(17):2054-9.

148. Celik A, Balin M, Kobat MA, Erdem K, Baydas A, Bulut M, Altas Y, Aydin S, Aydin S. Deficiency of a new protein associated with cardiac syndrome X; called adropin. *Cardiovasc Ther.* 2013;31(3):174-8.

149. Wanchu A, Khullar M, Sud A, Bambery P. Elevated nitric oxide production in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol.* 2000;19(5):360-4.

150. Couffignal T, Dupl a C, Moreau C, Lamazi re JM, Bonnet J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1994;74, 25–34.

151. Lee HM, Kim HJ, Won KJ, Choi WS, Park SH, Song H, Park PJ, Park TK, Lee CK, Kim B. Soluble form of vascular cell adhesion molecule 1 induces migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res.* 2008;45(3):259-68.

152. Konttinen YT, Platts LA, Tuominen S, Eklund KK, Santavirta N, T rnwall J, Sorsa T, Hukkanen M, Polak JM. Role of nitric oxide in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1997;40(5):875-83.

153. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;34(6):879-86.

154. Akcılar R, Emel Koçak F, Şimşek H, Akcılar A, Bayat Z, Ece E, K kdaşgil H. The effect of adropin on lipid and glucose metabolism in rats with hyperlipidemia. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19(3):245-51.

155. Argyropoulou OD, Tzioufas AG. Common and rare forms of vasculitis associated with Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2020;32(1):21-28.

156. Bozic J, Borovac JA, Galic T, Kurir TT, Supe-Domic D, Dogas Z. Adropin and Inflammation Biomarker Levels in Male Patients With Obstructive Sleep Apnea: A Link With Glucose Metabolism and Sleep Parameters. *J Clin Sleep Med*. 2018;14(7):1109-1118.
157. Brnić D, Martinovic D, Zivkovic PM, Tokic D, Tadin Hadjina I, Rusic D, Vilovic M, Supe-Domic D, Tonkic A, Bozic J. Serum adropin levels are reduced in patients with inflammatory bowel diseases. *Sci Rep*. 2020;10(1):9264.
158. Kuliczowska-Płaksej J, Mierzwicka A, Jończyk M, Stachowska B, Urbanovych A, Bolanowski M. Adropin in women with polycystic ovary syndrome. *Endokrynol Pol*. 2019;70(2):151-6.
159. Tičinović Kurir T, Miličević T, Novak A, Vilović M, Božić J. Adropin—Potential Link in Cardiovascular Protection for Obese Male Type 2 Diabetes Mellitus Patients Treated with Liraglutide. *Acta Clin Croat*. 2020;59(2):344-350.
160. Retamozo S, Akasbi M, Brito-Zerón P, Bosch X, Bove A, Perez-de-Lis M, Jimenez I, Soto-Cardenas MJ, Gandia M, Diaz-Lagares C, Viñas O, Siso A, Perez-Alvarez R, Yague J, Ramos-Casals M. Anti-Ro52 antibody testing influences the classification and clinical characterisation of primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(5):686-92.
161. Bartoloni E, Baldini C, Schillaci G, Quartuccio L, Priori R, Carubbi F, Bini V, Alunno A, Bombardieri S, De Vita S, Valesini G, Giacomelli R, Gerli R. Cardiovascular disease risk burden in primary Sjögren's syndrome: results of a population-based multicentre cohort study. *J Intern Med*. 2015;278(2):185-92.
162. Salmon JE, Roman MJ. Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. 2008;121(10 Suppl 1):S3-8.
163. Shoenfeld Y, Gerli R, Doria A, Matsuura E, Cerinic MM, Ronda N, Jara LJ, Abu-Shakra M, Meroni PL, Sherer Y. Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases. *Circulation*. 2005;112(21):3337-47.
164. Sabio JM, Sánchez-Berná I, Martínez-Bordonado J, Vargas-Hitos JA, Navarrete-Navarrete N, Expósito Ruíz M, Jiménez-Alonso J. Prevalence of and factors associated with

increased arterial stiffness in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015;67(4):554-62.

165. Li L, Xie W, Zheng XL, Yin WD, Tang CK. A novel peptide adropin in cardiovascular diseases. *Clin Chim Acta*. 2016;453:107-13.

166. Lim U, Cassano PA. Homocysteine and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Epidemiol*. 2002;156(12):1105-13.

167. Sundström J, Sullivan L, D'Agostino RB, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH, Wilson PW, Levy D, Vasan RS. Plasma homocysteine, hypertension incidence, and blood pressure tracking: the Framingham Heart Study. *Hypertension*. 2003;42(6):1100-5.

168. Onyemelukwe OU, Maiha BB. Relationship between plasma homocysteine and blood pressure in hypertensive Northern-Nigerians. *Afr Health Sci*. 2020;20(1):324-337.

169. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 1998;338(15):1042-50.

170. Sen U, Mishra PK, Tyagi N, Tyagi SC. Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension. *Cell Biochem Biophys*. 2010;57(2-3):49-58.

171. Samouillan V, Lamy E, Dandurand J, Foucault-Bertaud A, Chareyre C, Lacabanne C, Charpiot P. Changes in the physical structure and chain dynamics of elastin network in homocysteine-cultured arteries. *J Biomed Mater Res A*. 2010;93(2):696-703.

172. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(14):6369-73.

173. Daly C, Fitzgerald AP, O'Callaghan P, Collins P, Cooney MT, Graham IM; COMAC Group. Homocysteine increases the risk associated with hyperlipidaemia. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009;16(2):150-5.

174. Chen A, Wu W, Gong J, Han Y, Xu G, Xie L. Association of homocysteine with carotid atherosclerosis in hypertension. *J Hum Hypertens*. 2023;37(3):227-234.

175. Kurt T, Gokmen F, Adam G, Ozcan S, Ozbudak E, Akbal A, Temiz A, Sacar M. How important is early diagnosis of subclinical atherosclerosis in primary Sjögren's syndrome patients. *Acta Med. Mediter.* 2015;31(3):741-9.

9. SAŽETAK

Uvod: Bolesnici s pSS-om imaju povećanu prevalenciju endotelne disfunkcije i preuranjene ateroskleroze, a posljednjih godina je u fokusu istraživanja subklinička ateroskleroza u bolesnika s autoimunim bolestima. Nedavno je otkriven adropin, sekretorni protein koji ima značajnu ulogu u regulaciji metabolizama lipida i inzulinskoj rezistenciji, a isto tako ispoljava pozitivan učinak na funkciju endotelnih stanica te ima protuupalni učinak. Povišene razine homocisteina pokazale su se kao jak i neovisan čimbenik kardiovaskularnog rizika u zdravoj populaciji. Homocistein se pokazao i kao neovisan faktor rizika za razvoj subkliničke ateroskleroze. Korištenje CIMT-a, valjanog markera generalizirane ateroskleroze i rizika od vaskularne bolesti, može pomoći u identificiranju visokorizičnih bolesnika sa subkliničkom aterosklerozom.

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti razine adropina i homocisteina te CIMT-a u bolesnika s pSS-om u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nadalje, ciljevi su bili istražiti povezanosti između adropina, homocisteina i CIMT-a s imunološkim parametarima u pSS-u, uključujući protutijela specifična za bolest, EULAR-ov indeks aktivnosti bolesti u Sjögrenovom sindromu (ESSDAI) i indeks oštećenja bolesti u Sjögrenovom sindromu (SSDDI).

Metode: U ovom presječnom istraživanju uključeno je 52 bolesnika s pSS-om i 52 ispitanika u kontrolnoj skupini usporedni s ispitivanom grupom po dobi, spolu, pušenju i ITM-u. Za dio istraživanja o homocisteinu uključeno je 48 bolesnika s pSS-om i 46 ispitanika u kontrolnoj skupini. Demografske varijable i klasični čimbenici kardiovaskularnog rizika: hipertenzija, dislipidemija, pretilost i navika pušenja procijenjeni su u obje skupine, a također su kliničkim pregledom i intervjuem prikupljene značajke povezane s bolešću u bolesnika s pSS-om. Za procjenu aktivnosti bolesti i kroničnog oštećenja su korišteni ESSDAI te SSDDI. Za analizu adropina je korištena enzimatska imunoanaliza (ELISA). Koncentracija homocisteina u serumu mjerena je korištenjem kemiluminiscentnog imunološkog testa mikročestica (CMIA). Prisutnost subkliničke ateroskleroze određena je CIMT-om procijenjenim ultrazvukom karotida.

Rezultati: Bolesnici s pSS-om imaju značajno više razine adropina u usporedbi s kontrolnom skupinom ($3,76 \pm 0,68$ naspram $3,14 \pm 0,69$ ng/mL, $p < 0,001$). Razine adropina u bolesnika s pSS-om su pozitivno povezane s HDL-om ($r = 0,290$, $p = 0,036$) i anti SSA/Ro52 antitijelima ($r = 0,307$, $p = 0,026$) te negativno povezane sa SSDDI ($r = -0,401$, $p = 0,003$).

Multivarijantna linearna regresija pokazala je da su razine adropina neovisno povezane s HDL-om ($\beta \pm SE$, $0,903 \pm 0,283$, $p = 0,002$) i SSDDI ($\beta \pm SE$, $-0,202 \pm 0,073$, $p = 0,008$).

Arterijski tlak je bio viši u bolesnika s pSS-om ($p = 0,007$) za sistolički krvni tlak (SBD) i ($p = 0,018$) za dijastolički krvni tlak (DBP). Suprotno od očekivanog, ukupni kolesterol (TC) bio je veći u kontrolnoj skupini ($p = 0,047$). Vrijednosti homocisteina bile su značajno veće u pacijenata s pSS-om ($p=0,015$), kao i CIMT ($p=0,0372$). Homocistein je pozitivno korelirao s trigliceridima (TG) ($r=0,204$, $p=0,048$) i CIMT-om ($r= 0,231$, $p=0,046$). CIMT je pozitivno povezan s dobi ($r=0,416$, $p<0,0001$), SBP ($r=0,293$, $r=0,004$) i s indeksom oštećenja u Sjögrenovom sindromu (SSDDI) ($r=0,351$, $p=0,014$). Također je negativno korelirao s autoantitijelima specifičnim za Sjögrenov sindrom anti SSA/Ro60 ($r= -0,431$, $p=0,002$) i anti SSB/La ($r= -0,346$, $p=0,016$).

Zaključak: Naše istraživanje ukazuje da bolesnici s pSS-om imaju povećani rizik za subkliničku aterosklerozu te da bi adropin mogao biti uključen u patofiziologiju pSS-a i navedene procese djelujući protektivno na endotel. Također smo pokazali da postoji značajna povezanost između subkliničkog aterosklerotskog procesa i homocisteina. Homocistein bi mogao biti jeftini i dostupan marker za stratifikaciju rizika razvoja subkliničke ateroskleroze u asimptomatskih bolesnika. Ovi rezultati upućuju da bi uključivanje određivanja razina adropina i homocisteina u plazmi u protokole za smanjenje rizika moglo biti relevantno za identifikaciju pojedinaca s većim rizikom od aterosklerotskih događaja. U konačnici bi to omogućilo pravovremeno poduzimanje preventivnih mjera kojima bi se navedeni rizici smanjili.

Ključne riječi: primarni Sjögren-ov sindrom, subklinička ateroskleroza, endotelna disfunkcija, adropin, homocistein, CIMT, anti SSA/Ro antitijela, anti SSB/La antitijela, SSDDI, ESSDAI

10. SUMMARY

Background: Patients with pSS have an increased prevalence of endothelial dysfunction and premature atherosclerosis, and in recent years the focus of research has been on subclinical atherosclerosis in patients with autoimmune diseases. Recently, adropin was discovered, a secretory protein that plays a significant role in the regulation of lipid metabolism and insulin resistance, and also has a positive effect on the function of endothelial cells and has an anti-inflammatory effect. Elevated homocysteine levels have been shown to be a strong and independent cardiovascular risk factor in a healthy population. Homocysteine has also been shown to be an independent risk factor for the development of subclinical atherosclerosis. The use of CIMT, a valid marker of generalized atherosclerosis and risk of vascular disease, may help identify high-risk patients with subclinical atherosclerosis.

Objective: The aim of this study was to determine the level of adropin and homocysteine and CIMT values in patients with pSS compared to healthy controls. Additional objectives were to investigate the correlation between adropin, homocysteine and CIMT with immunological parameters in pSS as disease-specific antibodies, EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI) and Sjögren's syndrome disease damage index (SSDDI).

Methods: In this cross-sectional study, 52 patients with pSS and 52 subjects in the control group were included, comparable in terms of age, sex, smoking and BMI. For the homocysteine part of the study, 48 patients with pSS and 46 subjects in the control group were included. Demographic variables and classic cardiovascular risk factors: hypertension, dyslipidemia, obesity and smoking habits were assessed in both groups, and features associated with the disease in the pSS group were also collected through clinical examination and interviews. ESSDAI and SSDDI were used to assess disease activity and chronic disease damage. Enzyme immunoassay (ELISA) was used to analyze adropin. Serum homocysteine concentration was measured using a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA). The presence of subclinical atherosclerosis was determined by CIMT assessed by carotid ultrasound.

Results: Patients with pSS have significantly higher adropin levels compared to controls (3.76 ± 0.68 vs. 3.14 ± 0.69 ng/mL, $p < 0.001$). Adropin levels in patients with pSS are positively correlated with HDL ($r = 0.290$, $p = 0.036$) and anti SSA/Ro52 antibodies ($r = 0.307$, $p = 0.026$) and negatively correlated with SSDDI ($r = -0.401$, $p = 0.003$). Multivariate linear regression showed that adropin levels were independently associated with HDL ($\beta \pm SE$, 0.903 ± 0.283 , $p = 0.002$) and SSDDI ($\beta \pm SE$, -0.202 ± 0.073 , $p = 0.008$).

Arterial pressure was higher in patients with pSS ($p = 0.007$) for systolic blood pressure (SBP) and ($p = 0.018$) for diastolic blood pressure (DBP). Contrary to expectation, total cholesterol (TC) was higher in the control group ($p = 0.047$). Homocysteine values were significantly higher in patients with pSS ($p=0.015$), as well as CIMT ($p = 0.0372$). Homocysteine positively correlated with triglycerides (TG) ($r = 0.204$, $p = 0.048$) and CIMT ($r= 0.231$, $p=0.046$). CIMT was positively correlated with age ($r = 0.416$, $p < 0.0001$), SBP ($r=0.293$, $r=0.004$) and with Sjögren's syndrome impairment index (SSDDI) ($r = 0.351$, $p = 0.014$). It also negatively correlated with Sjögren's syndrome-specific autoantibodies anti SSA/Ro60 ($r = -0.431$, $p = 0.002$) and anti SSB/La ($r = -0.346$, $p = 0.016$).

Conclusion: Our findings are implying that patients with pSS have an increased risk for subclinical atherosclerosis and that adropin could be involved in the pathophysiology of pSS and the in mentioned processes by acting protectively on the endothelium. We also showed that there is a significant association between the subclinical atherosclerotic process and homocysteine. So, homocysteine could be a cheap and available marker for risk stratification of the development of subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients. These results suggest that the inclusion of determination of plasma adropin and homocysteine levels in risk reduction protocols may be relevant to identify individuals at higher risk of atherosclerotic events. Ultimately, this would enable timely taking of preventive measures that would reduce the mentioned risks.

Key words: primary Sjögren's syndrome, subclinical atherosclerosis, endothelial dysfunction, adropin, homocysteine, CIMT, anti SSA/Ro antibodies, anti SSB antibodies, SSDDI, ESSDAI

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Marijana Janković Danolić

Adresa: Zagrebačka cesta 132, 10000Zagreb

Telefon: 0916302348

Elektronička pošta: marijana-st@hotmail.com

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 24.09.1987. Slavonski Brod, Hrvatska

Školovanje:

2002. – 2006.	I. jezična gimnazija, Split
2006. – 2011.	mag. pharm., Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2015. – danas	poslijediplomski doktorski studij “Klinička medicina utemeljena na dokazima” (EBM), Medicinski fakultet u Splitu

Radno iskustvo:

2018. - danas	Key Account Manager Biopharmaceuticals (područja: hematologija, imunologija, onkologija i nefrologija) – SANDOZ.D.O.O.
2015. – 2018.	medicinski suradnik – ASTRAZENECA D.O.O
2013. – 2015.	stručno komercijalni suradnik – KRKA-FARMA D.O.O
2011. – 2012.	pripravnik - ljekarne ‘Splitsko-dalmatinske županije’

Jezične vještine:

Materinski jezik/jezici: HRVATSKI

Drugi jezici:

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
ENGLISKI	C2	C2	C2	C2	C2
NJEMAČKI	C1	C1	B1	B1	B1
TALIJANSKI	C1	C1	B1	B1	B1

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

Publikacije:

Danolić MJ, Perković D, Petrić M, Barišić I, Gugo K, Božić J. Adropin Serum Levels in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *Biomolecules*. 2021 Aug 31;11(9):1296.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA	3
1. UVOD	7
1.1. Definicija	8
1.2. Epidemiologija	8
1.3. Patofiziologija	9
1.4. Kliničke manifestacije	9
1.4.1. Kserostomija	9
1.4.2. Oteklina žlijezda slinovnica	10
1.4.3. Kseroftalmija	10
1.4.4. Izvanžlijezdane manifestacije SS-a	11
1.5. Dijagnostički kriteriji	14
1.5.1. Schirmerov test	15
1.5.2. Biopsija žlijezda slinovnica	16
1.5.3. Sijalometrija i sijalografija	16
1.5.4. Scintigrafija slinovnica	16
1.5.5. Serologija	17
1.6. Procjena aktivnosti bolesti i oštećenja u pSS-u	18
1.7. Ateroskleroza	23
1.8. Adropin	26
1.9. Homocistein	30
1.10. Debljina intime-medije karotidnih arterija	31
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	34
3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA	37
3.1. Ispitanici	38
3.2. Postupci	40
3.2.1. Klinički i laboratorijski nalazi	40
3.2.2. Definicija kardiovaskularnog rizika	41
3.2.3. Procjena aktivnosti bolesti i oštećenja u pSS-u	42
3.2.4. Određivanje CIMT-a	42
3.2.5. Statistička obrada podataka	43
4. ETIČKA NAČELA	44
5. REZULTATI	46

5.1. Rezultati za adropin.....	47
5.1.1. Osnovne karakteristike studijske populacije	47
5.1.2. Laboratorijski parametri studijske populacije	48
5.1.3. Serumske razine adropina u bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine	49
5.1.4. Korelacija adropina i drugih parametara	51
5.1.5. Multipla regresijska analiza.....	53
5.2. Rezultati za homocistein i CIMT	55
5.2.1. Osnovna obilježja bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine.....	55
5.2.2. Laboratorijski parametri	56
5.2.3. Razine homocisteina i max CIMT-a u bolesnika s pSS-om i u kontrolnoj skupini.....	57
5.2.4. Povezanost homocisteina i antropometrijskih, laboratorijskih i kliničkih parametara ...	59
5.2.5. Povezanost CIMT-a i antropometrijskih, laboratorijskih i kliničkih parametara	61
5.2.6. Multipla regresijska analiza.....	64
6. RASPRAVA	65
7. ZAKLJUČCI	73
8. POPIS LITERATURE.....	75
9. SAŽETAK.....	95
10. SUMMARY.....	98
11. ŽIVOTOPIS.....	101

POPIS OZNAKA I KRATICA

ANA	antinuklearna protutijela (engl. <i>antinuclear antibodies</i>)
AHA	Američko udruženje za srce (engl. <i>American Heart Association</i>)
Apoe ^{-/-}	apolipoprotein E-deficijentni miševi skloni aterosklerozi (engl. <i>atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient</i>)
BAFF	faktor aktivacije B stanica (engl. <i>B-cell activating factor</i>)
BD	Behcetova bolest (engl. <i>Behcet's disease</i>)
BP	krvni tlak (engl. <i>blood pressure</i>)
C3	komponenta komplementa 3 (engl. <i>complement component 3</i>)
C4	komponenta komplementa 4 (engl. <i>complement component 4</i>)
CH50	ukupna aktivnost komplementa (engl. <i>total complement activity</i>)
CIDP	kronična upalna demijelinizirajuća polineuropatija (engl. <i>chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy</i>)
CIMT	zadebljanje intime-medije karotide (engl. <i>carotide intima-media thickness</i>)
CK	kreatin kinaza (engl. <i>creatine kinase</i>)
CMIA	kemiluminiscentni imunotest mikročestica (engl. <i>chemiluminescence microparticle immunoassay</i>)
CNS	središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i>)
Cys	cistein (engl. <i>cysteine</i>)
DBP	dijastolički tlak (engl. <i>diastolic blood pressure</i>)
DL _{CO}	difuzijski kapacitet za ugljikov monoksid (engl. <i>diffusing capacity for carbon monoxide</i>)

ELISA	enzimska imunoanaliza (eng. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMG	elektromiografija (engl. <i>electromyography</i>)
EMNG	elektromioneurografija (engl. <i>electromyoneurography</i>)
ENHO	gen povezan s energetsom homeostazom (engl. <i>energy homeostasis-associated gene</i>)
eNOS	endotelna sintaza dušikovog oksida (engl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ERK1/2	kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>).
ESR	brzina sedimentacije eritrocita (engl. <i>erythrocyte sedimentation rate</i>)
ESSDAI	EULAR Sjögren-ov sindrom indeks aktivnosti bolesti (engl. <i>EULAR Sjögren syndrome disease activity index</i>)
FRS	Framinghamov rezultat rizika (engl. <i>Framingham risk score</i>)
FVC	forsirani vitalni kapacitet (engl. <i>forced vital capacity</i>)
GFR	Brzina glomerularne filtracije (engl. <i>glomerular filtration rate</i>)
HDL	lipoprotein visoke gustoće (engl. <i>high-density lipoprotein</i>)
HRCT	Kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije (engl. <i>high-resolution computed tomography</i>)
hsCRP	C-reaktivni protein visoke osjetljivosti (engl. <i>high-sensitivity C-reactive protein</i>)
IgG	imunoglobulin G (engl. <i>immunoglobulin G</i>)
ILD	intersticijska bolesti pluća (engl. <i>interstitial lung disease</i>)
ITM	indeks tjelesne mase
LDL	lipoprotein niske gustoće (engl. <i>low-density lipoprotein</i>)
MALT	ekstranodalni B-stanični limfomi marginalne zone vezan uz limfatično tkivo sluznice (engl. <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>).

MCP	metakarpofalangealni (engl. <i>metacarpophalangeal</i>)
MCV	prosječni volume eritrocita (engl. <i>mean corpuscular volume</i>)
Met	metionin (engl. <i>methionine</i>)
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
NHL	non-Hodgkinov limfom (engl. <i>non-Hodgkin lymphoma</i>)
NO	dušikov oksid (engl. <i>nitric oxide</i>)
NYHA	New York kardiološka asocijacije (engl. <i>New York Heart Association</i>)
PI3K-Akt	fosfoinozimid-3-kinaza-protein kinaza B (engl. <i>phosphoinositide-3-kinase–protein kinase B</i>)
PIP	proksimalni interfalangealni (engl. <i>proximal interphalangeal</i>)
PSN	periferna senzorna neuropatija (engl. <i>peripheral sensory neuropathy</i>)
PNS	periferni živčani sustav (engl. <i>peripheral nervous system</i>)
PPAR γ	receptor za aktivator proliferacije peroksisoma tip gama (engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>)
pSS	primarni Sjögrenov sindrom (engl. <i>primary Sjögren's syndrome</i>)
RA	reumatoidni artritis (engl. <i>rheumatoid arthritis</i>)
RF	reumatoidni faktor (engl. <i>rheumatoid factor</i>)
ROS	reaktivne vrste kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RTA	renalna tubularna acidoza (engl. <i>renal tubular acidosis</i>)
SAH	S-adenozil-L-homocistein (engl. <i>S-Adenosyl-L-homocysteine</i>)
SBP	sistolički tlak (engl. <i>systolic blood pressure</i>)
SICCA	kohorta međunarodnog kliničkog kolaborativnog saveza Sjögrenovog sindroma (eng. <i>Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance</i>)

SS	Sjögrenov sindrom (engl. <i>Sjögren's syndrome</i>)
sSS	sekundarni Sjögrenov sindrom (engl. <i>secondary Sjögren's syndrome</i>)
SSc	sistemska skleroza (engl. <i>systemic sclerosis</i>)
SSDDI	indeks oštećenja bolesti u Sjögren-ovom sindrom (engl. <i>Sjögren syndrome disease damage index</i>)
SLE	sistemiški eritemski lupus (engl. <i>systemic lupus erythematosus</i>)
TC	totalni kolesterol (engl. <i>total cholesterol</i>)
TIN	tubularni intersticijski nefritis (engl. <i>tubulointerstitial nephritis</i>)
TLRs	toll-like receptori (engl. <i>toll-like receptors</i>)
TNF	čimbenik tumorske nekroze (engl. <i>tumor necrosis factor</i>)
TG	trigliceridi (engl. <i>triglycerides</i>)
VEGFR2	receptor faktora rasta vaskularnog endotela tipa 2 (engl. <i>vascular endothelial growth factor receptor type 2</i>)
VLDL	lipoproteina vrlo niske gustoće (engl. <i>very low-density lipoprotein</i>)
VSMC	vaskularne mišićne glatke stanice (engl. <i>vascular smooth muscle cells</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)

1. UVOD

1.1. Definicija

Sjögrenov sindrom (engl. *Sjögren's syndrome* - SS) je kronična, sporo napredujuća autoimuna bolest karakterizirana limfocitnom infiltracijom egzokrinih žlijezda što rezultira suhoćom usta (kserostomijom) i suhim očima (kseroftalmijom). Bolest ima široki klinički spektar, od ograničene autoimune egzokrinopatije do sistemske bolesti [1]. U sistemskom obliku bolesti mogu biti zahvaćena pluća, bubrezi, štitnjača, mišići, srce, živčani sustav i koža, a često su prisutni simptomi umora, depresije, kognitivnih poremećaja, kožnih lezija, boli i blagog artritisa [2]. Bolest se može javiti samostalno i tada se naziva primarnim Sjögrenovim sindromom (engl. *primary Sjögren's syndrome* - pSS). Kada se javlja u sklopu drugih autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa (engl. *rheumatoid arthritis* - RA), sistemskog eritemskog lupusa (engl. *systemic lupus erythematosus* - SLE) ili progresivne sistemske skleroze (engl. *systemic sclerosis* - SSc) naziva se sekundarnim Sjögrenovim sindromom (engl. *secondary Sjögren's syndrome* - sSS) [3].

Prvi opis ove bolesti dao je Mikulicz 1892. godine. Mikuliczov sindrom obuhvaćao je lokalizirano zahvaćanje žlijezda slinovnica bez sistemskih znakova bolesti što nije pružalo dovoljno dijagnostičkih i terapijskih informacija. Švedski oftalmolog Henrik Sjögren 1933. godine opisao je suhoću usta i očiju u 19 žena. Sjögren je također prvi uveo termin *keratokonjunktivitis sicca* [4].

1.2. Epidemiologija

Prevalencija pSS-a je ~ 0.5-1 %, a sekundarni se oblik razvija u 5-20 % bolesnika [1]. pSS se znatno češće razvija u žena u odnosu na muškarace; razlika u spolu kreće se u omjerima 9:1 i 19:1. Prosječna dob u vrijeme postavljanja dijagnoze pSS je 56 godina, dok se drugi vrhunac bolesti javlja između 20 i 40 godine. Međutim, prvi simptomi mogu se pojaviti godinama prije postavljanja dijagnoze [5]. Pojedina istraživanja ukazuju da omjer spolova i dobna raspodjela ovise o etničkoj pripadnosti i geografskom području ispitane populacije. SS rijetko se javlja u djece, no početak je moguć već u petoj godini života [6].

