Koncentracija serotonina u trombocitima i polimorfizam serotoninskoga transportera u bolesnika sa Sjögrenovim sindromom

Šarac, Helena

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:775368

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository



Središnja medicinska knjižnica

Šarac, Helena (2013) ***Koncentracija serotonina u trombocitima i polimorfizam serotoninskoga transportera u bolesnika sa Sjögrenovim sindromom.*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/1896

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

Helena Šarac

Koncentracija serotonina u trombocitima i polimorfizam serotoninskoga transportera u bolesnika sa Sjögrenovim sindromom

DISERTACIJA



Zagreb, 2013

Disertacija je izrađena u Klinici za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zavodu za kliničku imunologiju i reumatologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Jedinici za neurologiju i Jedinici za radiologiju Poliklinike „Neuron“ Hrvatskog Instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za imunologiju, pulmologiju i reumatologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Odjelu za molekularnu biologiju Laboratorija za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta Ruđer Bošković i Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu Zagreb. Disertacija je izrađena u okviru znanstvenog projekta “Sjögrenov sindrom - neurohumoralna regulacija autoimunosti i aterogeneza“ (šifra projekta:108-1081874-2416), čiji je voditelj prof.dr.sc. Jasenka Markeljević.

Voditelj rada: prof.dr.sc. Jasenka Markeljević

Disertaciju posvećujem svojoj obitelji, pok. suprugu Ivanu i ocu na strpljenju i ohrabrenju da ustrajem u ostvarenju svojih ideja i planova.

Za podršku i stručno vođenje, ne samo prilikom izrade ove disertacije, nego i tijekom cjelokupne zajedničke suradnje, zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Jasenki Markeljević.

Izrada ove disertacije ne bi bila moguća bez podrške i dugogodišnje zajedničke suradnje kako na ovom tako i na nizu drugih projekata, mojih pretpostavljenih, akademika Ivice Kostovića i prof.dr.sc. Nevena Henigsberga koji su me podržavali i pomagali na mojem poslovnom putu i bodrili u nastojanju da se osim kroz struku potvrdim i u znanstvenom radu.

Zahvaljujem doc.dr.sc. Nadi Božina, prof.dr.sc. Jadranki Sertić i kolegici dr.sc. Viktoriji Erdeljić na nesebičnoj pomoći i neumornom radu tijekom cijelog postupka izrade ove disertacije.

Iskreno hvala pok. prof.dr.sc. Branimiru Jerneju i dr.sc. Lipi Čičin-Šain na korisnim savjetima i znanstvenoj podršci. Srdačno zahvaljujem i cjelokupnom osoblju Hrvatskog Zavoda za transfuzijsku medicinu Zagreb kao i svim dobrovoljnim darivateljima krvi koji su bili spremni pomoći i u znanstvene svrhe.

Od srca zahvaljujem dr.sc. Ivanu Mužiću i ing. Mladenu Vučiću zaslužnima za tehničku izvedbu, na prijateljskoj podršci i strpljenju pri izradi ove disertacije.

Veliko hvala predstojnici Klinike za neurologiju prof.dr.sc. Sanji Hajnšek na razumijevanju i svim djelatnicima Odjela za heredodegenerativne bolesti Zavoda za poremećaje pokreta s kojima svakodnevno radim i izvrsno surađujem, na razumijevanju i podršci.

SADRŽAJ

1 UVOD 1
1.1 Pregled dosadašnjih spoznaja 2
1.2 Klinički simptomi i dijagnostika pSS 4
1.3 PSS i srodne autoimune reumatske bolesti 5
1.4 Epidemiologija i etiopatogeneza pSS 6
1.5 Endokrini mehanizmi aktivacije urođene imunosti u pSS 7
1.6 Genetička epidemiologija u pSS 8
1.7 Kemokini, citokini i biomarkeri u pSS 9
Polimorfizmi citokina u pSS 11
1.7.1 Evaluacija tkiva slinovnica u pSS pomoću mikročipova i transkripcijsko profiliranje 11
1.8 Imuni odgovor u pSS 12
1.9 Klasifikacijski kriteriji u pSS 14
1.10 Klinička slika u pSS 15
1.10.1 Suhoća sluznica (sicca sindrom) 16
1.10.2 Umor 17
1.10.3 Depresivnost 18
1.11 Indeks aktivnosti bolesti u pSS (ESSDAI) 20
1.12 . Subjektivne bolesnikove tegobe 20
1.13 Trombociti 21
1.14 Serotonin (5-HT) 23
1.14.1 Fiziologija 5-HT 25
1.14.2 Središnji odjeljak 5-HT sustava 26
1.14.3 Periferni odjeljak 5-HT sustava 28
1.14.4 Trombocitni serotonergički sustav 28
1.14.5 Trombocitni model u neurobiologiji 29
1.14.6 Trombocitni 5-HT receptor (5-HTr) 31
1.14.7 Serotoninski transporter (5-HTT) i polimorfizmi 5-HTT 31
1.15 Neuroimunoendokrina regulacija u pSS 38
1.15.1 Periferni neuroendokrini sustav 39
1.15.2 5-HT u neuroimunim interakcijama u pSS 46
1.15.3 Neuroendokrine interakcije u pSS 48
1.15.4 Neuroendokrina regulacija u stresu 50
1.15.5 Neuroimunoendokrini uzroci umora i depresije u pSS 52
1.15.6 Trombocitni 5-HT u upalnim reumatskim bolestima 53
1.16 Neurološke komplikacije u pSS 54
1.16.1 Komplikcije perifernog živčanog sustava (PSŽ) u pSS 54
1.16.2 Manifestacije središnjeg živčanog sustava (SŽS) u pSS 56
2 HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA 58
2.1 Hipoteza 58
2.2 Ciljevi istraživanja 58
3 ISPITANICI I METODE 60
3.1 Ispitanici 60
3.2 Metode 61
3.2.1 Ljestvice 61
3.2.2 Postupak uzimanja uzoraka krvi 63

3.2.3 Postupak određivanja koncentracije trombocitnog serotonina 65
3.2.4 Genotipizacija 66
Materijal i metode 66
3.2.5 Analiza MRI mozga u bolesnika s pSS 68
3.2.6 Suglasnosti 70
3.2.7 Statističke metode 70
4 REZULTATI 72
4.1 Analiza općih podataka 72
4.1.1 Demografski podaci 72
4.2 Varijable trombocita 75
4.2.1 Koncentracija 5-HT u trombocitima (PSL), broj i volumen trombocita ... 75
4.3 Serumske varijable u bolesnika s pSS 78
4.3.1 Utjecaj serumskih varijabli na PSL u bolesnika s pSS 79
4.4 Polimorfizmi gena za serotoninski transporter (5-HTT) 80
4.4.1 Distribucija haplotipova 5-HTTLPR i rs25531 polimorfizama u bolesnika s pSS i kontrola 81
4.4.2 Distribucija alela i genotipova 5-HTTin2VNTR u bolesnika s pSS i kontrola 83
4.5 Utjecaj polimorfizama 5-HTT na PSL 84
4.5.1 Utjecaj polimorfizama 5-HTTLPR na PSL 84
4.5.2 Utjecaj polimorfizma 5-HTTin2VNTR na PSL 86
4.5.3 Utjecaj polimorfizma 5-HTTLPR na kliničke varijable u bolesnika s pSS 88
4.5.4 Utjecaj polimorfizma 5-HTTin2VNTR na kliničke varijable u bolesnika s pSS 89
4.6 Kliničke varijable 90
4.6.1 Rezultati kliničkih objektivnih testova suhoće sluznice 90
4.6.2 Povezanost PSL s kliničkim varijablama u bolesnika s pSS 92
4.6.3 Varijable aktivnosti bolesti mjerene kliničkom ljestvicom ESSDAI 93
4.6.4 Varijable subjektivnih bolesnikovih tegoba mjerenih ljestvicom ESSPRI 98
4.6.5 Varijable subjektivnih tegoba bolesnika s pSS mjerenih ljestvicom 6-items-VAS-SS 103
4.7 Varijable depresivnosti u bolesnika s pSS 106
4.7.1 Utjecaj PSL na depresivnost u bolesnika s pSS 107
4.7.2 Utjecaj polimorfizma 5-HTTLPR na depresivnost u bolesnika s pSS 108
4.7.3 Utjecaj polimorfizma 5-HTTin2VNTR na depresivnost u pSS 108
4.7.4 Utjecaj serumskih varijabli na depresivnost u bolesnika s pSS 109
4.7.5 Utjecaj aktivnosti bolesti i subjektivnih tegoba na depresivnost u bolesnika s pSS 110
4.8 Varijable umora u bolesnika s pSS 115
4.8.1 Utjecaj PSL na umor u bolesnika s pSS 121
4.8.2 Utjecaj polimorfizma 5-HTTLPR na umor u bolesnika s pSS 124
4.8.3 Utjecaj polimorfizma 5-HTTin2VNTR na umor u bolesnika s pSS 124
4.8.4 Utjecaj serumskih varijabli na umor u bolesnika s pSS 125
4.8.5 Utjecaj ativnosti bolesti i subjektivnih tegoba na umor u bolesnika s pSS 125
4.8.6 Utjecaj depresivnosti na umor u bolesnika s pSS 129
4.9 Neuroradiološke varijable bolesnika s pSS 131
4.10 Elektromioneurografske (EMNG) varijable u bolesnika s pSS 135

5 RASPRAVA 136
6 ZAKLJUČAK 161
7 SAŽETAK 162
8 SUMMARY 163
9. LITERATURA 164
10. DODATAK.....196

11.ŽIVOTOPIS.....216

12. PUBLIKACIJE.....217

KRATICE

pSS	primarni Sjögrenov sindrom
SŽS	središnji živčani sustav
PŽS	periferni živčani sustav
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. deoxyribonucleic acid),
5-HT	5-hidroksitriptamin, serotonin (prema engl. 5-hydroxsytriptamine),
RA	reumatoidni artritis (prema engl. rheumatoid arthritis)
SLE	sistemski lupus eritematosus
SSc	sklerodermija (prema engl. systemic sclerosis)
MCTD	miješana bolest vezivnog tkiva (prema engl. mixed connective tissue disorder)
HLA	ljudski leukocitni entigen (prema engl. human leukocyte antigen)
CTLA4	citotoksični antigeni vezani za T-limfocite 4 (prema engl. cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
PD-1	programirana smrt 1 (prema engl. programmed death-1)
PSL	koncentracija serotonina u trombocitima (prema engl. platelet serotonin level)
IL-1RA	antagonist receptora za interleukin 1 (prema engl. interleukine 1 receptor antagonist)
IL-4Rα	interleukin 4 receptor alfa (prema engl. interleukin receptor 4 alpha)
TGF-β1	transformirajući faktor rasta-β1 (prema engl. transforming growth factor β-1)
IL-1RN*2	polimorfizam gena za interleukin 1
IL-1RA	interleukin receptor antagonist (prema engl. interleukine 1 receptor antagonist)
ANCA	antinuklearna citoplazmatska protutijela (engl. antinuclear icytoplasmatic antibodies)
TSST	Trier Social Stress Test (engl.)
HHN	hipotalamus-hipofiza-nabubrežna žlijezda (prema engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)

HHG	hipotalamus-hipofiza-gonade (prema engl. hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG)
ESSDAI	indeks aktivnosti bolesti za Sjogrenov sindrom (prema engl. European League Against Rheumatism Sjögren's syndrome disease activity index)
ESSPRI	indeks subjektivnih bolesnikovih tegoba (prema engl. European League Against Rheumatism Sjogren's syndrome patient report index)
BAFF	faktor aktivacije B-limfocita (prema engl. B-cell activating factor)
PDC	plazmacitoidne dendritične stanice (prema engl. plasmacytoid dendritic cell)
INFα	interferon αlfa (prema engl. interferone α)
INFγ	interferon γ (prema engl. interferone γ)
IL	interleukin (prema engl. interleukine)
ICAM	intercelularne adhezijske molekule (prema engl. intercellular adhesion molecules)
RF	reumatoidni faktor (prema engl. rheumatoid factor)
MHC	glavni sustav tkivne podudarnosti (prema engl. major hystocompatibility complex)
VAS	vizualna analogna ljestvica (prema engl. visual analogue scale)
MS	multipla skleroza
TNF	tumorski faktor nekroze (prema engl. tumor necrosis factor)
Tfh	pomagačke stanice (prema engl. helper cell)
5-HTT	serotoninski transporter (prema engl. 5-hydroxytryptamine transporter)
5-HTr	serotoninski receptor (prema engl. 5-hdroxytryptamine receptor)
5-HTT-LPR	promotorska regija gena za serotoninski transporter
SSI	upitnik *sicca* simptoma (prema engl. Sicca Symptoms Inventory)
XI	upitnik kserostomije (prema engl. Xerostomia Inventory)
NEI-VFQ-25	Upitnik vidnih funkcija Nacionalnog Instituta za oko National Eye Institue Visual Function 25-item Questionnaire (engl.)
OSDI	indeks bolesti površine oka (prema engl. Ocular Surface Disease Index)
SCAI	klinički indeks aktivnosti bolesti za Sjogrenov sindrom (prema engl. Sjögren Clinical Activity Index)

PROFAD	upitnik umora i nelagode (prema engl. Profile of Fatigue and Discomfort)
PROF	upitnik umora (prema engl. Profile of Fatigue)
FACITS	ljestvica za procjenu funkcije u kroničnim bolestima (prema engl. Functional Assesment of Chronic Illnes Therapy scale (engl.)
FSS	ljestvica umora (prema engl. Fatigue Severity Scale)
PGA	liječnička opća procjena (prema engl. Physician's global assesment)
ESSDAI	indeks aktivnosti bolesti za Sjogrenov sindrom Europske lige protiv reumatizma (prema engl. EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (engl.)
ESSPRI	indeks tegoba bolesnika s Sjögrenovim sindromom Europske lige protiv reumatizma (prema engl. EULAR Sjögren's syndrome Patient Reported Index)
5-HIAA	5-hidroksiindoloctena kiselina (prema engl. 5-hydroxyindoleacetic acid)
MAO	monoamin oksidaza (prema engl. monoamine oxydase)
HHN	os hiptalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (prema engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis)
CRH	kortikotropin oslobađajući hormon (engl. corticotropine releasing hormone)
AVP	arginin-vazopresin
TRH	tirotropin oslobađajući hormon (prema engl. thyrotropin-releasing hormone)
GHRH	hornom rasta oslobađajući hormon (prema engl. growth hormone releasing hormone)
GnRH	gonadotropin oslobađajući hormon (prema engl. gonadotropin-releasing hormone)
MAO-B	monoamin oksidaza-B (prema engl. monoamine oxidase B)
5-HTTLPR	promotorska regija serotoninskog transportera (prema engl. 5-HTT gene linked polymorphic region)
5-HTtin2VNTR	intronska regija serotoninskog transportera (prema engl. variable number of tandem repeats)
S	kratki alel promotorske regije gena za 5-HTT (prema engl. short)
s	kratki alel intronske regije gena za 5-HTT (prema engl. short)
L	dugi alel promotorske regije gena za 5-HTT (prema engl. long)

l	dugi alel intronske regije gena za 5-HTT (prema engl. long)
ADHD	poremećaj hiperaktivnosti i deficita pažnje (prema engl. attention deficit-hyperactivity disorder)
OCD	opsesivno-kompulzivni poremećaj (prema engl. obsessive–compulsive disorder)
cAMP	ciklički adenozin mono fosfat (prema engl. cyclic adenosine monophosphate)
SSRI	selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (prema engl. selective serotonin reuptake inhibitors)
bp	par baza (prema engl. base pair)
LC	locus coeruleus (engl.)
LH	luteinizirajući hormon (prema engl. luteinic hormone)
FSH	folikul stimulirajući hormon (prema engl. follicle-stimulating hormone)
LHRH	faktor oslobađanja luteinizirajućeg hormona (prema engl. luteinizing-hormone-releasing hormone)
TSH	tireotropin stimulirajući hormon (prema engl. thyroid stimulating hormone)
PRL	prolaktin (prema engl. prolactine)
HPVN	paraventrikularna jezgra hipotalamusa (prema engl. paraventricular nucleus of the hypothalamus)
α-MSH	melanocit-stimulirajući hormon alfa (prema engl. alpha-melanocyte stimulating hormone)
PAF	faktor aktivacije trombocita (prema engl. platelet activating factor)
EGF	epidermalni faktor rasta (prema engl. epidermal growth factor)
TGFβ	tumorski faktor rasta beta (prema engl. tumor growth factor)
CGRP	kalcitonin gen peptid (prema engl. calcitonin gene related peptide)
VIP	vazoaktivni intestinalni peptid (prema engl. vasoactive intestinal peptide)
NK	stanice ubojice (prema engl. natural killer)
LHHN	os limbički sustav-hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda
GR	glukokortikoidni receptori (prema engl. glucocorticoid receptors)
DST	test supresije deksametazonom (prema engl. dexamethason supression test)

MDD	veća depresivna epizoda (prema engl. major depressive disorder)
TH	tiroidni hormon (prema engl. thyroid hormone)
DEX/CRH	(engl.dexametason/corticotropine-realizing hormon test)
VAC index	vasokonstriktorni indeks (prema engl. vasoconstriction index)
E/I omjer	omjer ekspirij/inspirij u testu dubokog izdisaja
AI	akceleracijski indeks (prema engl. acceleration index)
BI	«brake» index (engl.)
α-MSH	melanocit-stimulirajući hormon (prema engl. melanocyte stimulating hormone)
IDO	indolamin 2,3-dioksigenaza (prema engl. indoleamine 2 3-dioxygenase)
CI	cirkulirajući imunokompleksi (prema engl. circulating imunocomplex)
NSAIR	nesteroidini antireumatici (prema engl. non-steroidal anti-inflammatory drug)
NY	neuropeptid Y (prema engl. neuropeptide Y)
SP	supstancija P (prema engl. substance P)
CGRP	peptid gena za kalcitonin (prema engl. calcitonin gene-related peptide)
EMNG	elekromioneurografija
NMO	optički neuromijelitis (prema engl. neuromyelitis optica)
Qs	Test nestimulirane salivacije
Qss	Test stimulirane salivacije
FETTH	učestala epizodička tenzijska glavobolja (prema engl. frequent episodic tension-type headache)
Vmax	maksimalna brzina unosa (prema engl. velocity,V)
Km	afinitet transportera

1 UVOD

Sjögrenov sindrom (SS) je autoimuna, limfoproliferativna bolest egzokrinih žlijezda, unutarnjih organa i živčanog sustava u kojoj dominira suhoća sluznica ili „sicca sindrom“ očiju (keroftalmija) i usne šupljine (kserostomija) (Jonsson 2005). Klinički se očituje kao primarni SS (pSS), sa žljezdanim i izvanžljezdanim tj. sistemskim očitovanjima ili sekundarni SS (sSS) koji je udružen s drugim autoimunim bolestima, najčeće reumatoidnim artritisom (RA), sistemskim eritemskim lupusom (SLE), sistemskom sklerozom (SSc), miješanom bolesti vezivnog tkiva (prema engl. *mixed connestive tissue disorder, MCTD*), primarnom bilijarnom cirozom, kroničnim aktivnim hepatitisom ili Hashimotovim tiroiditisom (Markeljević 2003). Atipična je među najčešćim upalnim reumatskim bolestima, zbog nižeg stupnja upalne reakcije. Najčešće su zahvaćene suzne žlijezde, slinovnice i parotide, ali i egzokrine žlijezde kože i sluznice dišnog, probavnog i genitourinarnog sustava, a izvanžljezdana zahvaćenost očituje se zahvaćanjem perifernog (PŽS) i središnjeg živčanog sustava (SŽS), lokomotornog sustava, pluća, bubrega, jetre i limfopoetskog sustava. Nedostatak univerzalnih dijagnostičkih metoda, klasifikacije i terapijskih mogućnosti u Sjögrenovom sindromu, kontinuirano potiče reumatologe, imunologe, neurologe, molekularne biologe i ostale stručnjake na daljnja istraživanja patogeneze, dugoročne evolucije i ishoda ove bolesti. Učestala koegzistencija s drugim autoimunim bolestima, omogućuje bolji uvid u genetičke, intrinzičke i čimbenike okoliša koji utječu na ekspresiju različitih fenotipova u Sjögrenovom sindromu. Klinički je vrlo važna moguća benigna i maligna limfoproliferacija povezana s pSS, a rizik obolijevanja od non-Hodgkinovog limfoma koji je oko 40 puta veći u oboljelih od pSS u odnosu na opću populaciju (Theander 2006), upućuje na povezanost autoimunosti, imunogenetike i maligniteta. Etiologija pSS nije razjašnjena iako postoji više hipoteza. Rezultati istraživanja upućuju na poremećenu neuro-endokrino-humoralnu regulaciju imunološkog sustava u genetički predisponiranih osoba izloženih provokativnim čimbenicima (Markeljević 2003). Prema nekim pretpostavkama, virusna infekcija ciljanih organa interferira sa imunim mehanizmima i uzrokuje nedovoljnu aktivaciju stečenog imunog sustava, dok se prema drugima radi o poremećaju imune regulacije usmjerene protiv ključnih vlastitih molekula (Delaleu 2005). Aktualna istraživanja usmjerena su prvenstveno na istraživanje neurohumoralnih procesa i specifičnih biomarkera povezanih s genetikom, spolom, vanjskim čimbenicima (virusi, stres) ili individualnoj osjetljivosti/otpornosti za nastanak pSS. Napredak DNA analitičkih metoda omogućuje bržu identifikaciju relevantnih gena, specifičnih haplotipova glavnog sustava tkivne podudarnosti (prema engl. major histocompatibility complex, MHC) ljudskih leukocitnih antigena

(prema engl. *human leukocyte antigene*, HLA) i non-HLA gena koji se povezuju s povećanim rizikom za nastanak pSS, kao i napredne analitičke platforme, multipli imunoeseji, masivna spektrometrija i mRNA mikročipovi koji se koriste u današnjim biomedicinskim istraživanjima pSS. Recentni rezultati primjene monoklonskog protutijela anti-CD20 u liječenju pSS su ohrabrujući i daju novo svjetlo o ulozi B-limfocita u patogenezi pSS. Kliničko značenje ovih istraživanja je u identifikaciji specifičnih biomarkera korisnih u selekciji oboljelih ili predisponiranih za nastanak pSS, a uz pomoć farmakoloških strategija u prevenciji i liječenju pSS. Ova studija će pridonijeti u navedenim segmentima, prvenstveno u boljem razumijevanju neuroimunogenetike i neurohumoralnih procesa u pSS.

1.1 Pregled dosadašnjih spoznaja

Sjögrenov sindrom je kronična upalna reumatska bolest s fokalnom i difuznom limfocitnom infiltracijom egzokrinih žlijezda, a u nekim slučajevima i drugih tkiva (bubrezi, jetra, pluća, mišići, koža, periferni i središnji živčani sustav) (Jonsson 2005). Može biti izolirana kao primarni Sjögrenov sindrom (pSS) ili koegizistirati s drugim reumatskim upalnim bolestima kao što su RA, SLE, SSc i MCTD, kao sekundarni Sjögrenov sindrom (sSS) (Vitali 2002). Etiologija pSS je nepoznata, a usprkos dokazima o snažnoj genetičkoj komponenti, u nastanku bolesti je ključna interakcija živčanog, endokrinog i imunog sustava, posredovana neurotransmiterima, hormonima, citokinima, neuropeptidima i njihovim receptorima (Tzioufas 2008, Delaleu 2008a). Serotonin (*5-hydroxytryptamine, 5-HT*) je prvenstveno neurotransmiter SŽS, ali ima važnu ulogu i u imunom sustavu ekspresijom brojnih podtipova svojih receptora na imunim stanicama i trombocitima. Fiziološka uloga visokih razina 5-HT u trombocitima (*engl. platelet serotonin level, PSL*) nije razjašnjena, ali je genetički regulirana pomoću nekoliko elemenata 5-HT sustava identičnih sinaptosomima (Jernej 1995). Promjene ekspresije i funkcije i pojedinih elemenata 5-HT sustava, a prvenstveno serotoninskog transportera (5-HTT) opažene su u afektivnim poremećajima (depresija), neurozama (anksiozni i opsesivno-kompulzivni poremećaj), bihejvioralnim poremećajima (agresivnost, impulzivnost) i ovisnostima (alkoholizam). S obzirom na funkciju i strogi genetički nadzor u trombocitima i neuronima, odnosno u sinapsi, 5-HTT se smatra ključnim elementom u regulaciji koncentracije 5-HT i njegove neurotransmisije. Dva su najpoznatija polimorfizma gena za 5-HTT i to na promotorskoj regiji, 5-HTTLPR s dodatnim polimorfizmom rs25531, te polimorfizam na intronskoj regiji, 5-HTTin2VNTR, a ispitivana su u raznim afektivinim i psihosomatskim poremećajima (Rauch 2002, Ito 2002).

Ranije su studije pokazale značajno snižen PSL u svim istraživanim upalnim reumatskim bolestima uključujući RA, SLE, SSs i MCTD (Meyerhoff 1981, Zeller 1983), ali ova istraživanja nisu obuhvatila i bolesnike s pSS. Rezultati ovih studija pokazali su da se pojačano otpuštanje 5-HT iz trombocita odvija primarno za vrijeme upalne epizode ovih reumatskih bolesti (Henson 1973), uz detaljan opis imunih reakcija trombocita kao i mehanizama otpuštanja sadržaja iz trombocitnih grnaula tijekom imunoloških reakcija, dok se genetske varijacije elemenata 5-HT sustava nisu istraživale. Neuroimunološke studije govore o ulozi 5-HT sustava u neuroimunomodulaciji kroz ekspresiju brojnih podtipova 5-HT receptora (5-HTr) u imunim stanicama i SŽS (Lima 2002). Važna je i uloga citokina kao moćnih neurohumoralnih regulatora imunog odgovora i povezanost njihove neravnoteže s kroničnom upalom. Navodi se i povezanost polimorfizama 5-HTT s kroničnom izloženosti proupalnim citokinima (Fredericks 2010). U pSS je dokazana i produkcija specifičnih protutijela anti-Ro/SS-A i anti-La/SS-B u egzokrinim žlijezdama i limfoidnim organima u pSS i njihova povezanost sa aktivnosti bolesti (Halse 1999). S aspekta neuroendokrine regulacije, neuroendokrini sustav sastavljen od; središnjeg - locus coeruleus i perifernog dijela - hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HHN) i hipotalamus-hipofiza-gonade-spolne žlijezde (HHG) sudjeluju u komunikaciji između SŽS-a i perifernog imunosnog sustava, gdje bi 5-HT mogao imati ključnu ulogu (Tzioufas 2008). U neuroznanosti su brojna istraživanja strukture i funkcije gena za 5-HTT u neuronima i trombocitima u fiziološkim uvjetima i kod promijenjene homeostaze, kao i promjene transkripcije gena za 5-HTT (Jernej 1995). Bolesnici sa pSS često imaju i neurološke komplikacije i to u PŽS (senzorna periferna neuropatija, senzorna ataksija, bolna i autonomna neuropatija, trigeminalna neuropatija, subakutna upalna poliradikulopatija i u SŽS (demijelinizacijske lezije, kronične vaskularne lezije, multifokalne manifestacije SŽS uključujući neuropsihijatrijske i kognitivne disfunkcije i multifokalne neurološke sindrome slične multiploj sklerozi (MS) koje su prisutne u oko 56% bolesnika s pSS (Delalande 2004).

Prema našim spoznajama, ne postoje studije koje su ispitivale koncentraciju 5-HT u trombocitima-PSL u pSS, a nisu poznati ni čimbenici koji utječu na promjene u PSL u pSS uključujući genetiku 5-HTT, tj. polimorfizme 5-HTTLPR, rs25531 i 5-HTTVNTR-in2. Malobrojne su studije analizirale povezanost varijacija u PSL s psihičkim poremećajima (npr. depresijom) (Beck 1996), umorom i aktivnosti bolesti u pSS. Od 2010.godine koristi se indeks aktivnosti bolesti koji je rezultat objektivnih sistemskih kartakteristika bolesti - ESSDAI (European League Against Rheumatism Sjögren's syndrome disease activity index) (Seror 2010), a od

2011.god. i samoocjenska ljestvica subjektivnih bolesnikovih tegoba ESSPRI (European League Against Rheumatism Sjögren's syndrome patient report index) (Seror 2011). Oba indeksa se koriste u kliničkom radu i kontroliranim kliničkim studijama.

1.2 Klinički simptomi i dijagnostika pSS

Klinički je pSS u gotovo svim slučajevima karakteriziran trajnom suhoćom sluznica (*sicca* sindrom) očiju (*xerophtalmia, keratoconjuctivitis sicca*) i usne šupljine (*xerostomia*) (Delaleu 2005), zbog disfunkcije suznih žlijezda i slinovnica, a koje se mogu mjeriti objektivnim testovima (Shirmer-ov test i Test salivacije, Qs). U težim slučajevima prisutni su otok parotida, bolnost parotida i limfadenopatija. Histološki se u žljezdanom tkivu nalaze veliki i perzistentni infiltrati mononukleara, tzv. limfocitni fokusi, atrofija acinarnih epitelnih stanica i fibroza koji ne koreliraju nužno s gubitkom sekrecijskog kapaciteta, nalazom specifičnih protutijela, niti sa stupnjem aktivnost bolesti (Dawson 2006). Sistemske, izvanžljezdane manifestacije prisutne su u oko trećine bolesnika sa pSS (Vitali 2002), a to su opći simptomi (povišena tjelesna temperatura, opća slabost, malaksalost), bolovi i otok u zglobovima (artralgije), bolovi u mišićima (mialgije), neurološke manifestacije, kožne, respiratorne, bubrežne, jetrene, vaskularne promjene. Mortalitet u pSS nije značajno viši u odnosu na opću populaciju (Theander 2004), a korespondira s povećanim rizikom nastanka sistemskog non-Hodgkinovog limfoma za 16-40 puta (Barone 2005, Theander 2006). Dijagnoza pSS se temelji na dijagnostičkim kriterijima (Vitali 2002) (**Prilog 1**). Dijagnostički kriteriji za pSS prikazani su u **Tablici 1** (Markeljević 2003).

Tablica 1. Dijagnostički kriteriji za Sjögrenov sindrom

Dijagnostički kriteriji za Sjögrenov sindrom
1. Okularni simptomi (suhoća sluznica >3 mjeseca ili osjećaj „pijeska u očima“ ili primjena umjetnih suza
2. Oralni simptomi (osjećaj suhoće u ustima >3 mjeseca ili stalne ili povremene otekline slinovnica ili učestalo pijenje tijekom obroka
3. Okularni znaci (pozitivan nalaz Shirmer-ovog testa ili Rose bengal testa)
4. Znaci zahvaćenosti slinovnica (scintigrafija slinovnica ili parotida, sijalografija ili dokaz smanjene sekrecije sline na Testu salivacije)
5. Patohistološki nalaz (limfocitna infiltracija slinovnica, limfocitni fokusi)
6. Autoprotutijela; anti-Ro/SS-A ili anti-La/SS-B

Preuzeto od Markeljević 2003, uz dopuštenje.

1.3 Sjögrenov sindrom i srodne autoimune reumatske bolesti

Sjögrenov sindrom je složena poligenska bolest koja ima zajedničke genetičke determinante s drugim autoimunim bolestima kao što su SLE, RA, SSc, psorijaza, multipla skleroza (MS). Dokumentirano je i grupiranje ovih bolesti unutar pojedinih obitelji (Criswell 2005). Bolesnici s pSS, RA i SLE mogu imati slične zajedničke simptome (artritis, mialgije, umor, crvenilo kože, vaskulitis) i autoimune serološke abnormalnosti; ANA, SS-A i SS-B i RF autoprotutijela u oko 55% pojedinaca u inače zdravim obiteljima (Fox 2008, Gilles 2000). Neke karakteristike pSS javljaju se i u RA kao npr. artritis i reumatoidni faktor (RF). Faktor regulacije interferona 5 (IRF5) i signalni transporter i aktivator transkripcije 4 (STAT4) su geni strogo povezani sa SLE za koje recentni podaci sugeriraju povezanost sa pSS (Korman 2008). Pojedini geni i genski lokusi uključeni su u etiologiju multiplih autoimunih bolesti. Povezanost različitih HLA lokusa s autoimunim bolestima dokazana je u SLE, RA, pSS, ankilozirajućem spondilitisu, psorijazi, MS i tipu 1 dijabetesa (Graham 2002). Osim toga i brojni non-HLA geni se povezuju s multiplim autoimunim bolestima, npr. citotoksični antigeni 4 vezan za T-limfocite (CTLA4), gen za programiranu smrt (PD-1) i protein tirozin fosfataza nereceptorski tip 22 (PTPN22) s RA (Lee 2003), SLE (Barreto 2004), Prokunina 2004, Orozco 2005). Genotipizacija je korisna u genetskim otkrićima brojnih autoimunih bolesti kao što su RA, SLE i autoimuni tiroiditis. Nasuprot SLE uz kojeg se veže više od 25 genskih lokusa, genetika pSS je bitno manje istražena, a glavni razlozi su

klasifikacijski problemi i nedostupnost multiplih, velikih, neovisnih kohorti dobro okarakteriziranih bolesnika za genetske studije. Idealno, odabir kohorte za genetske studije trebaju obavljati multidisciplinarni timovi istraživača koji osiguravaju uniformnu fenotipizaciju oralnih, okularnih i sistemskih značajki pSS.