1.3. Patofiziologija

Patofiziologija SS-a vrlo je složena. Unatoč velikom napretku u razumijevanju autoimunih zbivanja, etiopatogeneza bolesti i dalje je nejasna. Smatra se da u bolesnika s genetskom predispozicijom kombinacija virusnih infekcija, hormona i okolišnih čimbenika vodi k aktivaciji epitelnih stanica i pojačanoj ekspresiji toll-like receptora (engl. *toll-like receptors* - TLRs). TLRs su transmembranski proteini uključeni u pokretanje imunološkog odgovora. Inicijalna faza bolesti obilježena je strukturalnim promjenama žlijezda što podrazumijeva izmjenu ekstracelularnog matriksa i promjenu međustanične komunikacije. Moguće je da te promjene uzrokuju epigenetičko reprogramiranje genske ekspresije. Pojačana ekspresija TLRs pobuđuje prirodni imunitet koji dovodi do aktivacije limfocita T i stvaranja proupalnih citokina. Osim što potiču aktivaciju i proliferaciju limfocita B, limfociti T izlučuju i citokine koji stimuliraju epitelne stanice. Rezultat te stimulacije je stvaranje proapoptotičnih molekula i ekspresija autoantigena koji dovode do aktivacije dendritičkih stanica. Ove stanice proizvode brojne citokine, uključujući i faktor aktivacije B stanica (eng. *B-cell activating factor* - BAFF) koji stimulira sazrijevanje promijenjenih B limfocita koji postaju autoreaktivni. Naposljetku, to dovodi do stvaranja specifičnih autoprotutijela koja na različite načine potiču oštećenje tkiva [7]. Najčešća autoprotutijela u SS-u su autoprotutijela na specifične ribonukleoproteine Ro i La. Postoje dokazi koji govore kako anti SSA/Ro i anti SSB/La protutijela igraju važnu ulogu u lokalnom autoimunom odgovoru, štoviše nađena su u žlijezdama slinovnica u oboljelih od SS-a [8].

1.4. Kliničke manifestacije

1.4.1. Kserostomija

Više od 90% bolesnika sa SS-om imaju simptome suhoće usne šupljine koji su posljedica funkcionalnih promjena žlijezda slinovnica. Simptomi uključuju suhoću usta, poteškoća u procesu žvakanja te potrebe unošenja više tekućine kako bi lakše progutali hranu. U ranoj fazi bolesti kserostomija je obično blaža, ali s progresijom bolesti i oštećenjem žlijezda slinovnica, kserostomija se pogoršava te je praćena stalnim osjećajem žarenja usta, izmjenama okusa, pojavom fisura na jeziku te angularnih heilitisa. Daljnjim napredovanjem kserostomija dovodi do brojnih komplikacija kao što su propadanje zubi, atrofija jezičnih papila, povećana učestalost infekcija sluznice usne šupljine, u prvom redu kandidijaze [9].

1.4.2. Oteklina žlijezda slinovnica

Oteklina parotida (Slika 1) i drugih većih žlijezda slinovnica obično je asimptomatski i obostran. Ako je otok izraženiji te praćen s boli i trizmusom potrebno je isključiti bakterijski sialodentis. Perzistentno, unilateralno povećanje žlijezda budi sumnju na limfom [10].



Slika 1. Povećana parotidna žlijezda; slika: vlastiti izvor

1.4.3. Kseroftalmija

Kseroftalmija ili suhoća očiju je često slabije izražena od kserostomije. Bolesnici najčešće navode osjećaj 'pijeska, odnosno stranog tijela u očima', ali i druge simptome kao što su fotofobija, žarenje, te nedostatak suza. Kseroftalmija nastaje zbog limfocitne infiltracije suznih žlijezda koja dovodi do destrukcije žlijezda i smanjenog stvaranja suza. Nedostatan protok suza dovodi do erozija rožnice i epitela spojnice, stanja poznatog kao *keratoconjunctivitis sicca* [9].

1.4.4. Izvanžlijezdane manifestacije SS-a

Muskuloskeletni sustav

Bolovi u zglobovima prisutni su u 30-60% bolesnika s pSS-om [11]. Često se može uočiti simetrični, periferni poliartritis malih zglobova šaka koji prethodi simptomima suhoće. Obično nije deformirajući niti erozivan, a zahvaća metakarpofalangealne (engl. *metacarpophalangeal* - MCP), proksimalne interfalangealne (engl. *proximal interphalangeal* - PIP) zglobove i zapešća [11,12]. Bolovi u mišićima, mišićna slabost i umor također su učestale tegobe ovih bolesnika [13].

Koža

Osim sindroma suhoće, kožne manifestacije SS-a uključuju i imunološki posredovana upalna stanja poput vaskulitisa te druge pridružene poremećaje kao što je Raynaudov fenomen. Vaskulitične promjene najčešće se javljaju na donjim udovima u obliku leukocitoklastičnog vaskulitisa [14]. Raynaudov fenomen vrlo je čest u pSS-u i obično prethodi simptomima suhoće. Suha koža zabilježena je u 50% bolesnika s SS-om, a nejasno je nastaje li uslijed limfocitne infiltracije žlijezda ili disfunkcionalnog znojenja [15, 16]. Ostale kožne manifestacije uključuju nodozni eritem, vitiligo i digitalne ulceracije [14].

Bubrezi

Učestalost zahvaćenosti bubrega u SS varira od 4 do 67% što se objašnjava razlikama u dijagnostičkim kriterijima i protokolima istraživanja. Tubularni intersticijski nefritis (engl. *tubulointerstitial nephritis* - TIN), koji je histopatološki obilježen peritubularnom infiltracijom limfocita i fibrozom, najčešća je bubrežna manifestacija u bolesnika sa SS-om. Glavna klinička prezentacija TIN-a je renalna tubularna acidoza (engl. *renal tubular acidosis* - RTA), a nastaje zbog oštećenja bubrežnih tubula. Posljedica RTA je zadržavanje kiselina ili gubitak bikarbonata te se očituje slabošću ili paralizom zbog gubitka kalija, bubrežnim kolikama zbog nefrokalcinoze te poliurijom/polidipsijom zbog nefrogenog dijabetesa insipidusa [16,17].

Distalna tubularna acidoza je također česta u bolesnika sa SS-om, a javlja se u otprilike oko 20% slučajeva. Najčešće je asimptomatska i bez kliničkog značenja. Glomerulonefritis je rijedak u SS-u, a manifestira se proteinurijom, nefrotskim sindromom, hematurijom,

arterijskom hipertenzijom i zatajivanjem funkcije bubrega [18]. Prisutnost glomerulonefritisa u bolesnika sa SS-om značajno pridonosi povećanju stope morbiditeta i mortaliteta te utječe na prognozu bolesti [19].

Respiratorni sustav

Zahvaćenost pluća se definira prisutnošću respiratornih simptoma potvrđenih dijagnostičkim testovima (funkcionalnim i radiografskim). Učestalost respiratornih simptoma u bolesnika s pSS-om varira od 9 do 75% dok se klinički značajne manifestacije pojavljuju u 9 do 12% bolesnika. [20].

Smanjena sekrecija nazalnih epitelnih stanica dovodi do stvaranja krasta u nosnicama, epistakse i recidivirajućih sinusitisa. Trahealna suhoća rezultira suhim neproduktivnim kašaljem i otežanim disanjem [21]. Često se uočava opstrukcija malih dišnih putova uslijed bronhijalne hiperreaktivnosti, dok teži oblici opstrukcije mogu nastati zbog limfocitne hiperplazije. Intersticijska bolesti pluća (*engl. interstitial lung disease - ILD*) je rjeđa manifestacija SS-a. Kliničke manifestacije ILD-a su suhi kašalj, dispneja u naporu, a radiološki se nalaze najčešće bilateralni plućni infiltrati. U kasnijim stadijima bolesti dolazi i do razvoja fibroze [22].

Probavni sustav

Gastrointestinalne manifestacije u bolesnika sa SS-om uključuju disfagiju, dispepsiju, mučninu i bol u epigastriju, što može biti povezano s hiposalivacijom, smanjenim motilitetom jednjaka, gastritisom te smanjenom proizvodnjom želučane kiseline. Bolesnici sa SS-om podložniji su nastanku gastroezofagealnog refluksa zbog sline koja ima neutralizirajući učinak na želučanu kiselinu [23]. Mogu biti prisutni nespecifični poremećaji jetrene funkcije, a česte pridružene bolesti su autoimuni hepatitis i primarna bilijarna ciroza [9].

Živčani sustav

Neurološke manifestacije se nalaze u oko 20 do 60% bolesnika sa SS-om. Spektar neuroloških poremećaja u sklopu SS-a je iznimno širok, od perifernih neuropatija do

poremećaja središnjeg živčanog sustava te mogu biti uzrokovane i vaskulitisom [24]. Najčešći oblik je periferna senzorna neuropatija (engl. *peripheral sensory neuropathy* - PSN) i smatra se karakterističnim neurološkim obilježjem SS-a. PSN obilježavaju klinički simptomi simetrične i distalne parestezije, neuropatska bol i osjećaj pečenja stopala, a kliničkim se pregledom mogu dokazati smanjeni ili odsutni duboki tetivni refleksi [25]. Uz PSN najčešće se mogu javiti optički mijelitis te neuralgija trigemina [26]. Zbog oštećenja živčanih vlakana (najčešće su zahvaćeni kranijalni živci: kohlearni živac, trigeminalni živac i lični živac) bolesnici s pSS-om često pokazuju kognitivne promjene kao što su poremećaji koncentracije i pamćenja te vizualno-prostorni poremećaji. Bolesnici opisuju i deficite kratkoročnog te dugoročnog pamćenja uz često prisutne depresivne poremećaje [24].

Hematološki sustav

Hematološki poremećaji su česti u bolesnika s pSS-om, te se u gotovo trećine razvija citopenija koja uključuje leukopeniju, anemiju i trombocitopeniju. Leukopenija se javlja u oko 20 do 60% bolesnika i povezana je s pozitivnim anti SSA protutijelima te većim žljezdanim oštećenjima. Anemije su najčešće blage i asimptomatske, a mogu se naći u oko 11 do 19% pSS bolesnika [27]. Poliklonska hipergamaglobulinemija nalazi se u 80 % bolesnika [9].

Bolesnici sa SS-om imaju 20 do 40 puta veći rizik za razvoj non-Hodgkinova limfoma (engl. *non-Hodgkin lymphoma* - NHL) u usporedbi s općom populacijom. NHL smatra se najtežom kliničkom manifestacijom SS-a, a prevalencija NHL u SS-u iznosi oko 4 % i javlja se u prosjeku 7,5 godina nakon postavljanja dijagnoze. Najučestaliji histološki tip NHL-a u bolesnika sa SS-om je ekstranodalni B-stanični limfomi marginalne zone vezan uz limfatično tkivo sluznice - MALT limfom (engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*). Klinički je najčešće indolentan, a pored žlijezda slinovnica lokaliziran je i u izvan limfatičnim tkivima kao što je želudac ili bubreg. Na veći rizik razvoja HNL-a ukazuju niske razine C₄, mješana monoklonalna krioglobulinemija, visoke razine β₂-mikroglobulina, CD4 limfocitopenija, prisutnost monoklonalnih lanaca u serumu i u urinu, pezistentno povećanje parotide, palpabilna purpura, ulceracije na nogama i splenomegalija [28,29].

Ostale izvanžlijezdane manifestacije

Endokrinološki poremećaji javljaju se u oko 20% bolesnika sa SS-om. Najčešći pridruženi poremećaj je hipotireoza [30]. Zahvaćen može biti i genitalni sustav. U mnogih premenopauzalnih žena oboljelih od SS-a javlja se vaginalna suhoća, posljedična dispareunija, te učestala endometrioza [31]. Trudnoća nema utjecaja na tijek bolesti, ali u djeteta postoji rizik od razvoja neonatalnog lupusa i prirođenog atrioventrikularnog bloka povezanog s visokim morbitetom i mortalitetom. Taj se rizik povećava uz prisutnost anti-SSA/Ro protutijela [32].

1.5. Dijagnostički kriteriji

Postavljanje dijagnoze SS-a se temelji na klasifikacijskim kriterijima za Sjögrenov sindrom: revidiranu verziju europskih kriterija predloženu od strane američko-europske konsenzusne grupe.

Klasifikacijski kriteriji SS-a prikazani su u Tablici 1 te uključuju subjektivne i objektivni znakove kserostomije i kseroftalmije, patohistološku analizu žlijezda slinovnica i prisutnost autoprotutijela [33].

Tablica 1. Revidirani međunarodni klasifikacijski kriteriji za Sjögrenov sindrom

I. Očni simptomi - potvdan odgovor na barem jedno od sljedećih pitanja: 1. Jeste li imali svakodnevno suhe oči dulje od 3 mjeseca? 2. Imate li povremeni osjet 'pijeska u očima'? 3. Upotrebljavate li umjetne suze više od 3 puta dnevno?
II. Oralni simptomi - potvdan odgovor na barem jedno od sljedećih pitanja: 1. Jeste li svakodnevno imali osjećaj suhих usta dulje od 3 mjeseca? 2. Jeste li imali povremeno ili stalno natečene žlijezde slinovnice kao odrasla osoba? 3. Pijete li često tekućinu kako biste lakše progutali hranu?
III. Očni znakovi - pokazatelji zahvaćenosti oka definirani kao pozitivan rezultat barem jednog od dvaju sljedećih testova: 1. Schirmerov test napravljen bez anestezije (≤ 5 mm u 5 minuta) 2. Rose bengal bodovna ljestvica ili neka druga očna bodovna ljestvica (\geq prema van Bijsterveldovu score sistemu)

<p>IV. Histopatologija malih žlijezda slinovnica (dobivena biopsijom bukalne sluznice koja izgleda normalno) pokazuje fokalni limfocitni sijaloadenitis, vrednuje se s focus scorom ≥ 1, a koji je definiran kao broj limfocitnih fokusa koji sadrže više od 50 limfocita na 4 mm² žljezdanog tkiva.</p>
<p>V. Zahvaćenost žlijezda slinovnica: objektivni dokaz zahvaćenosti žlijezda slinovnica definiran kao pozitivan rezultat barem jednog od sljedećih dijagnostičkih testova:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nestimulirano lučenje sline ($\leq 1,5$ ml u 15 minuta) 2. Sijalografija parotide kojom se uočavaju difuzne sijalektazije (punktiformni, kavitarni uzorak) bez znakova destrukcije u velikim vodovima 3. Scintigrafija slinovnica koja pokazuje odgođeni unos, smanjenu koncentraciju i/ili odgođeno izlučivanje kontrasta
<p>VI. Antitijela; prisutnost u serumu sljedećih antitijela: Antitijela na SSA/Ro ili SSB/La antigen ili oba</p>

U oboljelih koji nemaju povezanu bolest, primarni SS se definira kao:

- a) Prisutnost 4 od 6 kriterija uz obvezno pozitivne kriterije IV (histopatologija) ili VI (serologija)
- b) Prisutnost bilo koja 3 od 4 objektivna kriterija (III, IV, V, VI)

U oboljelih s povezanim bolestima (npr. druga dobro definirana bolest vezivnog tkiva) prisutnost kriterija I ili II uz prisutnost bilo koja 2 od III, IV i V kriterija su dovoljni za postavljanje dijagnoze sekundarnog SS [33].

1.5.1. Schirmerov test

Ovim testom određuje se vodena komponenta suznoga filma. Provodi se postavljanjem sterilnog filter-papira na prijelazu srednje i vanjske trećine donje vjeđe. Nakon pet minuta papir se ukloni i očita se dužina navlaženog dijela papira u milimetrima. Normalno se filter-papir navlaži 15 mm od ruba vjeđe u pet minuta. Ako je ona < 5 mm, test se smatra pozitivnim [34].

1.5.2. Biopsija žlijezda slinovnica

Biopsija žlijezda slinovnica dugo se smatrala zlatnim standardom u dijagnostici pSS. Međutim, u kliničkoj je praksi njezina primjena često rezervirana za bolesnike u kojih dijagnoza ostaje nejasna nakon temeljite kliničke i laboratorijske procjene. Izraz žarišni (fokalni) limfocitni sialoadenitis odnosi se na histopatološki obrazac prisutnosti jednog ili više upalnog žarišta u biopsiji, dok se okolno tkivo sastoji uglavnom od nepromijenjenog parenhima. S druge strane, žarište ili fokus definira se kao nakupina od ≥ 50 limfocita. Patohistološki nalaz smatra se pozitivnom ako je u preparatu prisutno ≥ 1 fokusa s više od 50 limfocita na 4 mm^2 tkiva [35].

1.5.3. Sijalometrija i sijalografija

Nestimularno lučenje sline (sijalometrija) jednostavan je, neinvazivan test koji mjeri ukupnu količinu sline koju bolesnik izbaci u mjernu epruvetu tijekom jedinice vremena u sjedećem položaju. Kod izvedbe testa važno je da ispitanik najmanje dva sata prije testa ništa ne jede, ne pije, ne puši i ne pere zube. Pozitivnim se testom smatra izlučenje > 1.5 ml sline u 15 minuta [36].

Sijalografija je kontrastno radiografsko snimanje slinovnica, obično parotide, nakon retrogradnog ubrizgavanja kontrastnog sredstva u izvodni kanal. Kontrast se distribuira kroz sustav kanala, što omogućuje analizu arhitekture i organizacije žljezdanih kanala. U bolesnika sa SS-om mogu se naći dilatirani i tortuozni kanalići, s neravnomjernom raspodjelom kontrastnog sredstva [37, 38].

1.5.4. Scintigrafija slinovnica

Scintigrafija pruža funkcionalnu procijenu svih žlijezda slinovnica analizom unosa i izlučivanja $^{99\text{mTc}}$ -pertehnata iz slinovnica 60 minuta nakon njegove intravenske aplikacije. U bolesnika sa SS-om se opisuje odgođeni unos, smanjena koncentracija i/ili odgođeno izlučivanje markera. Scintigrafija je visoko osjetljiva, ali slabije specifična metoda [39].

1.5.5. Serologija

Jedan od kriterija za dijagnozu pSS-a su pozitivna anti SSA/Ro i/ili pozitivna anti SSB/La antitijela. Ovisno o korištenoj laboratorijskoj metodi anti SSA/Ro i anti SSB/La antitijela mogu biti pozitivna u 50 do 70% bolesnika s pSS-om [40]. Anti SSA/Ro su neovisna od anti SSB/La antitijela [41], dok je obrnuta situacija rijetka što potvrđuje i nedavna analiza kohorte međunarodnog kliničkog kolaborativnog saveza Sjögrenovog sindroma (*engl. Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance - SICCA*) koja je zaključila da osobe s anti SSB/La, ali bez anti SSA/Ro nisu imale bolest [42]. S druge strane Venables i sur. su pokazali da su pozitivna anti SSB/La u prisutnosti anti SSA/Ro prediktor za prepoznavanje bolesnika sa SS-om [43].

Studija Theander-a i sur. usporedila je podatke iz registra primarnog Sjögrenovog sindroma u Malmou i 3 švedske biobanke zdravstvene skrbi. Uzorci seruma su analizirani na antinuklearna protutijela (*engl. antinuclear antibodies - ANA*), reumatoidni faktor te anti SSA/Ro60, anti SSA/Ro52 i anti SSB/La antitijela. Od 117 pSS bolesnika u registru koji su imali uzorke seruma u biobankama prije dijagnosticiranja bolesti, 81% ih je imalo pozitivna autoantitijela prije pojave simptoma bolesti. Pozitivna anti SSA/Ro i anti SSB/La autoantitijela pojavljuju se i 18 do 20 godina prije postavljanja dijagnoze [44, 45]. Prediktor za konačni razvoj bolesti su vrijednosti anti SSA/Ro60 i anti SSA/Ro52 antitijela [44].

Ro/La čestica je protein-RNA kompleks nastao spajanjem Ro60 i La proteina s malom citoplazmatskom RNA [46]. Ro52 i Ro60 su inče unutarstanični proteini. Ro52, poznat kao TRIM21, je ubikvitin E3 ligaza, uključena u regulaciju imunoloških odgovora posredovanih regulatornim faktorom interferona, koji je uglavnom izražen u imunološkim stanicama [47, 48].

Anti SSA/Ro i anti SSB/La autoantitijela su povezani s mlađom dobi u trenutku postavljanja dijagnoze, dužim trajanjem bolesti, težom disfunkcijom egzokrinih žlijezda, rekurentnim povećanjem parotidne žlijezde i obilnijim limfocitnim infiltratima u malim žlijezdama slinovnicama [49, 50]. Naime, Ramos-Casals M. i sur pokazali su da bolesnici s pozitivnim anti SSA/Ro i anti SSB/La protutijelima imaju manje godina pri postavljanju dijagnoze pSS-a te imaju značajno veću vjerojatnost za razvoj svih kliničkih manifestacija bolesti. To uključuje povećanje parotida, Raynaud-ov sindrom, artritis, vaskulitis, bubrežnu tubularnu acidozu, perifernu neuropatiju, citopenije i pozitivan reumatoidni faktor [51].

Davidson i sur. su tijekom desetogodišnjeg praćenja 100 bolesnika s pSS-om utvrdili da su sistemske, izvanžljezdane manifestacije razvili samo bolesnici s pozitivnim anti SSA/Ro [52].

U bolesnika s pSS-om je često pozitivan reumatoidni faktor (engl. *rheumatoid factor* - RF) i povezan je s prisutnošću anti SSA/Ro i anti SSB/La te sistemskom bolešću [53]. Stoga je pozitivan RF prognostički pokazatelj u pSS-u, međutim nije dovoljno osjetljiv za pSS jer se često nalazi u drugim bolestima [54].

1.6. Procjena aktivnosti bolesti i oštećenja u pSS-u

Za procjenu aktivnosti bolesti u SS-u primjenjuje se EULAR indeks aktivnosti bolesti (engl. *EULAR Sjögren syndrome disease activity index* - ESSDAI), koji uključuje 12 domena: konstitucijsku, hematološku, biološku, žljezdanu, zglobnu, kožnu, plućnu, bubrežnu i mišićnu domenu, uključuje i limfadenopatiju te zahvaćenost perifernog i središnjeg živčanog sustava (Tablica 2) [55].

Stupanj kroničnog ireverzibilnog oštećenja u primarnom SS-u procijenjuje se pomoću indeksa oštećenja (engl. *Sjögren syndrome disease damage index* - SSDDI), koji se sastoji od tri domene: očne, oralne i sistemske domene. Sistemska domena uključuje neurološka, bubrežna, plućna, kardiovaskularna, gastrointestinalna, mišićno-koštana, endokrina i maligna oštećenja (Tablica 3) [56].

Tablica 2: EULAR Sjögren-ov sindrom indeks aktivnosti bolesti (ESSDAI)

Domena	Aktivnost	Opis
Konstitucijska <i>Isključenje temperature zbog infekcije ili samovoljnog gubljenja tjelesne težine</i>	Nema = 0	Odsutnost navedenih simptoma
	Niska = 1	Blaga do srednje povišena temperatura (37.5°–38.5°C)/noćno znojenje i/ili neželjeni gubitak tjelesne težine za 5 to 10%
	Umjerena = 2	Visoko povišena temperatura (>38.5°C)/noćno znojenje i/ili neželjeni gubitak tjelesne težine >10%
Limfadenopatija <i>Isključenje infekcija</i>	Nema = 0	Odsutnost navedenih značajki/obilježja
	Niska = 1	Limfadenopatija ≥ 1 cm u bilo kojoj nodalnoj regiji, ≥ 2 cm

Domena	Aktivnost	Opis
		u ingvinalnoj regiji
	Umjerena = 2	Limfadenopatija ≥ 2 cm u bilo kojoj nodalnoj regiji, ili ≥ 3 cm u ingvinalnoj regiji i/ili splenomegalija (klinički jasna/opipljiva ili utvrđena slikovnom metodom)
	Visoka = 3	Trenutni maligni poremećaj proliferacije B-stanica
Žljezdana <i>Isključenje litijaze ili infekcija slinovnica</i>	Nema = 0	Odsutnost oteklina žljezda
	Niska = 1	Mala oteklina žlijezda s povećanom parotidom (≤ 3 cm), ili limitirano/ograničeno submandibularno ili lakrimalno oteknuće
	Umjerena = 2	Velika oteklina žlijezda s povećanom parotidom (> 3 cm), ili značajno submandibularno ili lakrimalno oteknuće
Zglobna <i>Isključenje osteoartritisa</i>	Nema = 0	Odsutnost trenutno aktivnih zglobnih promjena
	Niska = 1	Artralgijska u rukama, šakama, zglobovima i stopalima popraćena jutarnjom ukočenošću (>30 min)
	Umjerena = 2	1 do 5 (od 28) zglobova sa sinovitisom
	Visoka = 3	≥ 6 (od 28) zglobova sa sinovitisom
Kožna	Nema = 0	Odsutnost trenutnih kožnih promjena
	Niska = 1	Erythema multiforme
	Umjerena = 2	Ograničeni kožni vaskulitis, uključujući urtikarijalni vaskulitis ili purpura ograničena na stopala i gležnjeve, ili subkutni kožni lupus
	Visoka = 3	Difuzni kožni vaskulitis, uključujući urtikarijalni vaskulitis ili difuzna purpuru, ili ulceracije povezane s vaskulitisom
Pulmološka <i>Označiti kao "Bez aktivnosti" stabilne dugotrajne značajke povezane s oštećenjem, ili respiratornim</i>	Nema = 0	Odsutnost pulmoloških promjena
	Niska = 1	Perzistentni kašalj ili bronhijalni događaji bez radiografskih abnormalnosti ili radioloških ili HRCT dokaza intersticijske plućne bolesti bez zaduhe i s normalnom plućnom funkcijom
	Umjerena = 2	Umjereno aktivni pulmološki događaj, kao intersticijska

Domena	Aktivnost	Opis
<i>dogadajima ne vezanim za samu bolest (konzumacija duhana)</i>		plućna bolest dokazana HRCT-om sa kratkoćom udaha tijekom vježbe (NHYA II) ili patološke vrijednosti testova plućne funkcije: 70% >DL _{CO} ≥ 40% or 80% >FVC ≥ 60%
	Visoka = 3	Teške plućne promjene, kao intersticijska plućna bolest dokazana HRCT sa skraćanjem udaha u mirovanju (NHYA III, IV) ili patološke vrijednosti testova plućne funkcije: DL _{CO} < 40% or FVC < 60%
Bubrežna <i>Označiti kao "Bez aktivnosti" stabilne dugotrajne značajke povezane s oštećenjem I bubrežnim događajima nevezanim za samu bolest. Ako je napravljena biopsija, aktivnost se određuje na temelju histoloških promjena</i>	Nema = 0	Odsutnost trenutnih bubrežnih promjena s proteinurijom < 0.5 g/d, bez hematurije, bez leukociturije, bez acidoze i bez dugotrajne stabilne proteinurije povezane s oštećenjem
	Niska = 1	Blaže bubrežno oštećenje, ograničeno na tubularnu acidozu bez bubrežnog zatajenja ili glomerularnih promjena s proteinurijom (između 0.5 i 1 g/d) i bez hematurije i bubrežnog zatajenja (GFR ≥ 60 ml/min)
	Umjerena = 2	Umjereno bubrežno oštećenje, kao tubularna acidoza s bubrežnim zatajenjem (GFR < 60 ml/min) ili glomerularno oštećenje s proteinurijom između 1 and 1.5 g/d i bez hematurije i renalnog zatajenja (GFR ≥ 60 ml/min) ili histološki dokaz izvanmembranskog glomerulonefritisa ili tubulointersticijskog nefritisa
	Visoka = 3	Teško oštećenje glomerularne filtracije s proteinurijom > 1.5 g/d hematurijom ili bubrežnim zatajenjem (GFR < 60 ml/min), ili histološki dokaz proliferativnog glomerulonefritisa ili krioglobulinemija povezana s bubrežnim oštećenjem
Mišićna <i>Isključiti slabost zbog kortikosteroida</i>	Nema = 0	Odsutnost aktivnih mišićnih promjena
	Niska = 1	Blago aktivni miozitis dokazan patološkim EMG-om ili biopsijom bez pojave slabosti i kreatin kinaze (N < CK ≤ 2N)
	Umjerena = 2	Umjereno aktivni miozitis dokazan patološkim EMG-om ili biopsijom uz pojavu slabosti (maximal deficit of 4/5), ili

Domena	Aktivnost	Opis
		povišenom kreatinin kinazom ($2N < CK \leq 4N$),
	Visoka = 3	Visoko aktivan miozitis dokazan patološkim EMG-om ili ili biopsijom uz pojavu slabosti ($\text{deficit} \leq 3/5$) i povišena kreatinin kinaza ($>4N$)
Periferni živčani sustav (engl. <i>peripheral nervous system</i> – PNS) <i>Označiti kao “Bez aktivnosti” stabilne dugotrajne značajke povezane s oštećenjem ili PNS poremećaj nevezan s bolešću</i>	Nema = 0	Odsutnost aktivnih PNS promjena
	Niska = 1	Blago aktivni poremećaj perifernog živčanog sustava, kao aksonalna senzorna polineuropatija dokazana EMNG-om ili trigeminalna (V) neuralgija
	Umjerena = 2	Umjereno aktivni poremećaj perifernog živčanog sustava dokazan EMNG-om, kao aksonalna senzorno-motorna polineuropatija s maksimalnim motoričkim deficitom 4/5, senzorna neuropatija s prisutnim krioglobulinemijskim vaskulitisom, ganglionopatija sa simptomima ograničenim na na blagu do umjerenu ataksiju, upalna demijelinizacijska polineuropatija (CIDP) s umjerenim funkcionalnim oštećenjima (maksimalni motorički deficit 4/5 ili blaga ataksija) ili kranijalni živčani poremećaj perifernog podrijetla (osim trigeminalne (V) neuralgije)
	Visoka = 3	Visoko aktivan PNS poremećaj dokazan EMNG-om, kao aksonalna senzorno-motorna neuropatija s motoričkim deficitom $\leq 3/5$, periferni živčani poremećaj uslijed vaskulitisa (multipli mononeuritis, itd.), ozbiljna ataksija zbog ganglionopatije, upalne demijelinizacijska polineuropatije (CIDP) sa ozbiljnim funkcionalnim oštećenjima: motorički deficit $\leq 3/5$ ili ozbiljna ataksija
Središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i> – CNS) <i>Označiti kao “Bez aktivnosti” stabilne dugotrajne značajke</i>	Nema = 0	Odsutnost aktivnih CNS promjena
	Niska = 1	Umjereno aktivne CNS značajke, kranijalni ili središnji živčani poremećaj, optički neuritis ili sindrom sličan multiploj sklerozi sa simptomima ograničenim na senzorna oštećenja ili dokazana kognitivna oštećenja
	Visoka = 3	Visoko aktivne CNS značajke, kao cerebralni vaskulitis s

Domena	Aktivnost	Opis
<i>povezane s oštećenjem ili CNS poremećaj nepovezan s bolešću</i>		cerebrovaskularnim događajem ili tranzitnom ishemijskom atakom, napadajima, transverzalni mijelitis limfocitni meningitis, sindrom sličan multiploj sklerozi s motoričkim defecitima
Hematološka <i>Za anemiju, neutropeniju i trombopeniju, u razmatranje se uzima samo autoimuna citopenija, Izuzima se deficijencija željeza i citopenija izazvana lijekovima</i>	Nema = 0	Odsutnost autoimune citopenije
	Niska = 1	Citopenija autoimunog podrijetla s neutropenijom (1000 < neutrofili < 1500/mm ³), i/ili anemija (10 < hemoglobin < 12 g/dl), i/ili trombocitopenija (100,000 < trombociti < 150,000/mm ³) ili limfopenija (500 < limfociti < 1000/mm ³)
	Umjerena = 2	Citopenija autoimunog podrijetla s neutropenijom (500 ≤ neutrofili ≤ 1000/mm ³), i/ili anemija (8 ≤ hemoglobin ≤ 10 g/dl), i/ili trombocitopenija (50,000 ≤ trombociti ≤ 100,000/mm ³) ili limfopenija (≤500/mm ³)
	Visoka = 3	Citopenija autoimunog podrijetla s neutropenijom (neutrofili < 500/mm ³), ili/i anemija (hemoglobin < 8 g/dl) i/ili trombocitopenija (trombociti <50,000/mm ³)
Biološka	Nema = 0	Odsutnost bioloških značajki
	Niska = 1	Klonalna komponenta i/ili hipokomplementemija (nizak C4 ili C3 ili CH50) i/ili hipergamaglobulinemija ili visoke IgG vrijednosti između 16 and 20 g/L
	Umjerena = 2	Prisutnost krioglobulinemije i/ili hipergamaglobulinemije ili visokih IgG vrijednosti > 20 g/L, i/ili nedavno otkrivena hipogamaglobulinemija ili nedavno sniženje IgG vrijednosti (<5 g/L)

Kratice: HRCT=kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije; NHYA=New York kardiološka asocijacija; DL_{co}=difuzijski kapacitet za ugljikov monoksid; FVC= forsirani vitalni kapacitet; GFR= brzina glomerularne filtracije; EMG= elektromiografija; CK= kreatin kinaza; EMNG= elektromioneurografija; CIDP= kronična upalna demijelinizirajuća polineuropatija; C3=komponenta komplement 3; C4=komponenta komplement 4; CH50=ukupna aktivnost komplementa; IgG= imunoglobulin G;

Tablica 3. Indeks oštećenja bolesti u Sjögren-ovom sindromu (SSDDI)

Oštećenja usne šupljine/slinovnica	Bodovi
Sijalometrija < 1.5 ml/15 min	1
Gubitak zubi	1
Okularna oštećenja	
Schirmer-ov test < 5 mm u 5 min	1
Ulceracija rožnice, katarakta, kronični blefaritis	1
Neurološka oštećenja	
Promjene u središnjem živčanom sustavu	2
Periferna neuropatija	1
Pleuropulmološka oštećenja	
Pleuralna ili intersticijska fibroza ili funkcionalno oštećenje	2
Bubrežna oštećenja	
bilo što od: povećane razine serumskog kreatinina, smanjena glomerularna filtracija, tubularna acidoza, nefrokalcinoza	2
Limfoproliferativne bolesti	
bilo što od: limfom B stanica, multipli mjelom, Waldenströmova makroglobulinemija	5

* trebalo bi biti ≤ 5 mm po Američko-Europskim kriterijima

1.7. Ateroskleroza

Ateroskleroza je kronična upalna, fibroproliferativna bolest velikih i srednjih arterija koju pokreću lipidi. Osnovni patološki proces u aterosklerozi je taloženje lipida u stijenci arterije uz proliferaciju glatkih mišićnih stanica i fibroznog matriksa. Napredovanje procesa dovodi do stvaranja aterosklerotskog plaka. Ruptura nestabilnog aterosklerotskog plaka i

agregacija trombocita uzrokuje stenozu ili okluziju krvnih žila, što dovodi do akutne kardiovaskularne bolesti [57,58].

Posljednjih desetljeća ateroskleroza se smatra kroničnom upalnom bolešću [59] jer upala igra važnu ulogu u svim fazama aterosklerotskog procesa [60]. Ateroskleroza može zahvatiti sve velike i srednje velike arterije, uključujući koronarne, karotidne i cerebralne arterije te glavne arterije ekstremiteta. Vodeći je uzrok morbiditeta i mortaliteta u većini razvijenih zemalja. Smrtnost u starijoj životnoj dobi koja se može pripisati aterosklerozi je u padu. No, unatoč tome u 2019. godini kardiovaskularne bolesti, prvenstveno koronarna i cerebrovaskularna bolest su uzrokovale oko 18 milijuna smrti diljem svijeta (> 30% svih smrti) [61]. Prevalencija ateroskleroze brzo raste u zemljama s niskim i srednjim prihodima. Na porast arterioskleroze, uz čimbenike kao što su pušenje, hipertenzija i dijabetes utječe i produženje životnog vijeka. Dakle, može se reći da je ateroskleroza još uvijek vodeći uzrok smrti u svijetu [62].

Među mnogim čimbenicima kardiovaskularnog rizika, povišena razina kolesterola u plazmi je dovoljna da potakne razvoj ateroskleroze, čak i u odsutnosti drugih poznatih čimbenika rizika. Čini se da drugi čimbenici rizika, kao što su hipertenzija, dijabetes, pušenje, muški spol i upalni parametri (npr. C reaktivni protein, citokini) ubrzavaju bolest potaknutu aterogenim lipoproteinima. Najvažniji lipoprotein u tom procesu je lipoprotein niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein* - LDL). Mehanizam djelovanja aterogenih lipoproteina nije potpuno jasan. Moguće je da povećavaju aterogenost LDL-a (npr. veličinu čestica, broj i sastav) ili povećavaju osjetljivost arterijske stijenke (npr. propusnost, glikaciju, upalu). No, važnost drugih čimbenika rizika, osim kolesterola, jasno je dokumentirana velikim razlikama u izraženosti bolesti među pojedincima s istom razinom kolesterola [63].

Ranije spomenuti čimbenici rizika ateroskleroze (dislipidemija, dijabetes, pušenje cigareta, hipertenzija) te uzročnici oksidativnog stresa (superoksidni radikali), angiotenzin II te sistemska upala inhibiraju proizvodnju dušikovog oksida (engl. *nitric oxide* - NO) i stimuliraju proizvodnju adhezijskih molekula, proupalnih citokina, kemotaktičkih proteina i vazokonstriktora. Konačni učinak je endotelno vezanje monocita i T stanica, migracija tih stanica u subendotelni prostor te započinjanje i održavanje lokalnog vaskularnog upalnog odgovora [64].

Monociti u subendotelu pretvaraju se u makrofage. Lipidi u krvi, osobito LDL kolesterol i kolesterol lipoproteina vrlo niske gustoće (engl. *very low density lipoprotein* - VLDL), također se vežu za endotelne stanice i oksidiraju se u subendotelu. Unos oksidiranih lipida i transformacija makrofaga u pjenaste stanice prepune lipida rezultiraju tipičnim ranim aterosklerotskim lezijama koje se nazivaju masne pruge. Raspadnute membrane eritrocita koje su rezultat rupture vasa vasorum i krvarenja unutar plaka mogu biti važan dodatni izvor lipida [65]. Makrofazi stvaraju proupalne citokine koji potiču migraciju glatkih mišićnih stanica iz medije. Nastali citokini dalje privlače i stimuliraju rast makrofaga. Razni čimbenici potiču umnažanje glatkih mišićnih stanica i povećanje stvaranja gustog izvanstaničnog matriksa. Rezultat je subendotelni plak s fibroznom kapom, građen od glatkih mišićnih stanica okruženih vezivnim tkivom te unutarstaničnim i izvanstaničnim lipidima. Proces sličan stvaranju kosti uzrokuje kalcifikaciju unutar plaka [66]. Vaskularna kalcifikacija obilježena je taloženjem minerala hidroksiapatita u obliku kalcij-fosfatnih kompleksa u arterijama. Transdiferencijacija između vaskularnih glatkih mišićnih stanica i stanica sličnih osteoblastima smatra se bitnom u nastanku i napredovanju ateroskleroze [67].

Disfunkcija endotelnih stanica arterija je najranija promjena u procesu ateroskleroze [68]. Nedostatak endotelne proizvodnje NO ili njegove bioraspoloživosti, kako u ljudi tako i u životinja, može prethoditi stvaranju klinički značajnih aterosklerotskih lezija [69]. Kako bi sintetizirale NO, endotelne stanice metaboliziraju L-arginin pomoću endotelne izoforme sintaze dušikovog oksida (engl. *endothelial nitric oxide synthase* - eNOS) [70, 71]. Bazalna razina stvaranja NO od strane endotelnih stanica doprinosi regulaciji vazomotornog tonusa i očuvanju netrombogene uloge vaskularne ovojnice. Sintezu NO stimuliraju receptorski ovisni agonisti acetilkolin i bradikinin, receptorski neovisni agonisti poput kalcijevih ionofora, kao i različite promjene u krvotoku [72]. Posebno značajno za vaskularnu homeostazu je djelovanje NO na glatke mišićne stanice, trombocite i leukocite [68]. Klinički značaj NO kod aterosklerozom uzrokovane kardiovaskularne bolesti prvi su pokazali Ludmer i suradnici koristeći koronarnu angiografiju [73].

1.8. Adropin

Godine 2008. Kumar i sur. identificirali su novi peptid nazvan adropin [74] koji se sastoji od 43 aminokiseline, a nastaje proteolitičkim cijepanjem prekursora od 76 aminokiselina. Naime, aminokiselinska sekvenca adropina visoko je očuvana među vrstama te je identična u štakora, miša, čovjeka i svinje [74]. Adropin je kodiran genom povezanim s energetsom homeostazom (engl. *energy homeostasis-associated gene* - ENHO), koji se uglavnom eksprimira u mozgu i jetri. Međutim, nalazi se i u perifernim tkivima kao što su srce, pluća, medula bubrega, mišići, mononuklearne stanice periferne krvi i stanice karcinoma dojke [74-76]. Nadalje, adropin je prisutan u cirkulacijskom sustavu životinja i ljudi [74,77].

Osim dobro utvrđene uloge adropina u metaboličkoj regulaciji, osobito učinka na metabolizam glukoze i inzulinsku osjetljivost u srcu, jetri i skeletnim mišićima, podaci pokazuju da adropin ima važan utjecaj na kardiovaskularne procese [75-79]. Naime, pokazalo se da stimulacija putova posredovanih adropinom poboljšava endotelnu funkciju i smanjuje upalu, čime se ublažavaju njezini štetni učinci. Unatoč tome, još smo daleko od implementacije adropina u rutinsku kliničku praksu, posebice u smislu terapije, budući da je terapijska uloga peptidnih hormona ograničena njihovim farmakokinetičkim svojstvima [80].

Na razine adropina u serumu utječe prehrana te ovise o prisutnosti metaboličke bolesti. Miševima koji su hranjeni hranom bogatom mastima tijekom 48 sati razine adropina u serumu su bile povišene [81]. Nasuprot tome, u miševa s pretilošću izazvanom prehranom s visokim udjelom masti, razine adropina u serumu su niske (<1 ng/mL). Negativna korelacija između razine adropina i indeksa tjelesne mase (ITM) također je potvrđena u studijama na ljudima [82-86], što upućuje da je niska razina adropina znak pretilosti.

Štoviše, čini se da adropin sudjeluje u održavanju energetske homeostaze i inzulinskog odgovora te je usko povezan s razvojem i progresijom aterogeneze [74]. Niže razine adropina dovode do oštećenja i disfunkcije endotela [87]. Dakle, smanjene razine adropina u serumu slabe endotelnu zaštitu i mogu potaknuti ili ubrzati aterosklerozu [88-90] zbog utjecaja na homeostazu lipida. U bolesnika na hemodijalizi je utvrđeno da adropin ima negativnu korelaciju s trigliceridima (engl. *triglycerides* – TG), LDL-om i totalnim kolesterolom (engl. *total cholesterol* - TC), dok ima značajnu pozitivnu korelaciju s lipoproteinom visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein* – HDL) tj. HDL kolesterolom [91]. Negativna korelacija između LDL-a i adropina utvrđena je u studiji Ghoshal i sur. koja je pokazala da niske razine

adropina mogu biti koristan biomarker za prepoznavanje pretelih bolesnika s povišenim LDL-om [92]. Spomenuta veza lipida i adropina otkrivena je u još nekoliko istraživanja [93,81]. Adropin modulira metabolizam lipida reguliranjem ekspresije jetrenih lipogenih gena i receptora za aktivator proliferacije peroksisoma tip gama (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* - PPAR γ), glavnog regulatora lipogeneze. Stoga bi primjena adropina mogla postati nova linija terapije protiv bolesti povezanih s poremećajem metabolizma glukoze i lipida [94]. Naime, studija na životinjama koju su proveli Akcilar i sur. pokazala da je intraperitonealna primjena niske doze adropina štakorima s hiperlipidemijom je bila iznimno učinkovita u smanjenju razina serumskih TG, TC i LDL kolesterola te povećanju razine HDL kolesterola [95].

Endotel ima središnju ulogu u održavanju vaskularne homeostaze, a oštećenje endotelne funkcije pridonosi razvoju i napredovanju različitih poremećaja. Najznačajniji poremećaji su oni u kardiovaskularnom sustavu te započinju s oštećenjem stanica endotela i razvojem ateroskleroze [96]. NO je najbitniji faktor za održavanje vaskularne homeostaze, a nastaje u endotelnim stanicama za vrijeme pretvorbe L-arginina u L-citrulin uz pomoć eNOS-a. [97]. NO difuzijom ulazi u vaskularne mišićne glatke stanice (engl. *vascular smooth muscle cells* – VSMC) te unutarstaničnim procesima uzrokuje relaksaciju VSMC [98]. Dodatno, NO sprječava migraciju i adheziju leukocita, proliferaciju glatkih mišićnih stanica, adheziju i agregaciju trombocita, te se suprotstavlja apoptozi i upali s ukupnim antiaterogenim učinkom [99]. Bioraspoloživost eNOS-a najvažniji je predstavnik endotelne funkcije. Reguliran je s najmanje tri različita mehanizma: transkripcijskom regulacijom eNOS-a, posttranskripcijskom aktivacijom eNOS-a i smanjenjem razgradnje NO posredovane reaktivnim vrstama kisika (engl. *reactive oxygen species* – ROS) [100].

Prvu studiju koja se bavila ulogom adropina u mogućoj zaštiti endotela proveli su Lovren i sur. [87]. Autori su pretpostavili da bi adropin mogao imati protektivnu ulogu u kardiometaboličkim bolestima. Njihovi rezultati impliciraju da adropin utječe na endotelnu sintezu NO posttranskripcijskom stimulacijom eNOS-a preko dva različita puta – preko fosfoinozimid-3-kinaza-protein kinaza B (engl. *phosphoinositide-3-kinase-protein kinase B* - PI3K-Akt) i kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase* - ERK1/2). Ova dva puta aktiviraju se s istim regulatorom, adropinskim receptorom - receptor faktora rasta vaskularnog endotela tipa 2 (engl. *vascular endothelial growth factor receptor type 2* - VEGFR2). Osim toga, adropin također može uključiti nekoliko putova

neovisnih o NO, pridonoseći regulaciji funkcije endotela putem VEGFR2-PI3K-Akt sustava. Lovren i sur. pokazali su da adropin potiče endotelne funkcije kao što su proliferacija, migracija, formiranje kapilarnih cjevčica, smanjena propusnost i apoptoza, kao i poboljšani angiogenetski potencijal [87]. Nadalje, autori su pokazali da adropin smanjuje upalni odgovor endotelnih stanica i makrofaga porijeklom iz monocita te smanjuje adheziju endotelnih stanica. Konačno, pokazali su da adropin potiskuje proliferaciju VSMC i povećava ekspresiju fibronektina i elastina u VSMC regulacijom PI3K-Akt puta, modulirajući tako stabilnost plaka i vaskularnu elastičnost. U in vivo dijelu gore navedene studije, autori su pokazali da je infuzija adropina značajno smanjila razvoj aterosklerotskih lezija u Apoe^{-/-} (engl. *atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient*) miševa [87]. Apoe^{-/-} miševi su miševi koji imaju slab klirens lipoproteina s naknadnim nakupljanjem čestica obogaćenih esterima kolesterola u krvi, što potiče razvoj aterosklerotskih plakova [87]. Rezultati nedavnog istraživanja pokazuju pokazali da adropin ublažava vaskularnu kalcifikaciju in vivo. Adropin je također inhibirao osteogenu diferencijaciju i kalcifikaciju VSMC in vitro. Lentivirusna transfekcija i mala interferirajuća RNA korištene su za prekomjernu ekspresiju adropina [67].

Klinički aspekt uloge adropina u endotelnoj disfunkciji također se istražuje posljednjih godina. S obzirom na učinke adropina na metabolizam NO, bila je upitna njegova uloga u regulaciji krvnog tlaka. Neki autori su utvrdili niže razine adropina u bolesnika s arterijskom hipertenzijom u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika koji su bili normotenzivni [101,102]. Gu i sur su pokazali da adropin može biti neovisni prediktor hipertenzije, a također negativno korelira s krvnim tlakom te utječe na njega štiteći endotelnu funkciju [101]. Nasuprot tome, Celik i sur. su pokazali da hipertenzivni bolesnici imaju visoke razine adropina [103]. Nadalje, liječenje hipertenzivnih bolesnika s antihipertenzivima kao što su valsartan i amlodipin dovodi do povećanja razine adropina u serumu [103]. Utvrđena je značajna negativna korelacija između razine adropina i predijaliznog sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka u bolesnika na kroničnoj hemodijalizi [91].

Sato i sur. proveli su studiju gdje je adropin, primjenjen subkutanom intraperitonejskom infuzijom u dozama od 5 do 10 µg/kg/h, pokazao je značajne učinke na krvni tlak u Apoe^{-/-} miševa [104]. Infuzija adropina od 5 µg/kg/h nije značajno spriječila povećanje aterosklerotske lezije aorte i promjenu veličine aterosklerotskog plaka u navedenoj studiji. Međutim infuzija adropina od 10 µg/kg/h značajno je smanjila područje aterosklerotične lezije aorte s tendencija smanjenja veličine plaka. Infuzija adropina od 10

$\mu\text{g/kg/h}$ značajno je smanjila i sadržaj monocita-makrofaga te VSMC unutar plaka. Zapravo, studija je pokazala da adropin ima višestruke učinke na najvažnije vaskularne stanice koje sudjeluju u patogenezi ateroskleroze (endotelne stanice, makrofage i VSMC). Isto tako, Sato i sur. su prvi pokazali da adropin suzbija aterosklerozu neovisno o metabolizmu glukoze i lipida te krvnom tlaku [104].

Fujie i sur. su potvrdili povezanost razina adropina s povišenim razinama nitrita/nitrata u krvi te smanjenom krutošću arterija. Pokazali su da aerobni trening povećava razine adropina i nitrita/nitrata što posljedično snižava krutost arterija. Povećanje serumskih razina adropina uslijed aerobnog treninga najvjerojatnije dovodi do smanjenja arterijske krutosti posredovane NO biodostupnošću. Stoga je moguće da adropin potiče smanjenje arterijske krutosti preko NO-ovisne signalizacije. [105]. U skladu s ovim podacima, tjelesna vježba regulira cirkulirajući adropin u ljudi, što je popraćeno poboljšanom funkcijom endotela krvnih žila [106].

Uloga adropina u autoimunim bolestima je popuno neistražena. Yolbas i sur. nisu pokazali značajnu razliku u razinama adropina u serumu bolesnika s RA i SLE i zdravih kontrola. Ekspresija gena ENHO bila je značajno veća u bolesnika s RA u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom, no to nije bilo praćeno povišenim razinama adropina u serumu [107]. S druge strane, povećana razina adropina u serumu nađena je u kohorti bolesnika sa SSc i Behcetovom bolešću (engl. *Behcet's disease* - BD) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Povećanje razine adropina u SSc i BD bi se moglo objasniti upalnim procesima na krvnim žilama koji su sastavni dio ovih bolesti [76, 95]. Za razliku od Yolbas-a i sur., studija Šimac i sur. je našla niže razine adropina u bolesnika s uznapredovalim RA [108].

Ukratko, na temelju dosadašnjih istraživanje se može pretpostaviti da su razine adropina u krvožilnom sustavu smanjene u bolesnika s kardiovaskularnim bolestima te da bi mogle biti prediktori kasnih komplikacija povezanih s kardiovaskularnim bolestima [109]. Dakle, adropin je važan čuvar vaskularnog zdravlja i budući da razine adropina u plazmi koreliraju s indeksima endotelne disfunkcije mogao bi poslužiti kao koristan biomarker kardiovaskularne patologije u nadolazećoj budućnosti [110]. Ulogu adropina u autoimunim bolestima je potrebno još istražiti.

1.9. Homocistein

Homocistein je neesencijalna aminokiselina koja nastaje biosintezom i metabolizmom metionina (engl. *methionine* - Met). Unutar Met metaboličkog puta, homocistein se može nepovratno razgraditi u cistein (engl. *cysteine* - Cys) putem transsulfuracije ili ponovno metilirati natrag u Met. Homocistein je izuzetno važan za homeostazu stanice, iako je njegova fiziološka aktivnost ključna za Met koji igra vitalnu ulogu za održivost stanice [111].

Hiperhomocisteinemija se smatra biomarkerom za nekoliko patoloških poremećaja u kojima se visoke razine homocisteina u plazmi mogu jednostavno pratiti testiranjem krvi [112]. Fiziološke razine homocisteina se kreću između 5 i 15 $\mu\text{mol/l}$, dok se hiperhomocisteinemija smatra blagom kada su vrijednosti u rasponu od 15 do 30 $\mu\text{mol/l}$, umjerenom za vrijednosti između 30 i 100 $\mu\text{mol/l}$ i teškom za vrijednosti veće od 100 $\mu\text{mol/l}$ [113]. Trajno povišeni homocistein potiče stvaranje aterosklerotskih plakova, aterotrombotičkih događaja usljed endotelne disfunkcije. Također dijeluje prouplano i pokazuje tzv. trombofilni profil [112]. Uz tradicionalne čimbenike rizika, prepoznata je uloga homocisteina u procesu aterogeneze. Stoga su se Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization* - WHO) i Ministarstvo zdravstva odlučili razmotriti homocistein kao značajni rizik kardiovaskularnih bolesti [114].

Homocistein doprinosi razvoju kardiovaskularnih bolesti inducirajući endotelnu disfunkciju smanjenjem NO, najsnažnijeg vazodilatatora kojeg proizvodi endotel, te oksidativnim stresom uslijed povećanog stvaranja ROS-a [112,115]. Osim toga, homocistein mijenja metabolizam lipida pokretanjem procesa oksidativne razgradnje lipida endotelne membrane, što dovodi do gubitka funkcije staničnih membrana [116]. Homocistein inhibira proizvodnju NO na dva načina, inhibicijom razine ekspresije eNOS-a podržavajući prekomjernu ekspresiju caveolina-1 koji veže i inaktivira eNOS [117,118] ili smanjenjem kationskog transportera aminokiselina koji arginin čini dostupnim za sintezu NO putem eNOS-a [119]. Homocistein može potaknuti progresiju ateroskleroze povećanjem ekspresije kemokina i adhezijskih molekula koje induciraju nakupljanje cirkulirajućih upalnih krvnih stanica što u konačnici dovodi do endotelne disfunkcije. Nadalje, pokazalo se da je visoka cirkulirajuća koncentracija homocisteina u endotelu odgovorna za povećanu proliferaciju glatkih mišićnih stanica koje, zajedno s promjenom normalne funkcije trombocita, mogu doprinijeti početku stvaranja aterosklerotskog plaka [115]. Štoviše, čini se da homocistein

pogoduje proliferaciji i aktivaciji monocita što dovodi do veće proizvodnje upalnih citokina [120].

Mnoge novije studije poduprle su teoriju o korelaciji između povišenih razina homocisteina i visokog krvnog tlaka, oba neovisna čimbenika rizika za kardiovaskularne bolesti [121,122].

Pokazalo se da su povišene razine homocisteina umjereno jak i neovisan čimbenik kardiovaskularnog rizika u zdravoj populaciji. Također su se pokazale kao faktor rizika za arterijsku hipertenziju [123].

Reumatske bolesti često su povezane s visokom prevalencijom koronarnih događaja [124]. Štoviše, bolesnici s RA i SLE razvijaju preuranjenu aterosklerozu i imaju povećanu smrtnost [125].

Sabio i sur. pokazali su da je homocistein neovisno povezan sa SBP-om i hipertenzijom u žena sa SLE-om, ali ne i u kontrolnoj skupini. Povišene razine homocisteina mogu povećati rizik za arterijsku hipertenziju u SLE-u, a također je utvrđeno da su nezavisan čimbenik rizika za progresiju ateroskleroze [123]. Studija provedena na bolesnicima s RA također je pronašla povezanost arterijske hipertenzije s povišenim koncentracijama homocistein [126].