1.4 Epidemiologija i etiopatogeneza Sjögrenovog sindroma

Sjögrenov sindrom je nakon RA najčešća upalna reumatska bolest. Neproporcionalno češće zahvaća žene u odnosu na muškarce u omjeru 9:1, najčešće se javlja između 40.-50.-te godine života. Prevalencija pSS se u svijetu kreće od 0,2% do 3,4% (200-300 slučajeva/100.000 stanovnika (Sanchez-Guerrero 2005, Haugen 2008). Bolest je relativno česta u zapadnim zemljama, dok su podaci iz azijskih zemalja oskudni, stoga je etnički specifična prevalencija izvan kohorte Europe i Sjeverne Amerike nepoznata, a nema niti dokaza temporalnog ili zemljopisnog grupiranja pSS. Etiologija pSS je nepoznata kao i za većinu autoimunih bolesti. Najnoviji podaci govore o zajedničkom utjecaju genetičkih i čimbenika okoliša (G X E) i interakciji urođene i stečene imunosti (Mariette 2010). Postoji više aspekata patogeneze pSS:

a) Čimbenici okoliša: virusi (virusna infekcija kao incijalni događaj), stres i hormonska neravnoteža.

b) Genetički čimbenici: polimorfizmi antigen-prezentirajućih stanica i polimorfizmi receptora T-limfocita, HLA-antigeni i non-HLA antigeni.

c) Nove promjene vlastitih antigena: u kontaktu s haptenima: kemikalije, metali ili u kontaktu s mikrobima (molekularna mimikrija); nemaskiranje - izloženost prethodno sekvestriranih vlastitih molekula. Poremećena ravnoteža u regulaciji prirodne autoimunosti u odnosu na vlastite molekule. Složena interakcija G x E, poremećaji prirođene i stečene imunosti, neuroendokrinog sustava i autonomnog živčanog sustava (Bolstad 2002). .

d) Autoimuni odgovor u egzokrinim žlijezdama potaknut čimbenicima okoliša u osjetljivih pojedinaca s aktivacijom i infiltracijom T-limfocita, apoptoza žljezdanih stanica i produkcija citokina odgovornih za nastanak upale i hiperaktivacija B-limfocita, poremećena diferencijacija B-limfocita sa stvaranjem protutijela.

e) Poremećena imunološka regulacija tolerancije na vlastite antigene

f) Disfunkcija egzokrinih žlijezda koja prethodi autoimunoj upali je novija pretpostavka. (Nikolov 2009).

Polazeći od hipoteze „virusnog okidača“ u pSS, istraživani su Epstein-Barr virus (EBV) (Iwakiri 2009), ljudski virus leukemije T-stanica (prema engl. *human T-cell leukemia virus, HTCLV*) (Green 1989) i hepatitis C (Haddad 1992). Genom i proteini virusa EBV češći su u slinovnicama bolesnika s pSS u odnosu na zdrave ispitanike, induciraju proupalne citokine i stvaranje imunih kompleksa i konačno akitviraju urođenu imunost. Istraživanja na Grčkoj populaciji sa dijagnozom pSS, identificiran je *Coxackievirus* kao potencijalni agens u indukciji pSS (Triantafyllopoulou 2004), ali nije potvrđen u kohorti Francuskih bolesnika sa pSS (Gottenberg 2006). Istraživanja transkriptoma slinovnica u bolesnika sa pSS na mikročipovima (Hjelmervik 2005) dokazala su da nakon virusne infekcije dolazi do aktivacije Th1-imunog odgovora, odnosno gena interferonskog (IFN) tipa I i II, nakon čega slijedi stvaranje imunih kompleksa koji potiču plazmacitoidne-dendritične stanice (PDCs) na stalnu produkciju IFN-α na razini tkiva (Bave 2005).

1.5 Endokrini mehanizmi aktivacije urođene imunosti u Sjögrenovom sindromu

Veći udio žena oboljelih od pSS upućuje na utjecaj spolnih hormona u patogenezi pSS, ali i na njihov utjecaj u zaštiti od autoimunosti. Moguća je ulogu estrogene deprivacije u nastanku bolesti. Manjak estrogena uzrokuje hiperaktivaciju urođene imunosti i pretpostavlja se kako žene oboljele od pSS imaju androgenu deficijenciju (Laine 2007). Estrogeni receptori u epitelnim stanicama slinovnica dokazani su 2009.god. gdje inhibiraju ekspresiju intercelularnih adhezijskih molekula 1 (prema engl. *intercellular adhesion molecules, ICAM1*) koje su povišene u slinovnicama bolesnika s pSS (Tsinti 2009). Manjak estrogena inducira produkciju anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B i antifodrinska protutijela (Ishimaru 2008), hiperekspresiju transkripcijskog faktora *RbAP48* koji potiče apoptozu epitelnih stanica slinovnica, inducira otpuštanje IL-18 i IFN-γ iz epitelnih stanica slinovnica i ekspresiju molekula HLA, CD80+, CD86+, ICAM1 na površini epitelnih stanica koje postaju antigen-prezentirajuće stanice. Iako miševi s manjkom α- i β-

estrogenih receptora ne razvijaju pSS, aromataza *knockout* miševi razvijaju limfoproliferativnu autoimunu bolest tipa pSS s infiltracijom B-limfocita u bubrezima i slezeni (Shim 2004).

1.6 Genetički mehanizmi u Sjögrenovom sindromu

Genetički aspekt u pSS je nedovoljno istražen, ali brojne studije afirmiraju ulogu genetičkih čimbenika u patogenezi pSS. Kao i u drugim autoimunim bolestima, na genetičku predispoziciju u pSS upućuje obiteljsko nakupljanje, veća učestalostu homozigotnih blizanaca, animalni modeli i studije gena kandidata (Bolstad 2002). Opisan je slučaj monozigotnih blizanaca sa pSS koji su imali anti-Ro/SS-A antitijela i dizigotnih blizanaca sa pSS (Houghton 2005). S obzirom na obiteljsko nakupljanje različitih autoimunih bolesti i multiplicitet autoimunih bolesti u pojedinaca, blizanačka konkordantnost se očekuje u RA 15%, u SLE 25%, dok 30-40% oboljelih od pSS imaju rođake s nekom bolesti vezivnog tkiva. Od 60 članova jedne obitelji, osam je imalo SLE uz pozitivan titar ANA s pleuritisom i crvenilom kože, pet je razvilo fotosenzitivnost i četiri nefritis (Šestak 1999). Blizanci imaju slične fenotipove; identičan broj limfocitnih fokusa na biopsiji malih slinovnica, suhoću sluznica očiju i usne šupljine i serološke pokazatelje (IgG, IgM, IgA, C3, C4, ANA, anti-Ro/SS-A i anti-La/SS-B, RF). Studije gena kandidata u pSS provedene su do danas samo za 20 genskih lokusa, što je manje od 0,1% od 20 000 gena ljudskog genoma. Studije gena za publikacije obično zahtijevaju uzorke veličine 200 ispitanika i 200 kontrola ili manje za povezivanje jednog ili ograničenog broja polimorfizama. Opisani su polimorfizmi antigen-prezentirajućih stanica (prema engl. *antigen presenting cells, APCs*) i polimorfizmi receptora T-limfocita (prema engl. *T-cells receptors,* TCR). Polimorfizam IRF5 povezan je s visokom razinom IRF5 mRNA, osobito nakon virusne infekcije.) Polimorfizam STAT4, IRF5 nakon virusne infekcije i stimulacija „Toll-like“ receptora (TLRs) u slinovnicama bolesnika s pSS povezuju se s pSS, SLE i RA (Nordmark 2009, Korman 2008, Deshmukh 2009, Miceli-Richard 2009). Postoje dokazi da su HLA-antigeni čimbenici rizika za nastanak i težinu autoimunih bolesti. Za pSS su relevantni HLA-antigeni klase II; HLA-DR (HLA-DR2 i HLA-DR3), koji zajedno s HLA-DQ obuhvaćaju 90% (Guggenbuhl 1998) i povezuju se s protutijelima SS-A i SS-B i težom kliničkom slikom.Varijanta HA-1 se povezuje sa smanjenim rizikom za pSS (Harangi 2005). Non-HLA antigeni se također povezuju s pSS u studijama izvan SAD-a na manjim uzorcima (<200) bolesnika s pSS.

1.7 Kemokini, citokini i biomarkeri u Sjögrenovom sindromu

Iako uloga kemoatraktivnih molekula (kemokina) nije sasvim razjašnjena, poznato je da imaju ulogu u angiogenezi, fibrozi i malignitetu, a mogu se koristiti u terapijske svrhe (Charo 2006, Delaleu 2008b). Infiltrati limfocita u egzokrinim žlijezdama u pSS nastaju zbog kvantitativnih promjena kemokina u ciljanom tkivu (Amft 2001). Fokalna upala u egzokrinim žlijezdama sastoji se uglavnom od T-limfocita i manje B-limfocita, malo makrofaga (Manoussakis 2007), a pronađene su povišene razine serumskog E-kadherina, adhezijskih molekula epitelnih stanica, što upućuje na blisku interakciju između epitelnih žljezdanih stanica i limfocita (Jonsson 2005). U malim slinovnicama otkrivene su strukture slične germinativnim centrima (prema engl. *germinal center, GC*) u oko 25% bolesnika sa pSS, a na njihovu prisutnost mogu potencijalo upućivati neki serumski biomarkeri (Jonsson 2007). Od 25 biomarkera, identificirani su faktor aktivacije B-limfocita (prema engl. *B-cell activating factor, BAFF*), kemokin C-C motif ligand 11 i IFN-γ u koncentracijama koje su dovoljne za otkrivanje bolesnika koji imaju GC (Szodoray 2005). GC su vjerojatno posljedica nakupljanja aktiviranih T-limfocita i B-limfocita oko krvnih žila i kanalića. Ovaj okoliš se primarno povezuje s višim stupnjem žljezdane upale i koincidira s povišenim titrom RF, anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B i IgG, ali može promovirati i neoplastičku transformaciju (Jonsson 2005, Jonsson 2007).

Citokini su topljivi peptidi, odgovorni za većinu bioloških učinaka na imuni sustav; stanična imunost i alergijskoj reakciji. T-limfociti su glavni izvor citokina. T-limfociti na svojoj površini nose receptore koji im omogućuju da prepoznaju strane patogene, ali i vlastito normalno tkivo za vrijeme epizode autoimune bolesti. Fenotipove T-limfocita obilježavaju CD5+ i CD11+ molekule. Postoje dvije glavne subpopulacije T-limfocita, s obzirom na molekule koje nose na površini; CD4+ T-limfociti ili pomagački (prema engl. „helperi“) i CD8+ T-limfociti ili supresijski. Prema vrsti citokina koje luče T-limfociti se dijele u dvije subpopulacije: Th1 i Th2 (Gereda 2000). Th1-citokini su proupalni, a Th2-citokini djeluju protuupalno, ali potiču alergijsku reakciju. Proupalno djelovanje Th1-citokina uključuje uništavanje intracelularnih patogena kao što su virusi, bakterije, paraziti, toksini, a glavni proupalni citokini su intereferoni (INF) i TNF - vodeći regulatori prirođenog i stečenog imunog odgovora koji moduliraju smjer i trajanje upalnog odgovora, među njima je glavni proupalni citokin interferon- γ (IFN-γ). Budući da prekomjerni proupalni odgovor može prouzročiti prekomjerno oštećenje tkiva, aktivira se mehanizam koji ga ograničava, što se postiže aktivacijom protuupalnog ili Th2-tipa imunog odgovora s oslobađanjem Th2-citokina koji

potiču diferencijaciju B-limfocita i produkciju neutralizirajućih ne-citolitičkih protutijela, što vodi prema humoralnoj imunološkoj reakciji. B-limfocite obilježavaju molekule CD20+ i CD19+; a porast razine dvostruko pozitivnih B-limfocita s pan-T biljegom CD5+ nalazimo u pSS i RA (Markeljević 1994). Neravnoteža citokina može uzrokovati egzokrinu disfunkciju na lokalnoj razini ili sistemske manifestacije. Zbog jednostavnosti i neinvazivnosti uzimanja uzorka, slina je atraktivan biofluid u istraživanju pSS, a citokini sline mogu upućivati na lokalno izraženu pSS neovisno o sistemskoj zahvaćenosti (Delaleu 2008).

Pronalaženje biomarkera od izrazite je važnosti u klasifikaciji bolesnika s pSS jer se ovaj poremećaj većinom dijagnosticira u kasnom stadiju kada je kvaliteta života bolesnika značajno narušena. Jednom validirani, biomarkeri omogućuju bolji uvid o stadiju i progresiji bolesti, ali i riziku za nastanak bolesti, a korisni su i za praćenje terapijskog odgovora. Masivnom spektrometrijom pronađena su 42 proteina u slini bolesnika s pSS (Hu 2007) iako njihova količina slabo korelira s ekspresijom mRNA, tj. s razinom transkripata, što upućuje na ograničenost studija koje evaluiraju samo mRNA ekspresiju.

Citokini sudjeluju u patogenezi pSS na više razina:

a) Sudjeluju u inicijaciji i održavanju upale lokalno u slinovnicama. Neravnoteža proupalnih i protuupalnih citokina rezultira kumulativnim oštećenjem žlijezda i smanjenom sekrecijskom funkcijom. Iako je limfocitna infiltracija žlijezda slinovnica glavna značajka pSS, neki bolesnici s pSS imaju tešku egzokrinu disfunkciju i bez veće žljezdane destrukcije (Humphrey-Beher 1999). Hiperekspresija nekih citokina čak i u odsutnosti limfocitne infiltracije, upućuje na izravni učinak citokina na epitelne stanice neovisno o oštećenju uzrokovanom upalom i limfocitnom infiltracijom, a kako su citokini ključne molekule u sistemskoj upali, mogu pridonositi i sistemskim komplikacijama u pSS.

b) Povišena ekspresija mnogih citokina u slinovnicama i razina u serumu povezuje se s vaskulitisom ili drugim sistemskim značajkama. Kroničnom stimulacijom T-limfocita i B-limfocita, citokini imaju ključnu ulogu u formiranju GC, povećavajući tako rizik za nastanak non-Hodgkinovog limfoma u egzokrinim žlijezdama (Tzioufas 2007). Iako ovi i drugi podaci podupiru Th1/Th2 koncept u razumijevanju mreže citokina i imunog odgovora, njegova primjena je još predmet brojnih istraživanja.

Polimorfizmi citokina u pSS

Podaci o ulozi polimorfizama citokina u patogenezi pSS su kontroverzni. Polimorfizam intron 1 Ro52 (Ben-Chetrit 2004) bio je češći u 97 bolesnika s pSS seropozitivnih na SS-A u odnosu na 72 zdrava ispitanika (Nakken 2001), a dokazana je povezanost pSS s još nekoliko polimorfizama citokina; IL-10, IL-6, IL-1, interleukin receptor antagonist (IL-1RA), IL-4 receptor alfa (IL-4Rα), TNF-α, INF-γ i transformirajući faktor rasta-beta 1 (prema engl. *transforming growth factor beta-1, TGF-β1*). U studiji sa 62 bolesnika s pSS i 400 zdravih kontrola dokazana je povezanost polimorfizma za protuupalni citokin IL-10, koji potiče proliferaciju i diferencijaciju B-limfocita i produkciju protutitijela SS-A, a dokazana je i povezanost proupalnog citokina IL-6 s brojem kriterija ispunjenih za dijagnozu pSS (Hulkkonen 2001) što nije potvrđeno naknadno u francuskoj studiji na 129 bolesnika s pSS i 96 zdravih kontrola (Gottenberg 2004). Veća je učestalost Q551 alela u 45 Koreanskih bolesnika s pSS u odnosu na 74 zdrava ispitanika (Youn 2000). Dokazana je i veća učestalost RF i otoka parotida u bolesnika s pSS nositelja ARSPRV haplotipa (Ramos-Casals 2004). U studiji na 129 Francuskih bolesnika i 96 zdravih kontrola, dokazano je pojačano stvaranje protuupalnog, imunosupresivnog citokina (TGF-β1) u slinovnicama, a dokazana je i povećana učestalost alela C na kodonu 10 TGF- β1 u pSS bolesnika seropozitivnih za anti-La/SS-B i bolesnika nositelja HLA-DRB1*3 haplotipa, što upućuje na pojačanu produkciju protutijela SS-B kod nositelja kombinacije polimorfizma TGF-β1 i HLA-DRB1*3 haplotipa (Guggenbuhl 2000, Gottenberg 2004). Aktivacija polimorfizma rs7574865 na STAT4 genu citokinima, može pokrenuti transkripciju IFN-γ, ključnog induktora diferencijacije T-limfocita u tip I „helpera“ (Bottini 2004).

1.7.1 Evaluacija tkiva slinovnica u pSS pomoću mikročipova i transkripcijsko profiliranje

Tehnologija mikročipova i razvoj transkripcijskog profiliranja povećava mogućnosti karakterizacije genske ekspresije u stanicama normalnog i bolesnog tkiva. U autoimunim fenotipovima uočena je prekomjerna ekspresija interferonom induciranih gena. U pSS je analizirano nekoliko profila genske ekspresije tkiva slinovnica. Na uzorku od 10 bolesnika s pSS i 10 zdravih kontrola, RNA je ekstrahirana iz tkiva malih slinovnica i hibridizirana s cDNA mikročipovima čime se dobilo 16 000 transkripata (Baechler 2006). Od 200 najdiferentnijih gena, najviše je bilo transkripata receptora T-limfocita b-lokusa, što upućuje na kronično upalno stanje. Evaluacija tkiva malih slinovnica 7 bolesnika s pSS i 7 kontrola pomoću mikročipova s 10 000 proba upućuje na IFN-posredovane imune mehanizme u patogenezi pSS (Gottenberg 2006).

1.8 Imuni odgovor u Sjögrenovom sindromu

Uloga B-limfocita i humoralnog tipa imunosti ključna je u patogenezi pSS, unatoč predominaciji T-limfocita u žljezdanim lezijama (Dawson 2006). Hiperaktivnost B-limfocita sa stvaranjem protutijela uz porast citokina BAFF, ima središnju ulogu u patogenezi pSS. Nije, međutim poznato da li je autoimuni poremećaj u pSS primarni događaj ili je posljedica infekcije ili drugih predisponirajućih čimbenika. Neimuni mehanizmi koji mogu sudjelovati u patogenezi pSS su: poremećena neuroendokrina regulacija, manjak androgena i disfunkcija autonomnog živčanog sustava (Nikolov 2009). Porast serumskih imunoglobulina dokazan je u mnogim autoimunim bolestima i upućuje na važnost humoralne imunosti u patogenezi autoimunih poremećaja (Biocina-Lukenda 2008). Nekoliko populacija protutijela se povezuje sa pSS; anti-Ro/SS-A su prisutna 30-60% bolesnika s pSS i nisu sasvim specifična za pSS, u 30% slučajeva prisutna su i u SLE, a protutijela anti-La/SS-B u 5-50% bolesnika s pSS i koegzistiraju s SS-A protutijelima u više od 50% slučajeva što dodatno upućuje na pSS. Protutijela SS-A i SS-B se povezuju s vaskulitisom i/ili leukopenijom u pSS. Iako je uloga ovih protutijela u patogenezi pSS nepoznata, recentne studije ponovo afirmiraju ulogu anti-Ro 52 u izravnoj indukciji T- i B-limfocita u pSS (Espinosa 2006). Serumi bolesnika s pSS imaju povišen reumatoidni faktor (RF) u oko 60% slučajeva, češće u muškaraca, a ANCA se rijetko nalaze. Alfa-fodrin protutijela često prethode protutijelima SS-A i SS-B, te su korisna u ranoj dijagnostici pSS, a često su udružena s neurološkim manifestacijama i znak su sistemske zahvaćenosti u pSS (Vitali 2002, Gottenberg 2005). B-limfociti i protutijela i važnu ulopgu u hiposalivaciji u pSS, ali mehanizmi nisu razjašnjeni.

Brojne metode kao što su protočna citometrija, mjerenje topljivih molekula s površine stanice, autoprotutijela, citokini i ligandi omogućuju bolje razumijevanje patogeneze pSS, bolju dijagnostiku i klasifikaciju težine bolesti. Rezultati prve uspješne, randomizirane, kontrolirane studije s monoklonskim protutijelom anti-CD20 (rituximab) pokazuju učinkovitost ove terapije u pSS. Alternativni terapijski pristupi kao što je organ-specifični genski transfer u razvojnoj su fazi. Zbog dobrog terapijskog učinka monoklonskog protutijela anti-CD20 (rituximab) u supresiji funkcije B-limfocita i redukciji simptoma u pSS, mehanizmi odgovora B-limfocita aktualno su predmetom brojnih istraživanja (Devauchelle-Pensec 2007). Primjenjujući koncept Th1- i Th2-citokina i autoimunosti, može se reći da pSS ima značajke oba tipa imunog odgovora s oslobađanjem specifičnih citokina (Mitsias 2002). U slinovnicama bolesnika s pSS dominira Th1-tip imune s aktivacijom T-limfocita i produkcijom proupalnih Th1 citokina; interferoni (IFNs),

dominantno IFNγ, interleukini (IL): IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, TNFα, IL-β, BAFF. IFNs su prvi otkriveni citokini, a imaju ključnu ulogu u prirođenom imunom odgovoru protiv virusa i smatra se da imaju važnu ulogu u patogenezi pSS, aktivirajući T-limfocite i makrofage, a pridonose proliferaciji i diferencijaciji B-limfocita, aktiviraju intercelularne adhezijske molekule (prema engl. *intercellular adhesion molecules, ICAM*) potičući imunoreaktivnost protiv patogena. Putevi signalizacije IFNs značajno su poremećeni u bolesnika s pSS, a profil se opisuje kao «interferonski potpis» (Bave 2005). Dvije su grupe IFNs: tip I interferona (IFNα i IFNβ) koje oslobađaju virusom-inficirane stanice i plazmacitoidne dendritične stanice (pDC), dok tip II-interferona (INFγ) većinom otpuštaju T-limfociti, prirođeno ubilačke stanice (prema engl. *natural killer, NK*) i makrofagi (Markeljevic 1991). Njihova ekspresija je poremećena u pSS, induciraju mnoge citokine i transkripcijske čimbenike koji se pojačano stvaraju u pSS (Markeljević 1991, Wildenberg 2008). Hiperekspresija IFNγ mRNA od strane limfocita dokazana je u slinovnicama bolesnika s pSS gdje se stvara proupalni okoliš, koji se za razliku od limfocitne infiltracije smatra odgovornim za disfunkciju slinovnica. I dok je impresivan inhibicijski učinak neutralizirajućim antagonistima TNF-α u RA (Feldmann 2002), njihova primjena u liječenju pSS je napuštena (Mariette 2004). Dokazana je i uloga proupalnog citokina BAFF (iz grupe TNF) koji potiče proliferaciju, ali ne i diferencijaciju B-limfocita i podržava hipergamaglobulinemiju u pSS. Bolesnici sa pSS imaju viši BAFF u serumu i slinovnicama u odnosu na zdrave kontrole, BAFF korelira s aktivnosti bolesti u pSS i SLE (Ittah 2008), a osobito bolesnici seropozitivni na SS-A i SS-B, s hipergamaglobulinemijom i višim brojem limfocitnih fokusa (*engl. „focus score*“) (Gottenberg 2001, Sellam 2007, Daridon 2007). Ispitivanjem 162 potencijalna biomarkera u serumu i slini bolesnika s pSS i njihove povezanosti s manifestacijama u pSS dokazana je predominacija protuupalnih Th2-citokina zbog hiperaktivacije Th2-imunog odgovora, hiperaktivacijom B-limfocita i produkcijom protutijela te protuupalnih Th2-citokina - IL-10, uz istovremeni pad drugih protuupalnih citokina; transformirajućeg faktora rasta (*engl. transforming growth factor β, TGF-β)* i IL-4 u slinovnicama bolesnika s pSS, a dokazana je njihova povezanost s hiposalivacijom (Delaleu N 2008, Nikolov 2009). TGF-β ograničava prirođeni i stečeni imuni odgovor, a TGF-β mRNA je prisutna u slinovnicama bolesnika s pSS i zdravih kontrola i niži je u bolesnika s višim brojem limfocitnih fokusa. Recentno je uočen i porast krvnih Tfh (helpera) u bolesnika s pSS (Simpson 2010). Neravnoteža citokina u pSS karakterizirana je porastom proupalnih citokina IFNγ, IL-12 i IL-18 važnih u aktivaciji T-limfocita i BAFF i IL-10 u aktivaciji B-limfocita i produkciji protutijela. Snižena ekspresija protuupalnih citokina TGF-β i IL-4 u pSS upućuje na gubitak zaštite od autoimunosti, a hiperekspresija protuupalnog citokina IL-10 uzrokuje gubitak

kontrole upale što ima za posljedicu aktivaciju B-limfocita i produkciju protutijela. Iako je neravnoteža citokina u pSS poznata, manje su jasni mehanizmi kojima oni pridonose egzokrinoj disfunkciji, stoga su neophodna istraživanja ostalih citokina (IL-1β, IL-17 i IL-23) u kroničnoj upali, odnosno njihovi učinci na lokalnu i sistemsku upalu i sekrecijsku funkciju.

1.8.1.Polimorfizmi serotoninskog transportera (5-HTT) i sklonost upali

Recentni podaci govore o povezanosti polimorfizama za serotoninski trasnporter (5-HTT), osobito na promotorskoj regiji (5-HTTLPR) i upalnog odgovora na akutne psihosocijalne stresore u zdravih mladih žena. Ove studije naglašavaju intrinzične imunobiološke razlike između klinički asimptomatskih nositelja dvaju kratkih alela S/S (prema engl. *short alel*) nasuprot nositeljima dva duga alela L/L (prema engl *long alel*) na 5-HTTLPR. Akutni stresori općenito uzrokuju porast proupalnih citokina. Zdravi nositelji S/S genotipa za 5-HTTLPR u odnosu na nositelje L/L genotipa mogu pokazivati *proupalni bias/fenotip* u stresu ili izvan stresa; prije i nakon *Trier Social Stress Test (TSST)* (Fredericks 2009) i imaju viši omjer proupalnih u odnosu na protuupalne citokine (IL-6/IL-10) što povećava njihovu sklonost bolestima koje se induciraju stresom, poput depresije, autoimunih bolesti, ulcerozni kolitis, dijabetes, iritabilni kolon i drugih psihosomatskih bolesti. Može se reći da se sklonost depresiji dijelom se povezuje i s proupalnim stanjem, tj. s hiperekspresijom proupalnih Th1-citokina i sniženom ekspresijom protupalnih Th2-citokina. Bolje razumijevanje poremećaja u mreži citokina moglo bi pridonijeti kreiranju preventivnih strategija i terapijskih ciljeva u pSS.

1.9 Klasifikacijski kriteriji u Sjögrenovom sindromu

Obzirom na učestalu koegzistenciju pSS s drugim upalnim reumatskim bolestima, nužni su precizni klasifikacijski kriteriji za postavljanje dijagnoze pSS. Aktualne kriterije je donijela Američko-Europska konsenzus grupa (prema engl. *American European Consensus Group)*, a temelje se na revidiranim Europskim kriterijima iz 1993.godine (Vitali 2002, Vitali 1993) **(Prilog 1**). Sukladno ovim kriterijima, za dijagnozu pSS bolesnici trebaju imati pozitivan histopatološki nalaz slinovnica i/ili proprotutijela; anti-Ro/SS-A ili anti-La/SS-B, s dodatnim kriterijima u različitim kombinacijama. Biopsija malih slinovnica nije rutinska u kliničkoj praksi zbog čega se određeni broj bolesnika sa pSS isključuje iako imaju tipične kliničke simptome SS, ali su

seronegativni za SS-A i/ili SS-B (Locht 2005). Prema aktualnim klasifikacijskim kriterijima za SS, termin «sekundarni» SS (sSS) se koristi za sve slučajeve konkomitantne prisutnosti pSS s nekom drugom bolesti vezivnog tkiva, čak i u slučaju kada je pSS bio prisutan godinama prije početka druge «primarne» bolesti. Neki autori koriste termin primarni Sjögrenov sindrom unatoč prisutnosti neke druge autoimune bolesti i ujedno uvode koncept preklapajućih ili povezanih bolesti (Szanto 2006, Salliot 2007) gdje termin «sekundarni» SS znači da je utjecaj komponente SS od minornog značenja što se tiče bolesnikova ishoda, kao što je čest slučaj u RA. Neki istraživači koriste histopatološki nalaz i genetičke pokazatelje u razlikovanju pSS od drugih autoimunih bolesti. Na uzorku od 114 bolesnika pSS, pokazalo se kako se čak 13 drugih autoimunih bolesti razvije prije ili nakon dijagnoze pSS tijekom 10,5 godina, među kojima su najčešće renalna tubularna acidoza, glomerulonefritis, pulmonarna fibroza, idiopatska trombocitopenija, bolest štitnjače, jetre, celijakija, miozitis, sklerodermija, perniciozna anemija i diskoidni lupus (Lazarus 2005). Oko 6% bolesnika sa pSS su imali dvije, 2% bolesnika sa pSS tri, a rijetki bolesnici su imali i do pet drugih autoimunih bolesti što govori u prilog širem poremećaju imunog sistema bolesnika, odnosno širokom spektru jedinstvenog nozološkog entiteta. Konkomitantna prisutnost spektra autoimunih manifestacija u jednog bolesnika upućuje najčešće na genetsku, hormonalnu, infektivnu ili drugu okolišnu etiologiju ili pak kombinaciju navedenih. Prisutnost multiplih protutijela karakterističnih za drugu sistemsku autoimunu bolest, ne za pSS, u većini slučajeva rezultira nastankom neke druge autoimune bolesti, ali može utjecati na način ekspresije u pSS. Isto tako prisutnost S/S s nekom drugom autoimunom bolesti, često utječe na fenotip te druge bolesti, npr. pojačava simptome umora ili limfom u RA ili umanjuje zahvaćenost bubrega i SŽS u SLE, a može utjecati i na način ekspresije simptoma u pSS, ali dugoročni utjecaj pSS na tu bolest zahtijeva daljnja istraživanja.

1.10. Klinička slika u Sjögrenovim sindromu

U bolesnika sa žljezdanim oblikom pSS dominiraju *sicca* simptomi. Najčešće su zahvaćene suzne žlijezde, slinovnice i parotide, ali i egzokrine žlijezde kože i sluznica dišnoga, probavnoga i genitourinarnoga sustava. Difuzni *sicca* sindrom se očituje kliničkim simptomima u sklopu traheitisa, bronhitisa, atrofičnoga gastritisa te dispareunije, uroinfekcija, pruritusa i suhoće kože**.** Klinička slika pSS s izvanžljezdanim manifestacijama koja je prisutna u oko 1/3 oboljelih (Vitali 2002) se očituje, osim općim simptomima (npr. subfebrilitet, malaksalost, opća slabost) i zahvaćanjem ostalih organskih sustava: lokomotornog sustava (artralgije, mialgije), kože

(Raynaudov sindrom), dišnog sustava (intersticijski pneumonitis), bubrega (intersticijski nefritis, renalna tubularna acidoza i rjeđe glomerulonefritis), jetre (hepatomegalija i poremećaj jetrene funkcije), limfopoetskog sustava (limfadenopatija, splenomegalija), PŽS i SŽS (neuropatije, vaskulitične demijelinizacijske lezije, ispadi kognitivnih funkcija). U oko 1/3 oboljelih prisutni su i izvanžljezdani simptomi u sklopu sistemske zahvaćenosti (Markeljević 2003).