Pokazano je da bolesnici s RA imaju značajno veće vrijednosti homocisteina u odnosu na kontrolnu skupinu [127], dok je objavljeno da bolesnici sa SLE imaju prevalenciju infarkta miokarda u rasponu od 4 do 45% ovisno o vrijednostima njihovog homocisteina. Što je homocistein veći, postotak infarkta miokarda u ovih bolesnika raste [128]. Dakle, homocistein se pokazao faktorom rizika za kardiovaskularne bolesti u bolesnika s RA i SLE. Kao što je prije pokazano, povećanje razine homocisteina ima izravno toksično djelovanje na endotelne stanice i potiče oksidaciju LDL te ima protrombotičke učinke [128].

1.10. Debljina intime-medije karotidnih arterija

Postoje mnoge metode za praćenje i mjerenje ateroskleroze i subkliničke ateroskleroze. Po preporuci Američkog udruženja za srce (engl. *American Heart Association*

– AHA), ne-invazivna metoda kojima subklinička ateroskleroza može biti potvrđena i praćena je ultrazvuk karotidnih arterija na nekoliko razina kroz dva bitna parametra, debljina intime-medije karotidne arterije (engl. *carotide intima-media thickness* – CIMT) i postojanje plakova [129].

Doppler karotidnih arterija je neinvazivna tehnika koja koristi ultrazvuk u procjeni prohodnosti karotidne arterije. Debljina intime-medije karotidne arterije je indikator kardiovaskularnog rizika i odlična mjera za praćenje vaskularnog oštećenja [130], te se koristi kao surogat marker za aterosklerozu [131].

Ultrasonografijom se može odrediti zajednička debljina arterijskog intimalnog i medijalnog sloja, koja se obično mjeri u zajedničkoj karotidnoj arteriji [132]. Debljina karotidne intime-medije odražava difuzno zadebljanje sloja intime koje se vidi kod ateroskleroze i potvrđena je kao mjera rizika za kardiovaskularne događaje [133] i opterećenje aterosklerotskom bolešću [134].

CIMT je valjani surogat marker vaskularne bolesti u populaciji bolesnika ali i u općoj populaciji. Povećani CIMT predviđa morbiditet i rizik smrtnosti od vaskularne bolesti [135].

Belibou i sur. dobili su rezultate koji podržavaju vrijednosti CIMT-a i postojanje karotidnog plaka kao surogat biomarkere ateroskleroze u žena sa SLE-om. Ultrazvuk karotida pokazao je zadebljanje intime-medije u više od polovice žena (51,4%), a karotidni plakovi zabilježeni su u 31,4% bolesnica sa SLE-om [129]. Više studija istraživalo je subkliničku aterosklerozu i u bolesnika s pSS-om mjerenjem vrijednosti CIMT-a. Vaudo i sur. bili su prvi koji su proučavali subkliničko kardiovaskularno oštećenje organa u pSS-u. Više od polovice bolesnica imalo je zadebljanje intime-medije karotide. Pacijentice sa zadebljanjem intime-medije karotide su imale povećanu vrijednost cirkulirajućih anti SSA antitijela, a multivarijantna analiza rezultata je pokazala da su anti SSA antitijela neovisni prediktori zadebljanja karotidne arterije [136]. Još su dvije studije pokušale dokazati subkliničku aterosklerozu u bolesnika s pSS-om mjerenjem debljine intime-medije karotidne arterije ali poveznicu nisu uspjeli dobiti [137, 138]. Nadalje, Zaradi i sur. proveli su *duplex doppler* sonografsku studiju karotida kako bi se procijenila debljina intime-medije. Nije pronađena značajna razlika u CIMT-u između pSS-a i kontrolne skupine. Nedostatak značajne razlike u subkliničkoj aterosklerozi između starijih bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine ispitanika, ukazuje na to da tradicionalni kardiovaskularni čimbenici rizika, imunološke promjene i

kronična upala ne utječu na napredovanje vaskularnog oštećenja u karotidnoj cirkulaciji bolesnika s medijanom trajanja bolesti od 6,5 godine [138]. Potom je 2015. godine Gavrani i sur. pokazao da 2/3 bolesnika s pSS-om imaju zadebljanje intime-medije karotide te je pSS sam po sebi identificiran kao nezavisni faktor rizika za zadebljanje arterijskog zida [139].

U općoj populaciji prijavljena je slaba povezanost ili odsutnost veze između vrijednosti homocisteina i CIMT-a [131, 140-142]. Međutim, općenito je nedovoljno dokaza o vezi između homocisteina i debljine intime-medie karotidne arterije, a kao takvi uopće ne postoje u bolesnika s pSS-om [139].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi serumske vrijednosti adropina u bolesnika s pSS-om i kontrolnoj skupini ispitanika
2. Utvrditi serumske vrijednosti homocisteina te promjene CIMT-a u oboljelih od pSS-a u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika

Sporedni ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi povezanost razine adropina s anti SSA/Ro i anti SSB/La proutijelima
2. Utvrditi povezanost adropina s aktivnošću bolesti mjerenom ESSDAI upitnikom i s kroničnim oštećenjem mjerenim s SSDDI upitnikom u oboljelih od pSS-a
3. Utvrditi povezanost homocisteina i CIMT-a
4. Utvrditi povezanost homocisteina i CIMT-a s anti SSA/Ro i anti SSB/La proutijelima
5. Utvrditi povezanost homocisteina i CIMT-a s aktivnošću bolesti mjerenom ESSDAI upitnikom i s kroničnim oštećenjem mjerenim s SSDDI upitnikom u oboljelih od pSS-a

Hipoteze:

1. Serumske razine adropina i homocisteina te promjene CIMT-a u bolesnika s pSS-om se značajno razlikuju u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika
2. Promjene CIMT-a u bolesnika s pSS-om su značajno veće u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika
3. Serumske razine adropina su pozitivno povezani s anti SSA/Ro i anti SSB/La proutijelima serumske razine adropina su negativno povezane sa zbrojem ESSDAI i SSDDI upitnika
4. Serumske razine homocisteina i CIMT su pozitivno povezane sa zbrojem ESSDAI i SSDDI upitnika
5. Serumske razine homocisteina te CIMT su negativno povezane s anti SSA/Ro i anti SSB/La proutijelima
6. Serumske razine homocisteina su pozitivno povezane sa CIMT-om

Ustroj istraživanja:

Ovo istraživanje je po pristupu kliničko, po razini i namjeni primjenjeno, po načinu dobivanja podataka opservacijsko, a po specifičnom ustroju presječno korelacijsko.

Glavni ishodi istraživanja:

1. Razlike u serumskim razinama adropina u bolesnika s pSS i kontrolnom skupinom izražene u mjernoj jedinici ng/ml,
2. Razlike u serumskim razinama homocisteina izražene u mjernoj jedinici $\mu\text{mol/L}$
3. CIMT-a u bolesnika s pSS-om i kontrolnoj skupini izražena u mm.

Sporedni ishodi istraživanja:

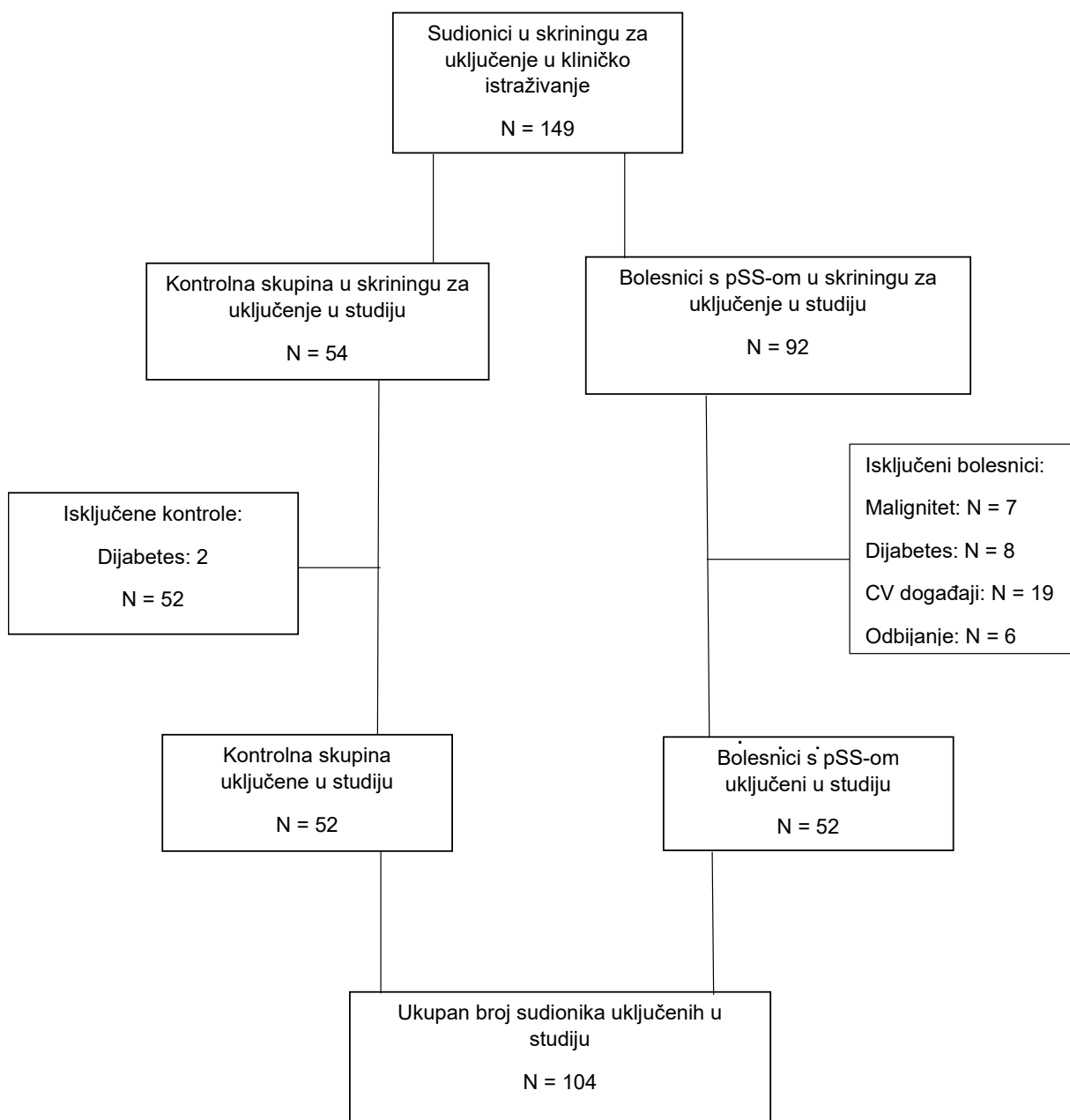
1. Povezanost adropina s HDL-om (izražen u mmol/L)
2. Povezanost adropina s anti SSA/Ro i anti SSB/La protutijelima (izražene u jedinici AU/ml)
3. Povezanost adropina s vrijednošću SSDDI upitnika (izraženi zbrojem bodova u upitniku)
4. Povezanost homocisteina s TG i CIMT-om
5. Povezanost CIMT-a s anti SSA/Ro i anti SSB/La protutijelima (izražene u jedinici AU/ml)
6. Povezanost CIMT-a s vrijednošću SSDDI upitnika (izraženi zbrojem bodova u upitniku)

3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

3.1. Ispitanici

Istraživanje serumskih razina adropina provedeno je na 52 bolesnika s pSS-om koji su kontrolirani i liječeni na Zavodu za reumatologiju i kliničku imunologiju KBC Split, od siječnja 2018. do veljače 2019. godine. Svi bolesnici ispunjavaju kriterije Američko-europske konsenzus grupe za klasifikaciju pSS [33]. Kriteriji za uključivanje bolesnika u istraživanje bila je dob iznad 18 godina i trajanje bolesti duže od godinu dana. Kriteriji za isključenje bili su prisutnost drugih upalnih reumatskih bolesti (RA, SLE, SSc, vaskulitis), esencijalna mješovita krioglobulinemija, IgG4 sindrom, šećerna bolest, kronično zatajenje bubrega, zloćudni tumori hematopoeze ili kardiovaskularne bolesti (akutni infarkt miokarda, angina pectoris, moždani udar ili periferna arterijska bolest). Kontrolna skupina je uključivala 52 ispitanika koji su po spolu, dobi, pušenju i indeksu tjelesne mase bili podudarni s pSS bolesnicima (Slika 2).

Iz daljnjeg istraživanja isključena su 4 bolesnika s pSS-om i 6 kontrolnih ispitanika jer nisu imali nalaze ultrazvuka. Stoga je u istraživanju serumskih razina homocisteina i promjena CIMT-a bilo uključeno 48 bolesnika s pSS-om. Kriteriji uključivanja i isključenja bili su identični kao u istraživanju s adropinom. Kontrolna skupina je uključivala 46 ispitanika koji su po spolu, dobi, pušenju i ITM bili podudarni s bolesnicima s pSS-om.



Slika 2. Hodogram dizajna kliničkog istraživanja

3.2. Postupci

3.2.1. Klinički i laboratorijski nalazi

Sudionici su ispitani pomoću standardiziranog kliničkog intervjua. Zabilježeni su sociodemografski, antropometrijski i klinički podaci; tradicionalni čimbenici KV rizika; komorbiditeti i trenutni lijekovi. Klinički podaci bolesnika kao trajanje bolesti, Schirmerov test, scintigram slinovnica i nalazi biopsije dobiveni su iz medicinske dokumentacije i elektroničkog kartona pacijenata. Nakon detaljnog fizičkog pregleda, uzeti su uzorci krvi. Uzorci krvi za biokemijske i imunološke pretrage su uzimani natašte, a analizirao ih je iskusni medicinski biokemičar koji nije bio upoznat s kliničkim podacima ispitanika prema standardnoj laboratorijskoj praksi od strane središnjeg laboratorija našeg centra. Analizirani su standardni laboratorijski parametri, komponente komplementa i adropin bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine. Autoantitijela su određena samo u bolesnika s pSS-om.

Uzorci za analizu razine adropina u serumu centrifugirani su i pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, dok su hematološki i biokemijski parametri bili analizirani istog dana standardnim laboratorijskim postupcima. Razine adropina u serumu utvrđene su korištenjem dvostruke enzimske imunoanalize (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) (marka uređaja: Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, SAD) prema uputama proizvođača. Kalibracije su dvostruko izmjerene, a vrijednosti optičke gustoće (OD) bile su u skladu s unaprijed definiranim vrijednostima OD navedenim u uputama proizvođača, a koeficijent varijabilnosti uparenih kalibracija bio je $<15\%$. Linearni raspon testa iznosio je $0,3\text{-}8,2\text{ ng/mL}$, a osjetljivost $0,3\text{ ng/mL}$, dok je koeficijent varijabilnosti unutar sonde bio manji od 10%

Uzorci krvi za mjerenje homocisteina stavljeni su na led nakon prikupljanja i prije centrifugiranja kako bi se smanjilo potencijalno povećanje razine homocisteina prouzročeno sintezom crvenih krvnih stanica. Nakon centrifugiranja uzorci seruma su odvojeni od stanica prijenosom u sekundarne epruvete prije analize. Koncentracija homocisteina u serumu mjerena je kemiluminiscentnim imunotestom mikročestica (engl. *chemiluminescence microparticle immunoassay* - CMIA) na analizatoru Architect (Abbott Laboratories, Chicago, IL, SAD). U ovoj kompetitivnoj CMIA metodi vezani ili dimerizirani homocistein (oksidirani oblik) se reducira u slobodni homocistein i pretvara u S-adenozil-L-homocistein (engl. *S-Adenosyl-L-homocysteine* - SAH). SAH se natječe s akridinijem obilježenim S-adenozil cisteinom iz reagensa za monoklonska detekcijska protutijela vezana na čestice. Nakon

ispiranja i odvajanja, započinje kemiluminiscentna reakcija i konačni signal se mjeri u relativnim svjetlosnim jedinicama.

Antinuklearna protutijela (ANA) detektirana su neizravnom imunofluorescencijom test na supstratu stanica HEp-2 (Inova Diagnostics, San Diego, CA, SAD). Rezultati ANA IFA su navedene s titrom i uzorkom fluorescencije. Titar za pozitivne rezultate bio je postavljen na 1:160, a titar 1:80 je definiran kao granično pozitivan. Specifična antitijela uključujući anti SSA/Ro60, anti SSA/Ro52 i anti SSB/La su mjerena pomoću testa Fidis Connective Profile 14 (Theradiag, Marne-la-Vallée, Francuska) na Luminex analizatoru 100/200. Ovaj polukvantitativni adresabilni imunološki test s laserskim kuglicama omogućuje istovremeno otkrivanje 14 različitih ANA specifičnih protutijela s razlikom između anti SSA/Ro60 i anti SSA/Ro52 antitijela. ANA i anti SSA/Ro 60, anti SSA/Ro 52, i anti SSB/La analizirani su samo u bolesnika s pSS-om. Ostali biokemijski parametri bili su analizirati prema standardnim laboratorijskim postupcima.

3.2.2. Definicija kardiovaskularnog rizika

Krvni tlak (*engl. blood pressure* - BP) mjerjen je dva puta, u razmaku od 5 minuta, na dominantnoj ruci, u sjedećem položaju ispitanika nakon najmanje 5 minuta odmora, a srednja vrijednost je izračunata kako bi se postigla preciznija vrijednost. BP je mjerio isti liječnik s validiranim automatskim oscilometrijskim uređajem (Rudolf Riester GmbH, Jungingen, Njemačka). Hipertenzija je definirana kao sistolički tlak (*engl. systolic blood pressure* - SBP) ≥ 140 mm Hg, dijastolički tlak (*engl. diastolic blood pressure* – DBP) ≥ 90 mm Hg, ili normalne vrijednosti krvnog tlaka u bolesnika koji se liječe antihipertenzivima. Hiperkolesterolemija je definirana kao TC $> 5,0$ mmol/L ili primjena statina, dok TG $> 1,7$ mmol/L ukazuju na hipertrigliceridemiju. Tjelesna visina i težina bile su određene pomoću medicinske vage s ugrađenim visinama (Seca, Birmingham, UK). Indeks tjelesne mase izračunat je po formuli = tjelesna masa/visina² (kg/m²). Pretilost je bila definirana kao ITM ≥ 30 kg/m². Sudionici su se smatrali pušačima ako su tijekom godine prije uključivanja u studiju pušili barem jednu cigaretu dnevno. Niska tjelesna aktivnost definirana je kao izostanak aktivnosti od najmanje 45 minuta umjereno intenzivne aerobne tjelesne vježbe manje od 3 dana tjedano. Menopauza je definirana izostankom menstruacije više od godinu dana. Framinghamov rezultat rizika (*engl. Framingham risk score* - FRS) izveden je za svakog ispitanika primjenom rodno specifične formule predviđanja koje su predložili Wilson i

sur. na temelju konvencionalnih kardiovaskularnih čimbenika rizika (dob, TC i HDL kolesterol krvni tlak, dijabetes i pušački status) [143]. Za ovu studiju, automatski je izračunat pomoću kalkulatora s web stranice: <https://www.mdcalc.com/framingham-risk-score-hard-coronary-heart-disease> (pristupljeno 26. svibnja 2018.).

3.2.3. Procjena aktivnosti bolesti i oštećenja u pSS-u

Aktivnost pSS mjerena je pomoću EULAR indeksa aktivnosti Sjögrenovog sindroma (ESSDAI), koji uključuje 12 domena: konstitucionalnu, limfadenopatiju, žljezdanu, zglobnu, kožnu, plućnu, bubrežnu, mišićnu, periferni živčani sustav, središnji živčani sustav, hematološku i biološku domenu [55]. Ireverzibilna oštećenja u pSS-u procijenjena su pomoću indeks oštećenja Sjögrenovog sindroma (SSDDI), koji se sastoji od sljedećih domena: očne, oralne i sistemske (neurološka, bubrežna, plućna, kardiovaskularna, gastrointestinalna, mišićno-koštana, endokrina i maligna) [56].

3.2.4. Određivanje CIMT-a

Kolor doppler ultrazvuk (GE Logiq P9) obavio je isti ispitivač; mjerenja su uključivala debljinu karotidne intime-medije (CIMT) i karotidne plakove. CIMT je procijenjen na tri razine na svakoj strani: zajednička karotidna arterija (10 mm prije bulbosa), bulbus (5-10 mm kranijalno do početka bulbosa) i unutarnja karotidna arterija (10 mm nakon razdjelnika protoka). Prema trenutnim sonografskim kriterijima, govorimo o "normalnom" CIMT-u kada je intima medija $\leq 0,9$ mm; CIMT $> 0,9$ mm smatrao se pokazateljem zadebljane intime, a CIMT $> 1,3$ mm pokazateljem aterosklerotskog plaka [144]. Osim toga, procijenjen je broj i veličina karotidnih aterosklerotskih plakova. Formiranje plakova definirano je kao žarišna izbočina više od 50% okolne stijenke [144, 145]. Maksimalni (max) CIMT je najveća vrijednost mjerena na tri razine karotidne arterije. Radiolog zadužen za ultrazvučni pregled nije bio upoznat s kliničkim pokazateljima ispitanika.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Statistička analiza provedena je pomoću MedCalc paketa, verzija 19.1.2 (MedCalc Soft ware, Ostend, Belgija). Kategoričke varijable izražene su cijelim brojevima (N) i postotcima (%) a kontinuirane varijable kao srednja vrijednost i standardna devijacija ili medijan i interkvartilni raspon, prema normalnosti distribucije podataka koja je procijenjena s Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Sukladno tome, statističke razlike između kategoričkih varijabli utvrđene su Hi-kvadrat testom, dok su razlike između kontinuirane varijable su određene t-testom za neovisne uzorke i Mann-Whitneyjevim U testom. Nadalje, procijenjene su korelacije između adropina i drugih parametara s Pearsonovim i Spearmanovim koeficijentima korelacije. Konačno, faktori neovisno povezani s razinama adropina određeni su korištenjem analize višestruke linearne regresije. Prijavljeni su nestandardizirani beta koeficijenti (β), standardna pogreška (SE), t i p-vrijednosti. Statistička značajnost postavljena je na $p < 0,05$.

Veličina uzorka određena je statističkim paketom MedCalc, korištenjem t-testa za nezavisne uzorke. U pilot studiji na 15 nasumično odabranih sudionika s pSS-om i 15 kontrolnih sudionika procijenjene su razine adropina. Razlika između dva sredstva za razinu adropina bila je 0,43, a standardna devijacija 0,59. S α pogreškom postavljenom na 0,05 i β pogreškom od 0,1, izračunata potrebna veličina uzorka bila je 40 ispitanika po skupini.

4. ETIČKA NAČELA

Svi postupci kojima su ispitanici u ovom istraživanju bili podvrgnuti koriste se u rutinskom dijagnostičkom postupku, praćenju i liječenju bolesnika s primarnim Sjogrenovim sindromom.

Tijekom istraživanja poštovani su etički i bioetički principi – osobni integritet, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost u skladu s nurnberskim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije (World Medical Association Declaration of Helsinki – 52nd WMA Annual assembly, Edinburgh, Scotland, October, 2000.) te u skladu s hrvatskim zakonima (Hrvatski liječnički zbor – kodeks medicinske etike i deontologije, Zagreb, 2002.).

Dobivena je privola Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split (date of approval: 25/10/2017) i Medicinskog fakulteta, Sveučilište u Splitu (date of approval: 27/10/2017). U istraživanje su bili uključeni samo oni ispitanici koji su prethodno potpisali informirani pristanak nakon što su bili informirani o procedurama i svrsi planiranog istraživanja. Rezultati će se koristiti isključivo za dobivanje znanstvenih rezultata i oblikovanje znanstvenog mišljenja, a neće se koristiti u svrhu stjecanja materijalne dobiti.

5. REZULTATI

5.1. Rezultati za adropin

5.1.1. Osnovne karakteristike studijske populacije

U istraživanje smo uključili 52 bolesnika s pSS i 52 kontrolna ispitanika koji se podudaraju po spolu, godinama, pušenju i indeksu tjelesne mase. Srednja dob bolesnika s pSS i kontrola bila je 59.3 ± 11.1 vs. 57.8 ± 10.5 (Tablica 4). Bolesnici su imali stabilnu bolest, s medijanom indeksa aktivnosti bolesti ESSDAI 2 (IQR 1-3), medijan indeksa oštećenja SSDDI 2 (IQR 2-3) i medijana trajanja bolesti 6 godina (IQR 3.5-10). Sistolički i dijastolički krvni tlak su bili statistički značajno veći u ispitivanoj grupi naspram kontrolne skupine (126.2 ± 16.8 vs. 118.9 ± 13.2 mmHg, $p = 0.015$ i 81.4 ± 7.6 vs. 77.6 ± 8.1 mmHg, $p = 0.014$) (Tablica 4). Bolesnici s pSS-om su imali veći desetogodišnji rizik za kardiovaskularne bolesti koji je iznosio 3.4 (IQR 1.3-5.5) vs. 2.1 (IQR 1.0-3.3), $p = 0.042$, iako je većina sudionika imala niski desetogodišnji rizik prema FRS.

Tablica 4. Osnovna obilježja bolesnika s pSS i kontrolne skupine.

Parametar	pSS grupa (N=52)	Kontrolna grupa (N=52)	p^*
Muški rod (N, %)	4 (7.7)	3 (5.8)	0.718
Starost (godine)	59.3 ± 11.1	57.8 ± 10.5	0.477
Težina (kg)	70.9 ± 11.6	71.9 ± 10.1	0.654
Visina (cm)	168.8 ± 7.1	168.3 ± 6.8	0.715
Indeks tjelesne mase (kg/m^2)	24.8 ± 3.4	25.4 ± 3.1	0.418
SBP (mmHg)	126.2 ± 16.8	118.9 ± 13.2	0.015
DBP (mmHg)	81.4 ± 7.6	77.6 ± 8.1	0.014
FRS (%)	3.4 (1.3-5.5)	2.1 (1.0-3.3)	0.042
Pušenje (N, %)	9 (17.3)	8 (15.4)	0.792
Dužina bolesti (godine) [†]	6 (3.5-10)	-	-
ESSDAI	2 (1-3)	-	-
SSDDI	2 (2-3)	-	-

Kratice: SBP: Sistolički krvni tlak; DBP: Dijastolički krvni tlak; FRS: Framingham rezultat rizika za koronarne srčane bolesti; ESSDAI: EULAR Primary Sjögren's Syndrome Disease Activity Index; SSDDI: Sjögren's Syndrome Disease Damage Index

Podaci su prikazani kao cijeli broj (postotak), srednja vrijednost \pm standardna devijacija ili medijan (IQR)

* hi-kvadrat test (Fisherov egzaktni test), t-test za neovisne uzorke ili Mann-Whitney U test

† vremensko razdoblje od početne dijagnoze

5.1.2. Laboratorijski parametri studijske populacije

Bolesnici s pSS su imali značajno niže razine hemoglobina ($p < 0.001$), leukocita ($p = 0.001$) i više vrijednosti sedimentacije eritrocita [ESR ($p = 0.006$)], dok je kontrolna skupina imala značajno više razine totalnog kolesterola ($p = 0.010$). Drugi parametri se nisu značajno razlikovali između ispitivanih skupina. (Tablica 5). Anti SSB/La antitijela bila su negativna u 25 pSS bolesnika (48,1%), pozitivna u 23 (44,2%) i granična u 4 (7,7%) bolesnika s pSS. Anti SSA/Ro52 antitijela bila su negativna u 15 bolesnika (28,8%) i pozitivna u 37 (71,2%) bolesnika s pSS. Anti SSA/Ro60 antitijela bila su negativna u 11 (21,2%) i pozitivna u 41 (78,8%) bolesnika s pSS.

Tablica 5. Laboratorijski parametri bolesnika s pSS i kontrolne skupine

Parametar	pSS grupa (N=52)	Kontrolna grupa (N=52)	p^*
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	4.37 \pm 0.42	4.52 \pm 0.32	0.047
Hemoglobin (g/L)	130.5 \pm 11.0	138.4 \pm 11.5	<0.001
MCV (fL)	87.1 \pm 12.8	93.1 \pm 16.1	0.034
Leukociti ($\times 10^{12}/L$)	4.88 \pm 1.38	5.94 \pm 1.81	0.001
Trombociti ($\times 10^9/L$)	230.8 \pm 52.1	244.1 \pm 47.9	0.179
Urea (mmol/L)	5.51 \pm 1.65	5.47 \pm 1.44	0.915
Kreatinin (mmol/L)	65.9 \pm 18.5	63.1 \pm 14.6	0.378
ESR (mm/h)	16.5 (8.0-27.5)	10.0 (6.0-16.0)	0.006
hsCRP (mg/L)	1.30 (0.8-3.8)	1.15 (0.7-3.3)	0.767
TC (mmol/L)	5.60 \pm 1.12	6.13 \pm 0.93	0.010
LDL (mmol/L)	3.56 \pm 0.96	3.91 \pm 1.15	0.093
TG (mmol/L)	1.18 \pm 0.42	1.42 \pm 0.85	0.072
HDL (mmol/L)	1.52 \pm 0.37	1.57 \pm 0.32	0.436

C3 (g/L)	1.21 ± 0.22	1.19 ± 0.17	0.567
C4 (g/L)	0.26 ± 0.19	0.31 ± 0.09	0.197
Anti SSB/La (AU/ml)	33.5 (2.5-81.5)	-	-
Anti SSA/Ro52 (AU/ml)	91.0 (16.5-162.0)	-	-
Anti SSA/Ro60 (AU/ml)	103.0 (56.5-117.0)	-	-

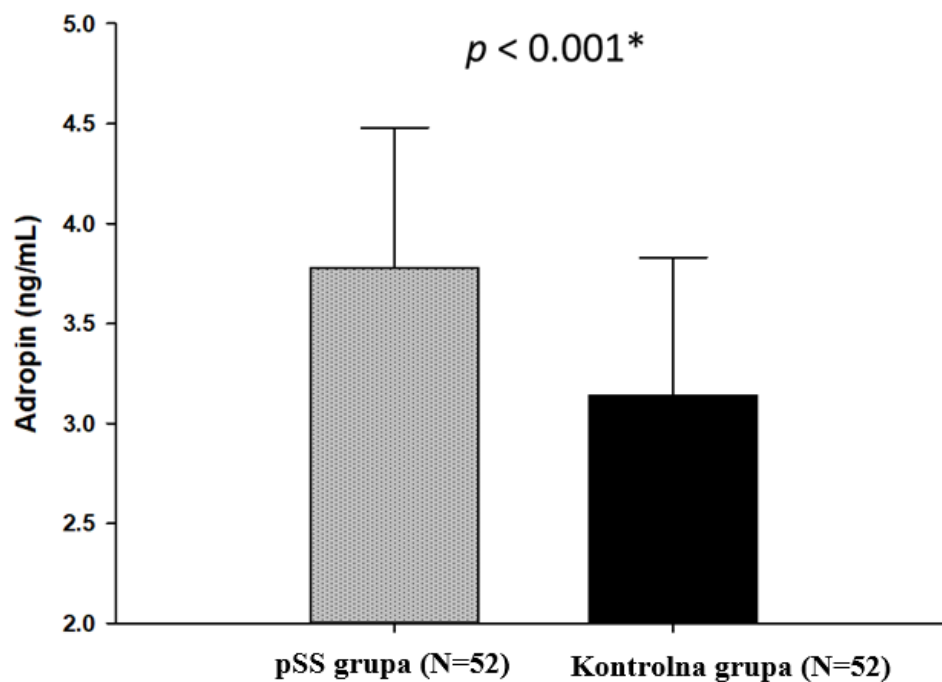
Kratice: MCV: Prosječni volumen eritrocita; ESR: Brzina sedimentacije eritrocita; hsCRP: C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; TC: ukupni kolesterol; LDL: lipoprotein niske gustoće; TG: trigliceridi; HDL: lipoprotein visoke gustoće; C3: komponenta komplementa C3; C4: komponenta komplementa C4;

Podaci su prikazani kao cijeli broj (postotak), srednja vrijednost ± standardna devijacija ili medijan (IQR)

* t-test za neovisne uzorke ili Mann-Whitney U test

5.1.3. Serumske razine adropina u bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine

Serumske razine adropina bile su statistički značajno veće u bolesnika s pSS u usporedbi a kontrolnom skupinom (3.76 ± 0.68 vs 3.14 ± 0.69 ng/ml, $p < 0,001$) (Slika 3). Nadalje, nakon podijele bolesnika s pSS-om u dvije skupine; skupinu s nižim vrijednostima adropina ($<3,73$ ng/ml) i skupinu s višim vrijednostima adropina ($>3,73$ ng/ml) pronađena je značajna statistička razlika u vrijednostima SSDDI skora 3.0 ($2.0-4.0$) vs. 2.0 ($1.0-2.0$), $p < 0,001$. Skupina bolesnika s pSS-om s nižim vrijednostima adropina ($<3,73$ ng/ml) imala je viši SSDDI (Tablica 6).



Slika 3. Serumske vrijednosti adropina u bolesnika s pSS-om-i u kontrolnoj skupini. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. * t-test za neovisne uzorke

Tablica 6. Obilježja bolesnika s pSS-om na temelju vrijednosti serumskih razina adropina

Parametar	Niže vrijednosti adropina (<3.73 ng/mL) (N=26)	Više vrijednosti adropina (>3.73 ng/mL) (N=26)	p^*
Dob (godine)	51.0 \pm 9.83	57.6 \pm 12.3	0.284
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	24.8 \pm 4.1	24.83 \pm 2.5	0.978
SBP (mmHg)	123.6 \pm 18.46	128.8 \pm 14.9	0.270
DBP (mmHg)	79.6 \pm 8.8	80.8 \pm 5.9	0.086
TC (mmol/L)	5.56 \pm 1.08	5.76 \pm 1.21	0.535
HDL (mmol/L)	1.46 \pm 0.36	1.56 \pm 0.38	0.362
LDL (mmol/L)	3.35 \pm 0.89	3.76 \pm 0.99	0.119
TG (μ mol/L)	1.15 \pm 0.43	1.20 \pm 0.40	0.694

hsCRP (mg/L)	1.35 (0.9-2.7)	1.15 (0.80-5.6)	0.869
Anti SSB/La (AU/ml)	36.0 (7.0-79.0)	9.5 (2.0-88.0)	0.734
Anti SSA/Ro52 (AU/ml)	73.0 (12.0-125.0)	109.0 (17.0-172.0)	0.272
Anti SSA/Ro60 (AU/ml)	101.0 (60.0-116.0)	107.5 (52.0-118.0)	0.963
Dužina bolesti (godine) [†]	6 (4.0-12.0)	6 (3.0-10.0)	0.607
ESSDAI	2.0 (1.0-3.0)	2.5 (1.0-3.0)	0.641
SSDDI	3.0 (2.0-4.0)	2.0 (1.0-2.0)	<0.001
FRS (%)	4.25 (1.2-6.2)	2.3 (1.4-5.2)	0.374

Kratice: SBP: sistolički krvni tlak; DBP: dijastolički krvni tlak; TC: ukupni kolesterol; HDL: lipoprotein visoke gustoće; LDL: lipoprotein niske gustoće; TG: trigliceridi; hsCRP: C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; ESSDAI: EULAR primarni indeks aktivnosti bolesti Sjögrenovog sindroma; SSDDI: Sjögrenov sindrom Indeks oštećenja bolesti, FRS: Framinghamov rezultat rizika za koronarnu bolest srca;

Podaci su prikazani kao cijeli broj (postotak), srednja vrijednost ± standardna devijacija ili medijan (IQR)

* t-test za neovisne uzorke ili Mann-Whitney U test

† vremensko razdoblje od početne dijagnoze

5.1.4. Korelacija adropina i drugih parametara

Korelacijska analiza je pokazala da serumske vrijednosti adropina u bolesnika s pSS-om značajno pozitivno koreliraju s HDL ($r=0.290$, $P=0.036$) i anti SSA/Ro52 antitijelima ($r=0.307$, $P=0.026$). SSDDI negativno korelira s razinama adropina ($r = -0.401$, $P=0.003$) (Tablica 7) (Slika 4).

Tablica 7. Korelacijska analiza između serumskih razina adropina i biokemijskih, kliničkih i antropometrijskih parametara.

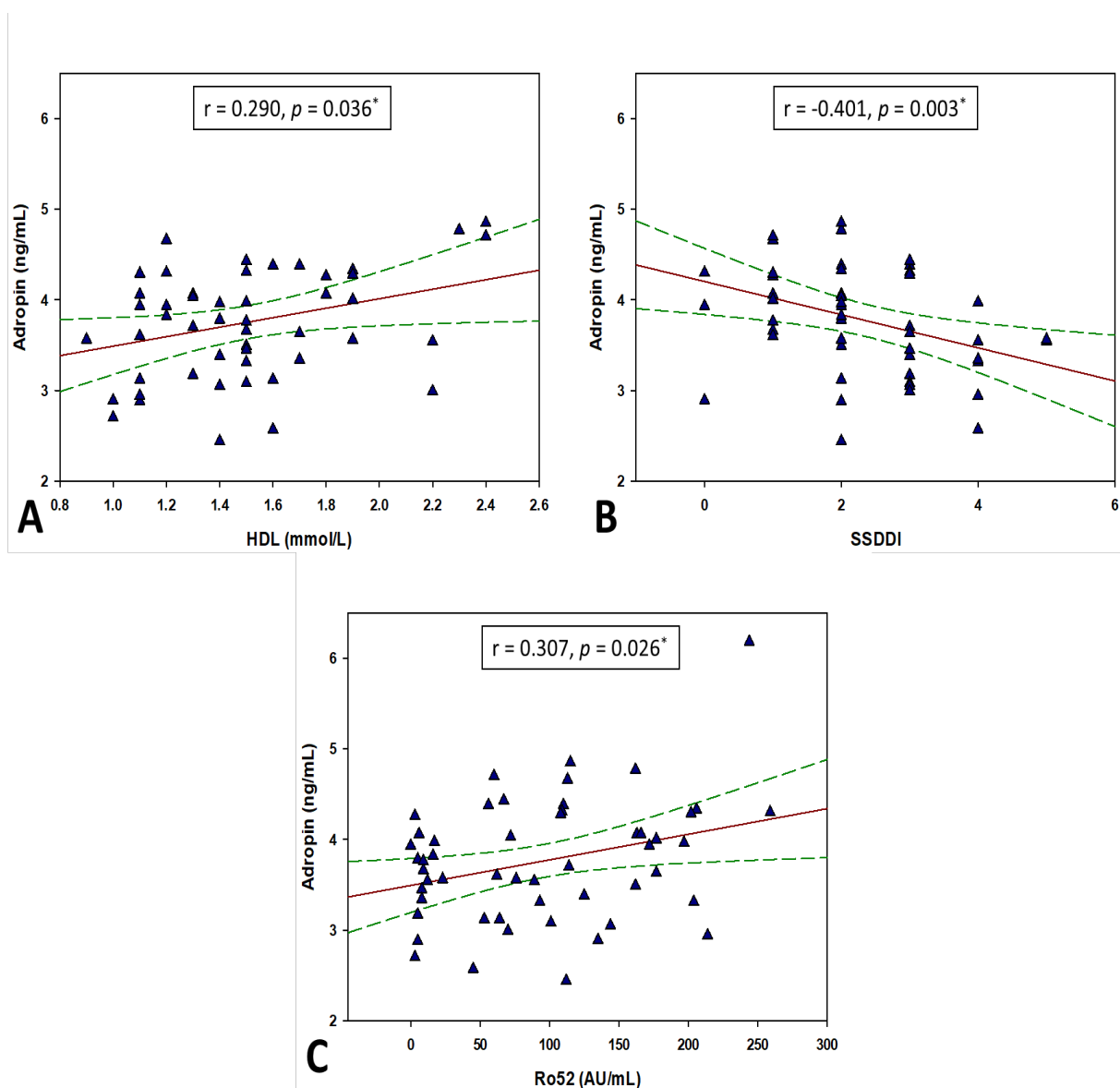
Parametar	r^*	p
Starost (godine)	-0.133	0.345
Indeks tjelesne mase (kg/m^2)	-0.133	0.348
hsCRP (mg/L)	0.158 [†]	0.262
TC (mmol/L)	0.224	0.109
TG (mmol/L)	-0.083	0.557
HDL (mmol/L)	0.290	0.036

LDL (mmol/L)	0.178	0.206
SBP (mmHg)	0.118	0.404
DBP (mmHg)	0.155	0.271
Anti SSA/Ro60 (AU/ml)	0.123 [†]	0.385
Anti SSA/Ro52 (AU/ml)	0.307 [†]	0.026
Anti SSB/La (AU/ml)	-0.009 [†]	0.946
ESSDAI	0.051 [†]	0.721
SSDDI	-0.401 [†]	0.003
Dužina bolesti (godine)	-0.041 [†]	0.770

Kratice: hsCRP: C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; TC: Ukupni kolesterol; TG: trigliceridi; HDL: lipoprotein visoke gustoće; LDL: lipoprotein niske gustoće; SBP: sistolički krvni tlak; DBP: dijastolički krvni tlak; ESSDAI: EULAR primarni indeks aktivnosti bolesti Sjögrenovog sindroma; SSDDI: Indeks oštećenja bolesti Sjögrenovog sindroma

* Pearsonov koeficijent korelacije

† Spearmanov koeficijent korelacije ranga



Slika 4. Korelacijska analiza serumskih razina adropina s HDL (A), SSDDI (B) i anti SSA/Ro52 antitijela (C) u ukupnoj populaciji ispitanika (N = 104).

* Pearsonov koeficijent korelacije

5.1.5. Multipla regresijska analiza

Nadalje, multipla linearna regresija je pokazala da serumске vrijednosti adropina imaju statistički značajnu poveznicu s HDL ($\beta \pm SE$, 0.903 ± 0.283 , $P = 0.002$) i SSDDI ($\beta \pm SE$, -0.202 ± 0.073 , $P = 0.008$) nakon prilagodbe statističkog modela za godine, indeks tjelesne mase i spol te serumске razine adropina kao ovisne varijable (Tablica 8).

Tablica 8. Multipli linearni regresijski model neovisnih prediktora za vrijednosti serumskih razina adropina

Varijable	β^1	SE ²	t-vrijednost	p
Starost (godine)	-0.013	0.011	-1.134	0.263
Spol	0.220	0.367	0.602	0.550
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	-0.007	0.002	-0.268	0.794
Anti SSA/Ro52	0.001	0.001	1.551	0.128
HDL	0.903	0.283	3.191	0.002
FRS	0.025	0.032	0.768	0.447
Dužina bolesti (godine) [†]	0.006	0.015	0.394	0.695
ESSDAI	0.044	0.061	0.718	0.476
SSDDI	-0.202	0.073	-2.754	0.008

Kratice: HDL: lipoprotein visoke gustoće; FRS: Framinghamov rezultat rizika za koronarnu bolest srca; ESSDAI: EULAR primarni indeks aktivnosti bolesti Sjögrenovog sindroma; SSDDI: Indeks oštećenja bolesti Sjögrenovog sindroma

¹ nestandardizirani koeficijent β

² standardna pogreška

[†] vremensko razdoblje od početne dijagnoze

5.2. Rezultati za homocistein i CIMT

5.2.1. Osnovna obilježja bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine

U studiju je bilo uključeno 48 bolesnika s pSS i 46 kontrola podudarnih po spolu, godinama, pušenju i indeksu tjelesne mase (Tablica 9) Prosječna dob bolesnika s pSS-om bila je 60.5 ± 9.6 vs. 57.4 ± 9.9 godina za kontrolnu skupinu. Bolesnici su imali stabilnu bolest sa srednjom vrijednošću indeksa aktivnosti bolesti, ESSDAI skor je iznosio 2 (IQR 1–3). Srednja vrijednost indeksa oštećenja specifičnog za bolest – SSDDI skor – je bio (IQR 2–3), a prosječno trajanje bolesti je bilo 6.5 godina (IQR 4.0–11.0). Sistolički i dijastolički tlak je bio značajno veći u bolesnika s pSS-om u usporedbi s kontrolnom skupinom (127.8 ± 16.8 vs. 119.2 ± 13.4 mmHg, $p = 0.007$ and 81.6 ± 7.4 vs. 77.8 ± 8.0 mmHg, $p = 0.018$) (Tablica 9) unatoč činjenici da je korištenje antihipertenzivnih lijekova bilo značajnije u bolesnika s pSS-om u odnosu na kontrolnu skupinu (21 (43.7%) vs 8 (17.4%), $p = 0.006$).

Tablica 9. Osnovna obilježja bolesnika s pSS i kontrolne skupine

Parametar	Bolesnici s pSS-om (N=48)	Kontrolna skupina (N=46)	<i>p</i> *
Muškarci (N, %)	4 (8.3)	3 (6.5)	0.953
Dob (godine)	60.5 ± 9.6	57.4 ± 9.9	0.129
Težina (kg)	70.9 ± 11.6	71.9 ± 10.1	0.654
Visina (cm)	168.3 ± 6.9	168.0 ± 6.7	0.837
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	24.8 ± 3.4	25.4 ± 3.1	0.418
SBP (mmHg)	127.8 ± 16.8	119.2 ± 13.4	0.007
DBP (mmHg)	81.6 ± 7.4	77.8 ± 8.0	0.018
Pušenje (N, %)	8 (16.7)	7 (15.2)	0.928
Dužina bolesti (godine) [†]	6.5 (4.0-11.0)	-	-
ESSDAI	2 (1-3)	-	-
SSDDI	2 (1.5-3.0)	-	-

Kratice: SBP: Sistolički krvni tlak; DBP: dijastolički krvni tlak; ESSDAI: EULAR indeks aktivnosti bolesti primarnog Sjögrenovog sindroma; SSDDI: Indeks oštećenja bolesti Sjögrenovog sindroma.

Podaci su prikazani kao cijeli broj (postotak), srednja vrijednost \pm standardna devijacija ili medijan (IQR)

* hi-kvadrat test (Fisherov egzaktni test), t-test za neovisne uzorke

† vremensko razdoblje od početne dijagnoze

5.2.2. Laboratorijski parametri

Bolesnici s pS-omS imali su značajno niže razine hemoglobina ($p=0,001$) i više razine SE ($p=0,006$) dok je kontrolna skupina imala značajno više razine ukupnog kolesterola ($p=0,047$). Primjena hipolipidemičnih lijekova bila je slična u obje skupine 7 (14,6%) prema 3 (6,5%), $p = 0,317$). Anti SSB/La antitijela, anti SSA/Ro52 i anti SSA/Ro60 antitijela mjerena su samo u bolesnika s pSS-om (Tablica 10).

Tablica 10. Laboratorijski parametri pSS pacijenata i kontrola

Parametar	pSS skupina (N=48)	Kontrolna skupina (N=46)	P^*
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	4.39 \pm 0.41	4.53 \pm 0.32	0.072
Hemoglobin (g/L)	131.1 \pm 10.5	138.8 \pm 11.9	0.001
Trombociti ($\times 10^9/L$)	227.0 \pm 51.95	246.7 \pm 49.4	0.064
Ureja (mmol/L)	5.53 \pm 1.65	5.42 \pm 1.41	0.720
Kreatinin (mmol/L)	66.3 \pm 19.1	62.3 \pm 14.6	0.260
ESR (mm/h)	16.5 (8.0-27.5)	10.0 (6.0-16.0)	0.006
hsCRP (mg/L)	1.30 (0.8-3.8)	1.15 (0.75-3.35)	0.767
TC (mmol/L)	5.7 \pm 1.1	6.2 \pm 0.8	0.047
LDL (mmol/L)	3.6 \pm 0.9	3.9 \pm 1.1	0.111
TG (mmol/L)	1.2 \pm 0.4	1.4 \pm 0.8	0.108
HDL (mmol/L)	1.5 \pm 0.4	1.5 \pm 0.3	0.888
C3	1.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	0.586
C4	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	0.447
Anti SSB/La (AU/mL)	26.5 (2.0-81.5)	-	-
Anti SSA/Ro52 (AU/mL)	97.0 (20.0 – 162.0)	-	-
Anti SSA/Ro60 (AU/mL)	100.0 (56.5-116.0)	-	-

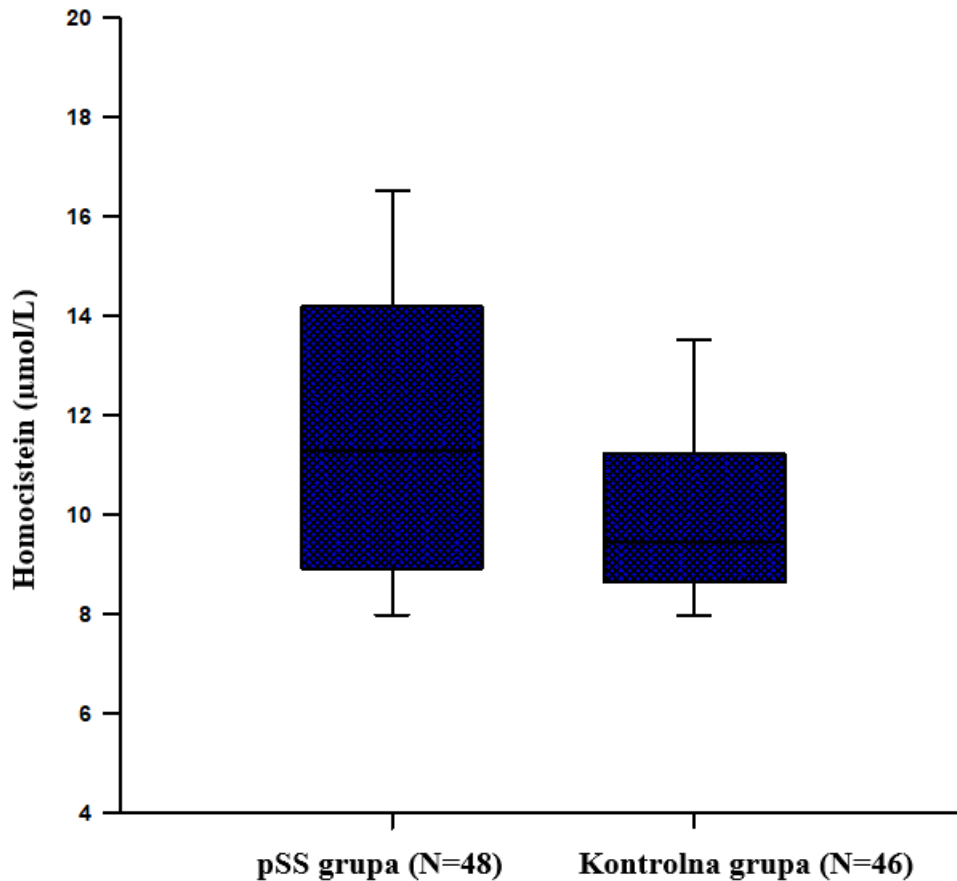
Kratice: ESR: brzina sedimentacije eritrocita; hsCRP: C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; TC: ukupni kolesterol; LDL: lipoprotein niske gustoće; TG: trigliceridi; HDL: lipoprotein visoke gustoće; C3: komponenta komplementa C3; C4: komponenta komplementa C4

Podaci su prikazani kao cijeli broj (postotak), srednja vrijednost \pm standardna devijacija ili medijan (IQR)

* t-test za neovisne uzorke ili Mann-Whitney U test

5.2.3. Razine homocisteina i max CIMT-a u bolesnika s pSS-om i u kontrolnoj skupini

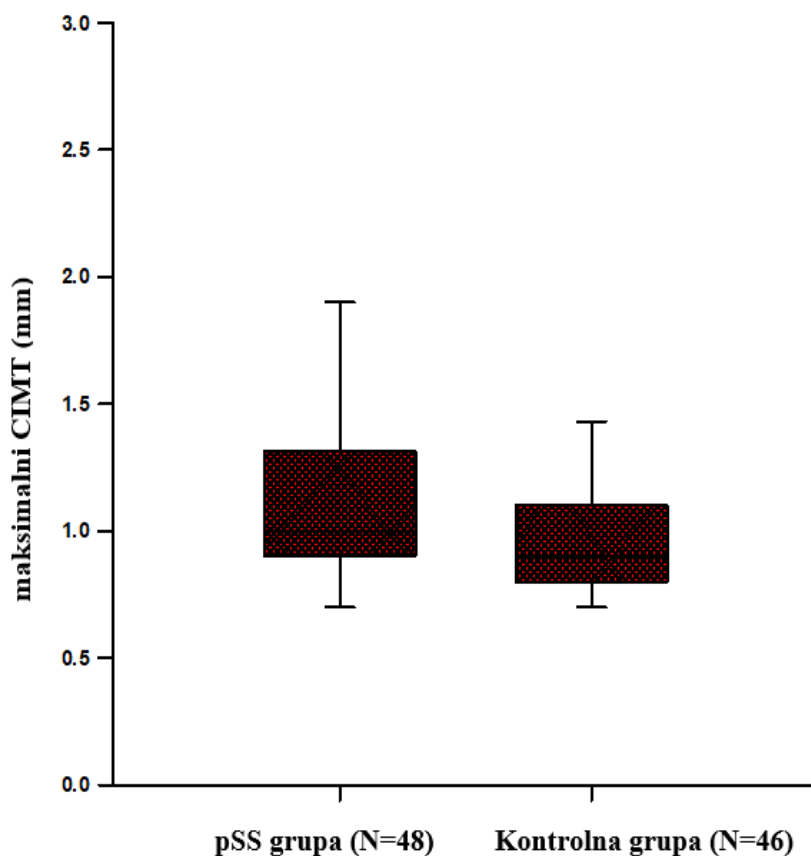
Razine homocisteina u serumu bile su značajno više u bolesnika s pSS-om u usporedbi s kontrolnom skupinom [medijan (IQR)]: 11.28 (8.93-14.06) vs. 9.46 (8.64-10.98), $p=0.015$ (Slika 5).



Slika 5. Razine homocisteina u plazmi u bolesnika s pSS-om i kontrolnoj skupini.

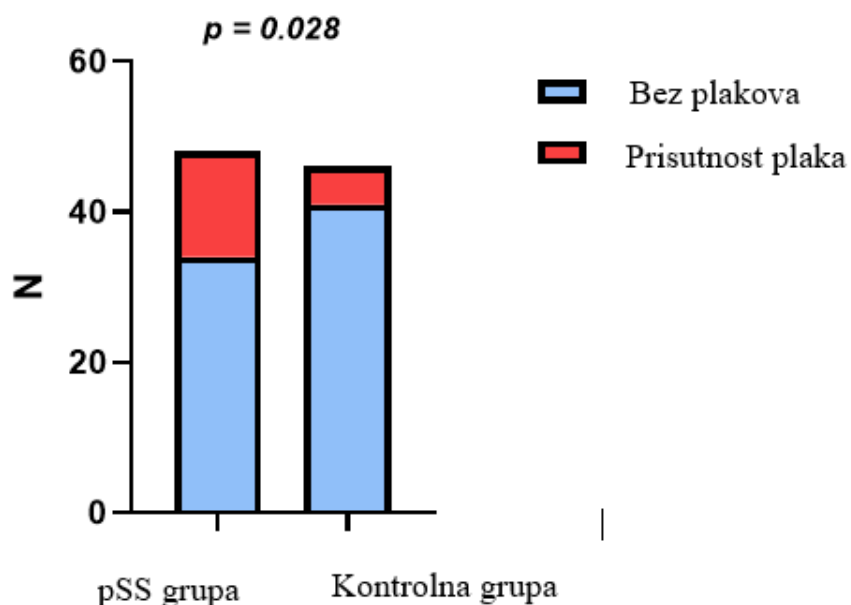
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. * t-test za neovisne uzorke

Bolesnici s pSS-om također su imali statistički značajno više vrijednosti CIMT ($p>0,05$) u usporedbi s kontrolnom skupinom [medijan (IQR)]: 1 (0.90-1.31) vs. 0.9 (0.80-1.10), $p=0.0372$ (Slika 6).