1.10.1 Suhoća sluznica (sicca sindrom)

Suhoća sluznica očiju *(xerophtalmia*) i usne šupljine (*xerostomia*) i rjeđe otok parotida, vodeći su lokalni, klinički simptomi pSS (Vitali 2002). Neravnoteža proupalnih i protuupalnih citokina rezultira kumulativnim oštećenjem žlijezda i smanjenom sekrecijskom funkcijom. Iako je limfocitna infiltracija slinovnica glavna značajka pSS, značajna sekrecijska disfunkcija može biti prisutna i bez veće žljezdane destrukcije (Fox and Speight 1996, Humphrey-Beher 1999). Dokazi hiperekspresije nekih citokina čak i u odsutnosti limfocitne infiltracije, upućuje kako bi citokini mogli imati izravni učinak na epitelne stanice neovisno o oštećenju uzrokovanom upalom i limfocitnom infiltracijom. Suhoća usne šupljine najkorisnija je u praćenju terapijskih učinaka lokalnog liječenja suhoće sluznica, ali kod sistemske terapije, npr. *rituximabom,* postupak procjene treba biti složeniji. U ocjeni suhoće sluznica, niz je nepoznanica, između ostalog i slaba povezanost između subjektivnih simptoma suhoće i objektivnih mjerenja lakrimalne i salivacijske funkcije (Hay 1998) što stvara dvojbu u kontekstu kliničkih istraživanja treba li koristiti objektivne testove mjerenja lakrimalne/salivarne funkcije (Shirmer test, Rose bengal test, Test salivacije; Qs, Qss) ili ocjenjivati subjektivne simptome ili oboje, pogotovo što je poboljšanje simptoma u placebo grupi do 30% (Vivino 1999). U terapiji okularne i oralne suhoće primjenjuju se muskarinski agonisti pilocarpin u dozi od 5 mg 4 x dnevno i cevimelin, ali rezultati su ograničeni i nakon 6-mjesečne terapije, stoga je nerealno očekivati izravni učinak bilo kojeg biološkog agensa na salivaciju supresijom (downregulacijom) B-limfocita. Topički, cyclosporin kapima (0,05% i 0,4%) kroz 12 tjedana postiže se tek neznatno poboljšanje simptoma u indeksu simptoma površine oka (prema engl. Ocular Surface Disease Index, OSDI) u odnosu na placebo. Interferon-α lozenges poboljšava salivacijsku funkciju i histološku sliku. Najjednostavniji način mjerenja suhoće je pomoću samoocjenske 0-10 VAS ljestvice (prema engl. Visual analogue scale, VAS), kojom bolesnik ocjenjuje subjektivni osjećaj umora od 0 – do maksimalno 10 (viša ocjena teži simptom), ali se mogu koristiti i detaljnije ljestvice. Pojedine ljestvice se koriste kvaliltativno kao dio klasifikacijskih kriterija za pSS, *EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI*)

(Vitali 2002, Vitali 1993), a druge i u kvantifikaciji očnih simptoma *National Eye Institue Vidual Function 25-item Questionnaire (NEI-VFQ-25*) i *Ocular Surface Disease Index (OSDI)(Vitale S, 2004), Sicca Symptoms Inventory (SSI*) (Bowman 2003), *Ocular Surface Disease Index* (Schiffman 2000) i salivacije (Bowman 2003) *Liverpool Sicca index* (Field 2003) Visual Analogue Scale upitnik za subjektivnu procjenu salivatorne disfunkcije (Pai 2001), *Preserved Salivary Output and Xerostomia-related Quality of Life* (Henson 2001), *Oral Health Impact Profile* (Slade 1994), *Xerostomia Inventory (XI*) (Thomson 1999) *Subjective Reports of Xerostomia and Objective Measures of Salivary Gland Performance* (Fox 1987). Neke od ovih ljestvica su jednodimenzionalne (Pai 2001, Fox 1987), a druge višedimenzionalne (Henson 2001, Slade 1994). Malobrojne su komparativne studije valjanosti različitih ljestvica *sicca* simptoma, ali postoje dokazi kako je mjerenje simptoma suhoće, boli i umora pomoću ljestvice VAS jednako vrijedno, stoga i najlogičnije u pristupu mjerenja, a detaljniji upitnici za suhoću se mogu koristiti za kontrolno mjerenje. Uočene su sličnosti između SSI i XI i između NEI-VFQ-25 i OSDI.

1.10.2 Umor

Bolesnici s pSS često imaju neuropsihijatrijske smetnje isimptome kroničnog stresa kao što su umor, fibromialgija, anksioznost i depresivnost (Gudbjornsson 1993, Vitali 1989, Hietaharju 1990, Malinow 1985). Umor je vodeći simptom u pSS i pogađa većinu oboljelih od pSS (Westhoff 2012, Bowman 2008, Pillemer 2003). Umor je najbolji pokazatelj fizičkog funkcioniranja i koristi se kao mjerilo kvalitete života u bolesnika s pSS. Rezultati recentnih studija dokazali su kako umor i depresivnost uzrokuju viši stupanj individualnih i socijalnih tegoba i opće pogođenosti bolešću nego suhoća sluznica u bolesnika s pSS (Bowman 2004, Bowman 2004a, Bowman 2008). Umor je nakon depresivnosti najbolji prediktor posjeta liječniku i radne nesposobnosti u žena sa pSS (Westhoff 2012). Kronični umor je bolji pokazatelj funkcioniranja bolesnika s pSS i od bioloških testova i ranije studije nisu dokazale povezanost umora niti sa jednim biološkim pokazateljem uključujući SE, CRP, IgG, SS-A, SS-B, citokini IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10 i TNF-α (Barendregt 1998, Hartkamp 2004, Bax 2002). U pSS je utvrđena povezanost umora s boli i nelagodom (artralgije, mialgije) i Raynaud-ovim fenomenom u okviru komparabilnih domena ljestvica *Sjogren Clinical Activity Index (SCAI*) i *Profile of Fatigue and Discomfort* (*PROFAD),* ali ne i povezanost umora s aktivnosti bolesti, vjerojatno zbog različitih nebioloških kontributora umora uključujući osobnost, slabo raspoloženje, pospanost i socijalne čimbenike (Andersson SI, 2001), a slično je dokazano i u RA gdje umor korelira s depresivnosti, boli i ženskim spolom, ali ne i sa

aktivnosti bolesti (Huyser 1998). Brojne studije aktualno ispituju povezanost umora s biološkim i psihosocijalnim pokazateljima u pSS, kao i povoljni učinci terapije na poboljšanje simptoma umora u pSS. Budući umor ima i psihološke, socijalne i biološke uzroke, ne može se koristiti kao jedino mjerilo ishoda, osobito kada je u pitanju biološka terapija, ali se može koristiti kao mjerilo sekundarnog ishoda bolesti (Segal 2009) pri čemu se dodatno ocjenjuju suhoća sluznica i bol. Umor je čest simptom i u drugim upalnim reumatskim bolestima kao što su RA i SLE, MS, hipotiroidizam, depresija, ali i u općoj populaciji (Bates 1993), a ponekad je medicinski neobjašnjiv što je slučaj u sindromu kroničnog umora koji se povezuje s kroničnim stresom (Bates 1993). Malobrojne su studije koje su ispitivale povezanost bioloških, psiholoških i socijalnih utjecaja na umor u bolesnika s pSS (Wessely 1998). Rezultati ljestvice umora i nelagode *Profile of Fatigue and Discomfort (PROFAD*) (Bowman 2004) pokazuju sličnosti karaktera umora između bolesnika s pSS i SLE i time upućuju na mogućnost zajedničkih patogenetskih mehanizama nastanka umora u obje bolesti. Najjednostavniji način procjene umora, ali i drugih simptoma u pSS (suhoća, bol, artralgije, mialgije, parestezije) je pomoću samoocjenske 10-cm ljestvice *VAS.* Koriste se i upitnici s više domena umora i fraza koje se odnose na pojedinu domena umora, npr. *Functional Assesment of Chronic Illnes Therapy scale (FACITS)* (Yellen 1997) i *Fatigue Severity Scale (FSS)* (Krupp 1989), *Profile of Fatigue and Discomfort (PROFAD*) (Bowman 2004). Ove ljestvice daju ukupni zbroj bodova („score“) koji većinom dobro korelira s rezultatima ljestvice VAS, stoga je ljestvica VAS prihvaćena kao jednako vrijedna kao i drugi duži upitnici (Wolfe 2004). Upotrebom drugih dužih upitnika osigurava se dodatna validnost mjerenja.

1.10.3 Depresivnost

Psihičko funkcioniranje je uz fizičko, značajno narušeno u bolesnika s pSS (Drosos 1989). Nema dokaza da su reumatske bolesti češće u psihijatrijskih bolesnika (DeVries 1994), ali su depresivnost i anksioznost česti komorbiditeti somatskih bolesti. Mjerenje psihijatrijskih simptoma otkriva važan aspekt pogođenosti bolesnika kroničnom bolesti (Henigsberg 2011, Henigsberg 2012). Depresivnost je najčešći psihički poremećaj u bolesnika sa pSS i uz umor je najbolji pokazatelj aspekta pogođenosti bolesnika kroničnom bolesti (Valdysdottir 2000, Utset 1994). Depresivnost je najbolji prediktor posjeta liječniku i radne nesposobnosti u žena sa pSS (Westhoff 2012). Žene s pSS značajno češće imaju simptome depresije i anksioznosti u usporedbi sa zdravim ženama i bolesnicama s RA. Koegzistencija depresije s umorom i raznim tjelesnim tegobama kroničnog tijeka, ponekad otežava postavljanje dijagnoze prave depresije. U 62 bolesnika sa pSS

depresivnost je značajno učestalija u odnosu na opću populaciju (Valtysdottir 2000), a slična je s nekim upalnim reumatskim bolestima kao što su RA i SLE. Dokazana je povezanost depresije sa somatskim umorom u pSS (Bowman 2004, Bax 2002, Barendregt 1998).

Postoje brojni dokazi o ulozi citokina u depresiji. Nekoliko je mehanizama koji bi mogli utjecati na nastanak depresije povezane s upalom. Prvo, citokini mogu aktivirati os hipotalamus-hipofiza-nadubrežna žlijezda (HHN), izravno, preko kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH) (Hughes 1994) ili putem citokinima izazvane rezistencije glukokortikoidnih receptora (Pariante 1995) koja uzrokuje hiperaktivnost HHN osi zbog oštećene negativne povratne sprege (Dinan 1994). Hiperaktivnost HHN osi dokazana je u melankoličnoj depresiji i kroničnom stresu, dok je snižena u atipičnoj ili sezonskoj depresiji, RA, sindromu kroničnog umora ili fibromialgiji, insuficijenciji nadbubrežne žlijezde, nakon kroničnoga stresa (Valtysdottir 2000). Drugo, proupalni citokini mogu mijenjati monoaminske neurotransmitere u različitim regijama mozga (Zalcman 1994), npr. akutni odgovor, karakteriziran porastom serumske razine IL-6 i proteina akutne faze, može pridonijeti smanjenjem raspoloživosti L-triptofana (Song 1998) za koje se zna da smanjuju raspoloživost serotonina u SŽS (Charney 1998) Treće, receptori za citokine u neuronima SŽS-a povećavaju mogućnost izravnog djelovanja citokina kao neurotransmitera (Schobitz 1994). Psihičke poremećaje je teško dijagnosticirati u prisutnosti fizičke bolesti, osobito ako je kronične naravi. Rezultati psihijatrijskih studija daju kontroverzne rezultate s aspekta razine trombocitnog serotonina i psihičkih poremećaja. U nekim studijama utvrđena je niža koncentracija trombocitnog serotonina (*engl. platelet serotonin level, PSL*) u bolesnika s psihičkim smetnjama; u suicidalnih bolesnika s depresijom sa ili bez psihotičnih reakcija (Mück-Seler 1996), u bolesnika s prvom epizodom psihoze (Marčinko 2007), u suicidalnih bolesnika sa ili bez postraumatskog stresnog poremećaja (PTSP), ali ne i u nesuicidalnih bolesnika s PTSP i zdravih kontrola (Kovacic Z 2008), dok druge studije nisu dokazale isto (Meltzer 1986, Mück-Seler 1991). Može se reći kako se PSL može koristiti kao periferni pokazatelj tj. biomarker određenih simptoma depresivnosti, ali ne i složenih psihijatrijskih sindroma. Polimorfizam gena za 5-HTT utječe na razvoj depresije povezane sa stresom (Caspi 2003). Geni koji kodiraju proteine uključene u sintezu ili pohranu 5-HT-a, a osobito geni za 5-HTT, posreduju u genetskoj osjetljivosti za razvoj depresije i anksioznosti (Deakin 1998) i PTSP-a (Nemeroff 2006).

1.11. Indeks aktivnosti bolesti u primarnom Sjögrenovom sindromu (ESSDAI)

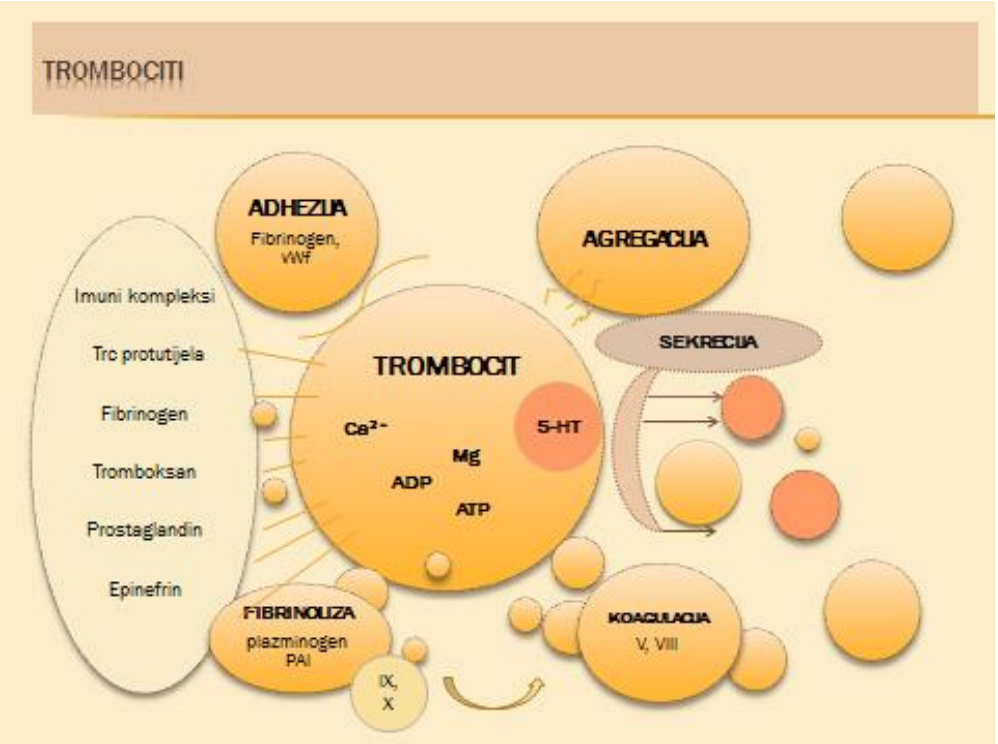
Klinički tijek pSS većine reumatskih upalnih bolesti karakteriziran je epizodama akutizacije bolesti različitog trajanja s pogoršanjem simptoma bolesti, porastom akutnih upalnih reaktanata i promjenama imunoloških pokazatelja. Prolongiranjem imunološkog procesa nastaju ireverzibilna oštećenja tkiva. Budući da ne postoje specifični klinički ili biološki pokazatelji opće aktivnosti bolesti ili kumulativne destrukcije za sistemske autoimune bolesti, koriste se specifični kriteriji za procjenu općeg statusa za svaku bolest koji su opsjetljivi na bilo kakve promjene u kliničkom tijeku bolesti (Liang 2006). U procjeni općeg stanja bolesti najčešće se koristi *Physician's global assesment (PGA)* koji obuhvaća većinu pokazatelja kliničke ekspresije bolesti. Zadnjih 30-tak godina nacionalne studije izdale su više kriterija za procjenu statusa za većinu sistemskih bolesti, koje su bile limitirane sadržajno i amplitudom prikupljanja podataka, stoga je *European League Against Rheumatism (EULAR*) inicirao razvoj indeksa aktivnosti bolesti u bolesnika sa pSS. Istraživači iz 6 Europskih i više prekooceanskih zemalja, postavivši dvije platforme: prvu za procjenu *sicca* simptoma i subjektivnih simptoma umora i boli, a drugu za procjenu opće aktivnosti bolesti kao rezultat objektivnih sistemskih pokazatelja bolesti. Godine 2009. definiran je prvi standardizirani instrument, indeks aktivnosti bolesti, tzv. *EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI)* (Seror 2010) (**Prilog 2**) koji se sastoji od 12 organ-specifičnih "domena" koje pridonose aktivnosti bolesti, a svaka je klasificirana u 3 do 4 razine prema težini simptoma, viša razina indicira teži stupanj

1.12. Subjektivne bolesnikove tegobe

Od 2011. god. dostupan je i drugi standardizirani instrument za procjenu subjektivnih bolesnikovih tegoba u pSS, tzv. *EULAR Sjogren's syndrome Patient Reported Index (ESSPRI*) (Seror 2011)(**Prilog 3**) koji je definiran kao sredina triju postojećih ljestvica s kojima dobro korelira uljučujući: *Patient Global Assesment (PGA), Sicca Symptoms Inventory (SSI) i Profile of Fatigue and Discomfort (PROFAD).* ESSPRI je vrlo jednostavan indeks dizajniran za mjerenje bolesnikovih simptoma i predstavlja srednju vrijednost suhoće boli, somatskog i mentalnog umora. Ova dva različita indeksa ESSDAI i ESSPRI su dobro definirana i validirana te se mogu koristiti u kliničkim istraživanjima i kliničkoj praksi u mjerenju aktivnosti bolesti i simptoma bolesti u pSS.

1.13. Trombociti

Trombociti su najmanje krvne stanice, životni vijek im je 7-10 dana, ali ako dospiju do svog krajnjeg cilja, retikuloendotelnog sustava bez sudjelovanja u hemostazi ili u trombotskim procesima žive najdulje. Osim u hemostazi, trombociti sudjeluju u upalnim procesima, u imunološkoj obrani od virusa, bakterija i parazita, angiogenezi, tumorskom rastu i nastanku metastaza. Za razliku od drugih stanica, nemaju jezgru i ne mogu se adaptirati na nove situacije *de novo* sintezom proteina, iako postoje dokazi sinteze rezidualnih proteina iz mRNA u megakariocitima. Zbog toga, trombociti trebaju imati različite presintetske molekule spremne izvesti različite fiziološke funkcije i adaptirati se u patološkim uvjetima. Sadrže sekrecijske organele; α-granule i guste granule (prema engl. *dense*) koje imaju jedinstveni molekularni sastav, kinetiku sekrecije (egzocitoze) i specifične genske poremećaje. Sekrecijom ili egzocitozom trombociti na mjestu vaskularnog oštećenja, otpuštaju molekule koje imaju ključnu ulogu u hemostazi (Flaumenhaft 2003**) (Slika 1**). Sekrecija sadržaja iz trombocita promovira aterogenezu i pojačana je u bolesnika s kardiovaskularnim bolestima (Ramsis 1998). **Alfa-granule** su najbrojnije i sadrže citokine, adhezijske molekule, prokoagulante, fibrinolitičke regulatore, čimbenike rasta i druge proteine **(Tablica 2).**



Slika 1. Trombociti; agregacija, sekrecija i koagulacija.

Tablica 2. Sadržaj α-granula. Preuzeto uz izmjene od Reed 2007

Adhezijske molekule	Fibrinogen[a], P-selektin[a], von Willebrandov faktor[a] thrombospondin, integrin α11b[b]β3, integrin αvβ3, fibronektin
Citokini/Kemokini	PBP[b], trombocitni faktor 4 i njegova varijanta[b] (CXCL4) i β-tromboglobulin[b]), CCL3 (MIP-1α), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP- 3), CCL17, CXCL1, onkogen-regulatori rasta-α), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8)
Prokoagulanti	Faktor V,[a] multimerin,[a] faktor VIII
Fibrinolitici	α_2-makroglobulin, plazminogen, plazminogen aktivator inhibitor 1
Angiogeneza	BFGF, EGF, HGF, IGF1, TGF β, VEGF-A, VEGF-C, PDGF
Imunosne molekule	β1H-globulin, faktor D, cl inhibitor, IgG
Drugi proteini	Albumin, α_1-antitripsin, Gas6, histidinom-bogati glikoprotein, HWK, OPN-11, APP

PBP-bazični protein trombocita (prema engl. platelet basic protein), BFGF-bazični faktori rasta fibroblasta (prema engl. basic fibroblast growth factor, EGF -epidermalni faktor rasta (prema engl. epidermal growth factor, EGF), HGF-faktor rasta hepatocita (prema engl. hepatocyte growth factor), IGF1-inzulinu sličan faktor rasta (prema negl. insulin-like growth factor 1), TGF β-transformirajući faktor rasta (prema engl. transforming growth factor β), VEGF-A-vaskularni endotelijani faktor rasta-A (prema engl. vascular endothelial growth factor-A i C, PDGF-faktor (prema engl. platelet-derived growth factor), HWK-kininogen visoke molekularne težine (prema engl.high molecular weight kininogen), OPN-11-(engl. osteonectin protease nexin-11), prekursor beta amiloida (prema engl. amyloid beta-protein precursor) [a]Trombocit-selektivni proteini se sintetiziraju ili preuzimaju u megakariocit-trombocitima, rijetko u drugim stanicama. [b]Trombocit-specifični proteini specifični samo za trombocite [c]Trombocit-bazični protein podliježe proteolizi (trombocitni faktor 4 i β-tromboglobulin proteini).

Guste granule tzv. „*bull's eye"* su 10x manje i malobrojnije od α-granula, prostorno su odvojene od membrane, ali filamente kojima su povezane s membranom (White 1992). Sadrže male molekule kao što su serotonin (5-HT), ADP i Ca^{2+} i nekoliko proteina. Guste granule su blago kisele (pH 6.1) i sadrže lizosomske membranske proteine kao što su CD63 (LAMP-3) i LAMP-2, ali ne i LAMP-1 (**Tablica 3**). Jedan od načina adaptacije trombocita na razne situacije je preko brojnih podtipova receptora na trombocitima koji pokazuju ekspresiju tek nakon aktivacije. Trombocitni receptori su veza između trombocita i vanjskog svijeta, određuju njihovu reaktivnost i identitet.

Tablica 3: Sadržaj gustih granula (Preuzeto uz izmjene od Reed 2007)

Molekule	
Transmiteri	**Serotonin**
Ioni	Ca, Mg, P, pirofosfat
Nukleotidi	ATP, ADP, GTP, GDP
Membranski proteini	CD63 (granulofizin), LAMP-2

Ca – kalcij, Mg – magnezij, ATP-adenozintrifosfat, GTF – guanidintrifosfat, ADP – adenozindifosfat, GDP-guanidindifosfat, LAMP-2-lizosomski membranski protein-2

Sekrecija iz trombocita događa se nakon aktivacije specifičnim ligandima (npr. imuni kompleksi, trombocitna antitijela, prostaglandin, norepinefrin, kolagen, tromboksan, trombin, ADP, A_2, endoperoksidi) (Brass 2003) koji potiču agregaciju trombocita i potom sekreciju sadržaja iz njihovih granula (npr. serotonin, ADP, faktori permeabilnosti, faktori rasta, β-tromboglobulin i lizosomski enzimi. U tom smislu trombociti predstavljaju važan intravaskularni izvor proupalnih medijatora (Weiss 1975). 5-HT i druge vazoaktivne molekule mogu povećati propusnost krvnih žila (Mustard 1965, Nachman RL 1972) i time stvoriti preduvjet za odlaganje cirkulirajućih imunih kompleksa u krvne žile, njihovo oštećenje i aterogenezu. Tome u prilog govori nalaz sniženog broja trombocita i njihovih konstituenata u RA i SLE. Ipak potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila uloga pojedinačnih ili multiplih vektora na broj i funkciju trombocita.

1.14. Serotonin (5-HT)

Serotonin (*5-hydroxytryptamine, 5-HT*) je biogeni monoaminski neurotransmiter koji se sintetizira iz esencijalne aminokiseline triptofana, široko rasprostranjene u biljnom i životinjskom svijetu. 5-HT je inicijalno otkriven kao vazokonstriktor u krvi, a kasnije u trombocitima gdje regulira agregaciju trombocita, u imunim stanicama regulira aktivaciju imunih stanica, u enterokromafinim stanicama gastrointestinalne sluznice gdje potiče autonomne kontrakcije želučane i crijevne glatke muskulature, u plućima i srcu. Davne 1937.godine otkrivena je kemijska struktura 5-HT iz enterokromafinih stanica crijeva, naknadno je sintetiziran, a potom je otkrivena i funkcija 5-HT kao neurotransmitera u SŽS-u, a istraživanja 5-HT su intenzivirana nakon njegovog

otkrića u hipofizi. Najviše 5-HT se sintetizira u enterokromafinim stanicama crijeva, a naširoko se sintetizira i u serotonergičkim neuronima SŽS, trombocitima i hipofizi (Peroutka & Howel, 1994). 5-HT je uključen u regulaciju središnjeg neuroendokrinog sustava kao i u kognitivnim funkcijama, raspoloženju i bazalnim fiziološkim funkcijama (Van de Kar 1991). 5-HT je važan neurotransmiter središnjeg i periferngo živčanog sustava, ali ima važnu ulogu i i homeostazi, kontrahira glatku muskulaturu krvnih žila, unutarnjih organa, srčani mišić, dok relaksira skeletnu muskulaturu. Oko 90% ukupnog 5-HT sintetiza se u enterokromafinim stanicama sluznice crijeva, a potom portalnim krvotokom dospijeva u jetru pluća gdje se metabolizira. Jedan dio se aktivnim transporotom, uz pomoć transmembranskog 5-HTT unosi u trombocite periferne krvi, a potom aktivnim transportom uz pomoć ADP unosi u mjehuriće tzv. guste granule. Influks Ca^{2+} dovodi do depolarizacije membrane trombocita što potiče oslobađanje serotonina iz granula u izvanstanični prostor. Trombociti ne sintetiziraju 5-HT, već se 5-HT aktivnim transportom unosi u trombocite. U SŽS 5-HT se sintetizira u serotonergičnim neuronima iz triptofana koji se uz pomoć ključnog sintetskog enzima *tryptophan hydroxylase* hidroksilira u 5-HT prekursor 5-hydroxytryptophan (5-HTP), a 5-HTP se dekarboksilira uz pomoć enzima dekarboksilaze l-aromatskih kiselina uz pomoć kofaktora piridoksalfosfata u amin serotonin, 5-HT. Kako bi se izbjegla enzimatska oksidacija u 5—hidroksiindoloctenu kiselinu (prema engl. *5-hydroxy-indol-acetic acid, 5-HIAA*), uz pomoć enzima monoamin oksidaze (prema engl. *monoamine oxidase, MAO*), 5-HT se pohranjuje u neuronskim vezikulama do otpuštanja u sinaptičku pukotinu. Glavni metabolički put 5-HT je oksidacija uz pomoć ključnog razgradnog enzima MAO-A u 5-HIAA, koja je u mozgu glavni razgradni produkt (Hamon 1982). Metabolički, degradacijski procesi su vrlo brzi, a k tome, koncentracije 5-HT u moždanom izvanstaničnom prostoru i u plazmi su niske, i ne odražavaju serotonergičnu aktivnost. U pinealnoj žlijezdi iz 5-HT-a nastaje melatonin. Glavni izvor perifernog 5-HT su enterokromafine stanice sluznice crijeva koje otpuštaju dio svog sadržaja serotonina u krvotok (Wade 1996) Serotonin iz krvne plazme djelomično unose u sebe trombociti, a glavno metaboličko mjesto su pluća, odnosno plućna mikrovaskulatura (Fuller 1986). Funkcija 5-HT-a u SŽS i perifernim tkivima određena je sintezom 5-HT-a, njegovim ponovnim unosom nakon otpuštanja u sinapsu, razgradnjom i učincima koje ostvaruje putem 15 vrsta 5-HT receptora (5-HTr) na presinaptičkim i postsinaptičkim neuronima, stanicama i tkivima na periferiji. Identificirani su brojni geni koji kodiraju te proteine i istražuju se razlike u potencijalnim genima i razlike u funkcionalnim polimorfizimima tih gena. Pokazano je da polimorfizmi gena za serotoninski transporter. Promotorska regija serotoninskog transportera, 5-HTTLPR povezuje se s nastankom depresije povezane sa stresom (Caspi 2003). Geni koji kodiraju proteine uključene u sintezu ili pohranu 5-

HT-a, a osobito geni za 5-HTT, posreduju u genetskoj osjetljivosti za razvoj depresije i anksioznosti (Deakin 1998) i PTSP-a (Nemeroff 2006).

1.14.1 Fiziologija 5-HT

Homeostaza 5-HT u čovjeka se odvija kroz dva metabolički odvojena odjeljka; središnji i periferni koji su odvojeni krvnomoždanom barijerom nepropusnom za 5-HT, ali propusnom za prekursor triptofan i metabolit 5-hidroksiindoloctenu kiselinu (5-HIAA). 5-HT je uključen u niz fizioloških procesa na periferiji (homeostaza, kardiovaskularne funkcije, imunomodulacija, metabolizam), a u mozgu ima ulogu neurotransmitora - neuromodulatora (Ortiz 1988), sudjeluje u regulaciji ponašanja, raspoloženja, apetita, učenja, kognitivnih i motoričkih funkcija, cirkadijarnih i neuroendokrinih ritmova, regulaciji disanja, spavanja, seksualnog ponašanja i termoregulaciji i dr (Hervig 1996).

Poremećaji 5-HT sustava mogu rezultirati neadekvatnim odgovorom na stres (Jørgensen 2007), poremećajem homeostaze i kardiovaskularnim bolestima (Williams 2001), kognitivnim disfunkcijama i mentalnim distresom (Roth 2004), somatskim bolestima, psihičkim poremećajima (Alda 2001) kao što su depresija (Caspi 2003), autizam (Betancur 2002) (Hranilović 2008), anksioznost (Lesch 2001a, Lesch 1996), anksiozno-depresivni poremećaj (Valtysdottir 2000), bipolarni poremećaj (Benedetti 1998), neuroticizam (Lesch 2003), agresivnost (Goveas 2004), opsesivno-kompulzivni poremećaj (Hanna 1998), psihoza (Marcinko 2003), suicidalnost (Božina 2012, Alvarez 1999), sizofrenija (Božina 2012, Braunig 1989), PTSP (Mellman 1994, Kovacic 2007) poremećaj uzimanja hrane, alkoholizam (Heinz 1999), ovisnosti (Comings 1996, Hrdina 1994), Tourette sindrom, (Comings 1996) i drugo. U nekima od ovih stanja dokazana je neuroendokrina disregulacija i uloga 5-HT sustava u regulaciji osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, HHN (prema engl. *hypothalamus-hypopituitary-adrenal axis, HPA*).

Neurotransmiteri moždanog korteksa, talamusa, limbičkog sustava i moždanog debla reguliraju hipotalamičke funkcije u skladu s hormonalnom povratnom spregom - „feedbackom“ iz endokrinih žlijezda (Carrasco 2003). Hipotalamus sintetizira hormone: kortikotropin oslobađajući hormon (prema engl. *corticotropine releasing hormone, CRH),* arginin-vazopresin (prema engl. *arginine-vasopresin, AVP), tirotropin oslobađajući hormon (*prema engl. *thyrotrophic releasing hormone (TRH),* hormon rasta oslobađajući hormon prema engl. *growth hormone releasing*

hormone, GRH) i somatostatin i gonadotropin oslobađajući hormon (prema engl. *somatostatine and gonadotropine releasing hormone, GnRH*), koji zajedno s klasičnim neurotransmiterima kao što su histamin, serotonin, kateholamini i dopamin reguliraju sekreciju hormona iz adenohipofize i neurohipofize. Neurotransmiteri sudjeluju u regulaciji ovih hormona, a osobito je važna uloga 5-HT i njegovih brojnih receptora na neuroendokrini sustav i stresne uvjete. Osim dobro istraženih 5-$HT1_A$ i 5-HT_2 receptora, i brojni drugi serotoninski receptori su uključeni u regulaciju hormona hipofize u bazalnim uvjetima i stresnim situacijama.

1.14.2 Središnji odjeljak 5-HT sustava

Središnji odjeljak serotonergičkog sustava predstavljaju serotonergički (5-HT) neuroni okupljeni u rafe jezgrama (nuclei raphe) u moždanom deblu i projiciraju se u sve dijelove mozga i kralježnične moždine. 5-HT neuroni se iz medijalne rafe jezgre (MRN) projiciraju u hipokampus i hipotalamus, a iz dorzalne rafe jezgre (DRN) u hipotalamus, kaudatus i putamen (Dahlström & Fuxe 1964). Visoka razina imunoreaktivnih 5-HT terminala nalazi se u limbičkom sustavu (hipokampus, amigdala, septum i ventrolateralni corpus geniculatum), talamusu, hipotalamusu i substanciji nigri.