Slika 6. Maksimalni CIMT (mm) u bolesnika s pSS-om i kontrolnoj skupini. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. * t-test za neovisne uzorke

Udio bolesnika s utvrđenim karotidnim plakovima bio je 29,2%, a u kontrolnoj skupini bio je 10,9%. Bolesnici s pSS-om imali su statistički značajno veći broj plakova u usporedbi s kontrolnom skupinom 14 u odnosu na 5, $p=0.028$ (Slika 7).



Slika 7. Omjer broja bolesnika s pSS-om i kontrolne skupine s prisutnim plakom i bez plaka

5.2.4. Povezanost homocisteina i antropometrijskih, laboratorijskih i kliničkih parametara

Korelacijska analiza pokazala je da razine homocisteina pozitivno koreliraju s trigliceridima ($r = 0,204$, $p = 0,048$) i maksimalnim CIMT-om ($r = 0,231$, $p = 0,046$). (Tablica 11) (Slika 8). Nije otkrivena povezanost s anti SSA/Ro antitijelima, anti SSB/La antitijelima te s indeksom aktivnosti ESSDAI i indeksom oštećenja SSDDI.

Tablica 11. Korelacija homocisteina s antropometrijskim, laboratorijskim i kliničkim parametrima u cijeloj ispitivanoj populaciji.

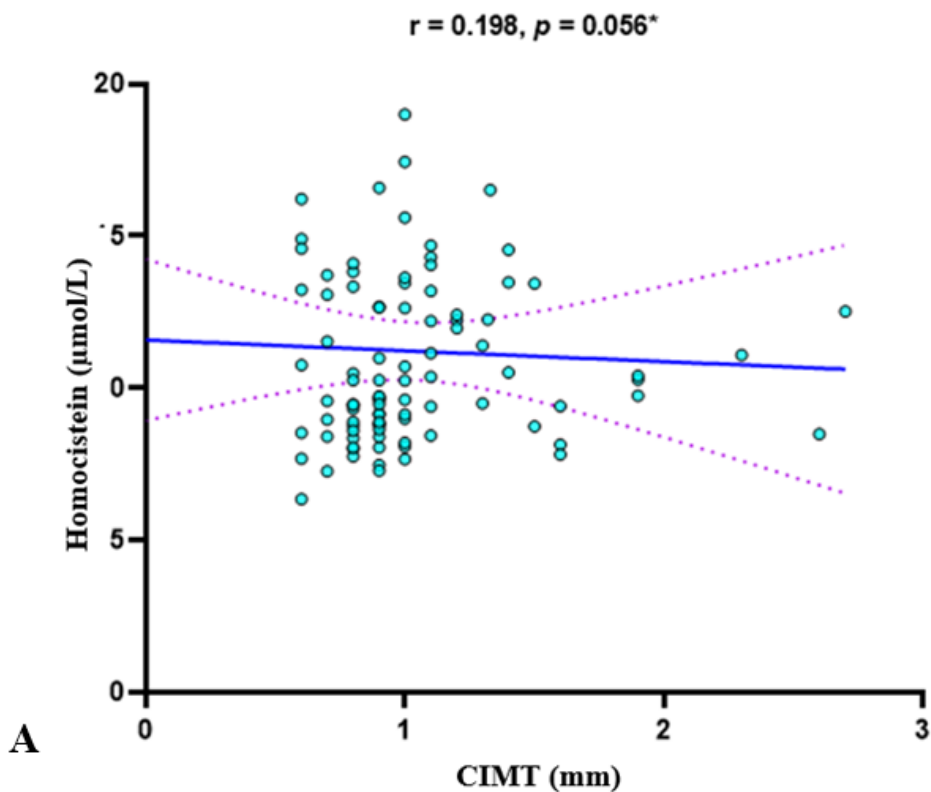
Parametar	r^*	p
Dob (godine)	0.093	0.371
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	-0.001	0.995
hsCRP (mg/L)	0.061	0.556
TG (mmol/L)	0.204	0.048
TC (mmol/L)	0.002	0.986

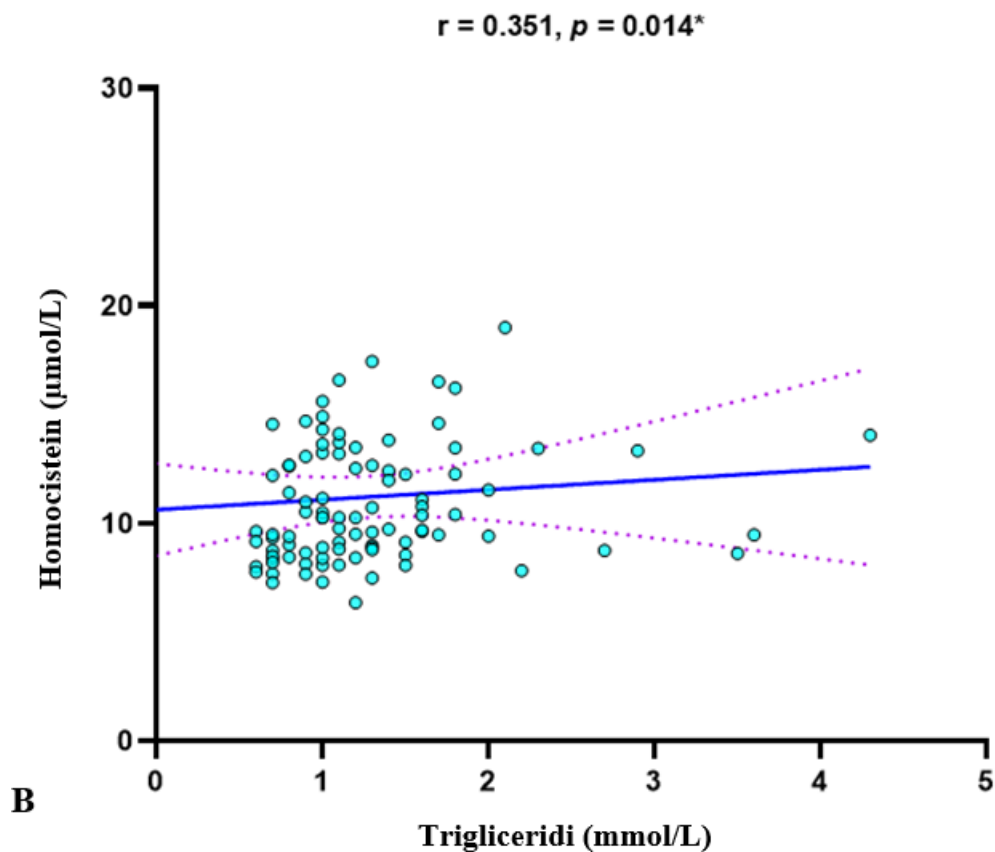
HDL (mmol/L)	-0.085	0.417
LDL (mmol/L)	-0.035	0.734
SBP (mmHg)	-0.033	0.754
DBP (mmHg)	-0.069	0.507
Maksimalni CIMT	0.231	0.046
Anti SSA/Ro60 (AU/mL)	0.056	0.705 [†]
Anti SSA/Ro52 (AU/mL)	0.190	0.194 [†]
Anti SSB/La (AU/mL)	0.004 [†]	0.980 [†]
ESSDAI	0.149 [†]	0.312 [†]
SSDDI	0.155 [†]	0.292 [†]
Dužina bolesti (godine) [†]	-0.195 [†]	0.183 [†]

Kratice: hsCRP: C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; TG: trigliceridi; TC: ukupni kolesterol; HDL: lipoprotein visoke gustoće; LDL: lipoprotein niske gustoće; SBP: Sistolički krvni tlak; DBP: dijastolički krvni tlak; ESSDAI: EULAR indeks aktivnosti bolesti primarnog Sjögrenovog sindroma; SSDDI: Indeks oštećenja bolesti Sjögrenovog sindroma

* Spearmanov koeficijent korelacije

† pSS grupa





Slika 8. Korelacijska analiza serumskih razina homocisteina s CIMT-om (A) i trigliceridima (B) u ukupnoj populaciji ispitanika (N = 94).

* Pearsonov koeficijent korelacije

5.2.5. Povezanost CIMT-a i antropometrijskih, laboratorijskih i kliničkih parametara

Korelacijska analiza je pokazala da je CIMT-a pozitivno povezan sa starosti ($r=0.416, P<0.0001$), a utvrđena je negativna korelacija CIMT-a s anti SSA/Ro60 antitijelima ($r = -0.431, P=0.002$) i anti SSB/La antitijelima ($r = -0.346, P=0.016$). Također je utvrđena i statistički značajna pozitivna korelacija CIMT-a sa SSDDI ($r=0.351, P=0.014$) (Tablica 12) (Slika 9).

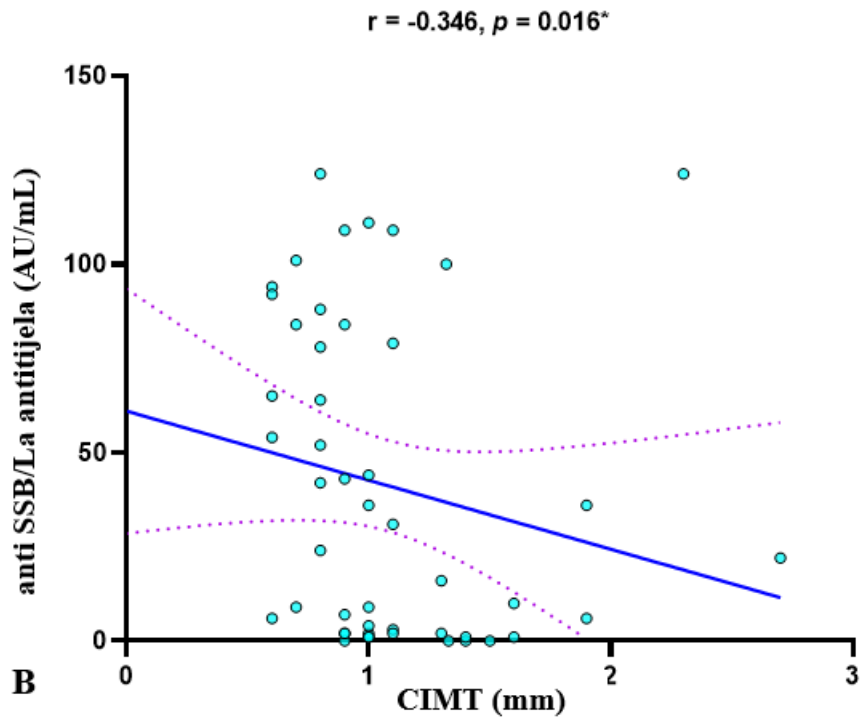
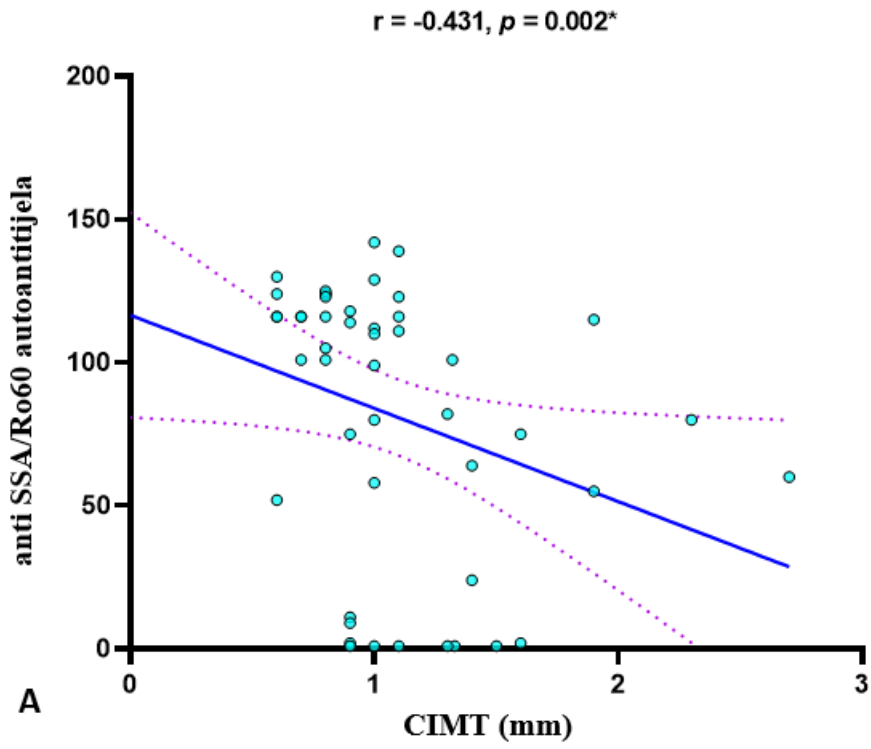
Tablica 12. Korelacija CIMT-a i antropometrijskih, laboratorijskih i kliničkih parametara

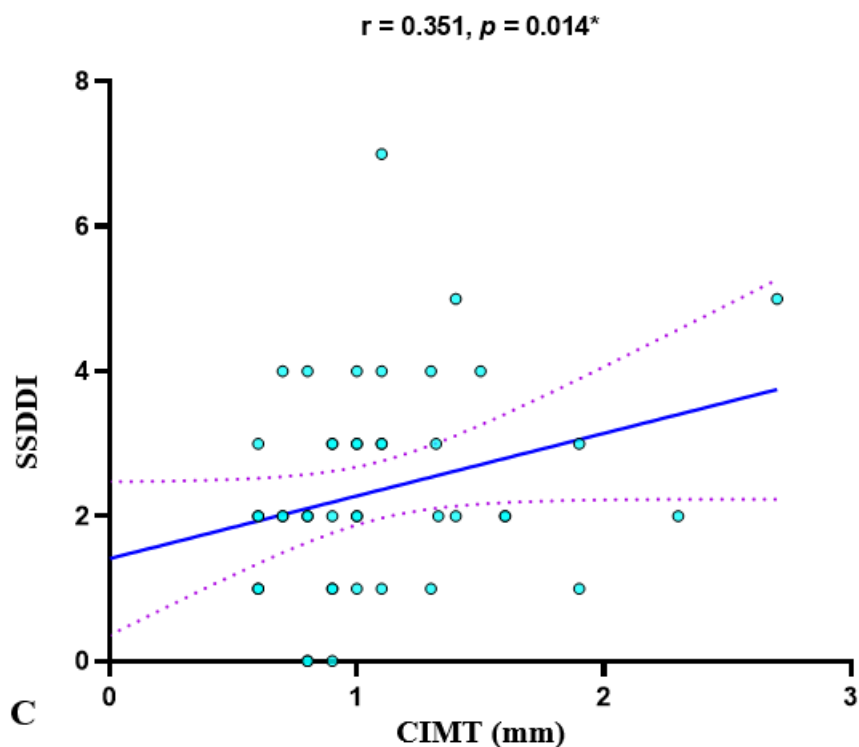
Parametar	r^*	p
Starost (godine)	0.416	<0.0001
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	0.108	0.300
hsCRP (mg/L)	0.020	0.845
TG (μmol/L)	0.064	0.538
TC (μmol/L)	0.127	0.224
HDL (μmol/L)	0.060	0.567
LDL (μmol/L)	0.151	0.146
SBP (mmHg)	0.293	0.004
DBP (mmHg)	0.058	0.576
Homocistein	0.198	0.056
Anti SSA/Ro60 (AU/mL)	-0.431	0.002 [†]
Anti SSA/Ro52 (AU/mL)	-0.266	0.067 [†]
Anti SSB/La (AU/mL)	-0.346 [†]	0.016 [†]
ESSDAI	-0.189 [†]	0.198 [†]
SSDDI	0.351 [†]	0.014 [†]
Dužina bolesti (godine) [†]	0.117 [†]	0.428 [†]

Kratice: hsCRP: C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; TG: trigliceridi; TC: ukupni kolesterol; HDL: lipoprotein visoke gustoće; LDL: lipoprotein niske gustoće; SBP: Sistolički krvni tlak; DBP: dijastolički krvni tlak; ESSDAI: EULAR indeks aktivnosti bolesti primarnog Sjögrenovog sindroma; SSDDI: Indeks oštećenja bolesti Sjögrenovog sindroma

* Spearmanov koeficijent korelacije

† pSS group





Slika 9. Korelacijska analiza vrijednosti CIMT-a s anti SSA/Ro60 antitijelima (A), anti SSB/La antitijelima (B) i SSDDI (C) u ukupnoj populaciji ispitanika (N = 94).

* Pearsonov koeficijent korelacije

5.2.6. Multipla regresijska analiza

Višestruka regresijska analiza pokazala je da su razine homocisteina neovisni prediktor Sjögrenova sindroma.

Tablica 13. Multivarijantni logistički regresijski model za predviđanje Sjögrenovog sindroma.

Varijable	OR	95% CI	<i>p</i>
Godine	1.027	0.977 to 1.081	0.287
Muški spol ¹	0.907	0.129 to 6.373	0.922
ITM	0.952	0.828 to 1.095	0.496
hsCRP	1.067	0.975 to 1.169	0.156
Max_CIMT	2.23	0.663 to 7.517	0.194
Homocistein	1.28	1.069 to 1.545	0.007

¹ ženski spol je referentna grupa

ITM - indeks tjelesne mase, hsCRP - C-reaktivni protein visoke osjetljivosti

6. RASPRAVA

6.1. Rasprava

Ovo istraživanje u sklopu doktorske disertacije je provedeno u dva dijela s ciljem utvrđivanja uloge adropina i homocisteina kao rizičnih čimbenika ubrzane ateroskleroze u bolesnika s pSS-om. Prvim dijelom ovog istraživanja je ispitivana razina adropina i njegova povezanost s kliničkim i laboratorijskim parametrima pSS-a. Koliko znamo, ovo je prva klinička studija koja je istraživala razine adropina u serumu u bolesnika s pSS-om. Naša je studija pokazala da bolesnici s pSS-om imaju značajno više razine adropina u serumu u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nadalje, pokazalo se da razine adropina u bolesnika s pSS-om pozitivno koreliraju s HDL i anti SSA/Ro52 antitijelima te negativno sa SSDDI.

Poznato je da adropin sudjeluje u regulaciji energetske homeostaze i inzulinskog odgovora te da je usko povezan s razvojem i napredovanjem aterogeneze, pozitivno utječući na endotelnu disfunkciju [74, 87, 146]. Endotel ima središnju ulogu u održavanju vaskularne homeostaze, a poremećena funkcija endotela doprinosi razvoju i napredovanju različitih kardiovaskularnih, upalnih, metaboličkih, infektivnih i bubrežnih bolesti. Naime, oštećenje endotela pokreće aterosklerotične i trombotske procese koji imaju značajan utjecaj u ovim stanjima [147, 148]. NO, snažan endogeni vazodilatator kojeg u endotelu stvara endotelna izoforma NO sintaze igra važnu ulogu u održavanju endotelne homeostaze. NO također inhibira adheziju monocita i leukocita na endotel, agregaciju trombocita, oksidaciju LDL-a i proliferaciju glatkih mišićnih stanica [104]. Nadalje, postoje dokazi da je proizvodnja NO povećana u bolesnika s pSS-om [149]. Aktivacija neurona i eNOS-a opisana je u ispitanika s primarnim SS-om kao posljedica povećane proizvodnje protutijela protiv muskarinskih acetilkolinских receptora [150-152].

Adropin bi mogao pojačati ekspresiju eNOS, odgovornog za proizvodnju vaskularnog NO, u endotelu, tako da je nedostatak adropina povezan sa smanjenom bioraspoloživošću NO u endotelu [83, 153]. Lovren i sur. su pokazali da adropin može ispoljiti zaštitne učinke na endotelnu funkciju vjerojatno posredovane regulacijom ekspresije eNOS-a putem receptora vaskularnog endotelnog faktora rasta 2 (VEGFR2), PI3K-Akt i putem ERK1/2 [87]. Pokazano je da adropin potiče kritičnu funkciju endotelnih stanica kao što je proliferacija, migracija, formiranje kapilarnih cjevčica i smanjena propusnost. Također, potiče apoptozu induciranu čimbenikom tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor* - TNF). Štoviše, pojačava aktivaciju eNOS, PI3K-Akt i ERK 1/2. Na taj način, putem inducibilne ekspresije NOS,

adropin smanjuje ekspresiju glasničke RNA (engl. *messenger RNA* - mRNA) proupalnih citokina, kao što su TNF-alfa i interleukin 6, smanjujući upalu [107, 154].

Svega je nekoliko studija koje su istraživale adropin u autimunim bolestima. Yolbas i sur. nisu pokazali značajnu razliku u serumskim razinama adropina između bolesnika s RA i SLE te zdravih kontrola. Ekspresija gena ENHO bila je značajno veća u skupini s RA u usporedbi sa kontrolnom skupinom, ali nije bila praćena povišenom razinom adropina u serumu [76]. Nadalje, povećana razina adropina u serumu primijećena je u kohorti bolesnika sa sistemskom sklerozom (SSc) i Behcetovom bolešću (BD) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Ovi rezultati upućuju da se razine adropina povećavaju u SSc i BD zbog upalnih procesa kojima su ove bolesti obilježene [95]. U obje bolesti se promjene javljaju na razini krvnih žila što bi se moglo povezati s povećanjem razina adropina kao zaštitnim čimbenikom. Ovi su nalazi u skladu s rezultatima naše studije, tim više što su vaskulitisi jedna od najčešćih klinička manifestacija pSS [155].

Najnovije studije povezuju adropin s kroničnim upalnim stanjima i pripisuju mu mogući imunomodulatorni učinak. Pokazalo se da bolesnici s opstruktivnom apnejom u snu, upalnim bolestima crijeva, sindromom policističnih jajnika i dijabetesom imaju značajno niže razine adropina u serumu [156-159].

U našem istraživanju adropin je pokazao značajnu pozitivnu korelaciju s anti SSA/Ro52 protutijelima. Anti SSA/Ro i anti SSB/La antitijela bila su usko povezana s glavnim kliničkim, histopatološkim i imunološkim značajkama pSS-a. Određivanje anti SSA/Ro52 autoantitijela može pomoći u identificiranju specifične podskupine SS bolesnika s agresivnijom bolešću i rizikom od određenih sistemskih manifestacija bolesti [160]. Pozitivna korelacija anti SSA/Ro52 antitijela i adropina u našoj studiji u skladu je s nekim ranijim istraživanjima koja su pokazala da su bolesnici s pozitivnim anti SSA/Ro imali manju učestalost arterijske hipertenzije, hiperkolesterolemije i hipertrigliceridemije u usporedbi s bolesnicima koji su imali negativna anti-SSA/Ro i SSB/La antitijela [161]. Stoga bi pozitivna povezanost adropina i anti SSA/Ro52 antitijela mogla ukazivati na potencijalnu zaštitnu ulogu anti SSA/Ro52 antitijela u aterogenezi bolesnika s pSS-om. S druge strane, Vaudo et al. su pokazali značajnu povezanost anti SSA/Ro antitijela s arterijskim zadebljanjem kao pokazateljem subkliničke ateroskleroze [136]. Dakle, uloga ovih autoantitijela, kao i adropina u procesu aterogeneze u ovih bolesnika je kontroverzna i zahtijeva daljnja istraživanja.

Zanimljivo je da smo utvrdili negativnu povezanost sa SSDDI rezultatom. Štoviše, multivarijantna linearna regresija pokazala je da je SSDDI također snažan prediktor za razine adropina u serumu. Dakle, ustanovili smo da je kumulativno oštećenje mjereno pomoću SSDDI neovisno povezano sa smanjenim adropinom u pSS-u. Kada su bolesnici s pSS-om podijeljeni prema vrijednosti adropina u dvije skupine, oni s nižim razinama adropina u serumu imali su viši SSDDI rezultat. Kumulativno oštećenje odražava učinak ozbiljnije bolesti tijekom vremena, a viši SSDDI rezultati mogu identificirati one pacijente koji su u prošlosti imali više sistemskih upala i veće imunološke poremećaje, i kojima je najvjerojatnije bilo potrebno intenzivnije liječenje [162, 163]. Ovi nalazi mogu upućivati na zaštitnu protuupalnu ulogu adropina u početnim fazama i prvim godinama bolesti. Štoviše, čini se da zaštitna uloga opada s trajanjem bolesti i većim oštećenjem krvnih žila i organa.

Činjenica da aktivnost bolesti (ESSDAI) nije bila u korelaciji s adropinom je očekivana, budući da je većina naših pacijenata u trenutku ispitivanja imala stabilnu bolest. Samo su dvije studije u pSS-u procjenjivale aktivnost bolesti pomoću ESSDAI i nisu pronašle povezanost sa subkliničkim kardiovaskularnim oštećenjem, što je u skladu s našim rezultatima [164, 139].

Bolesnici s pSS-om imali su viši sistolički i dijastolički krvni tlak i veći 10-godišnji rizik za kardiovaskularne događaje prema Framingham izračunima u usporedbi sa zdravim kontrolama, ali su i bolesnici i kontrolna skupina klasificirani kao oni s niskim 10-godišnjim rizikom prema FRS-u. Nekoliko je studija procijenilo odnos između razine adropina i krvnog tlaka. Gu i sur. izvijestili su o nižim razinama adropina u odraslih s arterijskom hipertenzijom [101]. Niske razine adropina u hipertenzivnih bolesnika također su izvijestili Gulen i sur. [102]. Nasuprot tome, Celik i sur. pokazalo je da hipertenzivni pacijenti imaju visoke razine adropina [103]. Također je zanimljivo da su naši bolesnici s pSS-om imali niže razine TC u usporedbi sa kontrolnom skupinom. To je u skladu s dostupnim podacima koji naglašavaju utjecaj adropina na homeostazu lipida.

U bolesnika na hemodijalizi utvrđeno je da adropin ima negativnu korelaciju s TG, LDL i TC dok ima značajnu pozitivnu korelaciju s HDL kolesterolom [91]. Iste korelacije između lipida i adropina pronađene su u nekoliko drugih studija [74,81,93,165]. Naša studija nije potvrdila povezanost između razine adropina u serumu i TC-a, no potrebno je naglasiti da su naši bolesnici imali su niže razine TC-a u usporedbi s kontrolnom skupinom. Međutim, u

naših bolesnika s pSS-om razine adropina u serumu su pozitivno korelirale s HDL kolesterolom. Nadalje, kada je provedena multivarijantna linearna regresija, HDL kolesterol identificiran je kao neovisni prediktor za razine adropina, što dodatno potvrđuje njegov učinak u održavanju homeostaze lipida. Naime, studija na životinjama koju su proveli Akcilar i sur. utvrdili su da je intraperitonealna primjena niske doze adropina štakorima s hiperlipidemijom bila iznimno učinkovita u smanjenju razine serumskog TG, TC, LDL kolesterola i povećanja razine HDL kolesterola [154]. Dakle, možemo zaključiti da je naša studija potvrdila povezanost adropina s metabolizmom lipida, ali isto tako pokazala značajnu ulogu u upalnom procesu u pSS-a.