Tablica 4. Serotoninski receptori (5-HTr)(Preuzeto uz izmjene od Gaddum 1957)

Receptor	**$5HT_{1A}$**	**$5\text{-}HT_{2A}$**	**$5\text{-}HT_{3}$**	**$5\text{-}HT_{4}$**	**$5\text{-}HT_{5A}$**	**$5\text{-}HT_{6}$**	**$5\text{-}HT_{7}$**
Tip receptora.	G_i-protein	G_s-protein	Ion. kanal	G_q-protein	G_{vo}-prot	G_s-protein	G_s-protein
Sec. mess.	Inhibira-adenil ciklazu	Stimulira fosfolipazu	Kation kanal	Stumulira adenil ciklazu	Inhibira-adenil ciklazu	Stimulira adenil ciklazu	Stimulira-adenil ciklazu
Lokalizacija	Limbicki s.: (hipotalamus, amigdala, hipokampus), neokorteks	Neokorteks hipokampus kaudatus trombociti, periferna tkiva	Pons m.deblo gusta dis.	Široka distribucija; SŽS, GI trakt, srce, korteks hipotalamus	Neokorteks hipokampus hipotalamus corpus callosum, glija	Striatum, hipokampus, amigdala, n. accumbens, neokorteks, olfaktorne trabakule	SŽS, limbički sustav, n.raphe, krvne stanice, glatki mišici
Funkcija	Rregulacija sekrecije ACTH, anksioznost, regulacija temperature	Spavanje, motorika, ponašanje, stimulacija sekrecije hormona (ACTH, kortikosteroida, renina, oksitocina, prolaktina), agregacija trombocita, halucinacije (LSD)	Refleks povraćanja GI-motilit kardiovask	Kontrola oslobađanja neurotransmit pamćenje	Spavanje motorika ponašanje	Kontrolira kolinergičku funkciju hranjenje?	Raspoloženje, anksioznost termoregulacija ritam spavanja
	$5\text{-}HT_{1B}$	$5\text{-}HT_{2C}$			$5\text{-}HT_{5B}$		
Lokalizacija	Subs. nigra b. gangliji front. korteks	Hipotalamus limbički s. b.gangliji			DRN CA1 hipok olfakt. bulbus		
Funkcija	Kontrola otpuštanja drugih neurotransmitera (Ach, Glu, DA, NA, GABA) Vask. funkcija	Erekcija Regulacija CSF (?)			?		
Reference	Lanfumey 2004 Hensler 2003	Leysen 2004 Pompeiano 1994	Costall 2004 Hoyer 2002	Bockaert 2004	Hoyer 2002 Nelson 2004	Woolley 2004	Thomas 2004

Kratice: ACTH-adrenokortikotropni hormon; Ach-acetilkolin; DA-dopamin; GABA-gamaaminomaslačnakiselina; Glu-glutamat; GI-gastrointestinalni; LSD-dietilamid lizerginske kiseline (engl. lyserg saurediaethylamid); NA- noradrenalin; OKP-opsesivno-kompulzivni poremecaj; SŽS-središnji živcani sustav.

Mozak ima vlastitu sintezu i razgradnju 5-HT koja je odvojena krvno-moždanom barijerom od perifernog 5-HT odjeljka. Sintetizirani 5-HT pohranjuje se u specifičnim vezikulama presinaptičkih završetaka serotonergičkih neurona. Podražen presinaptički neuron oslobađa serotonin u sinaptičku pukotinu gdje 5-HT ima funkciju neurotransmitera, a pokazano je da

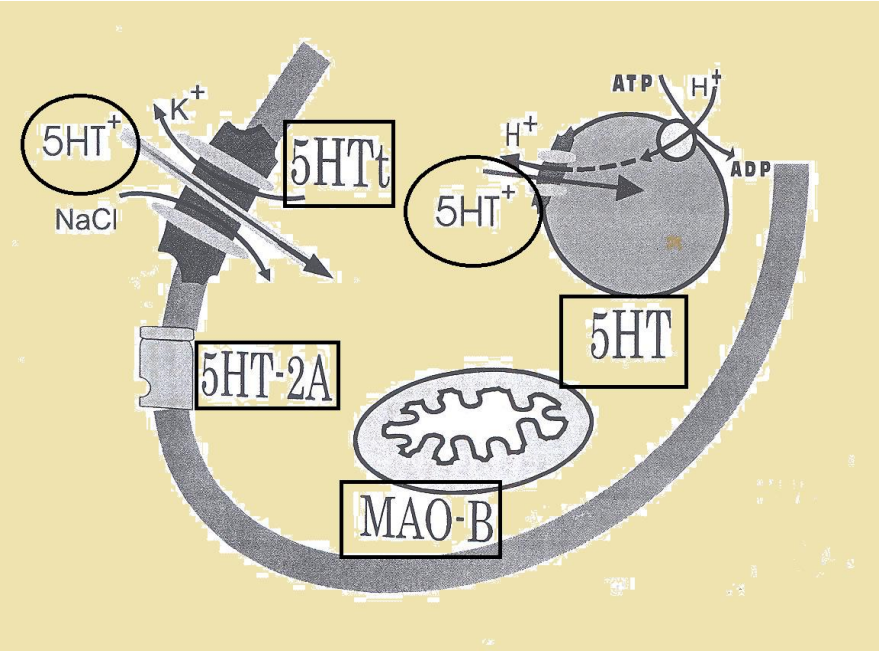
serotonergički neuroni sudjeluju u regulaciji spavanja, raspoloženja, učenja, seksulanog ponašanja, termoregulacije, apetita itd.

1.14.3 Periferni odjeljak 5-HT sustava

U perifernom 5-HT odjeljku koji sadrži oko 90% ukupnog 5-HT, glavni izvor sinteze 5-HT su enterokromafine stanice crijeva koje otpuštaju dio 5-HT u krvotok, odakle veći dio aktivnim transportom unose u sebe trombociti, a glavno mjesto razgradnje 5-HT-a su pluća. Trombociti su ujedno najbogatiji serotoninom iako ga ne sintetiziraju i 99% 5-HT krvi pohranjeno je u trombocitima, dok se u ostalim tkivima nalazi se u zanemarivim koncentracijama.

1.14.4 Trombocitni 5-HT sustav

Trombociti su uz serotonergičke neurone i enterokromafine stanice, stanice najbogatije 5-HT-om. Iako se trombociti strukturno, funkcionalno i ontogenetski razlikuju od neurona, elementi trombocitnog 5-HT sustava gotovo su identični onima u 5-HT neuronima. Za razliku od neurona, trombociti nemaju jezgru, ne sintetiziraju 5-HT niti druge amine, ne provode električne impulse i imaju kraći životni vijek. 5-HT sustav u trombocitima sudjeluje u trombocitnom odgovoru, tj. promjeni oblika i agregaciji trombocita (Vangs 1992). Trombociti ne sintetiziraju 5-HT već ga aktivnim transportom, pomoću 5-HT transportera (*5-hydroxytryptamine transporter*, *5-HTT*, *SERT)* u trombocitnoj membrani, sakupljaju iz krvne plazme u citoplazmu i pohranjuju u gustim (engl. dense) granulama. Enzim monoaminoksidaza-B (MAO-B), smješten na vanjskoj strani mitohondrija razgrađuje 5-HT. Na površini trombocita, nalazi se 5-HT_{2A} receptor koji nakon vezanja 5-HT aktivira promjenu oblika trombocita i reakciju otpuštanja sadržaja iz granula i agregaciju trombocita izazvanu 5-HT-om (Waldeier 1993). Na vezno mjesto za 5-HT na 5-HTT vežu se i antidepresivi, inhibitori aktivnog unosa 5-HT (Cook 1994). Fiziološka uloga visokih koncentracija 5-HT u trombocitima zdravih osoba i dalje je nejasna. Klasični koncept trombocita kao «čistača» plazmatskog 5-HT doveden je u pitanje nalazima individualne stabilnosti koncentracije 5-HT u trombocitima zdravih osoba (Jernej 2000) i genetskim nadzorom nad tim parametrom (Lesch 1998).



Slika 2. Preuzeto uz izmjene od Balija 2010. 5-HT – serotonin, 5-HTT - serotoninski transporter, 5-HTr – serotoninski receptor, MAO-B – inhibitor monoaminoksidaze

Istraživanja fizioloških karakteristika trombocitnog/cirkulirajućeg 5-HT u zdravoj populaciji pokazala su normalnu distribuciju koncentracije 5-HT, tendenciju, ali ne značajnu, pada koncentracije 5-HT (PSL) sa starenjem, izostanak značajnog utjecaja spola i godišnjeg doba na PSL (Balija 2010, Guicheney P, 1988, Martin F 1990). Stabilnost PSL tijekom duljeg vremena ukazuje na ekvilibrij između trombocitnog i plazmatskog 5-HT, kontroliranog aktivnim unosa 5-HT u trombocite koji je pod strogim genetskim nadzorom (Jernej 1994). Dokazana je značajna pozitivna povezanost PSL s maksimalnom brzinom (Vmax) unosa 5-HT u trombocite i značajna povezanost maksimalne brzine (Vmax) unosa 5-HT u trombocite i Michaelisove konstante (Km) mjere afiniteta trombocitnog 5-HTT (Jernej 2000, Balija 2003).

1.14.5 Trombocitni model u neurobiologiji

Ideja trombocitnog modela javila se s otkrićem rezerpina i njegove inhibicije aktivnog unosa 5-HT u guste granule, dok imipramin inhibira unos 5-HT u trombocite i ponovni unos u neurone SŽS (Hrdina 1994) Genetička identičnost 5-HT sustava u trombocitima i sinaptosomima, kao i dostupnost trombocita i njihovih 5-HT elemenata, popularizirala je njihovo korištenje kao perifernog modela za sinaptosome. Genetička identičnost trombocita i neurona očituje se u

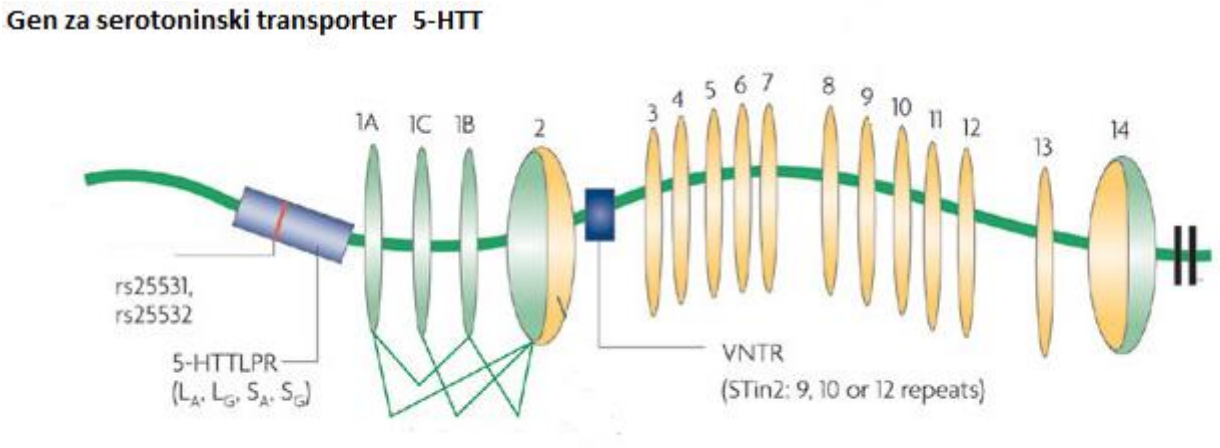
identičnom unosu 5-HT u trombocite i neurone, pohrani i otpuštanju, aktivnosti 5-HTT, MAO-B i 5-HT_{2A} receptora. U prijenosu 5-HT u trombocite sudjeluju dva transportera; 5-HTT na membrani trombocita koji unosi 5-HT iz krvne plazme u trombocite (Pletscher 1991) i drugi na membrani gustih granula nalazi tzv. vezikularni transporter koji unosi 5-HT iz trombocitne citoplazme u guste granule. Iako su otkrića strukturne identičnosti između trombocitne i neuronske monoaminoksidaze (MAO) (Chen 1993), 5-HTT (Lesch 1993) i 5-HT2_A receptora (Cook 1994), te njihova kodiranost istim genima pridonijela značaju trombocitnog modela u neurobiologiji, postoje i brojne različitosti i to: ontogenetski: trombociti potječu iz mezoderma, a neuroni iz ektoderma; strukturno: odsutnost jezgre u trombocitu i funkcionalno: trombociti sudjeluju u homeostazi, imunološkim reakcijama, neurohumoralnoj regulaciji, dok neuroni prenose električne impulse, a prvenstveno se razlikuju u transkripciji gena u mozgu i u perifernim tkivima, što sve ograničava korištenje trombocitnog modela u neurobiologiji. Ipak se u neurofarmakologiji trombocitni model koristi u studijama psihotropnih lijekova; inhibitora serotoninskog prijenosa, inhibitora granularne pohrane 5-HT-a, inhibitora enzima MAO-B, te antagonista 5-HT2_A receptora. Koncentracija 5-HT u krvi odraz je koncentracije 5-HT u trombocitima (PSL) u kojima je pohranjeno preko 99% ukupnog 5-HT u cirkulaciji. U usporedbi s trombocitima, druge krvne stanice i plazma sadrže zanemarive količine 5-HT. Koncentracija 5-HT u trombocitima zavisi o više čimbenika: koncentraciji slobodnog 5-HT u krvnoj plazmi, aktivnosti 5-HTT na trombocitnoj membrani, mehanizmu pohrane 5-HT u guste granule i o individualnoj različitosti otpuštanja 5-HT iz trombocita u plazmu. Rezultati istraživanja na velikom broju ispitanika potvrđuju da u fiziološkim uvjetima visoka PSL je u izravnom odnosu s visokom koncentracijom tog amina u krvi (Guicheney 1988, Martin 1990). Trombocitni 5-HT pohranjuje se u gustim granulama, analogno vezikulama u neuronu, gdje je zaštićen od enzimske aktivnosti MAO-B. Osim pohrane, trombociti sekrecijom otpuštaju 5-HT nakon aktivacije/stimulacije tijekom zgrušavanja, što je slično otpuštanju serotonina tijekom neurotransmisije. Aktivacija ili stimulacija trombocita trombinom, kolagenom, ADP-om, adrenalinom i drugim čimbenicima mobilizira unutarstanični Ca^{2+} što rezultira fuzijom plazmatske i granularne membrane i otpuštanja 5-HT (White 1992).

1.14.6 Trombocitni 5-HT receptor (5-HTr)

Za razliku od 14 različitih 5-HT receptora na neuronima, svaki sa specifičnim anatomskim, funkcionalnim i farmakološkim karakteristikama, na površini trombocita nalazi se samo serotoninski receptor 5-HT_{2A}, koji je uključem u odgovor pri aktivaciji trombocita plazmatskim serotoninom kao agonistom (Yamawaki 1996). 5-HT_{2A} receptori su važni za veliki broj fizioloških funkcija na periferiji i SŽS. Depresija je neovisni rizični čimbenik za povećani mortalitet u bolesnika nakon akutnog koronarnog događaja za što je odgovorna povećana aktivnost trombocita. U SŽS, 5-HT_{2A} receptor se nalazi na postsinaptičkoj membrani aksona korteksa i mezolimbičkih struktura. Kliničkim ispitivanjima uočena je povezanost disfunkcije 5-HT_{2A} receptora s migrenom, anksioznim stanjima, paničnim poremećajem, shizofrenijom, autizmom, alkoholizmom itd. Brojne studije pokazale su da postoji porast ekspresije 5-HT_{2A} receptora u akutnoj depresiji.

1.14.7 Serotoninski transporter (5-HTT)

Serotoninski transporter (5HTT ili SERT; Locus Symbol SLC6A4), mapiran na 17q11.1-17q12 je integralni membranski protein sastavljen od 630 aminokiselina, a 12 hidrofobnih regija tvori transmembranske domene. Kodiran je genom smještenim na kromosomu 17q11-q12 (Ramamoorthy 1993) sadrži 43 parova baza (pb) *(engl. base pair, bp*) insercije/delecije (ins/del, 5-HTTLPR) polimorfizma u 5' regulacijskoj regiji gena (Heils 1996). 5-HTT se nalazi na membranama raznih stanica; trombocita, limfocita, placente, kromafinih stanica nadbubrežne žlijezde, endotelu plućnih kapilara, epitelnim stanicama mukoze crijeva, parafolikularnim stanicama štitnjače i osnovna mu je funkcija prekid djelovanja 5-HT-a, brzom eliminacijom neurotransmitera iz sinapse ili krvne plazme, te zauzima ključno mjesto u regulaciji serotonergične neurotransmisije (Lesch 1998) i zanimljiv je u neuropsihijatrijskim istraživanjima učinaka lijekova (Božina 2008). 5-HTT na trombocitnoj membrani uklanja farmakološki aktivan 5-HT iz plazme, odnosno prenosi 5-HT iz krvi u trombocit. Primarna struktura 5-HTT utvrđena je 1991.god. (Blakely 1991) i u svim je stanicama identična (Lesch 1993). Gen za 5-HTT ima vodeću ulogu u regulaciji serotonergičke transmisije (Lesch 1996).



Slika 3. Struktura gena za serotoninski transporter (5-HTT). Preuzeto uz izmjene od (Bowman 2004)

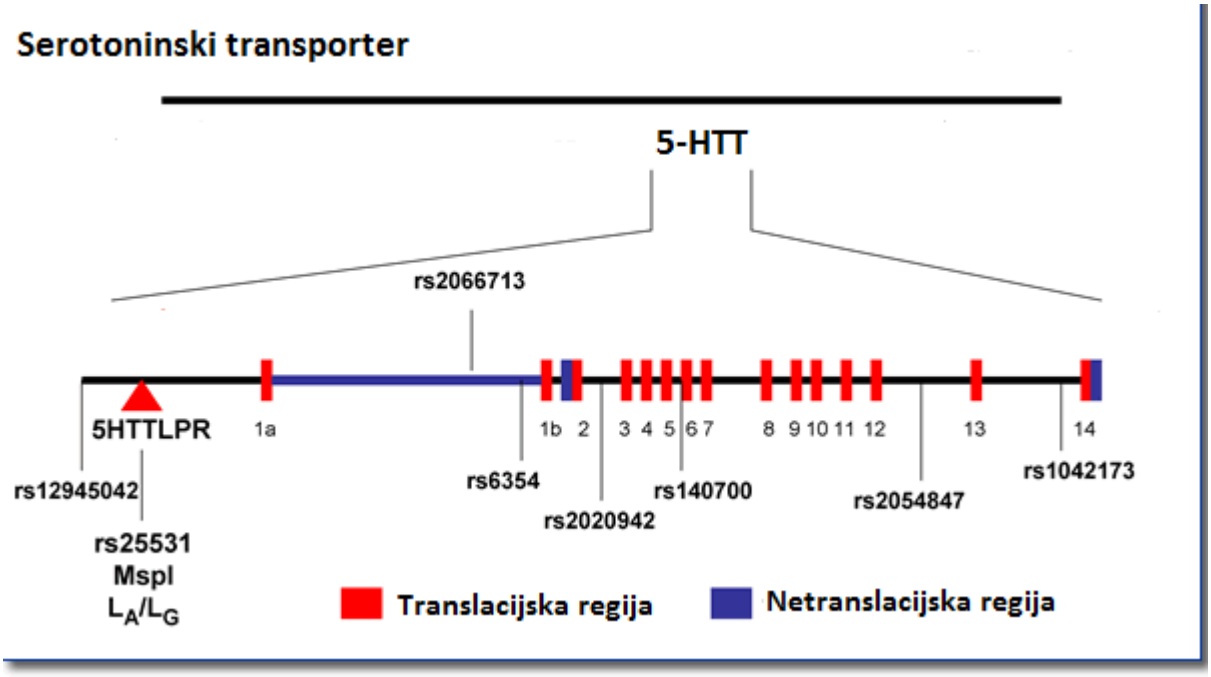
1.14.8 Polimorfizmi gena za 5-HTT

Obzirom na genetsku varijabilnost funkcije 5-HTT, poznata su dva osnovna polimorfizma 5-HTT gena (GenBank accesion no. X70697), a to su 5-HTTLPR i 5-HTTin2VNTR (Lesch 2001).

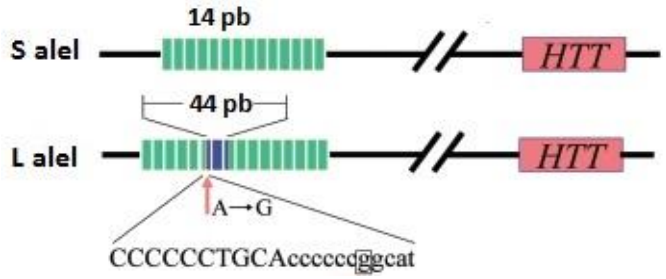
1.14.8.1. Polimorfizam promotorske regije 5-HTTLPR

Promotorska regija gena za 5-HTT (gen SLC6A4) sadrži43 pb insercije/delecije (eng. ins/del, 5HTTLPR) polimorfizma u 5' regulacijskoj regiji gena (Heils 1996). 5-HTTLPR *(engl. 5-HTT gene linked polymorphic region*) je obilježen s dva moguća alela; alel s 16 ponavljajućih jedinica ili dugi alel ili „L" alel *(engl. long, L*) i alel s 14 ponavljajućih jedinica ili kratki alel ili „S" alel (*engl. short, S*) (Lesch 1996). Kod „L" alela je prisutna insercija 44 pb (*engl. base pair, bp*) istog slijeda parova baza, a kod „S" alela prisutna je delecija od 44 pb. Aleli sa 15, 18, 19, i 20 ponavljanja su rijetki (Heils 1996). 5-HTTLPR izravno modulira transkripcijsku aktivnost 5-HTT gena, a polimorfno mjesto se nalazi na gornjem dijelu transkripcijskog startnog mjesta. Ins/del na promotoru se povezuje s varijacijama u transkripcijskoj aktivnosti: duga varijanta „L" s insercijom ima oko tri puta veću bazalnu aktivnost od kratkog promotora „S" s delecijom (Lesch 1996), koji ima za oko 50% nižu transkripcijsku aktivnost gena za 5-HTT u Europljana (Praschak-Rieder, 2007) iako ovo nije jedinstveni podatak (Willeit 2001). Varijanta „S" je dominantnija od „L"

varijante (Heils 1996). U više studija je dokazan utjecaj polimorfizma 5-HTTLPR na serotonergičku funkciju *in vivo*. Nositelji L/L genotipa imaju značajno viši maksimalni unos 5-HT u trombocite u odnosu na nositelje genotipova L/S ili S/S (Nobile 1999, Greenberg 1999). Drugi polimorfizam koji je najbliži 5HTTLPR se nalazi proksimalno od lokusa ins/del je rs25531, pa modulacija polimorfizma 5-HTTLPR polimorfizmom rs25531 rezultira u haplotipovima s visokim (L_A) ili niskim (L_G, S_A i S_G) učinkom (Hu 2006, Martin 2007), a rezultira supstitutima „A“ i „G“ rs25531 SNP (MspI, L/A i L/G) i modulira učinke 5-HTTLPR na transkripciju (Bonvicini 2010). Alel „G“ je u fazi sa „L“ alelom i utječe na transkripciju bolje od „S“ alela, ali ipak slabije od „L“ alela. Dokazano je da SNP (rs25531, A/G) u „L“ formi 5HTTLPR-a može imati funkcionalni značaj (Hu 2006). Češći je alel L_A koji je povezan s višom bazalnom aktivnosti, dok manje česti L_G alel nema transkripcijsku aktivnost veću od „S“ alela. Istraživači ističu kako bi se u analizama povezanosti L_G alel trebao analizirati zajedno sa „S“ alelom. Substitucija alela G za A u SNP, proizvodi i MspI restrikcijsko mjesto (CCGG) koje formira bazu analitičke strategije. Sekvencu 5-HTTLPR regije prvi opisuje (Heils 1996).



Slika 4. Prikaz promotorske (translacijske) regije i intronske (netranslacijske) regije gena za serotoninski transporter. Preuzeto uz izmjene od Anchordoquy, adaptirano prema Heils et al, 1996 and Lesch et al, 1996.



Slika 5. Promotorska regija gena za serotoninski transporter (5-HTTLPR). Preuzeto uz izmjene od Hu 2006.

Dokazan je utjecaj recentnih stresnih događaja na nastanak depresije i suicidalnih ideja u nositelja „S“ alela na 5-HTTLPR (Caspi 2003). Rezultati nedavnih studija dokazuju povezanost genotipa S/S) na 5-HTTLPR i upalnog odgovora na akutni psihosocijalni stres u mladih žena, pri čemu nositelji S/S genotipa na 5-HTTLPR imaju viši omjer proupalnih u odnosu na protuupalne citokine (Il-6/IL-10) i pokazuju tzv. proupalnu sklonost u odnosu na nositelje dva duga alela L/L (Fredericks 2009). Važni su i dokazi o povezanosti između terapijskog odgovora na inhibitore ponovne pohrane serotonina (*engl. selective serotonin reupatke inhibitors, SSRI*) i polimorfizma 5-HTTLPR u bolesnika s depresijom (Lesch 2005). Opće prihvaćene teze o složenim interakcijama geni x geni i geni x okoliš u regulaciji plasičnosti mozga i individualnim razlikama u odgovoru na lijekove, snažno podupiru koncept razvoja psihofarmakogenetike. Budući da rezultati upućuju na slabi pojedinačni, ali mogući kombinirani učinak oba polimorfizma 5-HTTLPR i 5-HTTin2VNTR polimorfizama na ekspresiju gena za 5-HTT (Hranilović 2004) aktualno se analiziraju oba polimorfizma za 5-HTT.

1.14.8.2. Polimorfizam intronske regije 5-HTTin2VNTR

Polimorfizam na intronskoj ili netranslacijskoj regiji koja djeluje samo kao transkripcijski regulator, uključuje varijabilni broj ponavljajućih sljedova veličine 17 bp (*engl. variable number of tandem repeats, VNTR*) u drugom intronu gena 5-HTT (tzv. polimorfizam VNTR-in2 (Lesch 1994, Lesch 2001). Može sadržavati različiti broj parova baza: 9, 10 („s“, kratki alel) ili 12 kopija („l“, dugi alel) od 16 ili 17-ponavljanja parova baza (Ogilvie 1997). Iako intronski dio gena nije podložan transkripciji, oba alela „s“ i „l“ mogu povećati transkripcijsku sposobnost, a „l“ alel ima veći učinak od „s“ alela (MacKenzie Qionn 1999). Brojne su i studije u području neuroznanosti koje istražuju strukturu i funkciju gena za 5-HTT u normalnim uvjetima i kod promijenjene homeostaze serotonina analizirajući promjene transkripcije 5-HTT u SŽS i trombocitima (Jernej 1995).

U većini istraživanih populacija utvrđena je slijedeća distribucija između dva lokusa na 5-HTT: umjerena distribucija (Europljani), vrlo jaka (nativni Amerikanci) i gotovo odsutna (Kinezi, Koreanci i Japanci) (Gelenter 1999, Noskova 2008). Dvije varijante alela na promotoru 5-HTTLPR različito moduliraju transkripciju 5-HTT gena. S i s aleli funkcionalno su manje efikasni (Heils 1996). Ovi nalazi potvrđeni su i u perifernim stanicama, otkrivajući limfoblaste L/L homozigote koji imaju višu stopu 5-HTT mRNA transkripcije, bolje vežu 5-HTT ligande i imaju bolji 5-HT unos od onih koji sadrže najmanje jednu kopiju «S» alela (Lesch 1996). Prvo istraživanje odnosa polimorfizama promotorske regije 5-HTTLPR i trombocitne 5-HTT kinetike prije i nakon tretmana antidepresivima pokazala je da inicijalni afinitet i genotip 5-HTT može utjecati na varijabilnost u ishodu studija u liječenju depresije (Rauch 2002). Polimorfizmi 5-HTTLPR utječu na unos 5-HT u trombocite (Greenberg 1999), (Nobile 1998), vezanje 5-HT (Stoltenberg 2002) i koncentraciju 5-HT u trombocitu (PSL) (Hanna 1998). 5-HTTLPR regija ima funkcionalne posljedice na 5-HTT ekspresiju u neuronima i tkivima (Mortensen 1999), otpuštanje (Heinz 2000) i funkciju (Hariri 2002) neuronalnog 5-HTT, iako neke studije nisu uspjele dokazati alel-specifične funkcionalne razlike.

Intronska regija 5-HTTin2VNTR djeluje kao regulator transkripcije 5-HTT gena. Alel sa 12-ponavljanja tzv. dugi alel (*engl. long, l*) ima jači učinak na transkripciju od tzv. kratkih alela (*engl. short, s*) sa 9 ili 10 ponavljanja. Osim broja ponavljanja i sama primarna struktura 5-HTTin2VNTR domene bi mogla utjecati na transkripciju gena (Lovejoy 2003). Funkcionalne posljedice polimorfizama intronske regije 5-HTTin2VNTR ispitivane su u samo dvije studije i nisu pokazale značajniji učinak ovog polimorfizma na unos (prema engl. *uptake*) 5-HT u trombocite (Ito 2002,

Kaiser 2002) ili na koncentraciju 5-HIIA u cerebrospinalnom likvoru (Jonsson 1998). Kasnije studije dokazale su povezanost polimorfizama intronske regije sa značajno višim razinom metabolita norepinefrina u homozigota l/l (12/12 pb).

Dakle, obje polimorfne regije gena za 5-HTT bile su predmetom istraživanja, osobito u psihijatriji. Razultati govore kako 5-HTTLPR ima umjereni utjecaj na ponašanje, genetski čimbenici doprinose 40-60% vjerojatnosati u osobnosti. To je konzistentno sa stavom da je utjecaj pojedinačnog polimorfizma na promjene u ponašanju kod čovjeka slab. Učinci polimorfizama na anksioznost, depresiju i agresivno ponašanje, uloga „S“ alela koji ima slabiju funkciju, povezuje se s različitim afektivnim bolestima kao što su depresija, bipolarni poremećaj, anksioznost, poremećaji hranjenja, ovisnosti, neurodegenerativne bolesti (Lesch 2003, Lesch 1998), ali i s nizom psihosomatskih bolesti kao što su tip 2 diabetes melitusa (Iordanidou 2009), iritabilni kolon (Jarrett 2007) i dr. Suprotno, hiperaktivnost 5-HTT povezuje se s nastankom ADHD sindromom (*engl. attention-deficit/ yperactivity disorder*), opsesivno kompulzivnim poremećajem (*engl. obsessive-compulsive disorder-OCD*) i autizmom (Lesch 2003). Analizom pomoću event-related potentials (ERP) ili funkcionalnog MRI (fMRI) mozga, dokazan je modulacijski učinak 5-HTTLPR na aktivnost prefrontalnog korteksa i amigdale. Ispitanici s jednim ili dva „S“ alela na 5-HTTLPR pokazuju višu prefrontalnu aktivnost u odnosu na ispitanike s „L“ alelom , što indicira da se „S“ alel na 5-HTTLPR povezuje s pojačanom aktivnosti prefrontalnog korteksa. Ovi nalazi upućuju na povezanost između kognitivnih funkcija i alelnih varijanti 5-HTT funkcije. Isto tako ispitanici sa barem jednom kopijom 5-HTTLPR „S“ alela pokazuju jači odgovor amigdala, što je vidljivo na fMRI u odgovoru na stimulus (Hariri 2002) u usporedbi sa visoko aktivnim alelom „L“, indicirajući različitu ekscitabilnost amigdale na emocionalne stimuluse mogu doprinijeti pojačanom strahu i anksioznosti. Dakle, genetske varijante 5-HT funkcije pridonose odgovoru moždanih regija rezultirajući odgovarajućim emocionalnim ponašanjem čime se bavi funkcionalna genomika mozga objektivizirajući različito informacijsko procesuiranje i odgovor mozga u odnosu na genske varijante.

Ispitivan je i utjecaj polimorfizama 5-HTT na gensku ekspresiju mRNA, a autori su se većinom usmjerili na ispitivanje učinaka jednog polimorfizma na ekspresiju i funkciju 5-HTT, a malobrojne su studije sipitivale odvojene i/ili kombinirane učinke promotorskih 5-HTTLPR i intronskih VNTR-in2 polimorfizama na perifernu transkripciju 5-HTT (Kaiser 2002, Hranilović 2004) i koncentraciju 5-HT. U dvije studije dokazan je različiti utjecaj polimorfizma 5-HTTLPR na razinu 5-HTT mRNA u mozgu i periferiji (Lesch 1996) u shizofreniji (Hranilovic 2004) i to *S*

alel je povezan s nižom ekspresijom. Prisutnost jednog ili dva „S“ alela (S/S, S/L) značajno snižava razinu transkripcije 5-HTT koja je za 60-70% niža u mozgu i oko 30% niža u limfoblastima u odnosu na analogne regije u L/L homozigota. Može se zaključiti da je genotip L/L «visoke ekspresije», a genotipovi L/S i S/S niže ekspresije. Međutim, iako je razlika u ekspresiji oko 30% u obje studije između genotipskih grupa, nije statistički značajna već samo indikativna. Može se zaključiti kako postoji kombinirani učinak promotorskih 5-HTTLPR i intronskih 5-HTTin2VNTR polimorfizama na gensku ekspresiju 5-HTT-a koji sadrži tri mjesta za fosforilaciju protein kinazom C i protein kinazom ovisnom o cikličkom adenozin mono fosfatu (cAMP). Iako kodirani istim genom, 5-HTT neurona i trombocita razlikuju se po genskoj transkirpciji zbog razlika u stupnju glikoziliranosti proteina (Barker 1996). Pretpostavlja se kako se regulacija ekspresije gena za 5-HTT odvija kratkoročno ili akutno i dugoročno ili kronično.

a) Kraktoročna regulacija ekspresije (broj i funkcija) 5-HTT gena na membrani odvija se post-translacijskim modifikacijama transportera, gdje promjena stupnja fosforiliranosti, posredovana protein-kinazama i fosfatazama utječe na njegovu distribuciju na membrani i na kapacitet unosa 5-HT kroz membranu (Marazziti 1999). Ekspresija gena za 5HTT na staničnoj membrani ovisi o izvanstaničnoj koncentraciji 5-HT i predstavlja vrlo osjetljiv homeostatski mehanizam koji istančano usklađuje kapacitet 5-HT transporta s fluktuirajućim koncentracijama 5-HT (Ramamoorty 1999).

b) Dugoročna regulacija ekspresije gena za 5-HTT temelji se na regulaciji transkripcije gena za 5-HTT, što za posljedicu ima smanjeni ili povećani broj molekula proteina 5-HTT na membrani (Rattray 1994).

Aktivni unos 5-HT u stanicu slijedi saturacijsku kinetiku tj. kinetiku zasićenja i opisuje se kinetskim konstantama: Vmax i Km i u skladu s Michaelis-Menten-ovim zakonom enzimske kinetike (Streyer 1995).

1.15. Neuroimunoendokrina regulacija u pSS

Primarni i sekundarni imuni ili limfoidni organi inervirani su simpatičkim noradrenergičkim vlaknima. Sve imune stanice imaju receptore za veće molekule neuroendokrinog sustava, neurotransmitere kao što su kateholamini; 5-HT, adrenalin, hormone; glukokortikoide, CRH, estrogene, androgene, a svi oni mogu utjecati na subpopulaciju i funkciju imunokompetentnih stanica, uključujući i oslobađanje citokina (Kemeny 2007). U sistemskoj upali, hipotalamus oslobađa CRH i arginin-vazopresin, koji stimuliraju oslobađanje hormona hipofize ACTH, koji stimulira sekreciju hormona nadbubrežne žlijezde; glukokortikoida, mineralokortikoida i androgena. Imuni sustav suprimiran je na više razina:

a) Izravno, promjenom transkripcije gena ili sekrecijom važnijih proupalnih citokina; IL-1, IL-6, TNF-α koji aktiviraju HHN os neovisno, ili u kombinaciji kada su njihovi učinci sinergistički; IL-6 povisuju koncentraciju ACTH i kortizola u plazmi na razinu čak i višu od one koja se postiže maksimalnom stimulacijom CRH Nadalje, hipofiza oslobađa prolaktin, β-endorfin, melanocit-stimulirajuće hormone (α-MSH) i druge peptide koji stimuliraju tiroidnu žlijezdu i gonade (Sternberg 2001). Nekoliko cirkulirajućih medijatora imaju važnu ulogu u izravnoj aktivaciji središnjeg i perifernog neuroendokrinog sustava za vrijeme upale.

b) Neizravno upala može aktivirati HHN os stimulacijom središnjeg noradrenergičkog sustava citokinima i drugim medijatorima koji najprije aktiviraju neurone stresnog-sustava, izvan krvno-moždane barijere ili neurone unutar barijere.

c) Noradrenergički i CRH stresni sustav u upalnim mjestima stimulirani su preko nocicepcijskih i somatosenzornih aferentnih vlakna ascendentno spinalnim ili moždanim putem.

d) Drugi upalni medijatori (faktor aktivacije trombocita, PAF, INF-α, INF-γ, IL-2, TGF-β, epidermalni faktor rasta) mogu također sudjelovati u regulaciji HHN osi.

S druge strane, neki imunoregulacijski citokini; IL-2 i IL-4, mogu inhibirati suprimirajući učinak glukokortikoida na T-limfocite smanjujući afinitet za njihove receptore (Sternberg EM 2001, Chrousos 1995). Ove činjenice upućuju na važnost povezanosti između hiperimunih stanja i neuroendokrine osi što rezultira autoimunim bolestima. Hipofunkcija stresne HHN osi dokazana je u mnogim bolestima; RA (Neck 1990, Gutierrez 1999), SLE (Gutierrez 1998), fibromialgija

(Crofford 1994) i pSS (Johnson 1992). Lokalna neuroendokrinoimuna kontrola na mjestu upale posredovana je neurotransmiterima na živčanim završecima (Sternberg 2006) čija efektorska vlakna oslobađaju različite neuropeptide od kojih neki imaju protuupalnu aktivnost (opioidi, NY i VIP, inhibirajući monocite za produkciju proupalnih citokina i stimuliraju produkciju protuupalnog citokina IL-1 koji inhibira funkciju NK-stanica. Ostali neuropeptidi koji imaju proupalno djelovanje su CRH, supstanciju-P, kalcitoninski peptid (prema engl. *calcitonine-gene-related peptide, CGRP*), stimulirajući makrofage na sekreciju IL-1, IL-6, TNFα i aktiviraju NK-stanice.

1.15.1 Periferni neuroendokrini sustav

Slinovnice su bogate neuroendokrinim molekulama, receptorima za neurotransmitere i hormone. Osim muskarinskih i kolinergičnih receptora, pronađene su i druge molekule kao što su VIP i neuropeptid Y. Sekrecija slinovnica i suznih žlijezda pod kontrolom je perifernog autonomnog sustava koji se prenose od lakrimalnih i salivatorne jezgara mezencefalona prenose do egzokrinih žlijezda stimulirajući sekreciju, a ove jezgre su pod utjecajem viših kortikalnih centara, što upućuje na mogući utjecaj reverzibilne nuspojave tricikličkih antidepresiva i klinidina (prema engl. *clinidine*), uzrokujući suhoću sluznica. U slinovnicama signali iz SŽS utječu na epitelna i stromalna tkiva preko neurotransmitera i njihovih receptora smještenih na površini ovih stanica. Glavni signalni neurotransmiteri su acetilkolin i VIP. Kolinergička vlakna stimuliraju sekreciju sline aktivacijom muskarinskih receptora na epitelnim stanicam slinovnica. Eferentna adrenergička vlakna oslobađajući norepinefrin utječu i na lokalne krvne žile. U stresu su povišene koncentracije VIP i NPY što upućuje na njihovo povećano otpuštanje iz upalnog tkiva ili kao kompenzaciju za smanjenu salivaciju. Ipak, još uvijek nije jasno, kako upalne molekule na mjestu upale ulaze u interakciju s neuroendokrinim molekulama. Činjenica da limfocitna infiltracija slinovnica ne korelira sa stupnjem oštećenja tkiva slinovnica niti sa subjektivnom i objektivnom suhoćom sluznica, upućuje na vjerojatnu uključenost drugih mehanizama nastanka suhoće sluznica. Sekretorna disfunkcije bi se mogla objasniti:

a) Oštećenom inervacijom rezidualnih žljezdanih elemenata i smanjenom gustoćom acetilkolinskih receptora na žljezdanim stanicama

b) Otpuštanjem citokina, protutitijela i drugih upalnih medijatora od strane limfocita koji bi mogli uzrokovati smanjeno otpuštanje neurotransmitera i smanjeni odgovor rezidualnih žljezdanih stanica na preostale neurotransmitere ili blokadom receptora. Citokini (TNF-α i IL-1) u upalnom tkivu mogu inhibirati otpuštanje acetilkolina uzrokujući neadekvatnu

sekreciju sline. Neadekvatna lokalna stimulacija sekrecije sline rezultira aktivacijom kompenzacijskih mehanizama, uključujući aktivaciju muskarinskih receptora na epitelu stanica (Beroukas 2002). Povećana razina upalnih proteina u upalnom tkivu pokreće mehanizam autoantigene prezentacije i produkcije antitijela doprinoseći nastanku bolesti (Casciola-Rosen 2005). U bolesnika s pSS dokazana su i autoprotutijela na muskarinske receptore M3 (Dawson 2004) koja izravno inhibiraju porast intracelularnog kalcija, što može upućivati na ulogu antitijela u smanjenjoj produkciji sline u bolesnika s pSS (Dawson 2006).

Tablica 5. Neuroendokrine molekule u slinovnicama

NEUROENDOKRINE MOLEKULE U SLINOVNICAMA
Acetilkolin
Norepinefrin
Muskarinski receptori
VIP
NPY
Acetilkolinski receptori

1.15.1.1 Os limbički sustav-hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (LHHN) klasični neuroendokrini krug

Ontogenetski gledano, sustav odgovora na stres u sisavaca je os limbički sustav hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (LHHN) (Keller-Wood 1984). Limbički sustav (prefrontalni korteks, hipokampus, amigdala i septum pelucidum) prima stresne impulse koji aktiviraju paraventrikularnu jezgru hipotalamusa (PVNH), a ona transformira stresni input u endokrini odgovor otpuštajući CRH, što stimulira ACTH adenohipofize, a potom glukokortikoide nadbubrežne žlijezde. Glukokortikoidi inhibiraju vlastito otpuštanje inhibirajući sekreciju i sintezu ACTH i CRH. Kronična izloženost višim razinama glukokortikoida ima višestruke destruktivne učinke (Vidović 2011).Inhibicija glukokortikoida odvija se kroz tri neovisna mehanizma (osjetljivi, intermedijarni i odgođeni feedback) (Keller-Wood 1984).

a) Brza povratna sprega (prema engl. *feedback*) je rapidni fenomen, traje nekoliko minuta, kada se nadzire relativni porast glukokortikoida, a inhibicija se postiže njihovim vezanjem u hipokampusu i hipotalamusu.

b) Intermedijarna i odgođena povratna sprega odvijaju se satima i danima, kada translocirani kompleks glukokortikoid-receptor djeluje na razini transkirpcije gena za CRH, suprimirajući njegovu ekspresiju (Funder 1986). Pretpostavlja se da tako djeluje i na serotonergičke strukture.

Iako glukokortikoidi mogu izravno inhibirati CRH neurone hipotalamusa, to se odvija preko hipokampusa i inhibicijom ACTH. Poznato je da veće lezije hipokampusa uzrokuju porast CRH mRNA kod kronično povišenog kortikosterona i ACTH. Očito je da hipokampus kontrolira stresnu os na složeni način, modulirajući bazalne razine, magnitudu inicijalnog stresa i završetak odgovora. Jasno je i da su ove funkcije posredovane složenim krugovima s jedinstvenim anatomskim, biokemijskim i funkcionalnim značajkama. Hipokampus je središnja komponenta limbičkoga kruga i ključan je u kontroli kognitivnih i psihičkih funkcija, integrirajući psihološki i fiziološki odgovor na stres. GABA inhibira sekreciju kortizola induciranu stresom, (Acs 1978) i inhibira oslobađanje CRH inducirano serotoninom i acetilkolinom in vitro (Hillhouse 1989).

1.15.1.2 Os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HHN) u pSS

HHN os, simpatički i adrenomedularni sustavi predstavljaju periferni odjeljak tzv. stresnog sustava, čija je glavna funkcija održavati bazalnu i homeostazu u stresu. HHN os je primarno regulirana preko CRH koji stimulira sekreciju ACTH za oslobađanje kortizola koji negativnom povratnom spregom suprimira CRH i ACTH. Interakcija između HHN osi i imunog sustava je vrlo važna. Abnormalnosti HHN osi prisutne su u različitim patofiziološkim stanjima, uključujući sistemske autoimune bolesti. Hiperaktivnost HHN osi opisana je u kroničnom stresu, melankoličnoj depresiji, kroničnom alkoholizmu, Cushing-ovu sindromu, zadnjem trimestru trudnoće, dok je hipofunkcija HHN osi utvrđena nakon kroničnog stresa, atipičnoj i sezonskoj depresiji, sindromu kroničnog umora, fibromialgiji, insuficijenciji nadbubrežne žlijezde, hipotiroidizmu, nikotinskoj apstinenciji, nakon glukokortikoidne terapije, postpartalno (Chrousos 1995). Neuroendokrine abnormalnosti u sindromu umora (sindrom kroničnog umora i fibromialgija) povezuju se insuficijencijom nadbubrežne žlijezde centralnog-hipotalamičkog uzroka (Gold 1988 part 1, Gold P 1988 part 2). Hiperaktivnost HHN osi normalan je odgovor na stres ili upalu i mogla bi biti posredovana središnjom i perifernom aktivnošću cirkulirajućih citokina IL-1 IL-6 i TNF-α, koji posreduju između aktiviranog imunog sustava, adenohipofize i steroidogeneze (Imura 1991, Perlstein 1993), rezultat čega je supresija imunog odgovora kroz protuupalne-imunosupresivne učinke glukokortikoida. Bilo bi očekivano da u bolesnika s kroničnim RA, nastupi adaptacija HHN osi. Obzirom da kronična upala potiče sekreciju ACTH, a

sekundarno uzrokuje hipertrofiju nadbubrežne žlijezde, očekuje se povišena sekrecija kortizola što je slučaj u depresiji (Restrepo 1987, Nemeroff 1993). Ipak, u RA je smanjena sekrecija kortizola, unatoč povišenom ACTH u plazmi (Gudbjornsson 1996) što bi moglo biti povezano s kroničnom upalom ili nekim genetskim-konstitucijskim čimbenicima (Masi 1996). GR (NR3C1) i mineralokortikoidni receptori (MR) imaju ulogu u regulaciji HHN osi i sresnoj regulaciji. GR posreduju mnogim učincima kortizola u ciljanim tkivima izravnim vezanjem na hormon-ovisne elemente u DNA i interakcijom s drugim transkripcijskim čimbenicima modulirajući transkripciju gena (DeRijk 2002, Bamberger 1996,). Stanični odgovor na kortizol je determiniran ne samo razinom kortizola već i osjetljivošću GR na kortizol (Bamberger 1996).

Recentne studije dokazuju kako polimorfizmi GR su ključan čimbenik u velikoj interindividualnoj varijabilnosti aktivnosti HHN osi, serumskoj razini markera HHN osi, i GC osjetljivosti tkiva u populaciji (DeRijk 2002, Rohleder 2003). Malobrojne su dokazane mutacije gena za GR (Spijker 2009, Van Rossum 2006). Poznata su četiri polimorfizma GR gena koji imaju utjecaj na GR osjetljivost, a koja se povezuje s afektivnim poremećajima (Bet 2009). Polimorfizam *ER22/23EK* se povezuje sa smanjenom osjetljivosti GR. Polimorfizam *N363S* A/G SNP povezuje se sa povećanom supresijom kortizola i povećanim odgovorom inzulina nakon deksametazonskog testa. Polimorfizam BclI karakteriziran kao C/G SNP također se povezuje s povećanom supresijom kortizola nakon oralne primjene deksametazona (Stevens 2004) Polimorfizam *Bcll*, povezuje se sa smanjenom osjetljivosti na gluikokortikoide i hiperfunkcijom HHN osi, dok varijante *N363S* niti *ER22/23EK* nisu značajnije povezane s hormonskim niti antropometrijskim parametrima. Bolesnici homozigoti za BclI polymorphism G/G češće imaju antropometrijske (abdominalni adipozitet) ili metaboličke abnormalnosti (viši „body mass index“ (BMI), razina glukoze u krvi bazalno i nakon testa opterećenja glukozom (OGTT), viši kolesterol i trigliceridi u krvi) u odnosu na nositelje tzv. Wild-genotipa C/C ili heterozigote V/G. Nositelji G/G genotipa imaju izraženiji abdominalni adipozitet, intoleranciju glukoze ili dijabetes melitus i dislipidemiju, dok je niži postotak bolesnika nositelja C/C ili C/G koji pokazuju takve antropometrijske ili metaboličke abnormalnosti (Giordano 2012) Polimorfizam 22/23EK je povezana s nižim Indeksom slobodnog kortizola (*engl. Free Cortisol Index*) u djetinjstvu. Heterozigoti za *BclI* varijantu, nasuprot onima sa tzv. wild-type and BclI homozigotima imaju niži stupanj vezanja kortizola za globulin, višu razinu slobodnog serumskog kortizola i višu ekspresiju GR, hiperosjetljivost na glukokortikoide i hiperfunkciju HHN osi i kod njih je prisutan nesupresorski učinak deksametazona na razinu kortizola i ACTH u deksametazon-supresijskom testu u oko 80% bolesnika, i skloni su većim depresivnim epizodama i

imaju lošiji terapijski odgovor na antidepresive. Četvrti polimorfizam A/G SNP je na exon 9beta i može pridonositi sniženoj osjetljivosti GR porastom GRβ-mRNA stabilnosti (DeRijk 2001). Epidemiološke studije dokazale su izravnu povezanost ovih funkcionalnih GR polimorfizama i afektivnih poremećaja (Van West 2006) dokazali su alelnu i genotipsku povezanost između veće depresivne epizode (engl. major depressive disorder, MDD) i polimorfizma 22/23EK u švedskoj populaciji, ali to nije dokazano i u Belgijskoj populaciji (Van West 2006, Van Rossum 2006) opisuju povezanost između 22/23EK, *N363S* i homozigota *BclI* i unipolarne depresije. Iako genetski čimbenici povećavaju rizik za razvoj depresije za oko 40–70%, i čimbenici okoliša, stresne situacije imaju važnu ulogu. Ovi podaci upućuju kako patogeneza multifaktorijelnih bolesti poput depresije je rezultat interakcije varijanti gena u kombinaciji s čimbenicima okoliša. Dokazana je interakcija geni-okoliš (G x E) između polimorfizama za GR gene otkrivajući osjetljive fenotipove za razvoj klinički relevantnih depresivnih simptoma u odrasloj dobi. Ova G-E interakcija se također odražava na hormone HHN osi podupirući uključenost HHN osi u stresu i patogenezi depresije (Bet 2009). Polimorfizam *ER22/23EK* se povezuje s rezistencijom na glukokortikoide i hipofunkcijom HHN osi, ali boljim terapijskim odgovorom na antidepresive i boljim kognitivnim funkcijama u odnosu na polimorfizam *BclI,* ali ne i zdrave kontrole, stogastoga homozigoti za *BclI* i *ER22/23EK* polimorfizme imaju povećani rizik za razvoj veće depresivne epizode. Ovi rezultati upućuju kako bi polimorfizmi gena za GR u interakciji s čimbenicima okoliša (npr. stres), mogli imati važnu ulogu u patofiziologiji depresije i varijabilnosti terapijskog odgovora na antidepresive. Mutacije GR gena uzrokuju generaliziranu rezistenciju GR na kortizol, pa se kortizol pojačano vezuje za mineralokortikoiodne receptore (MR) što uzrokuje hiperstimulaciju HHN osi i pojačanu sekreciju hormona hipofize, oštećena je negativna povratna sprega glukokortikoida, dolazi do hiperstimulacije HHN osi, pojačane sekrecije CRH i ACTH, hiperstimulacije nadbubrežne žlijezde i konačno hiperprodukcije androgena što može uzrokovati hirzutizam i hipertenziju. Povezanost polimorfizama za GR i MR i depresije otkriva kombinirane učinke genetsko-endokrine osnove i omogućuje homogeniziranje bolesnika u grupe za koje se može predvidjeti ishod liječenja i rizik relapsa depresije.

U pSS je utvrđena hipofunkcija HHN osi uz blago statistički značajno snižene bazalne vrijednosti i kortizola i ACTH (Johnson 2006), iako se u nekim studijama sinteza kortizola pokazala intaktnom, uz samo snižene serumske koncentracije androgena odosno povišen omjer kortizol/dehydroepiandrosteron-sulfata prema (prema engl. *dehydroepiandrosteron-sulfate*) (Valtysdottir 2001) iako naknadno, u recentnim studijama na 60 bolesnika s pSS davanje

dehidroepiandrosteron-sulfata nije dovelo do poboljšanja simptoma umora niti depresivnosti (Hartkamp 2008). Interakcija između neurotransmisije 5-HT i HHN osi sustavno se istražuje zadnjih 30-tak godina, ali mehanizam ove interakcije nije do kraja razjašnjen. 5-HT aktivira HHN os stimulacijom hipotalamusa preko 5-HT_{2C} receptora (5-HT_{2C}Rs) u PVHN. Genetska inaktivacija 5-HT_{2C}R smanjuje ekspresiju CRH mRNA i reducira oslobađanje CRH (Heisler 2007). Oba stresna hormona CRH i kortizol povezuju se s depresijom, zbog svog izravnog učinka na 5-HT sustav. Značajan porast ili pad glukokortikoida u mozgu se povezuju s depresijom, a agonisti i antagonisti glukokortikoidnih receptora (GR) imaju antidepresivni učinak. Stresan život često prethodi epizodi veće depresije (Holsboer 2001, Parker 2003), stoga bi upravo utjecaj stresa na HHN os mogao biti ključan element veće depresivne epizode, a moguće i drugih psihičkih poremećaja, što se intenzivno istražuje.Mehanizmi aktivnosti vrlo su složeni, jer GR koji djeluju kao transkripcijski faktor pa mogu pozitivno ili negativno regulirati - akutno, ili čak mijenjati – kronično, ciljane gene, među kojima i one za serotonin (Schulkin 1998, Reul 2002). GC koji se nalaze u različitim regijamam mozga, reguliraju produkciju CRH. GR stimuliraju ekspresiju CRH u limbičkim regijama (amigdala), a negativnom povratnom spregom inhibiraju sekreciju CRH. Recentni podaci govore kako porast kortizola i oštećena glukokortikoidna signalizacije dovode do disregulacije HHN osi u gotovo svih psihijatrijskih bolesnika u usporedbi sa zdravim kontrolama. U deksametazonskom testu (en*gl. dexamethason supression test, DST*) i u deksametazon/CRH testu (DEX/CRH), u depresivnih bolesnika kortizol i ACTH ostaju povišeni što je pokazatelj disfunkcije HHN osi i ujedno je prediktor relapsa bolesti. Glukokortikoidi se vežu na GR i mineralokortikoidne receptore MR, široko su rasprostranjeni u mozgu, a najviše ih ima u hipokampusu, prefrontalnom korteksu i PVHN, amigdali i girus dentatusu. MR se nalaze u hipokampusu, amigdali i prefrontalnom korteksu. U normalnim okolnostima, kortizol se veže samo na MR, dok se u stresu veže i za GR, što znači da su MR uključeni u odgovor na stres, a GR limitiraju reakciju na stres i promoviraju pohranu memorije i planiranje (Gesing 2001). Blokada MR kortizolom u mozgu vodi aktivaciji HHN osi u stresu i normalnim okonostima. U kroničnom stresu ovaj balansirajući sustav je poremećen što rezultira poremećajima raspoloženja i kognitivnim difunkcijama (Pariante 2006, Pariente 2009). Dokazana je smanjena ekspresija GR mRNA u stanicama periferne krvi bolesnika s depresijom (Matsubara 2006) i u mozgovima bolesnika s većom depresivnom epizodom (prema engl. *major depressive disorder, MDD*). Kao kompenzaciju za ovu disfunkciju i rezistenciju GR (glukokortikoidna rezistencija), raste razina kortizola, ACTH i CRH, a u mozgu je disregulacija HHN osi povezana s neuroendokrinim i čak anatomskim promjenama. Neuroendokrine promjene zahvaćaju kateholaminski sustav; dopamin i

adrenalin utječući na srčani ritam i krvni tlak, te serotonin, 5-HT sustav utječući na raspoloženje, ponašanje i kognitivne funkcije. Glukokortikoidi slabe aktivnost 5-HT neurona**,** smanjuju ekspresiju tj. broj 5-HT_{1A} receptora i njihovu sposobnost vezanja serotonina, utječući tako izravno na promjene raspoloženja u smislu depresivnosti. CRH je drugi regulacijski hormon u mozgu koji se povezuje s depresijom oštećenjem negativne povratne sprege s glukokortikoidima (Van Praag 2004). Hipersekrecija CRH može biti posljedica smanjene osjetljivosti (*engl. downregulation*) središnjih GR na glukokortikoide kao posljedica kroničnog stresa. Anatomske promjene u depresiji su smanjen volumen hipokampusa, amigdala i prefrontalnog korteksa koji reguliraju pamćenje, emocije i egzekutivne funkcije (Sheline 1999). PET studije pokazuju hipermetabolizam desnog hipokampusa i hipometabolizam frontalnih regija mozga, koje regrediraju nakon terapije, što upućuje na utjecaj disregulacije GC u ovim regijama mozga.

1.15.1.3 Os hipotalamus-hipofiza-gonade (HHG)

Spolni hormoni; estrogeni, progesteron i androgeni imaju određene imunološke učinke. Estrogeni suprimiraju stanični, a pojačavaju humoralni odgovor, pa manjak estrogena pridonosi nastanku pSS čemu u prilog ide podatak da većina bolesnica s pSS razvija prve simptome u perimenopauzi. Androgeni suprimiraju stanični i humoralni odgovor. Estrogeni receptori, odnosno α i β (ERα i ERβ) mRNA pronađeni su u tkivu slinovnica (Leimola-Virtanen 2000). Estrogen suprimira nastanak pSS, dok ovariektomija vodi stanju sličnom pSS (Ishimaru 2003). Moguće je da dugotrajni manjak estrogena uzrokuje autoimunu egzokrinopatiju tipa pSS. Fiziološke doze estrogena uklanjaju nakupljanje T-limfocita u slinovnicama (Carlsten 1992). Manjak enzima aromataze pogoduje nastanku egzokrinopatije slične pSS u miševa što nije dokazano i u čovjeka, a fitoestrogeni mogu prevenirati nastanak pSS (Shim 2004). Fiziološke koncentracije estrogena pojačavaju imuni odgovor, tj. imunoreaktivnost, dok suprafiziološke doze suprimiraju imuni odgovor. Iako svi podaci indiciraju ulogu estrogena u nastanku pSS, uloga estrogena u imunoregulaciji ostaje nejasna. Žene s pSS imaju niže razine androgena u krvi, pa se smatra kako bi upravo manjak androgena mogao biti ključan čimbenik u patogenezi pSS (Sullivan 1999), a glukokortikoidi bi mogli dodatno utjecati regulacijom receptora za spolne hormone i neurotransmitere (serotonin, dopamin, noradrenalin), a mogu mijenjati i njihovu konfiguraciju.

Prolaktin (PRL) je imunostimulirajući hormon, aktivira T-limfocite, potiče stanični imuni odgovor i ima proupalni učinak (Jara 1991, Walker 1993). Hiperprolaktinemija se povezuje s organ-specifičnim upalnim bolestima, npr. s aktivnom fazom SLE i autimunog tiroiditisa, a utvrđene su povišene vrijednosti i u pSS i fibromialgiji. Uočena je složena interakcija PRL i citokina. IL-6 potencijalno stimulira sekreciju PRL u autoimunim bolestima, a IL-6 je povišen u pSS (Berczi 1992). U sklopu smanjenog odgovora HHN osi, PRL može pridonositi patogenezi autoimunih bolesti, čemu u prilog govori rezultati liječenja bromokriptinom koji suprimira sekreciju PRL i tako inhibira nastanak autoimunih bolesti (Neidhart 1989).

1.15.1.4 Os hipotalamus-hipofiza-tiroidna žlijezda (HHT)

Uloga tiroidnog hormona (*enlg. thyroid hormone, TH*) u disfunkciji HHN osi i patogenezi autoimunih-upalnih bolesti nije razjašnjena, ali postoji povezanost između disfunkcije štitne žlijezde, neuropsihijatrijskih bolesti i autoimunih-upalnih bolesti. TH ima važnu ulogu u sazrijevanju i modulaciji funkcije HHN osi. Hipotiroidizam se povezuje s insuficijencijom nadbubrežne žlijezde (Kamilaris 1991).

1.15.1.5 Autonomni živčani sustav u pSS

Bolesnici s pSS pokazuju znakove simpatičke i parasimpatičke disfunkcije u različitim testovima; vasokonstriktorni (VAC) index, koristeći protok krvi kroz kožu prsta; test dubokog disanja, izdisaj/udisaj (E/I omjer); ortostatski test «tilt-table», akceleracijski index (prema engl. *acceleration-index, AI*), «brake» indeks (BI) i ortostatski krvni tlak. Utvrđen je značajno povišen VAC-indeks i snižen EI-indeks, što upućuje na simpatičku i parasimpatičku disfunkciju. Bolesnici seropozitivni na SS-A i SS-B protutijela, imali su poremećenu regulaciju krvnog tlaka u tilt-table testu, dok nije bilo povezanosti između autonomnih funkcija i kliničkih *sicca* simptoma.

1.15.2 5-HT u neuroimunim interakcijama u pSS

Osim u SŽS gdje ima važnu ulogu u nastanku afektivnih bolesti, 5-HT sustav sudjeluje i u imunom sustavu kroz ekspresiju brojnih receptorskih subtipova na imunim stanicama. 5-HT ima važnu ulogu u regulaciji funkcije HHN osi, čemu u prilog govori dokaz da oštećenja rafe jezgara i PVNH uzrokuje smanjen odgovor ACTH i vazopresina na stres. Stimulacija 5-HT_{2A} receptora u hipotalamusu uzrokuje porast vazopresin mRNA. 5-HT djeluje izravno na PVNH stimulirajući sekreciju vazopresina. 5-HT je uključen u bazalnoj i stresom induciranoj regulaciji PRL, ACTH, vazopresina i oksitocina preko 5-HT2A i 5-HT2C receptora, pri čemu CRH ima važnu, ali ne i

cjelokupnu odgovornost za oslobađanje ACTH inducirano serotoninom. Fizički i psihički stres aktiviraju serotonergičke neurone hipokampusa i hipotalamusa. Stres povećava razinu 5-HT u dorzalnoj rafe jezgri (DRN), ali ne mijenja razinu 5-HT u hipotalamusu, a povećava se i metabolizam 5-HT. 5-HT preko svojih receptora u hipotalamusu i hipofizi utječe na sekreciju CRH i ACTH, a moguće i na razini nadbubrežne žlijezde (Jørgensen 2007).

Limfociti sadrže 5-HTT promjenjivog broja (snižena je ekspresija u depresiji) dok je afinitet vezanja nepromijenjen. Do djelomičnog oporavka broja 5-HTT na limfocitima dolazi nakon primjene SSRI. Ovi podaci govore o interakciji između živčanog i imunog sustava. Mehanizmi ove interakcije nisu sasvim razjašnjeni, a mogli bi biti povezani s ekspresijom i funkcijom 5-HTT u limfocitima u određenim bolestima kao što je npr. depresija. Depresija je povezana i s teškim imunološkim poremećajima (Maddock 2001), smanjenom limfocitnom priliferacijom (Zaharia 2000) i drugim promjenama imunog sustava. Osim 5-HTr, na imunim stanicama; T- i B-limfociti, NK-stanice, makrofagi i mastociti, utvrđeni su i adrenergički, GABA-ergički, kolinergički i peptidergički receptori (Hernandez 2002). Aktivacijom nekih od ovih receptora na imunim stanicama promovira se proliferacija tih stanica (Mossner 1999). Imunohistokemijski je utvrđeno da svi limfociti nemaju ove receptore, indicirajući selektivnu ekspresiju prema tipu perifernih stanica. Terapija antidepresivima dovodi do porasta broja 5-HTT i na imunim stanicama, što je povezano s kliničkim poboljšanjem simptoma depresije, što govori u prilog povezanosti između živčanog i imunog sustava u patološkim uvjetima. Nema, međutim povezanosti između težine depresije i broja 5-HTT, afiniteta za vezanje 5-HT i razine 5-HT u plazmi i limfocitima ili 5-HIIA (Lima 2002). Činjenica da limfociti imaju različite podtipove 5-HT receptora i smanjen broj 5-HTT u depresiji, moglo bi rezultirati povećanom aktivacijom 5-HT receptora na limfocitima. Nema značajnih razlika u koncentraciji 5-HT u plazmi i limfocitima u depresiji nasuprot kontrolama, ali dolazi do značajnog smanjenja nakon primjene antidepresiva. Kronična depresija dovodi so smanjenja limfocitne proliferacije u odnosu na akutnu depresivnu epizodu (Zaharia 2000). Unatoč jasnim kriterijima, depresija je heterogena bolest i relacije između živčanog i imunog sustava su kompleksne i varijabilne. U depresiji dolazi do porasta općeg imunog odgovora, broja leukocita i pada broja limfocita, smanjenje aktivnosti NK stanica. Serotonergička disfunkcija u depresiji očituje se padom broja tj. ekspresije 5-HTT i sniženom koncentracijom 5-HT. Izloženost životnim stresovima uz genetsku predispoziciju, povećava rizik za psihičke poremećaje, ali utječe i na stanice imunog sustava (Segerstrom 2004). Akutni stres dovodi do značajne aktivacije upalnih signalnih puteva u imunim stanicama (Bierhaus 2003), porasta cirkulirajućih upalnih čimbenika i

koncentracije kateholamina (Steptoe 2007), promjene citokina, pojačanoj upali koja ima značajnu ulogu u patofiziologiji depresije (Raison 2006). Neravnoteža citokina može pojačati aktivnost enzima indolamin 2,3-dioksigenaze (IDO) koji skreće metabolizam triptofana prema kinureninu i tako smanjuje bioraspoloživost triptofana za sintezu 5-HT čime se snizuje njegova razina u SŽS i periferno u enterokromafinim stanicama. Isto vrijedi i obrnuto, manjak 5-HT može oslabiti proliferaciju i diferencijaciju limfocita i time dovesti do disbalansa citokina, tj. povećati omjer proupalnih IL-6 citokina u odnosu na protuupalne IL-10 citokine i potencirati imunu hiperaktivnost i upalnu reakciju. Depresivni, ali somatski zdravi bolesnici pokazuju porast koncentracije cirkulirajućih proupalnih čimbenika u stresu i izvan njega (Pace 2006). Zaključno, stres potiče upalu koja pak može predisponirati pojedinca za razvoj depresije, ali svatko neće razviti isti proupalni odgovor, niti će svatko razviti depresiju nakon izlaganja stresu.