Drugi dio istraživanja se odnosio na homocistein i CIMT u bolesnika s pSS-om. Ovo je prva studija koja je istraživala povezanost između razine homocisteina i CIMT-a, dvaju biomarkera subkliničke ateroskleroze, u bolesnika s pSS-om. Već dugo je prepoznat povećani rizik od kardiovaskularnih bolesti među osobama s autoimunim bolestima. Još uvijek je otvoreno pitanje uloge pojedinih čimbenika na povećanje rizika, odnosno kolika je uloga primjenjene terapije, osobito steroida, a koliko je posljedica samog autoimunog procesa s posljedičnom upalom. PSS je sustavna bolest koju obilježava kronični autoimuni upalni proces. Stoga se, analogno sličnim bolestima kao što su SLE i RA, očekuje povećana učestalost subkliničke ateroskleroze. Tome u prilog govore rezultati naše studije. Naime, utvrdili smo značajno povećane razine homocisteina u bolesnika s pSS-om u usporedbi s kontrolnom populacijom. Nadalje, pokazali smo da je homocistein neovisan čimbenik za predviđanje primarnog Sjogren-ovog sindroma. Ranija istraživanja su dokazala da su povišene razine homocisteina umjereno jak i neovisan čimbenik kardiovaskularnog rizika u zdravoj populaciji [123]. Također, povišene razine homocisteina identificirane su kao faktor rizika za hipertenziju [166-168]. Sabio i sur. su pokazali da je homocistein neovisno povezan sa SBP-om i hipertenzijom u žena sa SLE-om te da je neovisni čimbenik rizika za progresiju ateroskleroze [123].

U našem istraživanju nismo pronašli povezanost između homocisteina te SBP-a i DBP-a, iako su bolesnici s pSS-om imali više razine SBP-a i DBP-a od kontrolne skupine. Treba naglasiti da su hipertenzivni bolesnici s pSS-om liječeni s antihipertenzivima, ali nijedan bolesnik nije uzimao tiazidni diuretik koji bi mogao utjecati na razinu homocisteina. Povišene razine homocisteina mogu pridonijeti endotelnoj disfunkciji različitim mehanizmima, kao što je oksidativni stres ili vazodilatacija ovisna o dušikovom oksidu,

poticanje apoptoze endotelnih stanica ili smanjenje proizvodnje sumporovodika (H₂S), koji je snažan antioksidans i čimbenik vazorelaksacije [169-170]. Homocistein može povećati vaskularnu krutost oštećivanjem elastinskih vlakana, povećanjem proizvodnje kolagena putem aktivacije metaloproteinaza i stimuliranjem proliferacije stanica glatkih mišića [171-172].

Nije utvrđena povezanost homocisteina s parametrima oštećenja i aktivnosti pSS-a te specifičnim autoantitijelima u pSS. U našem istraživanju bolesnici s pSS-om imali su značajno niže razine ukupnog kolesterola u odnosu na kontrolnu skupinu, iako nisu uočene razlike u vrijednostima LDL, HDL kolesterola i triglicerida. Bez obzira na to što je kontrolna skupina imala višu razinu ukupnog kolesterola u odnosu na bolesnike s pSS-om, to nije bilo praćeno značajnijim zadebljanjem arterijske stijenke. Ovaj rezultat ukazuje da zadebljanje arterijske stijenke nije samo posljedica hiperkolesterolemije već djelovanja i drugih čimbenika. Također je potrebno razmotriti mogućnost promjenjenog lipidnog profila u bolesnika s pSS-om. Važno je naglasiti da naši bolesnici nisu bili liječeni većom dozom kortikosteroida, a primjena statina bila je slična u obje skupine [7 (14,6%) naspram 3 (6,5%), $p = 0,317$], tako da nije bilo značajnog farmakološkog utjecaja na razlike u lipidogramu među skupinama. Ovo potvrđuje rezultate Dayla i sur. da niže razine kolesterola nemaju zaštitni učinak na rizike ateroskleroze povezane s razinama homocisteina [173].

Također, homocistein je pozitivno korelirao s trigliceridima i s maksimalnim CIMT-om kao surogatnim biomarkerom ateroskleroze u bolesnika s pSS-om. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima koji su pokazali da su bolesnici s višim razinama triglicerida imali više razine homocisteina te veću prevalenciju zadebljanja arterijske stijenke [139]. Najnovija studija također je potvrdila progresivno povećanje prevalencije ateroskleroze karotidne arterije i debljine karotidne intime-medije ovisne o razinama homocisteina [174]. Naše je istraživanje pokazalo da je CIMT bio značajno viši u bolesnika s pSS u usporedbi s kontrolnom skupinom. Vadu i sur. te Gavrani i sur. Su također pokazali slične rezultate. Vadu i sur. su prvi uočili subklinička oštećenja kardiovaskularnih organa u pSS-u. Bolesnici s pSS-om imali su veću debljinu intime medija u odnosu na kontrolne ispitanike iste dobi. Gotovo polovica bolesnika je imala zadebljanje karotidne intime medija [136]. Gavrani i sur. našli su povećano zadebljanje arterijske stijenke u dvije trećine bolesnika s primarnim pSS-om, a prisutnost pSS-a bila je neovisni čimbenik rizika za zadebljanje arterijske stijenke [139].

Očekivano, CIMT je pozitivno korelirao sa SBP, što se može objasniti poznatim i prethodno opisanom učinkom SBP na endotel i proces ateroskleroze. Također je nađena

pozitivna korelacija s SSDDI i dobi. Očekujemo veći SSDDI u bolesnika s duljim trajanjem bolesti i težim kliničkim tijekom. Stoga bi ovaj podatak mogao značiti da duljina bolesti i klinički tijek, odnosno intenzivniji upalni proces, ubrzavaju razvoj ateroskleroze u bolesnika s pSS-om. Naime, poznato je da je u osoba s autoimunim bolestima odavno prepoznat povećan rizik od kardiovaskularnih bolesti što dodatno potkrepljuje naš zaključak. S druge strane, utvrđena je negativna korelacija CIMT sa specifičnim autoantitijelima Ro60 i autoantitijelima La. To bi govorilo u prilog protektivnoj ulozi spomenutih protutijela u razvoju ateroskleroze u bolesnika s pSS. Ovaj bi rezultat bio u skladu s istraživanjem koje je pokazalo da su anti-SSA/Ro pozitivni pacijenti imali manju učestalost arterijske hipertenzije, hiperkolesterolemije i hipertrigliceridemije u usporedbi s anti-SSA/Ro i SSB/La negativnim bolesnicima [161]. S druge strane, Vaudo et al. pokazali su značajnu povezanost anti SSA/Ro antitijela s arterijskim zadebljanjem [136] kao pokazateljem subkliničke ateroskleroze. Međutim, uloga ovih protutijela u procesu aterogeneze u ovih bolesnika je kontroverzna i zahtijeva daljnja istraživanja.

Budući da je ateroskleroza sustavna bolest, karotidna arterija također može poslužiti kao ‘prozor’ u stanje ateroskleroze [175]. Dakle, naši rezultati upućuju na to da bi se mjerenje CIMT-a moglo koristiti kao jednostavna i dostupna metoda za otkrivanje asimptomatske subkliničke sistemske ateroskleroze i na taj način spriječiti njezino napredovanje i fatalne KV ishode. Osim toga, homocistein se također može koristiti za otkrivanje subkliničke ateroskleroze, odnosno pokazuje potencijal kao jeftini marker za stratifikaciju rizika asimptomatskih bolesnika, a poznato je da pravovremenim preventivnim mjerama možemo smanjiti učestalost kardiovaskularnih incidenata i njihovih posljedica. S obzirom na korelaciju homocisteina i CIMT-a, to bi moglo poslužiti kao probir za upućivanje na daljnju ultrazvučnu procjenu. Primjena jeftinih i neinvazivnih metoda poput određivanja razine homocisteina i mjerenja CIMT-a omogućile bi prevenciju mortaliteta i morbiditeta povezanih s kardiovaskularnim bolestima. Međutim, za konačne zaključke potrebne su multicentrične studije na većem broju bolesnika.

Provedena istraživanja na kojima se temelji ova doktorska disertacija imaju nekoliko ograničenja. Prvo, relativno mala veličina uzorka može utjecati na rezultate. Međutim, treba uzeti u obzir da veličinu uzorka određuje ograničenost populacije bolesnika s dijagnosticiranim primarnim Sjögrenovim sindromom. Istraživanje se provelo u jednom kliničkom centru. Dakle, radi se o monocentričnom istraživanju. Nadalje, nije bilo moguće u

potpunosti isključiti sve zbunjujuće čimbenike koji bi mogli interferirati s dobivenim rezultatima a koji uključuju terapiju antihipertenzivima i hipolipemicima. Konačno, dizajn presječnog istraživanja sprječava nas u donošenju uzročno-posljedičnih zaključaka.

7. ZAKLJUČCI

Ovo je prva studija o adropinu u bolesnika s pSS-om koja je pokazala povećane razine adropina u serumu ovih bolesnika. Nadalje, razine adropina su bile negativno povezane sa stupnjem oštećenja u pSS-u. Što su niže bile vrijednosti adropina to je bilo veće oštećenje, odnosno SSDDI. Ova otkrića upućuju na to da pojačano oslobađanje adropina može biti uključeno u patogenezu pSS-a te da bi mogao imati zaštitnu ulogu u upalnom okruženju koje je sastavni dio svih autoimunih bolesti. Adropin je pokazao pozitivnu povezanost s anti SSA/Ro52 antitijelima što potkrepljuje imunomodulatorne učinke ovog peptida. Osim imunomodulatorne uloge, povezanost adropina s HDL-om nedvojbeno potvrđuje njegovu značajnu ulogu u metabolizmu lipida. Unatoč tome, potrebna su daljnja istraživanja s većim brojem ispitanika kako bi se utvrdila točna uloga adropina u pSS-u.

Također, ovo je prvo istraživanje koje je pokazalo da je homocistein, kao poznati čimbenik povećanog rizika ateroskleroze, neovisan čimbenik predviđanja pSS-a. Bolesnici s pSS-om imaju značajno veće razine homocisteina u usporedbi s kontrolnom skupinom, a homocistein je pozitivno povezan sa CIMT-om, ali i s trigliceridima. Ovi podatci nedvojbeno ukazuju na povećani rizik ateroskleroze a time i kardiovaskularnih događanja u bolesnika s pSS-om. Budući da su oba parametra biomarkeri (surogati) subkliničke ateroskleroze, njihova bi rutinska primjena u praćenju bolesnika s pSS-om mogla pomoći u ranoj dijagnozi ateroskleroze. To bi ujedno omogućilo pravovremeno poduzimanje preventivnih mjera s ciljem sprječavanja kroničnih oštećenja uzrokovanih ovim poremećajem. O međudjelovanju rizičnih čimbenika subkliničke ateroskleroze i autoimunih procesa ukazuje povezanost CIMT-a sa anti/SSA i anti/SSB antitijelima. Pored toga, bolesnici s pSS su imali veći broj aterosklerotskih plakova u odnosu na kontrolnu skupinu. No za konačne zaključke o ulozi homocisteina u pSS-u nužna su daljnja multicentrična istraživanja na većem broju bolesnika.

8. POPIS LITERATURE

1. Feltsan T, Stanko P, Mracna J. Sjögren's syndrome in present. Bratisl Lek Listy. 2012;113(8):514-6.
2. Brandt JE, Priori R, Valesini G, Fairweather D. Sex differences in Sjögren's syndrome: a comprehensive review of immune mechanisms. Biol Sex Differ. 2015;6:19.
3. Venables PJ. Sjögren's syndrome. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2004;18(3):313-29.
4. Daniels TE, Fox PC. Salivary and oral components of Sjogren's syndrome. Rheum Dis Clin North Am. 1992;18(3):571-89.
5. Stefanski AL, Tomiak C, Pleyer U, Dietrich T, Burmester GR, Dörner T. The Diagnosis and Treatment of Sjögren's Syndrome. Dtsch Arztebl Int. 2017;114(20):354-361.
6. Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR. Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. 10. izdanje. Philadelphia: Elsevier; 20173.
7. Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. J Autoimmun. 2010;35(3):219-24
8. Hammi AR, Al-Hashimi IH, Nunn ME, Zipp M. Assessment of SS-A and SS-B in parotid saliva of patients with Sjogren's syndrome. J Oral Pathol Med. 2005;34(4):198-203.
9. Fox RI. Sjogren's syndrome. Lancet. 2005;366(9482):321-31.
10. Kassan SS, Moutsopoulos HM. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjogren syndrome. Arch Intern Med. 2004;164(12):1275-84
11. Carubbi F, Alunno A, Conforti A, Riccucci I, Di Cola I, Bartoloni E, Gerli R. Characterisation of articular manifestations in primary Sjögren's syndrome: clinical and imaging features. Clin Exp Rheumatol. 2020;38 Suppl 126(4):166-173.
12. Haga HJ, Peen E. A study of the arthritis pattern in primary Sjogren's syndrome. Clin Exp Rheumatol. 2007;25(1):88-91.

13. Vitali C, Tavoni A, Neri R, Castrogiovanni P, Pasero G, Bombardieri S. Fibromyalgia features in patients with primary Sjögren's syndrome. Evidence of a relationship with psychological depression. *Scand J Rheumatol*. 1989;18(1):21-7.
14. Kittridge A, Routhouska SB, Korman NJ. Dermatologic manifestations of Sjögren syndrome. *J Cutan Med Surg*. 2011;15(1):8-14.
15. Rostron J, Rogers S, Longman L, Kaney S, Field EA. Health-related quality of life in patients with primary Sjögren's syndrome and xerostomia: a comparative study. *Gerodontology*. 2002;19(1):53-9.
16. Borić K, Perković D. Systemic manifestations of Sjögren's syndrome. *Reumatizam* [Internet]. 2021 [pristupljeno 01.03.2023.];68(2):61-68.
17. Maripuri S, Grande JP, Osborn TG, Fervenza FC, Matteson EL, Donadio JV, Hogan MC. Renal involvement in primary Sjögren's syndrome: a clinicopathologic study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(9):1423-31.
18. Aasarød K, Haga HJ, Berg KJ, Hammerstrøm J, Jørstad S. Renal involvement in primary Sjögren's syndrome. *QJM*. 2000;93(5):297-304.
19. Brito-Zerón P, Kostov B, Solans R, Fraile G, Suárez-Cuervo C, Casanovas A, Rascón FJ, Qanneta R, Pérez-Alvarez R, Ripoll M, Akasbi M, Pinilla B, Bosch JA, Nava-Mateos J, Díaz-López B, Morera-Morales ML, Gheitasi H, Retamozo S, Ramos-Casals M; SS Study Group, Autoimmune Diseases Study Group (GEAS), Spanish Society of Internal Medicine (SEMI). Systemic activity and mortality in primary Sjögren syndrome: predicting survival using the EULAR-SS Disease Activity Index (ESSDAI) in 1045 patients. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(2):348-55.
20. Flament T, Bigot A, Chaigne B, Henique H, Diot E, Marchand-Adam S. Pulmonary manifestations of Sjögren's syndrome. *Eur Respir Rev*. 2016;25(140):110-23.
21. Parke AL. Pulmonary manifestations of primary Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(4):907-20.
22. Parambil JG, Myers JL, Lindell RM, Matteson EL, Ryu JH. Interstitial lung disease in primary Sjogren syndrome. *Chest*. 2006;130(5):1489-95.

23. Mandl T, Ekberg O, Wollmer P, Manthorpe R, Jacobsson LT. Dysphagia and dysmotility of the pharynx and oesophagus in patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol*. 2007;36(5):394-401.
24. Delalande S, de Seze J, Fauchais AL, Hachulla E, Stojkovic T, Ferriby D, Dubucquoi S, Pruvo JP, Vermersch P, Hatron PY. Neurologic manifestations in primary Sjögren syndrome: a study of 82 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2004;83(5):280-291.
25. Fauchais AL, Magy L, Vidal E. Central and peripheral neurological complications of primary Sjögren's syndrome. *Presse Med*. 2012;41(9 Pt 2):e485-93.
26. Segal B, Carpenter A, Walk D. Involvement of nervous system pathways in primary Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(4):885-906.
27. Wu J, Chang X, Zhang J, Liu C, Liu M, Chen W. Clinical and laboratory features of primary Sjögren's syndrome complicated with mild to severe thrombocytopenia. *Ann Transl Med*. 2022;10(6):300.
28. Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in Sjögren's syndrome: risks, management, and prognosis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(4):921-33, viii.
29. Nishishinya MB, Pereda CA, Muñoz-Fernández S, Pego-Reigosa JM, Rúa-Figueroa I, Andreu JL, Fernández-Castro M, Rosas J, Loza Santamaría E. Identification of lymphoma predictors in patients with primary Sjögren's syndrome: a systematic literature review and meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2015;35(1):17-26.
30. Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Cervera R, Gaya J, Halperin I, Ubieta I, et al. Thyroid disease in primary Sjogren syndrome. Study in a series of 160 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79(2):103-8.
31. Marchesoni D, Mozzanega B, De Sandre P, Romagnolo C, Gambari P, Maggino T. Gynaecological aspects of primary Sjogren's syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1995;63(1):49-53.
32. Picone O, Alby C, Frydman R, Mariette X. [Sjögren syndrome in Obstetric and Gynecology: literature review]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2006;35(2):169-75.

33. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(6):554-8.
34. Lemp MA. Evaluation and differential diagnosis of keratoconjunctivitis sicca. *J Rheumatol Suppl.* 2000;61:11-4.
35. Kroese FGM, Haacke EA, Bombardieri M. The role of salivary gland histopathology in primary Sjögren's syndrome: promises and pitfalls. *Clin Exp Rheumatol.* 2018;36 Suppl 112(3):222-233.
36. Kalk WW, Vissink A, Spijkervet FK, Bootsma H, Kallenberg CG, Nieuw Amerongen AV. Sialometry and sialochemistry: diagnostic tools for Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(12):1110-6.
37. Kalk WW, Vissink A, Spijkervet FK, Bootsma H, Kallenberg CG, Roodenburg JL. Parotid sialography for diagnosing Sjogren syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(1):131-7.
38. Aoun G, Nasseh I, Berberi A. Evaluation of the oral component of Sjögren's syndrome: An overview. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016;6(4):278-84.
39. Vinagre F, Santos MJ, Prata A, da Silva JC, Santos AI. Assessment of salivary gland function in Sjogren's syndrome: the role of salivary gland scintigraphy. *Autoimmun Rev.* 2009;8(8):672-6.
40. Vitali C, Bootsma H, Bowman SJ, Dorner T, Gottenberg JE, Mariette X, Ramos-Casals M, Ravaud P, Seror R, Theander E, Tzioufas AG. Classification criteria for Sjogren's syndrome: we actually need to definitively resolve the long debate on the issue. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(4):476-8.
41. Elkon KB, Gharavi AE, Hughes GR, Moutsopoulos HM. Autoantibodies in the sicca syndrome (primary Sjögren's syndrome). *Ann Rheum Dis.* 1984;43(2):243-5.
42. Baer AN, McAdams DeMarco M, Shiboski SC, Lam MY, Challacombe S, Daniels TE, Dong Y, Greenspan JS, Kirkham BW, Lanfranchi HE, Schiødt M, Srinivasan M, Umehara H, Vivino FB, Vollenweider CF, Zhao Y, Criswell LA, Shiboski CH; Sjögren's International

Collaborative Clinical Alliance (SICCA) Research Groups. The SSB-positive/SSA-negative antibody profile is not associated with key phenotypic features of Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(8):1557-61.

43. Venables PJ, Shattles W, Pease CT, et al. Anti-La (SS-B): a diagnostic criterion for Sjögren's syndrome? *Clin Exp Rheumatol*. 1989;7(2):181-184.

44. Theander E, Jonsson R, Sjöström B, Brokstad K, Olsson P, Henriksson G. Prediction of Sjögren's Syndrome Years Before Diagnosis and Identification of Patients With Early Onset and Severe Disease Course by Autoantibody Profiling. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(9):2427-36.

45. Jonsson R, Theander E, Sjöström B, Brokstad K, Henriksson G. Autoantibodies present before symptom onset in primary Sjögren syndrome. *JAMA*. 2013;310(17):1854-5.

46. Keene JD. Molecular structure of the La and Ro autoantigens and their use in autoimmune diagnostics. *J Autoimmun*. 1989;2(4):329-34.

47. Espinosa A, Zhou W, Ek M, Hedlund M, Brauner S, Popovic K, et al. The Sjogren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death. *J Immunol*. 2006;176(10):6277-85.

48. Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, Ambrosi A, Higgs R, Quintana FJ, Sjöstrand M, et al. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by disregulating the IL-23-Th17 pathway. *J Exp Med*. 2009;206(8):1661-71.

49. Manoussakis MN, Pange PJ, Moutsopoulos HM. Profil' autoantitel pri sindrome Shegrena [The autoantibody profile in Sjögren's syndrome. *Ter Arkh*. 1988;60(4):17-20.

50. Mavragani CP, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoantibodies to cellular antigens. Clinical and molecular aspects. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;123(1):46-57.

51. Ramos-Casals M, Solans R, Rosas J, Camps MT, Gil A, Del Pino-Montes J, Calvo-Alen J, Jiménez-Alonso J, Micó ML, Beltrán J, Belenguier R, Pallarés L; GEMESS Study Group. Primary Sjögren syndrome in Spain: clinical and immunologic expression in 1010 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2008;87(4):210-219.

52. Davidson BK, Kelly CA, Griffiths ID. Primary Sjögren's syndrome in the North East of England: a long-term follow-up study. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38(3):245-53.
53. Bournia VK, Vlachoyiannopoulos PG. Subgroups of Sjögren syndrome patients according to serological profiles. *J Autoimmun*. 2012;39(1-2):15-26.
54. Fayyaz A, Kurien BT, Scofield RH. Autoantibodies in Sjögren's Syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2016;42(3):419-34.
55. Seror R, Ravaud P, Bowman SJ, Baron G, Tzioufas A, Theander E, Gottenberg JE, Bootsma H, Mariette X, Vitali C; EULAR Sjögren's Task Force. EULAR Sjogren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(6):1103-9.
56. Vitali C, Palombi G, Baldini C, Benucci M, Bombardieri S, Covelli M, Del Papa N, De Vita S, Epis O, Franceschini F, Gerli R, Govoni M, Bonghi SM, Maglione W, Migliaresi S, Montecucco C, Orefice M, Priori R, Tavoni A, Valesini G. Sjögren's Syndrome Disease Damage Index and disease activity index: scoring systems for the assessment of disease damage and disease activity in Sjögren's syndrome, derived from an analysis of a cohort of Italian patients. *Arthritis Rheum*. 2007;56(7):2223-31.
57. Kanter JE, Kramer F, Barnhart S, Averill MM, Vivekanandan-Giri A, Vickery T, Li LO, Becker L, Yuan W, Chait A, Braun KR, Potter-Perigo S, Sanda S, Wight TN, Pennathur S, Serhan CN, Heinecke JW, Coleman RA, Bornfeldt KE. Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(12):E715-24.
58. Zhu Y, Xian X, Wang Z, Bi Y, Chen Q, Han X, Tang D, Chen R. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules*. 2018;8(3):80.
59. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
60. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-25.
61. [Global Health Estimates 2020](#): Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2019. Geneva, World Health Organization, 2020

62. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, et al: American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2021;143(8):e254-e743.
63. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104(4):503-16.
64. White J, Swerdlow DI, Preiss D, Fairhurst-Hunter Z, Keating BJ, Asselbergs FW, Sattar N, Humphries SE, Hingorani AD, Holmes MV. Association of Lipid Fractions With Risks for Coronary Artery Disease and Diabetes. *JAMA Cardiol*. 2016;1(6):692-9.
65. Emerging Risk Factors Collaboration; Erqou S, Kaptoge S, Perry PL, Di Angelantonio E, Thompson A, White IR, Marcovina SM, Collins R, Thompson SG, Danesh J. Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA*. 2009;302(4):412-23.
66. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, et al: CHARGE Extracoronary Calcium Working Group. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2013;368(6):503-12.
67. Wang L, Jin F, Wang P, Hou S, Jin T, Chang X, Zhao L. Adropin Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Osteogenic Differentiation to Alleviate Vascular Calcification via the JAK2/STAT3 Signaling Pathway. *Biomed Res Int*. 2022;2022:9122264.
68. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1177-8.
69. Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36.
70. Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1992;267(22):15274-6.

71. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1992;90(5):2092-6.
72. Kuchan MJ, Frangos JA. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol.* 1994;266(3 Pt 1):C628-36.
73. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986;315(17):1046-51.
74. Kumar KG, Trevaskis JL, Lam DD, Sutton GM, Koza RA, Chouljenko VN, Kousoulas KG, Rogers PM, Kesterson RA, Thearle M, Ferrante AW Jr, Mynatt RL, Burris TP, Dong JZ, Halem HA, Culler MD, Heisler LK, Stephens JM, Butler AA. Identification of adropin as a secreted factor linking dietary macronutrient intake with energy homeostasis and lipid metabolism. *Cell Metab.* 2008;8(6):468-81.
75. Butler AA, Zhang J, Price CA, Stevens JR, Graham JL, Stanhope KL, King S, Krauss RM, Bremer AA, Havel PJ. Low plasma adropin concentrations increase risks of weight gain and metabolic dysregulation in response to a high-sugar diet in male nonhuman primates. *J Biol Chem.* 2019;294(25):9706-9719.
76. Yolbas S, Kara M, Kalayci M, Yildirim A, Gundogdu B, Aydin S, Koca SS. ENHO gene expression and serum adropin level in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Adv Clin Exp Med.* 2018;27(12):1637-1641.
77. Butler AA, Tam CS, Stanhope KL, Wolfe BM, Ali MR, O'Keeffe M, St-Onge MP, Ravussin E, Havel PJ. Low circulating adropin concentrations with obesity and aging correlate with risk factors for metabolic disease and increase after gastric bypass surgery in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(10):3783-91.
78. Ali II, D'Souza C, Singh J, Adeghate E. Adropin's Role in Energy Homeostasis and Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci.* 2022;23(15):8318.
79. Banerjee S, Ghoshal S, Girardet C, DeMars KM, Yang C, Niehoff ML, Nguyen AD, Jayanth P, Hoelscher BA, Xu F, Banks WA, Hansen KM, Zhang J, Candelario-Jalil E, Farr

- SA, Butler AA. Adropin correlates with aging-related neuropathology in humans and improves cognitive function in aging mice. *NPJ Aging Mech Dis.* 2021;7(1):23.
80. Mushala BAS, Scott I. Adropin: a hepatokine modulator of vascular function and cardiac fuel metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021;320(1):H238-H244.
81. Ganesh Kumar K, Zhang J, Gao S, Rossi J, McGuinness OP, Halem HH, Culler MD, Mynatt RL, Butler AA. Adropin deficiency is associated with increased adiposity and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20(7):1394-402.
82. Sayegh M, Farquharson A, Horgan G, Gray SR, Thies F, Ranawana V, et al. Determinants of plasma adropin associated with metabolic control and links to lipid and glucose homeostasis. *Proceedings of the Nutrition Society. Cambridge University Press;* 2020;79(OCE3):E745
83. Yu HY, Zhao P, Wu MC, Liu J, Yin W. Serum adropin levels are decreased in patients with acute myocardial infarction. *Regul Pept.* 2014;190-191:46-9.
84. Yosae S, Khodadost M, Esteghamati A, Speakman JR, Shidfar F, Nazari MN, Bitarafan V, Djafarian K. Metabolic Syndrome Patients Have Lower Levels of Adropin When Compared With Healthy Overweight/Obese and Lean Subjects. *Am J Mens Health.* 2017;11(2):426-434.
85. Zang H, Jiang F, Cheng X, Xu H, Hu X. Serum adropin levels are decreased in Chinese type 2 diabetic patients and negatively correlated with body mass index. *Endocr J.* 2018;65(7):685-691.
86. Choi HN, Yim JE. Plasma Adropin as a Potential Marker Predicting Obesity and Obesity-associated Cancer in Korean Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *J Cancer Prev.* 2018;23(4):191-6.
87. Lovren F, Pan Y, Quan A, Singh KK, Shukla PC, Gupta M, Al-Omran M, Teoh H, Verma S. Adropin is a novel regulator of endothelial function. *Circulation.* 2010;122(11 Suppl):S185-92.
88. Niepolski L, Grzegorzewska AE. Salusins and adropin: New peptides potentially involved in lipid metabolism and atherosclerosis. *Adv Med Sci.* 2016;61(2):282-7.