1.15.3 Neuroendokrine interakcije u pSS

Interakcije između živčanog, imunog i endokrinog sustava, posredovane neurotrasmiterima, citokinima, hormonima, neuropeptidima i njihovim receptorima, imaju važnu ulogu u modulaciji osjetljivosti i rezistenciji na upalne bolesti. Neuroendokrini sustav se sastoji od središnjeg i perifernog dijela (**Tablica 6**). Središnji dio smješten je u locus ceruleusu (LC), centrima autonomnog sustava i paraventrikularnim jezgram u moždanom deblu. Periferni dio sastoji se od simpatičkog-adrenomedularnog sustava, osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HHN) (prema engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA*), hipotalamus-hipofiza-gonadalna osovina (HHG)(prema engl. *hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG*) i neuroendokrinog tkiva u raznim organima u tijelu. Neurotransmiteri, citokini, hormoni i neuropeptidi mogu utjecati na aktivnost limfatičnih organa i stanica preko brojnih podtipova receptora na njihovim membranama, na aktivnost endokrinih i lokalnih autokrinih/parakrinih puteva ili mijenjati funkciju stanica u ciljanim organima. Dokazana je povezanost neuroendokrine disfunkcije s najčešćim reumatskim upalnim bolestima kao što su RA, SLE i SSc i pSS. U pSS koja je prototip autoimune bolesti širokog kliničkog spektra, oštećene su različite funkcije neuroendokrinog sustava (Tzioufas 2008). Prvo, niža je bazalna aktivnost osi HHN povezana sa oslabljenim odgovorom hipofize na egzogeni CRH i sniženi odgovor nadbubrežne žlijezde na ionako sniženi endogeni ACTH, što rezultira značajno nižim vrijednostima kortizola u pSS u odnosu na zdrave kontrole. Drugo, uočena je i insuficijencija osi HHG, uz oslabljeno oslobađanje LHRH i odgođeno oslobađanje LH i FSH na stimulaciju sniženog LHRH što upućuje na centralnu disfunkciju osi HHG u pSS, uz posljedični manjak

androgena i estrogena. Uočena je povezanost manjka androgena i u manjoj mjeri estrogena s nastankom autoimune egzokrinopatije u različitim eksperimentalnim modelima. Nasuprot tomu, bolesnici s pSS imaju povišene bazalni TSH i blagi hipotiroidizam. Ovi podaci upućuju na središnju insuficijenciju sve tri neuroendokrine osi: adrenalnoj, gonadalnoj i tiroidnoj, ali je nejasno ima li jedna od ove tri osi primarnu ulogu u patogenezi pSS. Vjerojatnije je kako se radi o mreži sinergističkih i anatagonističkih učinaka multiplih hormona, tj. da manjak hormona nadbubrežne žlijezde (ACTH i kortizola) i spolnih hormona (LH, FSH) i hormona štitnjače (T3 i T4) uz povišen TSH i PRL, ima snažni učinak u bolesnikia s pSS, potičući staničnu imunost (Johnson 2000). Egzokrine žlijezde bogate su neuroendokrinim molekulama koje se upravo povezuju s lokalnim autoimunim lezijama. Kliničke manifestacije pSS, *sicca* sindrom, umor, bol, fibromialgije i psihičke smetnje i psihosocijalni poremećaji mogu se jednostavno objasniti poremećajima neuroendokrine osi. S druge strane, učinci upale za vrijeme lokalne ili sistemske autoimune reakcije i njihove interakcije sa stanicama i medijatorima neuroendokrinog sustava, su nerazjašnjene. Poremećaji u HHN osi utječu na upalni odgovor. Interakcija između živčanog, imunog i endokrinog sustava predstavlja funkcionalnu jedinicu, tzv. neuroendokrinoimunološku os koja ima važnu ulogu u modulaciji osjetljivosti ili rezistenciji na upalne i autoimune bolesti, a odvija se na više razina:

a) sistemskoj, kroz protuupalne akcije različitih hormona (npr. glukokortikoidi) koji se oslobađaju stimulacijom HHN osi i

b) regionalnoj, kroz produkciju medijatora unutar simpatičke inervacije imunih organa kao što je timus, i lokalno-mjesta tkivne upale. K tome, citokini koji predstavljaju specifični upalni odgovor mogu imati pleiotropno djelovanje na neuroendokrini sustav (Johnson 2006). Pod utjecajem određenih egzogenih i endogenih stresnih stimulusa, središnji i periferni dio se aktivira i nastoji održati homeostazu kroz brojne negativne povratne sprege, u kojoj svaka reakcija djeluje kao inhibitor dodatne sekrecije inicijalne supstance. Stresni sustav je aktivan čak i u stanju opuštenosti, odgovarajući na različite cirkadijarne, neurosenzorne, krvne i limbičke stimuluse, uključujući i citokine TNF-α, IL-1 i IL-6, čija je produkcija posredovana imunološkim upalnim reakcijama. Aktivacija stresnog sustava facilitira motoričke reflekse, poboljšava pažnju i kognitivne funkcije, smanjuje apetit i libido i pojačava toleranciju na bol, mijenja kardiovaskularnu funkciju i inhibira imunološki posredovanu upalnu reakciju (Chrousos 1995, Johnson 1992).

Primarni i sekundarni limfoidni organi inervirani su simpatičkim noradrenergičkim vlaknima, a limfoidne stanice imaju receptore za molekule neuroendokrinog sustava (serotonin, adrenalin, glukokortikoidi, estrogeni, CRH i dr.) koji mogu mijenjati cirkulaciju i funkciju imunokompetentnih stanica, uključujući i produkciju citokina (Kemeny 2007). U akutnoj sistemskoj upali, hipotalamus oslobađa CRH, koji inducira oslobađanje ACTH koji stimulira oslobađanje kortikosteroida iz nadbubrežne žlijezde. Imuni sustav oštećen je primarno endogenim kortkosteroidima, koji suprimiraju upalni odgovor na raznim razinama. Čak i u fiziološkim koncentracijama, kortikosteroidi mogu suzbiti upalu djelujući izravno, mijenjajući gensku transkripciju i imune stanične funkcije uključujući i sekreciju važnijih pru-upalnih citokina (TNFα, IL 1, IL 6). Interakcija između gena i okoliša utječe na endokrini odgovor na stres u nekliničkom uzorku.

Tablica 6. Neuroendokrini sustav

Središnji neuroendorkini sustav
Kortikalni centri
Lokus ceruleus retikularne formacije
Centri autonomnog sustava u moždanom deblu
Hipotalamička paraventrikularna jezgra (HPVN)
Lakrimatorne i salivatorne jezgre moždanog debla
Periferni neuroendokrini sustav
Simpatički adrenomedularni sustav
Os hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HHN)
Os hipofiza-spolne žlijezde (HHG)

1.15.4 Neuroendokrina regulacija u stresu

Prema dostupnim podacima, polimorfizam 5-HTTLPR uz stres mogu izazvati hiperaktivnost osi HHN i tako povećati osjetljivost za razvoj depresije u osoba sa smanjenom funkcijom HTT i anamnezom teškog stresa. Homozigoti za „S“ alel na 5-HTTLPR sa anamnezom težeg stresnog događaja imaju značajno povišenu razinu kortizola u odgovoru na stres u odnosu na sve druge grupe, ukazujući na signifikantnu interakciju geni-okoliš, na endokrinu reaktivnost na stres. Dakle, nosioci *S/S* genotipa na 5-HTTLPR izloženi stresu mogli bi predstavljati specifičan endofenotip, ali nema većeg pojedinačnog učinka 5-HTTLPR i/ili stresa na sekreciju kortizola (Alexander 2009).

Bolesnici s depresijom imaju brojne disregulacije HHN osi (Holsboer 2001), a poremećaji odgovora na stres povezani s polimorfizmima na promotorskoj regiji 5-HTTLPR, upućuju na važnu ulogu serotonergičke neurotransmisije u aktivaciji i odgovoru HHN osi (Fuller 1990, Porter 2004) Nosioci „S“ alela na 5-HTTLPR imaju istovremeno disfunkciju i redukciju sive tvari limbičkog sustava (amigdala i cingulurnog girusa) (Pezawas 2005).

Hipofiza oslobađa prolaktin, β-endorfin, melanocit-stimulirajući hormon (α-MSH) i druge neuropeptide koji stimuliraju tiroidnu žlijezdu i spolne žlijezde (Sternberg 2001). Kod akutnog stresa, raste razina glukokortikoida u krvi koji preko specifičnih receptora u hipokampusu aktiviraju hipotalamus na sekreciju CRH, a potom hipofizu za ACTH koji stimulira sekreciju kortizola iz nadbubrežne žlijezde. Produljeni ili kronični stres mijenja strukturu i odgovor glukokortikoidnih receptora koji umjesto visoko adaptivnih postaju maladaptivni te se nastavlja prekomjerna produkcija CRH, ACTH i kortizola koji potom utječu na neurotransmiterske sustave (npr. serotonergički u kojem mijenjaju i samu strukturu serotonergičnih receptora na periferiji i u SŽS) (Alexander 2009). Glukokortikoidi oštećuju neurone hipokampusa gdje reduciraju broj 5-HT_{1A} receptora i uzrokuju porast ili pad 5-HT_{2A} receptora u moždanom korteksu, kao posljedica pokušaja smanjenja učinka hiperaktivnosti HHN osi. Ove promjene opažene su kod pojedinaca koji su počinili suicid ili imaju hipersekreciju glukokortikoida. U normalnim okolnostima negativna povratna sprega, preko receptora u hipotalamusa suprimira prekomjernu produkciju CRH, koja u nekim bolestima (npr. depresija) izostaje. U depresiji kao i u sistemskoj upali općenito dolazi do hiperaktivnosti HHN osi. Psihički stres izravno preko središnjih i perifernih kateholamina, povisuje koncentraciju citokina IL-6 neovisno upali, endotoksemiji i oštećenju tkiva. Ispitivanja su pokazala kako ni hipofiza, nabubrežna žlijezda, niti slezena, ne utječu na porast citokina IL-6 u stresu (Takaki 1994). Štoviše, HHN os suprimira otpuštanje IL-6 u odgovoru na stres. Samo središnji i periferni kateholamini izravno utječu na porast proupalnog citokina IL-6 u stresu, neovisno o utjecaju HHN osi. Različiti cirkulirajući citokini izravno aktiviraju središnji i periferni neuroendokrini sustav za vrijeme upale. Proupalni citokini IL-1, IL-6 i TNF-α izravno aktiviraju HHN os. Citokin IL-6 povisuje ACTH i kortizol. Dakle, upala može neizravno aktivirati HHN os stimulacijom središnjeg noradrenergičnog stresnog sustava citokinima i drugim medijatorima koji najprije djeluju na neurone stresnog sustava izvan ili unutar krvno-moždane kroz endotelno-glijalnu-neuronalnu kaskadu. K tome, upalna mjesta sadrže nocicepcijske, visceralne i somatosenzorne aferentne neurone, koji stimuliraju noradrenergični sustav i CRH putem ascendentnih spinalnih ili moždanih neuronskih puteva. I drugi upalni medijatori, uključujući INFα

i INFγ, IL-2, epidermalni faktor rasta (EGF), tumorski faktor rasta (TGF-β), i faktor aktivacije trombocita (PAF), mogu također sudjelovati u regulaciji HHn osi. S druge strane, različiti imunoregulacijski protuupalni citokini, IL-2 i IL-4 mogu inhibirati učinak glukokortikoida na T limfocite smanjujući njihov afinitet za receptore (Chrousos 1995, Sternberg 2001). Ova zapažanja važna su u istraživanju uloge neuroendokrine osi u hiperimunim stanjima, tj. u autoimunim bolestima uključujućiu kojima je defektan odgovor HPA osovine, u pSS smanjen (Johnson 1998). Smanjen odgovor hipotalamusa u pSS može dijelom biti posljedica smanjene aktivacije 5-HT_{2C} receptora u hipotalamusu ili poremećene ravnoteže Th1/Th2 citokina u upali i/ili stresu zbog pojačanog oslobađanja kateholamina.

Važna je i uloga spolnih hormona u patogenezi upalnih reumatskih bolesti. Spolni hormoni su vjerojatno odgovorni za 2-9 puta veću učestalost autoimunih bolesti u žena u odnosu na muškarce, kao i za modulaciju autoimunih fenomena u trudnoći. Receptori za androgene, estrogene i prolaktin, nalaze se u raznim nespolnim tkivima pa i u imunim stanicama, snažno podupirući tezu da spolni hormoni izravno reguliraju imune funkcije (Di Comite 2007). Na mjestu upale živčana vlakna koja otpuštaju neurotransmitore otpuštaju kateholamine i actilkolin, a osjetna vlakna otpuštaju različite neuropeptide, uključujući CRH, kalcitonin-gen peptid (CGRP), supstanciju P i neuropeptid Y koji djeluju proupalno na stanice urođene imunosti, stimulirajući oslobađanje IL-1, IL-6 i TNF-α iz makrofaga i stimulacijom NK stanica. Suprotno, opioidi i VIP imaju protuupalno djelovanje.

1.15.5 Neuroimunoendokrini uzroci umora i depresije u pSS

Bolesnici s pSS često imaju neobjašnjiv kronični umor, psihičke smetnje i fibromialgiju. Čest nalaz je atipična depresija (upalom izazvana depresija) sa simptomima apatije i pasivnosti, maladaptacije, smetnjama u suočavanju sa stresnim situacijama i pasivnim stavom prema životu, dok je teška depresija rjeđa. Brojne studije pokazuju da su bolesnici s pSS doživjeli stres 6-12 mjeseci prije pojave prvih simptoma bolesti. Disfunkcija HHN osi može utjecati na slabije podnošenje stresa u bolesnika s pSS što vodi psihološkom popremećaju. Povezanost između disfunkcionalne HHN osi i depresije je poznata, ali izravna povezanost SŽS i autoimne bolesti u kontekstu pSS je nerazjašnjena. U bolesnika s pSS dokazana je insuficijencija HHN osi i bazalne vrijednosti ACTH i kortizola su značajno snižene u odnosu na zdrave kontrole (Johnson 1998). Ipak, još smo daleko od saznanja da li insuficijencija HHN osi uzrokuje tj. pridonosi patogenezi pSS ili je posljedica kroničnog autoimunog procesa.

1.15.6 Trombocitni 5-HT u upalnim reumatskim bolestima

Davne studije govore o značajno sniženim vrijednostima trombocitnog serotonina u svim ispitivanim reumatskim bolestima uključujući RA, SLE, pSS i MCTD (Meyerhoff 1981, Zeller 1983, Smith 1978). Utvrđena je povezanost između sniženog PSL i aktivnosti bolesti u SLE (febrilitet, artritis, mukokutane lezije, vaskulitis, alopecia, serozitis, neurološke manifestacije, hematološke abnormalnosti – leukopenia, trombocitopenia, renalna bolest s proteinuriom 0,5 g/l, eritrocituria s > 5 eritrocita u sedimentu u najmanje dva nalaza),dok pad PSLnije korelirao s pojačanim otpuštanjem drugih granularnih konstituenata (npr. β-tromboglobulinom), trombocitopenijom, bubrežnom bolesti ili neuropsihijatrijskim manifestacijama (Meyerhoff 1981). Naknadno je utvrđena povezanost između sniženog PSL i kliničke aktivnosti bolesti u RA i SLE. Najniže vrijednosti bile su umultisistemskim oblicima bolesti, dok nije bilo povezanosti između PSL i IgG, cirkulirajućih imunokompleksa (CI) i liječenja nesteroidinim antireumaticima (NSAIR). Ranije studije i recentni podaci o imunim reakcijama trombocita i mehanizmimaoslobađanja sadržaja iz trombocita tijekom imunoloških reakcija, upućuju na pojačano otpuštanje 5-HT iz trombocita *in vivo*, primarno za vrijeme upalne epizode reumatskih bolesti (Henson 1973, Zeller 1983). Niti jedna od ranijih studija nije ispitivala moguće alteracije trombocitnog 5-HT u bolesnika s pSS niti njihove uzroke (pojačana sekrecija 5-HT iz trombocita zbog pojačane agregacije trombocita tijekom upalne reakcije, genetske varijacije elemenata 5-HT sustava ili neki drugi intrinzični trombocitni defekti.

1.16.Neurološke komplikacije u pSS

Neurološke i neuropsihijatrijske komplikacije česte su u bolesnika s pSS, a nerijetko su i prezentirajući simptom sistemskog oblika ove bolesti. Subjektivno dominiraju simptomi PŽS, iako su česte i manifestacije SŽS, ali su one slabije istražene. Pretpostavlja se da su neurološke komplikacije u pSS posljedica imunološki posredovane upalne vaskularne bolesti i/ili izravne infiltracije moždanog tkiva kroničnim upalnim stanicama koje mogu izazvati i pravu destrukciju moždanog parenhima vidljivo kao lezije bijele tvari na MRI mozga (Alexander 1981, Alexander 1982).

1.16.1 Komplikcije perifernog živčanog sustava (PSŽ) u pSS

Zahvaćenost PŽS je česta komplikacija u bolesnika s pSS. Norveška studija na grupi bolničkih pacijenata s pSS utvrdila je simptome i znakove periferne neuropatije kod 27% bolesnika s pSS temeljem samo kliničkog pregleda, a u 55% bolesnika iste grupe je periferna neuropatija objektivizirana elektromioneurografski (EMNG) (Gøransson 2006). Prema drugoj studiji (Lopate 2006) je čak 60% bolesnika s pSS imalo objektiviziranu perifernu neuropatiju od kojih je samo u 5% slučajeva dijagnoza periferne neuropatije prethodila dijagnozi pSS. Studija klinikopatoloških i elektrodijagnostičkih pokazatelja na 92 bolesnika s perifernom neuropatijom koja je prethodila dijagnozi pSS, navodi sedam glavnih kliničkih prezentacija periferne neuropatije: senzorna ataksijska neuronopatija, trigeminalna neuropatija, bolna senzorna neuropatija bez senzorne ataksije, multipla mononeuropatija, multipla kranijska neuropatija, autonomna neuropatija i radikuloneuropatija (Mori 2005).

a) Senzorna bolna neuropatija bez senzorne ataksije je vjerojatno najčešća periferna neuropatija u bolesnika s pSS. Klinički se manifestira distalnim gubitkom osjeta boli i temperature, uz očuvane miotatske reflekse i uredan EMNG nalaz urednih senzornih amplituda i brzina provođenja (Chai 2005, Mori 2005, Lopate 2006). Mnogi bolesnici imaju smanjenu gustoću epidermalnih vlakana u bioptatu kože, malih, tankih senzornih vlakana (*engl. small fibers neuropathy*), a ne tzv. «*dying back*» vlakana u senzornoj aksonopatiji povezanoj s dijabetičkom neuropatijom, a ova neurološka komplikacija utvrđena je u oko 80% bolesnika s neuropatijom vezanom uz pSS (Chai 2005). Drugi autori utvrdili su mali udio neuropatije malih, tankih vlakana (Gøransson 2006). Naknadnim ispitivanjima utvrđena je periferna neuropatija u oko 75% svih

bolesnika s pSS, 45% s izoliranom neuropatijom malih, tankih vlakana, a samo u 4% bolesnika s pSS neuropatija je dijagnosticirana prije postavljanja dijagnoze pSS (Lopate 2006).

b) **Senzorna ataksijska neuronopatija** je učestala manifestacija PŽS u pSS, a akutnom ili subakutnom prezentacijom i progresijom (Griffin 1990). Inicijalni simptom su distalne parestezije koje se šire proksimalno (Mori 2005) uz teški gubitak dubokog osjeta i senzornu ataksiju donjih udova ili pseudoatetozu gornjih udova (Griffin 1990). Klinički je prisutan teški gubitak dubokog osjeta pozicije i vibracije, generalizirana arefleksija, senzorna ataksija i pozitivan Romberg-ov znak. EMNG pokazuje odsutnost senzornih potencijala. Ponekad je udružena s autonomnom neuropatijom i Adiev-om toničkom pupilom (Mori 2005). U podlozi je ganglionitis s degeneracijom neurona dorzalnih korjenova zbog limfocitne infiltracije (Griffin 1990). Glavni diferencijalno dijagnostičkog entitet senzorne ataksijske neuronopatije je paraneoplastička subakutna senzorna neuronopatija od koje se teško razlikuje.

c) **Senzorna neuropatija trigeminusa** je druga po učestalosti neuropatska manifestacija pSS, karakterizirana parestezijama i analgezijom u distribuciji trigeminalnog živca unilateralno ili bilateralno, bez motoričkog ispada. (Hagen 1990). U pozadini je ganglionitis trigeminalnog živca s gubitkom neurona (Mori 2005) zbog limfocitne infiltracije.

d) Autonomna neuropatija također može biti glavna klinička manifestacija periferne neuropatije u bolesnika s pSS, a uključuje i Adieve toničke pupile, unilateralnu ili bilateralnu, ortostatsku hipotenziju i hipohidrozu ili segmentalnu anhidrozu, cilijarni ganglionitis (Dyck 2005) (Griffin 1990, Mori 2005). Rijetko se javlja izolirana u svega 3% bolesnika, a najčešće je preklapajuća s drugim prominentnim perifernim neuropatijama (Mori 2005); sa senzornom ataksijskom neuropatijom, bolnom senzornom neuropatijom bez senzorne ataksije i trigeminalnom senzornom neuropatijom. Patogentski se radi o autonomnom ganglioneuritisu (Mori 2005) uzrokovanom limfocitnom infiltracijom, degeneracijom i gubitkom neurona.

e) **Multipla mononeuropatija i multipla kranijska neuropatija** (**mononeuritis multiplex**). Mogu biti zahvaćeni razni kranijski živci (III. - XII). Biopsija *n.suralisa* u ovih bolesnika otkriva vaskulitis malih arterija i arteriola što govori u prilog vaskulitičnoj etiopatogenezi (Mori 2005).

f) **Radikuloneuropatija** ili **kronični upalni demijelinizirajući senzomotorni poliradikulololoneuritis (CIDP)** klinički se prezentira progresivnim, ascendentnim senzomotornim

ispadom, povišenim proteinima u likvoru, produženim F valom na EMNG i kontrastnom imbibicijom spinalnih korjenova *i caude equine* na MRI (Mori 2005). U seriji 54 bolesnika s perifernom neuropatijom povezanom sa *sicca* sindromom bez sigurnih znakova za pSS (Grant 1997), 11% bolesnika imalo je CIDP.

Tablica 7. Periferne neuropatije u primarnom Sjögrenovom sindromu

Senzorna ataksijska neuronopatija	Dorzalni ganglionitis uzrokovan limfocitnom infiltracijom
Trigeminalna senzorna neuropatija	Trigeminalni ganglionitis uzrokovan limfocitnom infiltracijom
Bolna senzorna neuropatija bez senzorne ataksije	Neuropatija tankih vlakana zbog neuronopatije
Autonomna neuropatija	Autonomni ganglionitis uzrokovan limfocitnom infiltracijom
Multipla mononeuropatija	Vaskulitis
Multipla kranijska neuropatija	Vaskulitis
Radikuloneuropatija	Senzomotorna inflamatorna demijelinizacija

Dijelom preuzeto od (Mori K, Lijma M, Koike H, et al. The wide spectrum of clinical manifestations in Sjogren's syndrome-associated neuropathy. Brain 2005;128(pt 11); 2518-2534).

1.16.2 Manifestacije središnjeg živčanog sustava (SŽS) u pSS

Zahvaćenost SŽS u pSS nije dobro istražena kao u PŽS. Oštećenja SŽS u pSS još uvijek je predmetom ozbiljnih kontroverzi među istraživačkim grupama. Manifestacije SŽS u pSS nisu česte, ali nisu zanemarive. Dijagnostika je teža u bolesnika s pSS s difuznom u odnosu na fokalnu bolest SŽS zbog nespecifičnih simptoma. Prevalencija hiperintenziteta bijele tvari na MRI mozga se kreće od „nedetektabilnih“ do „čestih“ (Delalande 2004, Soliotis 2004). Dio podataka iz starije literature nije potvrđen novijim ispitivanjima, zbog mogućih različitosti uzorka bolesnika s pSS. Dosadašnji podaci pokazuju kako su u populaciji oboljelih od pSS s neurološkim manifestacijama, česti multifokalni hiperintenziteti bijele tvari u T2-sekvencama na MRI mozga u periventrikularnim i subkortikalnim regijama mozga, te povećanje ventrikula i proširenje sulkusa (Mataro 2003, Morgan 2004), dok se rjeđe spominju lezije smještene infratentorijski i u bazalnim ganglijima. Oštećenja moždanog tkiva u pSS posljedica je različitih patogenetskih čimbenika i mehanizama; izravna infiltracija SŽS mononuklearima[5] oštećenje endotela krvnih žila, vaskulitis i

stanjenje malih krvnih žila u prisutnosti antitijela i i posljednično ishemija, (Alexander 1988, Bachine 1991, Molina 1981, Alexander 1994). Neuropatološki, lezije bijele tvari mozga povezuje se s perivaskularnim edemom, periventrikularnom gliozom, demijelinizacijom konzistentno lezijama kod MS, arterioskleroza, ishemija, lakunarni infarkti, vaskulitis s infiltratima limfocita (Morgen 2004, Čikeš 2008). Davne studije pokazale su povezanost pSS s različitim fokalnim i multifokalnim manifestacijama SŽS uključujući i neuropsihijatrijske poremećaje, kao što je multipli neurološki sindrom koji oponaša multiplu sklerozu (MS), klinički, radiološki i likvorski. (Alexander 1981, Alexander 1986, Alexander 1988). Nekonzistentni rezultati studija učestalosti MS-a u bolesnika s pSS, mogli bi biti posljedica različitosti ispitivanih skuppina. U prospektivnoj studiji na 192 bolesnika s MS-om (Noseworthy 1989), detaljnom analizom kliničkih, laboratorijskih i likvorskih nalaza, nije pronađen niti jedan slučaj MS-a (Sandberg-Wollheim 1992), a pSS je zabilježen u samo jednog od 30 bolesnika s MS-om, kao i u studiji na 64 bolesnika s MS-om zabilježena su samo dva slučaja pSS (Miro 1990), dok je kasnijoj studiji na 60 bolesnika s MS, 10 bolesnika imalo je i simptome pSS, a u dva slučaja su pronađene spinalne lezije. (Wingerchuk 2007, Seze 2001). Može se zaključiti kako MS nije učestalija u populaciji bolesnika s pSS u odnosu na opću populaciju. Nasuprot tomu, utvrđena je povezanost pSS i optičkog neurmijelitisa (NMO) (Gökcay 2007), Mochizuki 2000, Wingerchuk 2007). Bolesnici s NMO češće su seropozitivni na SS-A i SS-B antitijela čak i u odsutnosti simptoma pSS, dok su bolesnici s pSS bez NMO seronegativni na NMO-IgG antitijela, što upućuje na dvije autoimune bolesti nego da se radi o neurološkoj komplikaciji pSS. Seroprevalencija za NMO-IgG protutijela jednaka je za tipični NMO i za pSS udružen s NMO. Neki bolesnici s pSS razviju longitudinalni opsežni mijelitis (Yamamoto 2006), ali u sklopu NMO, ali su učestalije druge neurološke manifestacije SŽS što je dokazano u retrospektivnim i u prospektivnim studijama. Utvrđene su različite fokalne i multifokalne neurološke manifestacije, neuropsihijatrijske i kognitivne disfunkcije, koje nisu adekvatno ispitane. MRI je standardna metoda u otkrivanju i subkliničkih oštećenja moždanog tkiva. Dokazana je i povezanost lezija s glavoboljama (Šarac 2013), kognitivnim i nekim neuropsihijatrijskim manifestacijama. Ipak, prevalencija, lokalizacija i patogeneza lezija bijele tvari mozga u bolesnika s pSS nije razjašnjena, kao niti njihova potencijalna povezanost s aktivnosti bolesti, laboratorijskim parametrima upale ili nekim vazoaktivnim molekulama, među ostalima i serotoninom što će biti predmetom analize ovog istraživanja.

2 HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1 Hipoteza

Na početku ovog istraživanja pretpostavka je bila da je koncentracija trombocitnog serotonina (prema engl. *platelet serotonin level, PSL*) snižena u bolesnika s pSS, da je povezana s varijantama, tj. polimorfizmima gena za 5-HTT, na promotorskoj regiji, 5-HTTLPR i/ili intronskoj regiji, 5-HTTin2VNTR i da bi se mogla koristiti kao biomarker umora i depresije u pSS, ali ne i same bolesti.

2.2 Ciljevi istraživanja

Opći cilj

Odrediti utjecaj polimorfizama 5-HTTLPR, rs 25531, te 5-HTTin2VNTR na PSL i njegovu ulogu u patofiziologiji depresije i umora u bolesnika s pSS.

S obzirom da se radi o upalnoj reumatskoj bolesti s dokazanom kroničnom neuroimunohormonalnom disregulacijom, ovo istraživanje je usmjereno na ispitivanje 5-HT u trombocitima kao neurobiološkog korelata za sinaptosome i njegove potencijalne uloge u patofiziologiji depresije i umora, vodećih simptoma u pSS i najboljih pokazatelja funkcioniranja, kvalitete života i mjerila sekundarnog ishoda bolesti.

Specifični ciljevi:

1. Odrediti PSL u bolesnika s pSS i zdravih ispitanika u kontrolnoj skupini.
2. Ispitati polimorfizme 5-HTT; 5-HTTLPR, rs 25531 i 5-HTTin2VNTR u bolesnika s pSS i zdravih ispitanika u kontrolnoj skupini.
3. Odrediti stupanj povezanost između PSL i polimorfizama 5-HTTLPR, rs 25531 i 5-HTTin2VNTR i PSL u bolesnika s pSS i zdravih kontrola.

4. Odrediti stupanj povezanosti PSL i polimorfizama 5-HTTLPR, rs 25531 i 5-HTTin2VNTR sa sociodemografskim karakteristikama i kliničkim pokazateljima; serumskim i imunološkim pokazateljima, objektivnom kliničkom ljestvicom ESSDAI, i samoocjenskim ljestvicama ESSPRI, 6-items-SS-VAS, VAS, PROFuk, PROFsom, PROFment) u bolesnika s pSS.

5. Odrediti stupanj povezanosti PSL i polimorfizama 5-HTTLPR, rs 25531 i 5-HTTin2VNTR s depresijom i umorom u bolesnika s pSS, temeljem rezultata samoocjenskih ljestvica depresije i umora.

6. Odrediti učestalost hiperintenziteta bijele tvari mozga u bolesnika s pSS koji pate od učestalih epizodičkih tenzijskih glavobolja u odnosu na kontrole s istim tipom glavobolja i njihovu potencijalnu povezanost s povećanim oslobađanjem serotonina iz trombocita.

3 ISPITANICI I METODE

Istraživanje je bilo presječno, tj. *cross sectional*.

3.1 Ispitanici

Ispitan je 61 bolesnik s konačnom dijagnozom pSS; pozitivan nalaz specifičnih protutijela anti-Ro/SS-A ili anti-La/SS-B ili pozitivan nalaz biopsije malih slinovnica unatrag najmanje 6 mjeseci i 100 zdravih kontrola. Ispitanika je 55 žena s pSS (90,16%) i 6 (9,84%) muškaraca, prosječne životne dobi 59,4 godina u rasponu od 34 do 80 godina, žene prosječno 60 godina u rasponu od 34 do 77 godina i muškarci 55,5 godina u rasponu od 42 do 77 godina. Prosječno trajanje simptoma bolesti je 8,2 godine, a od postavljanja dijagnoze pSS 5,5 godina u rasponu od 1-19 godina. Bolesnici su odabrani metodom slučajnog uzorka iz kliničke populacije i bolesnika s pSS liječenih u Zavodu za kliničku imunologiju i reumatologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Klinici za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Jedinici za neurologiju i Jedinici za radiologiju Poliklinike „Neuron“ Hrvatskog Instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za imunologiju, pulmologiju i reumatologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, tijekom dvije godine istraživanja. Konačnu dijagnozu pSS postavio je imunolog, a komorbidne neurološke i psihijatrijske dijagnoze utvrdili su neurolog i psihijatar. Kontrolna skupina obuhvatila je 100 zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi, 74 (74%) žene i 26 (26%) muškaraca, prosječne životne dobi 38 godina u rasponu od 19 do 66 godina, žene prosječno 37,7 (od 19 -66) i muškarci prosječno 39 (od 24-59) koji su dobrovoljno dali uzorke krvi u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu. Dijagnoza pSS postavljena je temeljem Klasifikacijskih kriterija za pSS: revidirana verzija Europskih kriterija predloženih od Američko-Europske konsenzus grupe (prema engl. American-European Consensus Group) (Vitali 2002), klinički, uz nadopunu objektivnim dokazima, uključujući Shirmerov test, Test nestimulirane salivacije (Qs) i Test stimulirane salivacije (Qss), biopsiju malih slinovnica, rutinske laboratorijske pretrage, upalne i imunološke pokazatelje, specifična protutijela anti-Ro/SS-A i anti-La/SS-B određena ELISA metodom. Svi bolesnici s pSS ispunili su klasifikacijske kriterije (Vitali 2002) za pSS koji zahtijeva prisutnost ili

anti-Ro/SS-A ili anti-La/SS-B i/ili pozitivan nalaz biopsije malih labijalnih slinovnica (focus score ≥ 1).

Aktivnost bolesti u bolesnika s pSS procijenjena je pomoću objektivnog standardiziranog mjernog instrumenta *ESSDAI (European League Against Rheumatism - EULAR Sjogren's Syndrome Disease Activity Index*). ESSDAI je klinički indeks recentno dizajniran za procjenu aktivnosti bolesti u bolesnika s pSS i sastoji se od 12 organ-specifičnih domena kojom je predstavljena svaka moguća komplikacija pSS, a za svaku domenu ativnost bolesti je klasificirana sa 3 ili 4 oznake (0,1,2 i 3) ocijenjene prema težini od 0 do maksimalnno 3 (Seror 2010), a maksimalni ESSDAI score je 27 i pokazuje najviši indeks aktivnosti bolesti. Prema ESSDAI ljestvici, srednja vrijednost je iznosila 6 (od 1 - 16).

Isključujući čimbenik bila je povezanost ili preklapanje pSS s drugom autoimunom bolesti od većeg značaja, ranije zračenje u području glave i vrata, hepatitis C, AIDS, ranija dijagnoza limfoma, sarkoidoza, reakcija odbacivanja, terapija antikolinergicima (ako je vrijeme kraće i od četverostrukog poluživota lijeka), liječenje kortikosteroidima, nesteroidnim antireumaticima, terapija antidepresivima, antipsihoticima, antiepilepticima, hormonalna nadomjesna terapija unutar 6 tjedana prije uključivanja u ispitivanje.

3.2 Metode

3.2.1 Ljestvice

3.2.1.1 Samoocjenske ljestvice

U svrhu podjele bolesnika na one s depresijom i one bez depresije i one s umorom i one bez umora bolesnici su ispunjavali različite ljestvice: u svrhu procjene različitih subjektivnih tegoba bolesnika s pSS uključujući somatski i mentalni umor, artralgije, parestezije, mialgije, suhoću sluznica, kao i sekundarnih uzroka umora kao što je npr. depresija, bolesnici su ispunjavali različite ljestvice. U istraživačke svrhe upotrijebljene su slijeeće ljestvice:

1. EULAR Sjogren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI*)* (Seror 2011) **(Prilog 3)** je vrlo jednostavan indeks dizajniran za mjerenje subjektivnih tegoba u bolesnika s pSS. ESSPRI ljestvica sastoji se od tri pojedinačne 0-10 cm ljestvice, tzv. visualne analogne ljestvice

(VAS) za svaku domenu koja predstavlja simptome bolesnika sa pSS: suhoća, bol i somatski umor. ESSPRI ljestvica dobro korelira s postojećim ljestvicama Prema ESSPRI ljestvici, srednja vrijednost bolesnikovog indeksa subjektivnih tegoba iznosila je 34,82 (raspon od 19-40) od maksimalnih 40. Ovu ljestvicu koristili smo i u procjeni drugih subjektivnih tegoba bolesnika s pSS kao što su mentalni umor, artralgije, mialgije i parestezije.

2. 6-items-VAS-SS je modificirana, proširena ESSPRI ljestvica koju su autori dizajnirali za potrebe ovog istraživanja, a za razliku od ESSPRI, ima šest dimenzija bolesnikovih tegoba vezanih uz pSS kao što su: suhoća, artralgije, mialgije, parestezije, somatski i mentalni umor (**Prilog 4**)

3.Beck-ova ljestvica depresije (BDI) (Beck 1996) **(Prilog 5**) je samoocjenska ljestvica depresije koja se sastoji od 21 pitanja koji se odnose na različite simptome depresije uključujući tri tipična: depresivno rapsoloženje, gubitak interesa i zadovoljstva ismanjenje energije uz povećanje umora te sedam ostalih: poremećen san, smanjena koncentracija i pozornost, ideja krivnje i bezvrijednosti, smanjen apetit, smanjeno samopouzdanje, sumoran pogled na budućnost, ideje samoozljeđivanja. U svakom pitanju navedena su četiri različita intenziteta simptoma (0 - minimalno do 3 - izrazito), a ispitanik bira one koji najbolje opisuju kako se osjećao proteklih tjedan dana. Na temelju toga se određuje težina depresije: 0-11 predstavlja osobu bez depresije, 12-19 blagu depresiju, 20-26 umjerenu depresiju, 27-63 tešku depresiju.

Ljestvice umora:

A. Jednodimenzionalne

Vizualna analogna ljestvica (prema engl. Visual Analogue Scale, VAS) **(Prilog 6)** je modificirana vizualna analogna 10-cm ljestvica (VAS), a odnosi se na raspon od 0- bez simptoma do 10- izraziti simptom (bol, umor, suhoću, parestezije, mialgije i artralgije) kojim bolesnik ocjenjuje svoj umor (Standard Patient Education Research Center). Cut off vrijednost je određena pomoću medijana. Ovu ljestvicu smo koristili i u ocjeni subjektivnog osjećaja suhoće i boli.

B. Multidimenzionalne

Profil umora (prema engl. Profile of Fatigue); PROFukupni, PROFsomatski i PROF mentalni**) (Prilog 7).** PROF se sastoji od 6 aspekata umora, a izdvojena je iz Profile of Fatigue and Discomfort (PROFAD); NRS 0-7) PROF je mjerni instrument simptoma umora kojim ispitanik opisuje kako se osjećao u zadnja 2 tjedna; od 0 bodova za „uopće nema problema“ do 7 bodova za

„najlošije moguće“. Uz umor uključuje i aspekt boli (nelagodu) (Bowman 2004). Somatski umor je razdijeljen u 4 potencijalno različita aspekta: a) potreba za odmorom, b) slaba izdržljivost, c) niska izdržljivost i d) mišićna slabost. Mentalni umor je podijeljen u 2 potencijalno različita aspekta: a) slaba koncentracije i b) slaba memorija. PROF score je zbroj svih bodova (0- minimalno do 7-maksimalno) za svaku pojedinu frazu aspekta umora (12 fraza za somatski umor i 4 fraza za mentalni umor Svaki aspekt umora boduje se s 0 do 7 bodova, NRS 0-7).

Pomoću dodatnih upitnika kao što su *Functional Assesment of Chronic Illnes Therapy scale* (Yellen 1997) i *Fatigue Severity Scale* (FSS), (Krupp 1989) potvrđeno je da su nalazi samoocjenske ljestvice VAS jednako vrijedni kao i drugi duži upitnici koji obuhvaćaju niz pitanja koji se odnose na simptom umora. Ove ljestvice daju ukupni score za umor kao i VAS skala umora što govori u prilog tomu da VAS skale suučinkovite kao i drugi duži i složeniji upitnici, barem kad je u pitanju RA (Wolfe 2004) ili slične reumatske upalne bolesti.

Bolesnici su ispunjavali sve upitnike simptoma za vrijeme kliničkih pregleda.

3.2.1.2 Objektivna klinička ljestvica

1. European League Against Rheumatism (EULAR) Sjogren's Syndrome Patient Reported Index (ESSDAI) (Prilog 2) je recentno publicirana standardizirana, klinička, objektivna ljestvica, tj. mjerni instrument za peocjenu aktivnosti bolesti u pSS. Kliničari su ispunjavali ESSDAI upitnik koji se sastoji od 12 organ-specifičnih «domena» koje doprinose aktivnosti bolesti. Za svaku domenu, aktivnost bolesti klasificirana je sa 3 ili 4 domene (0,1,2 i 3) bodovane prema težini od 0 do maksimalno 3, a maksimalni zbroj bodova je 27 i indicira najviši indeks aktivnosti bolesti. Dobiveni zbroj bodova za svakog bolesnika korišten je kao realistična vinjeta kojom je predstavljena svaka moguća sistemska komplikacija pSS (Seror 2010).

3.2.2 Postupak uzimanja uzoraka krvi

1) Bolesnici s dijagnozom pSS unatrag najmanje 6 mj, ukupno 61 bolesnik dali su krv u Kliničkom Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb-Rebro.

2) Kontrolna skupina bili su zdravi odrasli ispitanici dobrovoljni darivatelji krvi. U ovoj skupini bilo je 100 ispitanika. Nakon vađenja krvi, ispitanici više nisu imali obveza prema istraživačima.

Za sve ispitanike sa pSS i zdrave kontrole učinjeno je slijedeće:

1. Određena je koncentracija trombocitnog serotonina u integralnom uzorku ispitanika sa pSS i u zdravih ispitanika.

2. Izdvojena je DNA iz leukocita periferne venske krvi.

3. Genotipizacija 2 polimorfizma:

   a) PCR za SERTPR-L/S polimorfizam

   b) PCR za SERTin2-VNTR polimorfizam

Za bolesnike sa pSS iz uzoraka krvi učinjena je biokemijska analiza seruma uključujući KKS, SE, CRP, koagulogram, lipidogram, imunologija (haptoglobin, RF, ANA, SS-A i SS-B, C3, C4), urin.

Uzorak zdravih kontrola obuhvatio je uzorke krvi zdravih dobrovoljnih davatelja krvi čiji su uzorci krvi uzeti u Hrvatskom zavoduza transfuzijsku medicinu u Zagreb tijekom dobrovoljnog darivanja krvi. Ispitanici oba uzorka su hrvatskog podrijetla.

Prikupljanje uzoraka krvi provodilo se između 8 i 11 sati. Za postupak određivanja trombocitnog serotonina, venska krv (8,5 ml) prikupljala se od bolesnika s pSS u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb, a od zdravih dragovoljaca (8,5 ml) u Hrvatskom Zavodu za transfuzijsku medicinu, Petrova 2, Zagreb.

Genotipizacija serotoninskog transportera (5-HTT) provodila se u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb u kojem je za izvedbu postupka genotipizacije, svakom sudioniku istraživanja uzet uzorak krvi (5-10 ml).

3.2.3 Postupak određivanja koncentracije trombocitnog serotonina

Za postupak određivanja trombocitnog serotonina, venska krv prikupljala se u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb i u Hrvastkom Zavodu za transfuzijsku medicinu, Petrova 2, Zagreb. Korišten je BD vacutainer ACD tubes 8.5 ml (Bechton Dickinson, cat no.364606) (ACD je antikoagulans, u vacutainer-u ga ima 1.5 ml). Odmah nakon vađenja krvi, uslijedilo je miješanje laganim potpunim inverzijama. Potom su se uzorci držali na sobnoj temperaturi maksimalno 4 sata do centrifugiranja. Prije centrifugiranja ponovo su promiješani uzorci. Uzorci su centrifugirani 15 min u horizontalnom rotoru na 200 x g (bez hlađenja) da bi se uzorak razdijelio u donji sloj koji sadrži eritrocite, i gornji sloj koji sadrži pretežito trombocite, plazma bogata trombocitima (prema engl. *platelet reach plasma, PRP*). Od ovakovog uzorka dobilo se oko 4 ml PRP, a uzorci za određivanje serotonina priređeni su u duplikatu (2 x 1 ml). Na prijelazu se dobio tanki sloj koji je sadržavao pretežito leukocite. Odmah je dekantiran, tj. izdvojen gornji sloj, supernatant sa trombocitima u drugu, plastičnu epruvetu pomoću plastične pipete i odvojeni aliquoti za brojanje trombocita (0.5 ml) i za određivanje vrijednosti serotonina (2 x 1.0 ml). Na uzorak za određivanje serotonina dodano je 5 ml fiziološke otopine sobne temperature, začepljeno parafilmom, promiješano inverzijom nekoliko puta. Potom je na Hrvatskom Institutu za istraživanje mozga centrifugirano 10 minuta u kosom rotoru na 10000 x g. Čim je centrifuga zaustavljena, odmah je izliven cijeli supernatant, a otvor epruvete prislonjen 2-3 sekunde na filter papir da se sve iscijedi. Talog trombocita odmah je zamrznuti u zatvorenim epruvetama na -20C. Uz epruvete su se dostavili i podaci o broju trombocita za svaki pojedini uzorak. Trombocitni *pellet*, dobiven centrifugiranjem razrijeđenog PRP uzorka (1 ml + 3 soli) na 8.500 x g kroz 5 minuta, je soniciran u 1 ml dejonizirane vode. Uslijedila je deproteinizacija sa ZnSo4/NaOH. Sadržaj 5HT izmjeren je uz pomoć orthophtaldialdehyde-fluorometrije na 345/485 nm, (Jernej 2000, Balija 2010) Rezultati su se iskazali kao ng 5HT po μL od ukupnih volumena trombocita, izračunato kao produkt srednjeg volumena i broja trombocita.



Slika 6. Priprema PRP centrifugiranjem

3.2.4 Genotipizacija

Materijal i metode

Genotipizacija je proveden u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Analitički uzorak

Za izdvajanje DNA korištena je puna krv sa antikoagulansom EDTA (5 ml svježe krvi, pohranjene na +4 º C najduže četiri dana ili pohranjene na –70º C).

Izdvajanje DNA metodom isoljavanja

Izdvajanje DNA iz pune krvi provodilo se makro-metodom isoljavanja (Miller 1988).

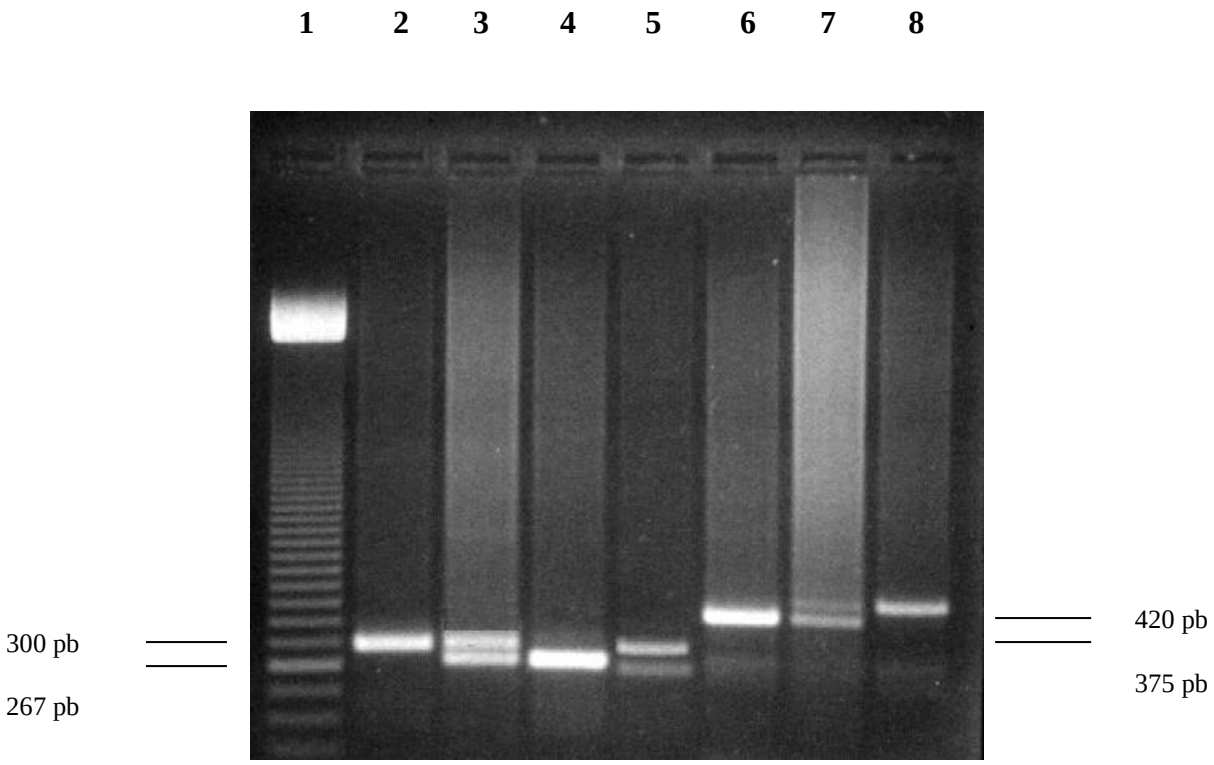
Metoda se temelji na lizi stanica te enzimskoj i kemijskoj ekstrakciji sa svrhom uklanjanja staničnih proteina, RNA i drugih makromolekula, nakon čega slijedi taloženje DNA u apsolutnom alkoholu.

Metode genotipizacije

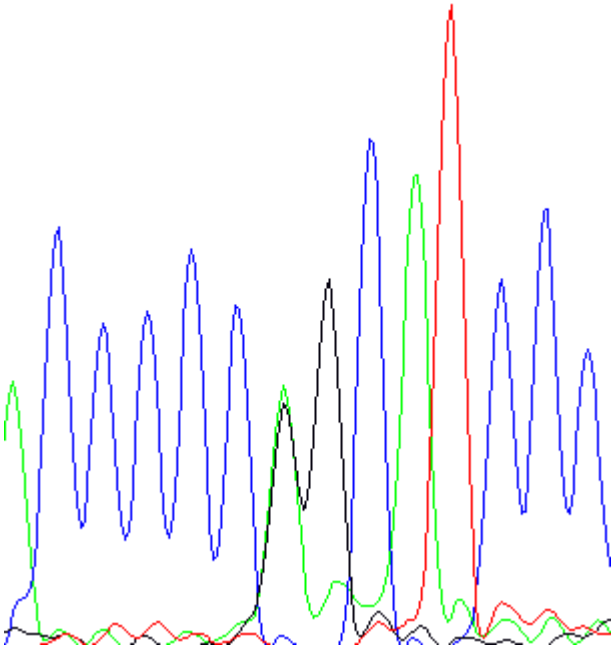
Genotipizacija 5-HTT

Analiza polimorfizama SERTPR L/S i SERTin2-VNTR provodila se prema opisanoj metodi Rauch 2002. Genotipizacija SERTPR se provodila u dva koraka. U prvom koraku su identificirani aleli L i S. U drugom koraku je genotipiziran i razlučen alel L na L_A i L_G. Bialelna genotipizacija

se provodila prema metodi Rauch 2002 uz određene modifikacije (Bozina 2007) (**Slika 7**). Za trialelnu genotipizaciju korištene su fluorogene probe specifične za L_A i L_G alele, u reakcijama u stvarnom vremenu, (Taqman real-time, Applied Biosystems), prema ranije opisanim metodama (Hu 2006). U svrhu pribavljanja pouzdanih kontrola i za potvrdu nekih upitnih rezultata dobivenih prethodnim analizama, provedena je metoda sekvenciranjem (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) prema objavljenim radovima (Hu 2006) (**Slika 8**). Također je u svrhu potvrde rezultata dobivenih metodom PCR u realnom vremenu provedena regenotipizacija svakog desetog uzorka prema opanoj metodi temeljenoj na PCR-RFLP (Lonsdorf 2009).



Slika 7. Analiza 5-HTTin2 (l, s) i 5-HTTLPR (L, S)
1. Mol marker; 2. l / l; 3. l / s; 4. s / s; 5. l / s; 6. S / S; 7. L / S; 8. L / L



Slika 8. Detekcija alela 5-HTTLPR L_A i L_G metodom sekvencioniranja

Specifične početnice i probe za analizu gena SERT, očekivani produkti PCR i veličine restrikcijskih ulomaka prikazani su u **Prilogu 8**.

Empirijski utvrđeni uvjeti umnažanja pojedinih DNA ulomaka u primjenjenim metodama prikazani su u **Prilogu 9**.

3.2.5 Analiza MRI mozga u bolesnika s pSS

Kod 22 bolesnika s pSS i učestalom epizodičkom tenzijskom glavoboljom (engl. frequent episodic tension-type headache, FETTH) i 20 kontrola s FETTH, učinjena je magnetska rezonancija mozga (MR) na 1,5 T (General Electric Medical Systems, Milwaukiee, Wisconsin, USA), a učinjene su T2 FLAIR aksijalne snimke, trajanje; 4.16 min; aksijalne sekcije, 5 mm s 0.7 mm prekida; matrix 224x224 polja, 24x24 cm, „repetition time“ (TR) od 8000 ms i echo vrijeme odgode (TE) od 80 msek. Sekvence su omogućile 20 paralelnih sekcija u 224x224 matrix-u. U analizi broja i distribucije hiperintenzivnih lezija korištena je modificirana Sheltens-ova ljestvica, a

lezije su klasificirane prema lokalizaciji: periventrikularno, subkortikalno, bazalni gangliji, mezencefalon, pons i infratentorijski. Broj i veličina lezija pobrojane su prema najvećem promjeru svake lezije, te su prema tome kategorizirane u; male < 2 mm, srednje 2-5 mm i veće lezije > 5 mm. Ovu detaljnu ljestvicu karakterizira dobra osjetljivost u odnosu na težiju i distribuciju lezija. Sve MR snimke očitane su od dva radiologa (T.K. and M.B.) koji su brojali lezije randomizirano. Značajnost lezija u bolesnika s pSS analizirana je u odnosu na njihov broj i veličinu ukupnih lezija i u prema regijama mozga, u odnosu na dob, trajanje simptoma pSS i aktivnost bolesti (ESSDAI).

Uključeni su bolesnici s pSS i kontrole, s kliničkom dijagnozom epizodične tenzijske glavobolje trajanja od 30 minuta do nekoliko dana (Headache Classification, 2004). Bol je bila tipično bilateralna ili tipa pritiska, nepulzirajuća i blaga do umjereno teškog intenziteta, nije agravirala u fizičkoj aktivnosti, bez popratnih simptoma mučnine, povraćanja, povremeno uz fotofobiju ili fonofobiju. Bolesnici su imali najmanje 10 epizoda ≥1 do ≤15 dana godišnje ili najmanje 3 mjeseca (≥12 i ≤180 dana godišnje). Svi ispitanici imali su glavobolju koja je ispunjavala kriterije za učestalu epizodičnu tenzijsku glavobolju. Kontrolna skupina obuhvatila je 20 ispitnika (14 žena i 4 muškarca), prosječne starosti 57.5 (od 44-71 godinu) s kliničkom dijagnozom glavobolje koja je ispunjavala kriterije za epizodičnu tenzijsku glavobolju. Ispitanici kontrolne skupine upućeni su iz Poliklinike Medikol, Zagreb. Iz ispitivanja isključeni su ispitanici s vaskularnom glavoboljom, glavoboljom koja je povezana s cerebralnim infarktom, cervikalnom disekcijom arterija, intrakranijskom aneurizmom ili nastale nakon cervikalnogili intrakranijskog zahvata, bolesnici s glavoboljom koja je prethodila nekom drugom neurološkom deficitu, ili glavobolja koja je koincidirala sa simptomima inzulta, bolesnici s anamnezom cerebrovaskularne bolesti, arterijskom hipertenzijom, dijabetesom, migrenom, ili drugim čimbenicima koji bi mogli biti povezani s nastankom hiperintenzivnih lezija (prema engl. signal hyperintensity, SH) vidljivih na MR mozga. MR snimke analizirala su dva neuroradiologa (T.K. i M.B.) koji su brojali hiperintenzivne lezije randomizacijski, bez saznanja o bolesnikovoj dijagnozi. Analizirale su se SH u slijedećim strukturama i regijama mozga: periventrikularno, subkortikalno, bazalni gangliji, mezencefalon, pons, cerebelum, supratentorijski, infratentorijski, frontalno, tewmporalno, parijetalno i okcipitalno. SH su klasificirane pomoću modificirane Sheltens-ove „semikvantitativne ljestvice“ (Sheltens 1993) kako bi se analizirala prevalencija, veličina i anatomska distribucija. Veličina SH pobrojana je prema najvećem promjeru jedne lezije, a lezije su klasificirane u kategorije: manje (< 2 mm), srednje (2-5 mm) i velike lezije (> 5 mm). Ovu vrlo detaljnu ljestvicu karakterizira visoka osjetljivost u odnosu na anatomsku distribuciju i proširenost lezija. Značaj

SH mozga u pSS analizirana je u odnosu na njihov broj i veličinu u različitim regijama mozga, s dobi, trajanjem bolesti, ESSDAI ineksom i standardnim imunološko-upalnim markerima bolesti. Standardna deskriptivna statistika (srednja vrijednost, Standardna devijacija, omjeri) korišteni su u analizi u opisu ispitanika i karakteristika SH. U evaluaciji razlika između skupina korišteni su Mann-Whitney U test i ML Chi-square test. Ovisnost između varijabli evaluirana je pomoću Spearman R korelacije. Statistička značajnost izražena je na razini značajnosti p-vrijednost <0.05. Podaci su analizirani koristeći statistički software: StatSoft, Inc. (2008), Statistica (data analysis software system) version 8.0. www.statsoft.com.

3.2.6 Suglasnosti

Istraživanje je provedeno uz suglasnot svih etičkih povjerenstava ustanova u kojima se istraživanje provodilo, uključujući i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i uz suglasnost svih ispitanika. Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom Deklaracijom (engl. Declaration of Helsinki). Svi ispitanici (bolesni i zdrave kontrole) potpisom su dali suglasnosti za sudjelovanje u istraživanju.

3.2.7 Statističke metode

U opisu demografskih i kliničkih karakteristika korištene su metode standardne deskriptivne statistike. Kategoričke varijable prikazane su tablicama kontingencije. Razlike među grupama za kategoričke varijable testirane su χ^2 testom. Kontinuirane varijable testirane su na normalnost Shapiro-Wilk testom, a u uvisnosti o distribuciji izračunate su odgovarajuće deskriptivne mjere:

a) Srednja vrijednost (MV) i standardna devijacija (SD) za varijable normalne distribucije vrijednosti

b) medijan vrijednosti i raspon za varijable beznormalne distribucije.

Razlike u vrijednostima kontinuiranih varijabli između grupa uspoređene su t-testom odnosno Mann-Whitneyjevim testom. Povezanost (korelacija) razine serotononina s kategoričkim prediktorima, (antitijela, SERT) procijenjena je metodom analize varijance (ANOVA; jednosmjerna i dvosmjerna). Povezanost (korelacija) razine serotonina s kontinuiranim

prediktorima (trajanje bolesti, brojčane varijable, CRP, RF, haptoglobin, 6-item-VAS-SS, ESSDAI, ESSPRI) procijenjena je primjenom jednostavne ili multiple linearne regresije.

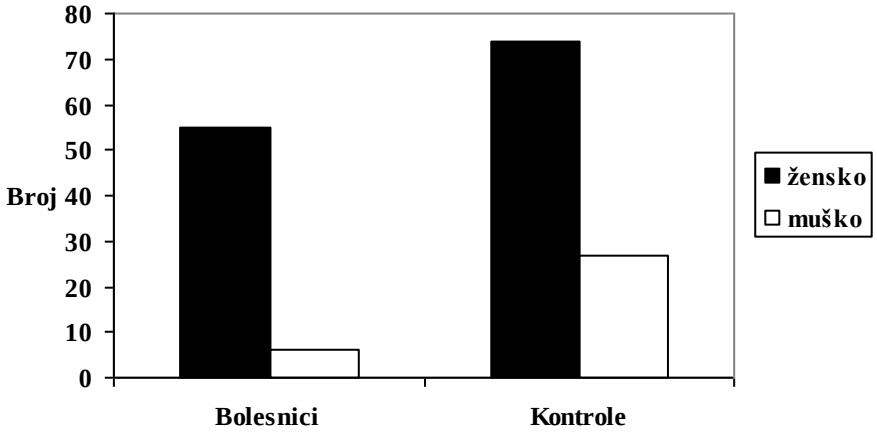
Rezultati su interpretirani na 5%-tnoj razini značajnosti ($p < 0.05$). Svi izračuni i statističke analize učinjene su primjenom programskog paketa Statistica Version 8.0 for Windows (StatSoft Inc.Tulsa, Oklahoma, USA).

4 REZULTATI

4.1 Analiza općih podataka

4.1.1 Demografski podaci

U ispitivanje je uključeno 61 bolesnik s pSS; 55 žena (90,16%) i 6 muškaraca (9,84%) i 100 zdravih kontrola dobrovoljnih darivatelja krvi; 74 žena (74%) i 26 muškaraca (26%) (**Slika 9) i (Tablica 8).**



Slika 9. Distribucija bolesnika s pSS i zdravih kontrola prema spolu

Tablica 8. Deskriptivna statistika za spol bolesnika s pSS i kontrola

Varijabla (SPOL)	Žene	Muškarci	Ukupno
BOLESNICI	55 90,16%	6 9,84%	61
KONTROLE	74 74,0%	26 26%	100
UKUPNO	129	32	161

Srednja dob bolesnika s pSS 59,39±11,23 godina, za žene 59,82 i muškarce 55,5 godina. U skupini zdravih kontrola prosječna dob je bila niža 38,04±12,67 godine; za žene 37,68 i muškarce 39,04 godina (**Tablica 9**).

Tablica 9. Deskriptivna statistika za dob bolesnika s pSS i kontrola prema spolu.

	DOB	Sredina	Medijan	Minimum	Maksimum	SD
BOLESNICI	**(N)**					
Ukupno	61	59,39	59,4	34	80	11,23
Žene	55	59,82	57	34	77	11,17
Muškarci	6	55,5	55	42	77	12,24
KONTROL						
Ukupno	97	38,04	38	19	66	12,67
Žene	74	37,68	38	19	66	13,34
Muškarci	26	39,04	39	24	59	10,8

Tablica 10. Razlike između bolesnika s pSS i zdravih kontrola po dobi i spolu

Varijabla	Bolesnici & Kontrole	p-vrijednost
Spol		**0,0094**
Dob		**0,001**

Pomoću X^2 testa utvrđena je razlika između skupina po spolu (**p=0,0094**) (**Tablica 10**) što je očekivano obzirom na ograničeni, tj. manji udio žena dobrovoljnih darivatelja krvi u odnosu na muškarce, s obzirom na ograničeni vremenski interval (od 8-11 sati na dan prikupljanja uzoraka) potrebnom za uzorkovanje i potom pripremu plazme bogate trombocitima (PRP).

Statističkom analizom demografskih podataka pomoću X^2 testa dokazano je da su se skupine, bolesnici i kontrole statistički značajno razlikovale i po dobi (**p = 0,001**) (**Tablica 10**). U skupini zdravih kontrola dobrovoljnih darivatelja krvi ispitanici su bili očekivano mlađi, a razlog je

ograničeni broj ispitanika odgovarajuće dobi u ograničenom vremenskom intervalu na dan prikupljanja uzoraka krvi.

U nastavku ispitivanja svi ispitanici su bez obzira na razlike u spolu i dobi zadržani u studiji, jer su rezultati ranijih studija pokazali da niti spol ni dob nemaju statistički značajnog utjecaja na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti PSL zdravih ispitanika (Balija 2010, Martin F 1990, Guicheney 1988), niti na funkciju 5-HTT, već PSL u najvećoj mjeri ovisi o aktivnosti 5-HTT budući da trombociti ne sintetiziraju 5-HT (Balija 2010), čemu pridonose dokazi kako se kinetski parametri serotoninskog transportera (5-HTT ili SERT); maksimalna brzina unosa (Vmax) i afinitet tranportera (Km) u fiziološkim uvjetima homeostatski kompenziraju. Stoga se statistički značajno niža Vmax i niži Km u starijoj dobi kompenziraju efikasnošću (Vmax/Km) koja se ne mijenja značajno s dobi (Balija 2010).

Ukupno trajanje bolesti od nastupa simptoma bolesti (sicca simptomi) prosječno je bilo 8,21 godinu (raspon od 1-23), a bolesti od postavljanja dijagnoze pSS prosječno 5,54 godine (od 1-19) (**Tablica 11**).

Tablica 11. Deskriptivna statistika za trajanje simptoma bolesti i od postavljanja dijagnoze pSS

Varijabla	(N)	Sredina	Medijan	Min	Max	SD
Početak simptoma	56	8,21	7	1	33	6,87
Trajanje bolesti pSS	57	5,54	4	1	19	4,4

Metodom jednostavne linearne regresije, tj. korelacijskom analizom vrijednosti nije utvrđen utjecaj trajanja simptoma od početka nastupa ($p = 0,8559$) niti trajanja simptoma od postavljanja dijagnoze pSS na PSL ($p = 0,6662$) (**Tablica 11**).