89. Zhao LP, You T, Chan SP, Chen JC, Xu WT. Adropin is associated with hyperhomocysteine and coronary atherosclerosis. *Exp Ther Med.* 2016;11(3):1065-1070.
90. Wu L, Fang J, Chen L, Zhao Z, Luo Y, Lin C, Fan L. Low serum adropin is associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetic and non-diabetic patients. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(5):751-8.
91. Boric-Skaro D, Mizdrak M, Luketin M, Martinovic D, Tokic D, Vilovic M, Supe-Domic D, Kurir TT, Bozic J. Serum Adropin Levels in Patients on Hemodialysis. *Life (Basel).* 2021;11(4):337.
92. Ghoshal S, Stevens JR, Billon C, Girardet C, Sitaula S, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Rankinen T, Bouchard C, et al. Adropin: An endocrine link between the biological clock and cholesterol homeostasis. *Mol Metab.* 2018;8:51-64.
93. Aydin S. Three new players in energy regulation: preptin, adropin and irisin. *Peptides.* 2014; 56:94-110.
94. Ali II, D'Souza C, Singh J, Adeghate E. Adropin's Role in Energy Homeostasis and Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci.* 2022;23(15):8318.
95. Yolbas S, Kara M, Yilmaz M, Aydin S, Koca SS. Serum adropin level and ENHO gene expression in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2016;35(6):1535-40.
96. Sena CM, Pereira AM, Seiça R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2216-31.
97. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart.* 2001;85(3):342-50.
98. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Lüscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation.* 1995;91(5):1314-9.
99. Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, Kearney MT. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med.* 2003;20(4):255-68.

100. Daiber A, Xia N, Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, Münzel T, Li H. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(1):187.
101. Gu X, Li H, Zhu X, Gu H, Chen J, Wang L, Harding P, Xu W. Inverse Correlation Between Plasma Adropin and ET-1 Levels in Essential Hypertension: A Cross-Sectional Study. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(40):e1712.
102. Gulen B, Eken C, Kucukdagli OT, Serinken M, Kocyigit A, Kılıc E, Uyarel H. Adropin levels and target organ damage secondary to high blood pressure in the ED. *Am J Emerg Med.* 2016;34(11):2061-2064.
103. Çelik HT, Akkaya N, Erdamar H, Gok S, Kazanci F, Demircelik B, Cakmak M, Yigitoglu R. The Effects of Valsartan and Amlodipine on the Levels of Irisin, Adropin, and Perilipin. *Clin Lab.* 2015;61(12):1889-95.
104. Sato K, Yamashita T, Shirai R, Shibata K, Okano T, Yamaguchi M, Mori Y, Hirano T, Watanabe T. Adropin Contributes to Anti-Atherosclerosis by Suppressing Monocyte-Endothelial Cell Adhesion and Smooth Muscle Cell Proliferation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5):1293.
105. Fujie S, Hasegawa N, Sato K, Fujita S, Sanada K, Hamaoka T, Iemitsu M. Aerobic exercise training-induced changes in serum adropin level are associated with reduced arterial stiffness in middle-aged and older adults. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(10):H1642-7.
106. Zhang H, Jiang L, Yang YJ, Ge RK, Zhou M, Hu H, Liu H, Cui J, Li LL, Dong YF, Cheng XS, Chen R, Li P. Aerobic exercise improves endothelial function and serum adropin levels in obese adolescents independent of body weight loss. *Sci Rep.* 2017;7(1):17717.
107. Akcilar R, Kocak FE, Simsek H, Akcilar A, Bayat Z, Ece E, Kokdasgil H. Antidiabetic and hypolipidemic effects of adropinin streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Bratisl Lek Listy.* 2016;117(2):100-5.
108. Simac P, Perkovic D, Bozic I, Bilopavlovic N, Martinovic D, Bozic J. Serum Adropin Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Life (Basel).* 2022;12(2):169.

109. Jaszszwili M, Billert M, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Adropin as A Fat-Burning Hormone with Multiple Functions-Review of a Decade of Research. *Molecules*. 2020;25(3):549.
110. Bozic J, Kumric M, Ticinovic Kurir T, Males I, Borovac JA, Martinovic D, Vilovic M. Role of Adropin in Cardiometabolic Disorders: From Pathophysiological Mechanisms to Therapeutic Target. *Biomedicines*. 2021;9(10):1407.
111. Fowler B. Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Semin Vasc Med*. 2005;5(2):77-86.
112. Bendini MG, Lanza GA, Mazza A, Giordano A, Leggio M, Menichini G, De Cristofaro R, Moriconi E, Cozzari L, Farina SM, Giordano G Fattori di rischio delle malattie cardiovascolari: esiste ancora un ruolo per l'omocisteina? *G Ital Cardiol* 2007;8(3):148-160.
113. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr*. 1992;12:279-98.
114. World Health Organization. Prevention of Cardiovascular Disease Guidelines for Assessment and Management of Cardiovascular Risk WHO Library Cataloguing-in-Publication Dana; 2007 (ažurirano 2012; citirano 23. veljače 2023) Dostupno.
115. Weiss N, Keller C, Hoffmann U, Loscalzo J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med*. 2002;7(3):227-39.
116. Eren E, Yilmaz N, Aydin O. High density lipoprotein and it's dysfunction. *Open Biochem J*. 2012; 6:78-93.
117. Nedvetsky PI, Sessa WC, Schmidt HH. There's NO binding like NOS binding: protein-protein interactions in NO/cGMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):16510-2.
118. Goligorsky MS, Li H, Brodsky S, Chen J. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283(1):F1-10.
119. Jin L, Abou-Mohamed G, Caldwell RB, Caldwell RW. Endothelial cell dysfunction in a model of oxidative stress. *Med Sci Monit*. 2001;7(4):585-91.

120. Su SJ, Huang LW, Pai LS, Liu HW, Chang KL. Homocysteine at pathophysiologic concentrations activates human monocyte and induces cytokine expression and inhibits macrophage migration inhibitory factor expression. *Nutrition*. 2005;21(10):994-1002.
121. Wilson CP, McNulty H, Scott JM, Strain JJ, Ward M. Postgraduate Symposium: The MTHFR C677T polymorphism, B-vitamins and blood pressure. *Proc Nutr Soc*. 2010;69(1):156-65.
122. Wald DS, Wald NJ, Morris JK, Law M. Folic acid, homocysteine, and cardiovascular disease: judging causality in the face of inconclusive trial evidence. *BMJ*. 2006;333(7578):1114-7.
123. Sabio JM, Vargas-Hitos JA, Martinez-Bordonado J, Navarrete-Navarrete N, Díaz-Chamorro A, Olvera-Porcel C, Zamora-Pasadas M, Jiménez-Alonso J. Relationship between homocysteine levels and hypertension in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66(10):1528-35.
124. Van Doornum S, McColl G, Wicks IP. Accelerated atherosclerosis: an extraarticular feature of rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum*. 2002;46(4):862-73.
125. Roman MJ, Shanker BA, Davis A, Lockshin MD, Sammaritano L, Simantov R, Crow MK, Schwartz JE, Paget SA, Devereux RB, Salmon JE. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2003;349(25):2399-406.
126. Manavathongchai S, Bian A, Rho YH, Oeser A, Solus JF, Gebretsadik T, Shintani A, Stein CM. Inflammation and hypertension in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2013;40(11):1806-11.
127. Hernanz A, Plaza A, Martín-Mola E, De Miguel E. Increased plasma levels of homocysteine and other thiol compounds in rheumatoid arthritis women. *Clin Biochem*. 1999;32(1):65-70.
128. Hahn BH. Systemic lupus erythematosus and accelerated atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2003;349(25):2379-80.

129. Belibou C, Ancuța C, Ancuța E, Filoș C, Chirieac R. Carotid intima-media thickness and plaque as surrogate biomarkers of atherosclerosis among consecutive women with systemic lupus erythematosus. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(1):29-34.
130. Bots ML, Dijk JM, Oren A, Grobbee DE. Carotid intima-media thickness, arterial stiffness and risk of cardiovascular disease: current evidence. *J Hypertens.* 2002;20(12):2317-25.
131. Durga J, Verhoef P, Bots ML, Schouten E. Homocysteine and carotid intima-media thickness: a critical appraisal of the evidence. *Atherosclerosis.* 2004;176(1):1-19.
132. Heiss G, Sharrett AR, Barnes R, Chambless LE, Szklo M, Alzola C. Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: associations with cardiovascular risk factors in the ARIC study. *Am J Epidemiol.* 1991;134(3):250-6.
133. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2007;115(4):459-67.
134. Taylor AJ, Kent SM, Flaherty PJ, Coyle LC, Markwood TT, Vernalis MN. ARBITER: Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol: a randomized trial comparing the effects of atorvastatin and pravastatin on carotid intima medial thickness. *Circulation.* 2002;106(16):2055-60.
135. Bots ML, Dijk JM, Oren A, Grobbee DE. Carotid intima-media thickness, arterial stiffness and risk of cardiovascular disease: current evidence. *J Hypertens.* 2002;20(12):2317-25.
136. Vaudo G, Bocci EB, Shoenfeld Y, Schillaci G, Wu R, Del Papa N, Vitali C, Delle Monache F, Marchesi S, Mannarino E, Gerli R. Precocious intima-media thickening in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2005;52(12):3890-7.
137. Akyel A, Tavil Y, Yayla C, Tufan A, Kaya A, Tezcan ME, Ozturk MA, Boyaci B. Endothelial dysfunction in primary Sjögren syndrome. *West Indian Med J.* 2012;61(9):870-2.

138. Zardi EM, Sambataro G, Basta F, Margiotta DP, Afeltra AM. Subclinical carotid atherosclerosis in elderly patients with primary Sjögren syndrome: a duplex Doppler sonographic study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014;27(4):645-51.
139. Gravani F, Papadaki I, Antypa E, Nezos A, Masselou K, Ioakeimidis D, Koutsilieris M, Moutsopoulos HM, Mavragani CP. Subclinical atherosclerosis and impaired bone health in patients with primary Sjogren's syndrome: prevalence, clinical and laboratory associations. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):99.
140. Markus H, Kapozsta Z, Ditrich R, Wolfe C, Ali N, Powell J, Mendell M, Cullinane M. Increased common carotid intima-media thickness in UK African Caribbeans and its relation to chronic inflammation and vascular candidate gene polymorphisms. *Stroke*. 2001;32(11):2465-71.
141. Durga J, Bots ML, Schouten EG, Kok FJ, Verhoef P. Low concentrations of folate, not hyperhomocysteinemia, are associated with carotid intima-media thickness. *Atherosclerosis*. 2005;179(2):285-92.
142. Inamoto N, Katsuya T, Kokubo Y, Mannami T, Asai T, Baba S, Ogata J, Tomoike H, Ogiwara T. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism with carotid atherosclerosis depending on smoking status in a Japanese general population. *Stroke*. 2003;34(7):1628-33.
143. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-47.
144. European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens*. 2003;21(6):1011-53.
145. Stergiou GS, Salgami EV; World Health Organization-International Society of Hypertension (WHO-ISH); USA Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC-7); European Society of Hypertension-European Society of Cardiology (ESH-ESC). New European, American and

International guidelines for hypertension management: agreement and disagreement. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2004;2(3):359-68.

146. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 2011;8(10):785-6.

147. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation.* 2003;108(17):2054-9.

148. Celik A, Balin M, Kobat MA, Erdem K, Baydas A, Bulut M, Altas Y, Aydin S, Aydin S. Deficiency of a new protein associated with cardiac syndrome X; called adropin. *Cardiovasc Ther.* 2013;31(3):174-8.

149. Wanchu A, Khullar M, Sud A, Bambery P. Elevated nitric oxide production in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol.* 2000;19(5):360-4.

150. Couffinhal T, Duplâa C, Moreau C, Lamazière JM, Bonnet J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1994;74, 25–34.

151. Lee HM, Kim HJ, Won KJ, Choi WS, Park SH, Song H, Park PJ, Park TK, Lee CK, Kim B. Soluble form of vascular cell adhesion molecule 1 induces migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res.* 2008;45(3):259-68.

152. Konttinen YT, Platts LA, Tuominen S, Eklund KK, Santavirta N, Törnwall J, Sorsa T, Hukkanen M, Polak JM. Role of nitric oxide in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1997;40(5):875-83.

153. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;34(6):879-86.

154. Akcılar R, Emel Koçak F, Şimşek H, Akcılar A, Bayat Z, Ece E, Kökdaşgil H. The effect of adropin on lipid and glucose metabolism in rats with hyperlipidemia. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19(3):245-51.

155. Argyropoulou OD, Tzioufas AG. Common and rare forms of vasculitis associated with Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2020;32(1):21-28.

156. Bozic J, Borovac JA, Galic T, Kurir TT, Supe-Domic D, Dogas Z. Adropin and Inflammation Biomarker Levels in Male Patients With Obstructive Sleep Apnea: A Link With Glucose Metabolism and Sleep Parameters. *J Clin Sleep Med*. 2018;14(7):1109-1118.
157. Brnić D, Martinovic D, Zivkovic PM, Tokic D, Tadin Hadjina I, Rusic D, Vilovic M, Supe-Domic D, Tonkic A, Bozic J. Serum adropin levels are reduced in patients with inflammatory bowel diseases. *Sci Rep*. 2020;10(1):9264.
158. Kuliczowska-Płaksej J, Mierzwicka A, Jończyk M, Stachowska B, Urbanovych A, Bolanowski M. Adropin in women with polycystic ovary syndrome. *Endokrynol Pol*. 2019;70(2):151-6.
159. Tičinović Kurir T, Miličević T, Novak A, Vilović M, Božić J. Adropin—Potential Link in Cardiovascular Protection for Obese Male Type 2 Diabetes Mellitus Patients Treated with Liraglutide. *Acta Clin Croat*. 2020;59(2):344-350.
160. Retamozo S, Akasbi M, Brito-Zerón P, Bosch X, Bove A, Perez-de-Lis M, Jimenez I, Soto-Cardenas MJ, Gandia M, Diaz-Lagares C, Viñas O, Siso A, Perez-Alvarez R, Yague J, Ramos-Casals M. Anti-Ro52 antibody testing influences the classification and clinical characterisation of primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(5):686-92.
161. Bartoloni E, Baldini C, Schillaci G, Quartuccio L, Priori R, Carubbi F, Bini V, Alunno A, Bombardieri S, De Vita S, Valesini G, Giacomelli R, Gerli R. Cardiovascular disease risk burden in primary Sjögren's syndrome: results of a population-based multicentre cohort study. *J Intern Med*. 2015;278(2):185-92.
162. Salmon JE, Roman MJ. Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. 2008;121(10 Suppl 1):S3-8.
163. Shoenfeld Y, Gerli R, Doria A, Matsuura E, Cerinic MM, Ronda N, Jara LJ, Abu-Shakra M, Meroni PL, Sherer Y. Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases. *Circulation*. 2005;112(21):3337-47.
164. Sabio JM, Sánchez-Berná I, Martínez-Bordonado J, Vargas-Hitos JA, Navarrete-Navarrete N, Expósito Ruíz M, Jiménez-Alonso J. Prevalence of and factors associated with

increased arterial stiffness in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015;67(4):554-62.

165. Li L, Xie W, Zheng XL, Yin WD, Tang CK. A novel peptide adropin in cardiovascular diseases. *Clin Chim Acta*. 2016;453:107-13.

166. Lim U, Cassano PA. Homocysteine and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Epidemiol*. 2002;156(12):1105-13.

167. Sundström J, Sullivan L, D'Agostino RB, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH, Wilson PW, Levy D, Vasan RS. Plasma homocysteine, hypertension incidence, and blood pressure tracking: the Framingham Heart Study. *Hypertension*. 2003;42(6):1100-5.

168. Onyemelukwe OU, Maiha BB. Relationship between plasma homocysteine and blood pressure in hypertensive Northern-Nigerians. *Afr Health Sci*. 2020;20(1):324-337.

169. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 1998;338(15):1042-50.

170. Sen U, Mishra PK, Tyagi N, Tyagi SC. Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension. *Cell Biochem Biophys*. 2010;57(2-3):49-58.

171. Samouillan V, Lamy E, Dandurand J, Foucault-Bertaud A, Chareyre C, Lacabanne C, Charpiot P. Changes in the physical structure and chain dynamics of elastin network in homocysteine-cultured arteries. *J Biomed Mater Res A*. 2010;93(2):696-703.

172. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(14):6369-73.

173. Daly C, Fitzgerald AP, O'Callaghan P, Collins P, Cooney MT, Graham IM; COMAC Group. Homocysteine increases the risk associated with hyperlipidaemia. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009;16(2):150-5.

174. Chen A, Wu W, Gong J, Han Y, Xu G, Xie L. Association of homocysteine with carotid atherosclerosis in hypertension. *J Hum Hypertens*. 2023;37(3):227-234.

175. Kurt T, Gokmen F, Adam G, Ozcan S, Ozbudak E, Akbal A, Temiz A, Sacar M. How important is early diagnosis of subclinical atherosclerosis in primary Sjögren's syndrome patients. *Acta Med. Mediter.* 2015;31(3):741-9.

9. SAŽETAK

Uvod: Bolesnici s pSS-om imaju povećanu prevalenciju endotelne disfunkcije i preuranjene ateroskleroze, a posljednjih godina je u fokusu istraživanja subklinička ateroskleroza u bolesnika s autoimunim bolestima. Nedavno je otkriven adropin, sekretorni protein koji ima značajnu ulogu u regulaciji metabolizama lipida i inzulinskoj rezistenciji, a isto tako ispoljava pozitivan učinak na funkciju endotelnih stanica te ima protuupalni učinak. Povišene razine homocisteina pokazale su se kao jak i neovisan čimbenik kardiovaskularnog rizika u zdravoj populaciji. Homocistein se pokazao i kao neovisan faktor rizika za razvoj subkliničke ateroskleroze. Korištenje CIMT-a, valjanog markera generalizirane ateroskleroze i rizika od vaskularne bolesti, može pomoći u identificiranju visokorizičnih bolesnika sa subkliničkom aterosklerozom.

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti razine adropina i homocisteina te CIMT-a u bolesnika s pSS-om u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nadalje, ciljevi su bili istražiti povezanosti između adropina, homocisteina i CIMT-a s imunološkim parametarima u pSS-u, uključujući protutijela specifična za bolest, EULAR-ov indeks aktivnosti bolesti u Sjögrenovom sindromu (ESSDAI) i indeks oštećenja bolesti u Sjögrenovom sindromu (SSDDI).

Metode: U ovom presječnom istraživanju uključeno je 52 bolesnika s pSS-om i 52 ispitanika u kontrolnoj skupini usporedni s ispitivanom grupom po dobi, spolu, pušenju i ITM-u. Za dio istraživanja o homocisteinu uključeno je 48 bolesnika s pSS-om i 46 ispitanika u kontrolnoj skupini. Demografske varijable i klasični čimbenici kardiovaskularnog rizika: hipertenzija, dislipidemija, pretilost i navika pušenja procijenjeni su u obje skupine, a također su kliničkim pregledom i intervjuem prikupljene značajke povezane s bolešću u bolesnika s pSS-om. Za procjenu aktivnosti bolesti i kroničnog oštećenja su korišteni ESSDAI te SSDDI. Za analizu adropina je korištena enzimatska imunoanaliza (ELISA). Koncentracija homocisteina u serumu mjerena je korištenjem kemiluminiscentnog imunološkog testa mikročestica (CMIA). Prisutnost subkliničke ateroskleroze određena je CIMT-om procijenjenim ultrazvukom karotida.

Rezultati: Bolesnici s pSS-om imaju značajno više razine adropina u usporedbi s kontrolnom skupinom ($3,76 \pm 0,68$ naspram $3,14 \pm 0,69$ ng/mL, $p < 0,001$). Razine adropina u bolesnika s pSS-om su pozitivno povezane s HDL-om ($r = 0,290$, $p = 0,036$) i anti SSA/Ro52 antitijelima ($r = 0,307$, $p = 0,026$) te negativno povezane sa SSDDI ($r = -0,401$, $p = 0,003$).

Multivarijantna linearna regresija pokazala je da su razine adropina neovisno povezane s HDL-om ($\beta \pm SE$, $0,903 \pm 0,283$, $p = 0,002$) i SSDDI ($\beta \pm SE$, $-0,202 \pm 0,073$, $p = 0,008$).

Arterijski tlak je bio viši u bolesnika s pSS-om ($p = 0,007$) za sistolički krvni tlak (SBD) i ($p = 0,018$) za dijastolički krvni tlak (DBP). Suprotno od očekivanog, ukupni kolesterol (TC) bio je veći u kontrolnoj skupini ($p = 0,047$). Vrijednosti homocisteina bile su značajno veće u pacijenata s pSS-om ($p=0,015$), kao i CIMT ($p=0,0372$). Homocistein je pozitivno korelirao s trigliceridima (TG) ($r=0,204$, $p=0,048$) i CIMT-om ($r= 0,231$, $p=0,046$). CIMT je pozitivno povezan s dobi ($r=0,416$, $p<0,0001$), SBP ($r=0,293$, $r=0,004$) i s indeksom oštećenja u Sjögrenovom sindromu (SSDDI) ($r=0,351$, $p=0,014$). Također je negativno korelirao s autoantitijelima specifičnim za Sjögrenov sindrom anti SSA/Ro60 ($r= -0,431$, $p=0,002$) i anti SSB/La ($r= -0,346$, $p=0,016$).

Zaključak: Naše istraživanje ukazuje da bolesnici s pSS-om imaju povećani rizik za subkliničku aterosklerozu te da bi adropin mogao biti uključen u patofiziologiju pSS-a i navedene procese djelujući protektivno na endotel. Također smo pokazali da postoji značajna povezanost između subkliničkog aterosklerotskog procesa i homocisteina. Homocistein bi mogao biti jeftini i dostupan marker za stratifikaciju rizika razvoja subkliničke ateroskleroze u asimptomatskih bolesnika. Ovi rezultati upućuju da bi uključivanje određivanja razina adropina i homocisteina u plazmi u protokole za smanjenje rizika moglo biti relevantno za identifikaciju pojedinaca s većim rizikom od aterosklerotskih događaja. U konačnici bi to omogućilo pravovremeno poduzimanje preventivnih mjera kojima bi se navedeni rizici smanjili.

Ključne riječi: primarni Sjögren-ov sindrom, subklinička ateroskleroza, endotelna disfunkcija, adropin, homocistein, CIMT, anti SSA/Ro antitijela, anti SSB/La antitijela, SSDDI, ESSDAI

10. SUMMARY

Background: Patients with pSS have an increased prevalence of endothelial dysfunction and premature atherosclerosis, and in recent years the focus of research has been on subclinical atherosclerosis in patients with autoimmune diseases. Recently, adropin was discovered, a secretory protein that plays a significant role in the regulation of lipid metabolism and insulin resistance, and also has a positive effect on the function of endothelial cells and has an anti-inflammatory effect. Elevated homocysteine levels have been shown to be a strong and independent cardiovascular risk factor in a healthy population. Homocysteine has also been shown to be an independent risk factor for the development of subclinical atherosclerosis. The use of CIMT, a valid marker of generalized atherosclerosis and risk of vascular disease, may help identify high-risk patients with subclinical atherosclerosis.

Objective: The aim of this study was to determine the level of adropin and homocysteine and CIMT values in patients with pSS compared to healthy controls. Additional objectives were to investigate the correlation between adropin, homocysteine and CIMT with immunological parameters in pSS as disease-specific antibodies, EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI) and Sjögren's syndrome disease damage index (SSDDI).

Methods: In this cross-sectional study, 52 patients with pSS and 52 subjects in the control group were included, comparable in terms of age, sex, smoking and BMI. For the homocysteine part of the study, 48 patients with pSS and 46 subjects in the control group were included. Demographic variables and classic cardiovascular risk factors: hypertension, dyslipidemia, obesity and smoking habits were assessed in both groups, and features associated with the disease in the pSS group were also collected through clinical examination and interviews. ESSDAI and SSDDI were used to assess disease activity and chronic disease damage. Enzyme immunoassay (ELISA) was used to analyze adropin. Serum homocysteine concentration was measured using a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA). The presence of subclinical atherosclerosis was determined by CIMT assessed by carotid ultrasound.

Results: Patients with pSS have significantly higher adropin levels compared to controls (3.76 ± 0.68 vs. 3.14 ± 0.69 ng/mL, $p < 0.001$). Adropin levels in patients with pSS are positively correlated with HDL ($r = 0.290$, $p = 0.036$) and anti SSA/Ro52 antibodies ($r = 0.307$, $p = 0.026$) and negatively correlated with SSDDI ($r = -0.401$, $p = 0.003$). Multivariate linear regression showed that adropin levels were independently associated with HDL ($\beta \pm SE$, 0.903 ± 0.283 , $p = 0.002$) and SSDDI ($\beta \pm SE$, -0.202 ± 0.073 , $p = 0.008$).

Arterial pressure was higher in patients with pSS ($p = 0.007$) for systolic blood pressure (SBP) and ($p = 0.018$) for diastolic blood pressure (DBP). Contrary to expectation, total cholesterol (TC) was higher in the control group ($p = 0.047$). Homocysteine values were significantly higher in patients with pSS ($p=0.015$), as well as CIMT ($p = 0.0372$). Homocysteine positively correlated with triglycerides (TG) ($r = 0.204$, $p = 0.048$) and CIMT ($r= 0.231$, $p=0.046$). CIMT was positively correlated with age ($r = 0.416$, $p < 0.0001$), SBP ($r=0.293$, $r=0.004$) and with Sjögren's syndrome impairment index (SSDDI) ($r = 0.351$, $p = 0.014$). It also negatively correlated with Sjögren's syndrome-specific autoantibodies anti SSA/Ro60 ($r = -0.431$, $p = 0.002$) and anti SSB/La ($r = -0.346$, $p = 0.016$).

Conclusion: Our findings are implying that patients with pSS have an increased risk for subclinical atherosclerosis and that adropin could be involved in the pathophysiology of pSS and the in mentioned processes by acting protectively on the endothelium. We also showed that there is a significant association between the subclinical atherosclerotic process and homocysteine. So, homocysteine could be a cheap and available marker for risk stratification of the development of subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients. These results suggest that the inclusion of determination of plasma adropin and homocysteine levels in risk reduction protocols may be relevant to identify individuals at higher risk of atherosclerotic events. Ultimately, this would enable timely taking of preventive measures that would reduce the mentioned risks.

Key words: primary Sjögren's syndrome, subclinical atherosclerosis, endothelial dysfunction, adropin, homocysteine, CIMT, anti SSA/Ro antibodies, anti SSB antibodies, SSDDI, ESSDAI

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Marijana Janković Danolić

Adresa: Zagrebačka cesta 132, 10000Zagreb

Telefon: 0916302348

Elektronička pošta: marijana-st@hotmail.com

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 24.09.1987. Slavonski Brod, Hrvatska

Školovanje:

2002. – 2006.	I. jezična gimnazija, Split
2006. – 2011.	mag. pharm., Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2015. – danas	poslijediplomski doktorski studij “Klinička medicina utemeljena na dokazima” (EBM), Medicinski fakultet u Splitu

Radno iskustvo:

2018. - danas	Key Account Manager Biopharmaceuticals (područja: hematologija, imunologija, onkologija i nefrologija) – SANDOZ.D.O.O.
2015. – 2018.	medicinski suradnik – ASTRAZENECA D.O.O
2013. – 2015.	stručno komercijalni suradnik – KRKA-FARMA D.O.O
2011. – 2012.	pripravnik - ljekarne ‘Splitsko-dalmatinske županije’

Jezične vještine:

Materinski jezik/jezici: HRVATSKI

Drugi jezici:

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
ENGLISKI	C2	C2	C2	C2	C2
NJEMAČKI	C1	C1	B1	B1	B1
TALIJANSKI	C1	C1	B1	B1	B1

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

Publikacije:

Danolić MJ, Perković D, Petrić M, Barišić I, Gugo K, Božić J. Adropin Serum Levels in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *Biomolecules*. 2021 Aug 31;11(9):1296.