4.2 Varijable trombocita

4.2.1 Koncentracija 5-HT u trombocitima (PSL), broj i volumen trombocita

Vrijednosti trombocitnih varijabli, volumena trombocita, broja trombocita i koncentracije trombocitnog serotonina (PSL) u skupinama bolesnika i zdravih kontrola prikazane su u **Tablici 12**. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD).

Tablica 12. Deskriptivna statistika trombocitnih varijabli; broj, volumeni koncentracija serotonina u trombocitima (PSL)

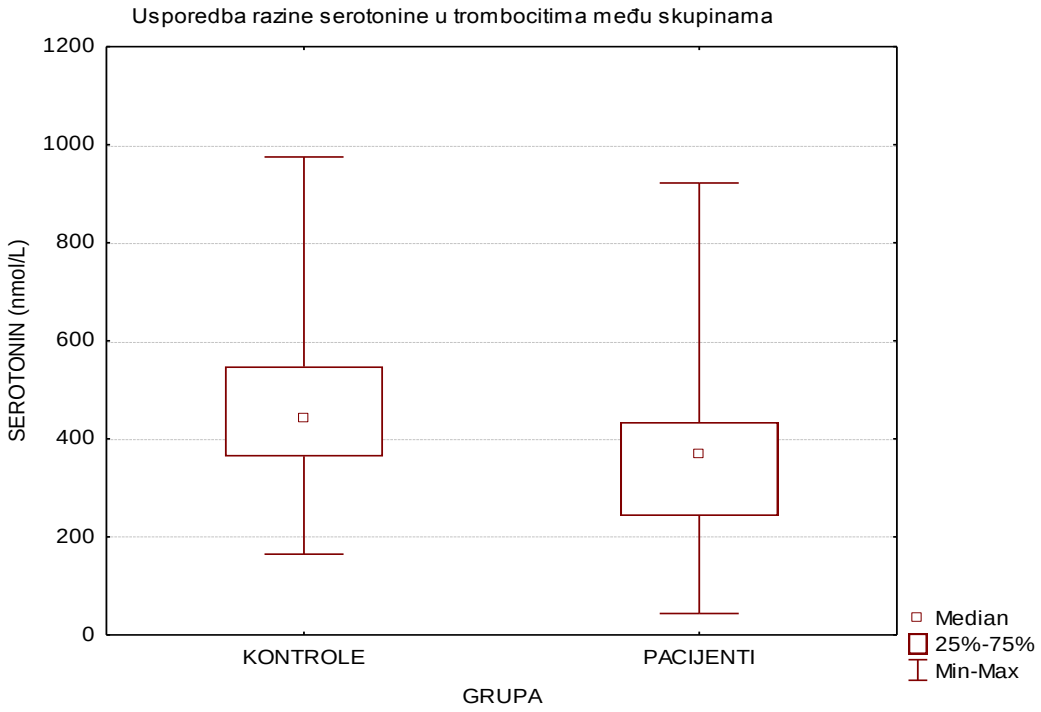
	(N=61)	**Sredina**	**Medijan**	**Minimum**	**Maksimum**	**SD**
BOLESNICI						
Vol.trombocita	61	9,41	9,41	7,3	11,6	1,05
Žene	55	9,46	9,2	5,0	11,6	1,20
Muškarci	6	8,87	8,9	8,0	9,8	0,77
Br.trombocita	61	315,29	315,0	107,0	599,0	101,0
Žene	55	316,16	315,0	107,00	599,0	104,45
Muškarci	6	307,22	314,0	206,0	391,0	70,02
PSL	61	384,90	367,59	43,81	922,12	209,28
Žene	55	396,0	372,73	43,81	922,12	217,12
Muškarci	6	283,15	272,28	230,18	367,59	51,32
KONTROLE						
Vol. Trombocita	**100**	9,77	9,77	7,8	12,1	0,95
Žene	74	9,73	9,7	7,8	12,1	0,96
Muškarci	26	9,84	9,9	7,8	12,1	0,9
Br. trombocita	**100**	343,36	351,5	138	658	100,4
Žene	74	340,74	348,5	138	658	103,04
Muškarci	26	350,81	361	150	539	93,83
PSL	**100**	464,35	442,5	165	975	157,29
Žene	74	480,4	459	165	975	161,7
Muškarci	26	418,65	413	175	701	136,6

Vol. trombocita – volumen trombocita, Br. Trombocita – broj trombocita, PSL – koncentracija trombocitnog serotonina

Statističkom analizom pomoću Mann-Whitney U testa dokazano je da se bolesnici s pSS ne razlikuju značajno od kontrola u broju trombocita (p = 0,093); žene (p = 0,22) i muškarci (p = 0,24), niti u volumenu trombocita (p = 0,13); žene (p = 0,076) i muškarci (p = 0,21), ali bolesnici s pSS ukupno statistički značajno niži PSL od zdravih kontrola ukupno (**p = 0,0007**)(**Slika 10**); i žene s pSS (**p = 0,002**) i muškarci s pSS (**p = 0,01**) (**Tablica 13**) su imali niži PSL od zdravih kontrola.

Tablica 13. Razlika u varijablama trombocita; broju trombocita, volumenu trombocita i PSL između skupina u odnosu na spol

Varijable trombocita	**Bolesnici & Kontrole**
	p-vrijednost
Broj trombocita	
Žene	0,2191
Muškarci	0,2439
Svi	0,093
Volumen trombocita	
Žene	0,076
Muškarci	0,2065
Svi	0,13
Trombocitnim serotonin (PSL)	
Žene	**0,0022**
Muškarci	**0,01**
Svi	**0,0007**



p = 0,0007

Slika 10. Usporedba koncentracije trombocitnog serotonina (PSL) između bolesnika s pSS i zdravih kontrola prikazana grafički pomoću verticals bars intervals prikaza.

Analizom pomoću X^2 testa utvrđena je razlika između skupina po spolu (**p = 0,0094**) (**Tablica 13**) što je očekivano obzirom na značajno manji udio žena dobrovoljnih darivatelja krvi u ograničenom vremenskom intervalu potrebnom za pripremu PRP (engl. platelet rich plasma) na dan uzorkovanja krvi. Statističkom analizom demografskih podataka pomoću X^2 testa dokazano je da su se skupine, bolesnici i zdrave kontrole statistički značajno razlikovale po dobi (**p = 0,001**) (**Tablica 14**). U skupini zdravih kontrola dobrovoljnih darivatelja krvi ispitanici su bili očekivano mlađi. Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja životne dobi na varijable trombocita pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova, u skupini bolesnika s pSS nije utvrđen utjecaj dobi na broj trombocita (p = 0,267), volumen trombocita (p = 0,414) niti na PSL (p = 0,95). U kontrolnoj skupini nije utvrđen utjecaj dobi na broj i volumen trombocita (p = 0,436, p = 0,718) (**Tablica 14**), dok je dokazan utjecaj dobi na PSL (**p = 0,0005**). Obzirom na rezultate ranijih studija na zdravim ispitanicima (Balija 2010) kojima je utvrđeno kako ni spol niti dob nemaju značajnijeg utjecaja na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti PSL zdravih ispitanika niti na funkciju 5-HTT već PSL u najvećoj mjeri ovisi o aktivnosti 5-HTT, u studiji smo zadržali sve ispitanike.

Tablica 14. Razlike u vrijednosti trombocitnih varijabli (broja, volumena i PSL) obzirom na dob u skupini bolesnika i kontrola.

Varijabla	**DOB(N=61)**	**p-vrijednost**
BOLESNICI		
Broj trombocita		0,267
Volumen trombocita		0,414
PSL		0,95
KONTROLE		
Broj trombocita		0,436
Volumen trombocita		0,718
PSL		**0,0006**

4.3 Serumske varijable u bolesnika s pSS

Analizirane su vrijednosti serumskih varijabli u skupini bolesnika s pSS (**Tablica 15**).

Tablica 15. Deskriptivna statistika bolesnika s pSS po varijablama seruma

Varijabla	(N)	Sredina	Medijan	Minimum	Maksimum	SD
SE	59	23	18	6	90	16,12
CRP	56	3,12	2,25	0,20	14,9	2,90
RF	46	22,25	6,75	0,20	151	34,21
Hpt	49	1,51	1,43	0,57	3,0	0,54
Ukupni proteini	56	75,33	75,5	65	88	4,97
Gama globulini	56	12,25	12,25	1,22	29,2	4,11
C3	56	1,1	1,1	0,3	1,7	0,26
C4	56	0,26	0,25	0,12	0,46	0,086

SE – sedimentacija, CRP – C reaktivni protein, RF – reumatoidni faktor, Hpt – haptoglobin, C3 i C4 – komplement

Tablica 16. Učestalost patoloških uzoraka prema varijablama seruma u bolesnika s pSS

Varijabla	Svi uzorci (N)	Patološki uzorci (%)
SE	59	18 (31)
CRP	56	16 (29)
RF	46	16 (35)
Hpt	49	8 (16)
Ukupni proteini	56	16 (29)
Gama globulini	56	16 (29)
C3	56	7 (13)
C4	56	5 (9)

Učestalost patoloških uzoraka prema varijablama seruma u bolesnika s pSS pokazuje relativno visoki udio bolesnika s patološki povišenim vrijednostima RF (35%), a manji udio bolesnika s patološkim vrijednostima SE (31%), gama globulina i CRP (29%) i slabi udio bolesnika s patološki promijenjenim vrijednostima haptoglobina (16%), C3 (13%) i najmanje C4 (9%) (**Tablica 16**).

Tablica 17. Učestalost specifičnih protutijela u bolesnika s pSS

Protutijela (N=61)	Pozitivni (N)%	Negativni (%)
ANA	36 (59)	25 (41)
anti-Ro/SS-A	22 (36,1)	39 (63,9)
anti-La/SS-B	17 (27,9)	44 (72,1)
SS-A/SS-B	17 (27,9)	44 (72,1)

U **Tablici 17** prikazana je učestalost pojavljivanja specifičnih protutijela. Najveća je učestalost protutijela ANA (59%), SS-A (36,1%) i SS-B (27,9%) bolesnika s pSS.

4.3.1 Utjecaj serumskih varijabli na PSL u bolesnika s pSS

Tablica 18. Povezanost PSL i serumskih varijabli u bolesnika s pSS

Serumska varijabla	PSL (N)	p-vrijednost
SE	57	0,3676
CRP	54	0,9328
RF	44	0,3051
Hpt	47	0,2766
Ukupni proteini	54	0,4202
Gama globulini	54	0,5204
C3	54	0,6443
C4	54	0,2624

Metodom jednostavne linearne regresije nije utvrđena povezanost PSL niti sa jednom od analiziranih varijabli seruma prikazanih u tablici 11, te se može reći kako niti jedna od ispitivanih varijabli seruma nema izravnog utjecaja na PSL (**Tablica 18**).

Tablica 19. Povezanost serumskih protutijela s PSL i razinom gama globulina u bolesnika s pSS

Varijabla	PSL (N)	p	Gama globulini	p
ANA	36	0,7427	36	**0,0021**
anti-Ro/SS-A	22	0,8452	22	**0,0039**
anti-La/SS-B	17	0,6408	17	**0,0011**

Analizom varijance ANOVA nije utvrđen utjecaj serumskih protutijela ANA, SS-A i SS-B na PSL (**Tablica 19**). Analizom pomoću Mann-Whitney U testa, međutim dokazano je da je razina gama globulina statistički značajno povezana s razinom serumskih protutijela specifičnih za pSS; anti-Ro/SS-A (**p = 0,0039**) i anti-La/SS-B (**p = 0,0011**), ali i s ANA (**Tablica 19**).

4.4 Polimorfizmi gena za serotoninski transporter (5-HTT)

U analizi varijacija promotora 5-HTTLLPR, koristili smo bi-alelnu i tri-alelnu klasifikaciju sa slijedećim varijacijama 5-HTTLPR haplotipova: S_AS_A, S_GS_G, L_AS_A, L_AL_A, L_AL_G i L_GS_A i SERT-in2VNTR genotipova: l/l, l/s i s/s alela. Budući je alel L_G funkcionalno sličan S alelu, analizirali smo distribuciju procijenjenih („estimated“) haplotipova (L_A, L_G i S_A) i faznih („phased“) haplotipova (L_AL_A, L_AL_G, L_AS_A, L_GS_A i S_AS_A) transformirajući klasifikaciju u trialelno/bialelni model prema razini alelne ekspresije: S_AS_A, L_GS_A iL_GL_G kaoS'S'; L_AS_A i L_AL_G kao L'S'; i L_AL_A kao L'L' (Hu 2006, Parsey 2006) i potom odredili učestalost grupiranih faznih haplotipova, „engl. *clustered phased haplotypes"* npr. L'L', L'S' i S'S'. Frekvencije su izražene u postocima. Haplotipove i fazne haplotipove smo koristili obzirom na recentno dokazani dodatni polimorfizam proksimalno od Ins/Del lokusu, kao što je rs25531, rs25532, rs202933 i 17-bp varijabilni broj ponavljanja na intronu dva (in2VNTR) (Hu 2005). Polimorfizam rs25531, najbliži 5-HTTLPR rezultira u „A“ i „G“ supstitutima za koje se dokazalo kako moduliraju transkripcijsku učinkovitost promotorske regije 5-HTTLPR. Manji „G“ alel rs25531 je u kontinuitetu u fazi s 5-HTTLPR dugog alela 5-HTT i slabi transkripcijsku učinkovitost u odnosu na 5-HTTLPR kratkog alela. K tome, modulacija 5-HTTLPR pomoću rs25531 rezultira u haplotipovima s visokom (L_A) ili niskom (L_G, S_A ili S_G) transkripcijskom učinkovitosti. (Hu 2006). Na ovoj osnovi, grupirali smo fazne haplotipove i kako bi dobili distribuciju ili učestalost pojavljivanja, odnosno njihov učinak na koncentraciju trombocitnog serotonina i/ili na depresivnost i umor.

4.4.1 Distribucija haplotipova 5-HTTLPR i rs25531 polimorfizama u bolesnika s pSS i kontrola

Učestalost haplotipova 5-HTTLPR polimorfizma obzirom na prisutnost ili odsutnost 44 parova-baza (5-HTTLPR): S_AS_A, S_GS_G, L_AS_A, L_AL_A, L_AL_G i L_GS_A nalazi se u **Tablici 20.**

Tablica 20. Procijenjene i fazne haplotipske distribucije 5-HTTLPR i rs25531 polimorfizama na genu za 5-HTT u bolesnika s pSS i zdravih kontrola

	BOLESNICI s pSS (N = 61)	**KONTROLE (N = 94)**	
Haplotipske frekvencije	**n (freq. %)**	**n (freq. %)**	
L_A	70 (57,38)	95 (50,53)	X^2= 1,73; p = 0,42
L_G	8 (6,56)	19 (10,11)	X^2= 1,74; p = 0,42
S_A	44 (36,07)	74 (39,36)	X^2= 0,19; p = 0,91
Grupirane haplotipske frekvencije			
L_A	70(81,87)	95 (50,53)	X^2= 1,56; p = 0,212
L_G+S_A	52(42,62)	93 (49,47)	X^2= 1,62; p = 0,444
Fazne haplotipske frekvencije			
L_AL_A	20 (32,79)	26 (27,66)	X^2 = 3,0; p = 0,7
L_AS_A	24 (39,34)	31 (32,98)	
L_AL_G	6 (9,84)	12 (12,77)	
L_GL_G	0 (0)	1 (1,06)	
L_GS_A	2 (3,28)	5 (5,32)	
S_AS_A	9 (14,75)	19 (20,21)	
Grupirane fazne haplotipske frekvencije			
L'L'	20 (32,79)	26 (27,66)	X^2 = 1,97; p = 0,372
L'S'	30 (49,18)	43 (45,74)	
S'S'	11 (18,03)	25 (26,6)	
Nositelji faznih haplotipova			
(S'S') *vs* (L'L'+L'S')	11 (18,03)	25 (26,6)	X^2 = 1,56; p = 0,212
L'L' *vs* (L'S' + S'S')	20 (32,77)	26 (27,66)	X^2 = 0,46; p = 0,496

Analizirali smo distribucije procijenjenih (prema engl. estimated) i faznih haplotipova pretvarajući klasifikaciju u trialelni-bialelni model prema razini ekspresije alela SLC6A4 5-HTLPR haplotipova S_AS_A, S_GS_G L_AL_A, L_AS_A, L_AL_G, L_GS_A i L_GL_G , kao S'S', L_AS_A i , L_AL_G kao L'S'; L_AL_A kao L'L' (Hu 2006, Parsey 2006) u skupini bolesnika s pSS. U skupini bolesnika s pSS distribucija haplotipova L_A, L_G i S_A 5-HTTLPR je bila 57,38%, 6,56% i 36,07%), a učestalost faznih haplotipova bila je: L_AL_A 20 (32,79), L_AS_A 24 (39,34), L_AL_G 6 (9,84), L_GL_G 0 (0), L_GS_A 2 (3,28), S_AS_A 9 (14,75%), a najučestaliji je fazni haplotip L_AS_A. Reklasifikacijom u bialelni sustav kojim haplotip L_G ima funkcionalni učinak alela S, grupirane fazne haplotipske frekvencije su slijedeće; L'L' 20 (32,79%), L'S' 30 (49,18%), i najrjeđi genotip S'S' 11 (18,03%). U skupini bolesnika 18,03% je nositelja faznih haplotipova S'S' i 32,77% nositelja L'L' (**Tablica 20**)

U kontrolnoj skupini distribucija haplotipova 5-HTTLPR je pokazala najveću učestalost haplotipa L_A (50,53%) , a L_G i S_A (10,11% i 39,36 %), a frekvencije faznih haplotipova 5-HTLPR u kontrolnoj skupini su: S_AS_A (20,21%), L_AL_A (27,66%), L_AS_A (32,98%), L_AL_G (12,77%), L_GS_A (5,32%) i L_GL_G (1,06%), s najvećom učestalosti pojavljivanja faznog haplotipa L_AS_A 32,98%. Budući haplotip L_G ima funkcionalni učinak kao S', grupirane fazne haplotipske frekvencije 5-HTTLPR polimorfizma u grupi bolesnika su: L'L' (27,66%), L'S' 43 (45,74%) i S'S' (26,6%), a učestalost nositelja faznih haplotipova za S'S' 26,6% i L'L' 27,66% **(Tablica 20).**

Statističkom analizom pomoću X^2 testa, što se tiče procijenjene haplotipske analize nije bilo statistički značajne razlike između skupina bolesnika i kontrola u frekvenciji haplotipova (L_A, L_G i S_A)(p = 0,42, p = 0,42, p = 0,91), niti značajnih razlika u učestalosti grupiranih haplotipskih frekvencija L_A iL_G +S_A (p = 0,212 i p 0 0,444) i faznih haplotipskih frekvencija (p 0 0,7). Pomoću X^2 testa praćene su i grupirane fazne haplotipske frekvencije (L'L', L'S' i S'S') (p = 0,372) i nositelji faznih haplotipova (S'S') *vs* (L'L'+L'S') i L'L' *vs* (L'S' + S'S') i nisu dokazane statistički značajne razlike između skupina niti u jednoj od ispitivanih kategorija.

4.4.2 Distribucija alela i genotipova 5-HTTin2VNTR u bolesnika s pSS i kontrola

Alelna i genotipska distribucija 5-HTT-in2VNTR polimorfizma (*s alel; 9 ili 10 ponavljajućih jedinica i l*ong alel, *l* = 12 ponavljanja) nalazi se u **Tablici 21.**

Tablica 21. Alelne i genotipske distribucije 5-HTT-in2VNTR u bolesnika s pSS i kontrola

Polimorfizam	**BOLESNICI s pSS N=61(%)**	**KONTROLE N=100 (%)**	
5-HTTin2VNTR Alelne Frekvencije			
l	82 (67,21)	116 (60,10)	
s	40 (32,79)	77 (39,90)	X^2test = 3,76; **p = 0,0525**
Genotipske frekvencije			
ll	30 (49,18)	32 (33.33)	
ls	20 (36,06)	51 (53,13)	
ss	11 (14,75)	13 (13,54)	X^2test = 4,77; p = 0,092
Nositelji			
l	55 (63,95)	86 (56,95)	
s	31 (36,05)	65 (43,05)	

(s-short 9 i 10 ponavljanja; l-long 12 ponavljanja

Praćena je učestalost pojavljivanja alela l i s i genotipova l/l, l/s, i s/s 5-HTTin2VNTR za obje skupine. U skupini bolesnika s pSS učestalost alela je bila: „l“ (67,21%) i „s“ (32,79%), a frekvencija genotipova l/l (49,18%), l/s (36,06%) i s/s (14,75%),a najčešći je genotip l/s. U kontrolnoj skupini frekvencije alela „l“ i „s“ su su bile 60,1% i 39,9%, a genotipova l/l (33,33%), l/s (53,13%) i s/s (13,54%), a najčešći genotip je l/s (53,13%).

Pomoću X^2 testa utvrđena je granično statistički značajna alelna razlika, tj. veća učestalost pojavljivanja alela „s“ u kontrolnoj skupini 5-HTTin2VNTR (X^2 test = 3,76; **p=0,0525**). Može se reći da postoji tendencija učestalijeg pojavljivanja alela „s*“* na 5-HTTin2VNTR u kontrolnoj skupini u odnosu na bolesnike s pSS (**Tablica 21**). Pomoću X^2 testa, nije međutim, utvrđena genotipska razlika među skupinama (p = 0,496).

4.5 Utjecaj polimorfizama 5-HTT na PSL

4.5.1 Utjecaj polimorfizama 5-HTTLPR na PSL

Tablica 22. Deskriptivna statistika za PSL prema 5-HTTLPR grupiranim faznim haplotipovima L'L', L'S' i S'S' u bolesnika s pSS i kontrola

Varijabla	PSL	Sredina	Minimum	Maksimum	SD
BOLESNICI i KONTROLE					
L'L'	46	447,99	75,17	922,12	198,06
L'S'	73	426,47	43,81	975,00	180,41
S'S'	36	457,07	63,64	831,00	168,37
BOLESNICI					
Fazni haplotipovi					
S'	41	358,57	43,81	874,87	183,67
L'	50	382,01	43,81	922,12	212,21
Grupirani fazni haplotipovi					
L'L'	20	438,87	63,64	773,29	204,68
L'S'	30	344,11	63,64	773,29	204,68
S'S'	11	398,04	43,80	874,87	176,86
Nositelji					
S'S' vs (S'L/'L'L')	50	376,01	43,81	922,12	212,21
L'L' vs (L'S'/S'S')	41	351,57	43,81	874,87	183,67
KONTROLE					
Fazni haplotipovi					
L'	67	473,03	179,00	975,00	156,95
S'	66	483,6	224,00	975,00	154,97
Grupirani fazni haplotipovi					
L'L'	26	455,00	179,00	739,00	151,08
L'S'	43	483,93	258,00	975,00	161,17
S'S'	25	483,04	224,00	8311,00	146,92
Nositelji					
S'S' vs (S'L/'L'L')	69	473,03	179,00	975,00	155,95
L'L' vs (L'S'/S'S')	68	483,78	224,00	975,00	154,97

Tablica 23. Utjecaj 5-HTTLPR polimorfizma na PSL u bolesnika i kontrola

5-HTTLPR	Bolesnici (N=61)	Kontrole (N=94)	Bolesnici & Kontrole
Grupirani fazni haplotipovi	0,4939	0,885	
L'L'			0,4097
L'S'			0,1971
S'S'			0,1235
Nositelji faznih haplotipova			
L'L' vs L'S'S'S'			**0,0000**
S'S' vs S'L'L'L'			**0,0006**

Analizom varijance pomoću Kruskall-Wallis ANOVA testa nije utvrđena statistički značajna razlika u PSL prema genotipovima L'L', L'S' i S'S' 5-HTTLPR unutar skupina: bolesnici s pSS (p = 0,4939) niti u kontrolnoj skuppini (p = 0,8847) (**Tablica 23**). Mann-Whitney testom nije utvrđena povezanost PSL s grupiranim faznim haplotipovima 5-HTTLPR unutar skupina, niti između skupina bolesnika s pSS i zdravih kontrola po grupiranim faznim haplotipovima; L'L' (p = 0,4097), L'S' (p = 0,1917) i S'S' (p = 0,1235).

Utvrđena je razlika u PSL uzmeđu skupina, ali u odnosu na oba haplotipa L' i S' pa se može reći da na razlike u PSL između skupina (niži PSl u bolesnika) ne utječu fazni haplotipovi niti grupirani fazni haplotipovi promotorske regije 5-HTTLPR. Može se reći da ne postoji genetski rizik za niži PSL u bolesnika s pSS niti u kontrolnoj skupini, niti među skupinama obzirom na 5-HTTLPR polimorfizam (**Tablica 23).**

4.5.2 Utjecaj polimorfizma 5-HTTin2VNTR na PSL

Tablica 24. Deskriptivna statistika za PSL u odnosu na genotipove SERT-in2VNTR polimorfizma (ll, ls i ss) u bolesnika s pSS i kontrola

Varijabla	(N)PSL	Mean	Min	Max	SD
BOLESNICI					
Aleli					
l	30	394,5	43,81	922,12	250,59
s	31	506,54	295,00	775,00	138,76
Genotipovi					
ll	30	390,11	49,06	793,37	196,61
ls	22	399,61	43,81	922,12	250,59
ss	9	331,58	152,94	604,04	140,03
Nositelji alela					
ss *vs* (sl/ll)	52	364,61	43,81	922.12	260,12
ll *vs* (ls/ss)	31	375,61	43,81	922,12	242,21
KONTROLE					
Aleli					
l	83	458,51	165,00	975,00	159,37
s	63	471,17	175,00	975,00	161.39
Genotipovi					
ll	32	456,10	165,00	831,00	150,82
ls	51	462,33	175,00	975,00	166,61
ss	12	506,54	295,00	775,00	138,76
Nositelji alela					
ss vs (sl/ll)	83	459,22	165,00	975,00	223,11
ll vs (ls/ss)	63	484,44	175,00	975,00	181,21

Rezultati deskriptivne statistike pokazuju neočekivano najviše vrijednosti PSL u skupini bolesnika prema alelu „s“ i genotipu l/s 5-HTTin2VNTR, a u kontrolnoj skupini prema alelu „s“ i genotipu s/s u skupini kontrola (**Tablica 24**).

Tablica 25. Utjecaj 5-HTTin2VNTR polimorfizma na PSL u bolesnika s pSS i kontrola

5-HTTin2VNTR	Bolesnici (N=61)	Kontrole (N=94)	Bolesnici & Kontrole
Genotipovi	0,8049	0,0602	
ll			0,436
ls			0,0588
ss			**0,0056**
Nositelji alela			
ll vs lsss			**0,0066**
ss vs slll			**0,0033**

Analizom korelacije rangova pomoću Kruskal-Wallis, u skupini bolesnika s pSS nije dokazana statistički značajna povezanost PSL prema genotipovima ll, ls i ss 5-HTTin2VNTR (p = 0,8049), niti u kontrolnoj skupini (p = 0,4360) **(Tablica 25)**.

Usporedbom vrijednosti PSL prema genotipovima l/l, l/s i s/s na 5-HTTin2VNTR između bolesnika s pSS i kontrola pomoću Mann-Whitney U testa, utvrđene su statistički značajno niže vrijednosti PSL u skupini bolesnika nositelja genotipa s/s na 5-HTT-in2VNTR u odnosu na kontrole (**p = 0,0056),** kao i tendencija prema nižim vrijednostima PSL u bolesnika s pSS nositelja genotipa l/s na 5-5HTTin2VNTR nasuprot kontrolama (**p = 0,05888**), dok nije utvrđena razlika među skupinama u PSL obzirom na genotip l/l na 5-HTTin2VNTR (p = 0,0602) (**Tablica 25)**.

Analizom varijance pomoću Kruskall-Walis ANOVA testa nije utvrđena statistički značajna razlika u PSL između 5-HTT-in2VNTR genotipova l/l, l/s, s/s unutar skupine bolesnika s pSS (p = 0,80), niti unutar kontrolne skupine (p = 0,8847) (**Tablica 25**). Međutim, utvrđene su statistički značajno niže vrijednosti PSL u skupini bolesnika nositelja 5-HTT-in2VNTR genotipa s/s prema kontrolama (**p = 0,0056),** kao i tendencija pada PSL u bolesnika s pSS nositelja genotipa l/s 5-5HTTin2VNTR prema kontrolama (**p = 0,05888**), dok nema genotip l/l na 5-HTTin2VNTR nema utjecaja na PSL između bolesnika s pSS i kontrola (p = 0,0602) (**Tablica 25**). Utvrđena je i statistički značajna razlika pomoću Mann-Witney testa u alelnoj analizi SERT-in2VNTR l/l *vs* sl/ss (**p = 0,0033**) i u s/s *vs* sl/ll (**p = 0,0066**) između dvije skupine (**Tablica 25**), naime bolesnici nositelji oba alela „l“ i „s“ na intronu imaju niže vrijednosti od kontrola, ali nema alelne razlike,

stoga se može reći da postoji genotipska razlika među skupinama, tj. da bolesnici nositelji ss genotipa na intronu imaju statistički značajno niže vrijednosti PSL u odnosu na kontrole, dok je ta razlika granična za nositelje l/s genotipa na intronu, a nema razlike prema genotipu ll. Budući da je utvrđena razlika među skupinama u oba alela na intronu, može se reći da postoji jasna samo genotipska razlika razlika, dok ne postoji jasna alelna razlika u PSL obzirom na polimorfizam na intronskoj regiji 5-HTTin2VNTR.

4.5.3 Utjecaj polimorfizma 5-HTTLPR na kliničke varijable u bolesnika s pSS

Multiplom komparacijom pomoću Kruskal-Wallis testa izračunata je povezanost između polimorfizma promotorske regije 5-HTTLPR i kliničkih varijabli aktivnosti bolesti mjerene pomoću objektivne kliničke ljestivce ESSDAI, samoocjenske ljestvice ESSPRI, Beck-ove ljestvice depresije, somataskog i mentalnog umora mjerenih samoocjenskom ljestvicom VAS (**Tablica 26**).

Tablica 26. Povezanost između polimorfizma 5-HTTLPR i kliničkih varijabli ESSDAI, ESSPRI, BDI, somatskog umora-VAS i mentalnog umora-VAS

Klinička varijabla	**5-HTTLPR**
	L'L', L'S', S'S'
	p-vrijednost
ESSDAI	0,159
ESSPRI	0,213
BDI	0,746
Somatski umor-VAS	0,239
Mentalni umor-VAS	0,899
PROF ukupni	0,351
PROsomatski	0,311
PROFmentalni	0,288

Multiplom komparacijom pomoću Kruskal-Wallis testa, nije postojala statistički značajna razlika niti u jednoj od ispitivanih kliničkih varijabli (ESSDAI, ESSPRI, BDI, somatski umor-VAS i mentalni umor-VAS, PROFukupni umor, PROF somatski umor, PROF mentalni umor) obzirom na grupirane fazne haplotipove polimorfizma 5-HTTLPR (**Tablica 26**).

4.5.4 Utjecaj polimorfizma 5-HTTin2VNTR na kliničke varijable u bolesnika s pSS

Multiplom komparacijom pomoću Kruskal-Wallis testa izračunata je povezanost između polimorfizma intronske regije 5-HTTin2VNTR i kliničkih varijabli aktivnosti bolesti mjerene pomoću objektivne kliničke ljestivce ESSDAI, samoocjenske ljestvice ESSPRI, Beck-ove ljestivce depresije, somataskog i mentalno gumora mjerenih samoocjenskom ljestvicom VAS (**Tablica 27**).

Tablica 27. Povezanost između polimorfizma 5-HTTin2VNTR i kliničkih varijabli ESSDAI, ESSPRI, BDI, somatskog umora-VAS i mentalnog umora-VAS

Klinička varijabla	**5-HTTin2VNTR**
	ll, ls, ss
	p-vrijednost
ESSDAI	0,291
ESSPRI	0,926
BDI	0,690
Somatski umor-VAS	0,868
Mentalni umor-VAS	0,725
PROF ukupni umor	0,737
PROF somatski umor	0,788
PROF mentalni umor	0,756

Multiplom komparacijom pomoću Kruskal-Wallis testa, nije dokazana statistički značajna razlika niti u jednoj od ispitivanih kliničkih varijabli (ESSDAI, ESSPRI, BDI, somatski umor-VAS i mentalni umor-VAS, PROF-ukupni umor, PROF-somatski umor, PROF-mentalni umor) obzirom na genotipove polimorfizma intronske regije 5-HTTin2VNTR (**Tablica 27**).

4.6 Kliničke varijable

4.6.1 Rezultati kliničkih objektivnih testova suhoće sluznice

Tablica 28. Deskriptivna statistika bolesnika po rezultatimaa Shirmer testa (ST) i kvantuma salivacije (Qs)

Varijabla	(N)	Sredina	Medijan	Minimum	Maksimum	SD
Shirmerov test	53	9,92	8	2	35	6,79
Test salivacije (Qs)	58	0,79	0,6	0	4,2	0,76

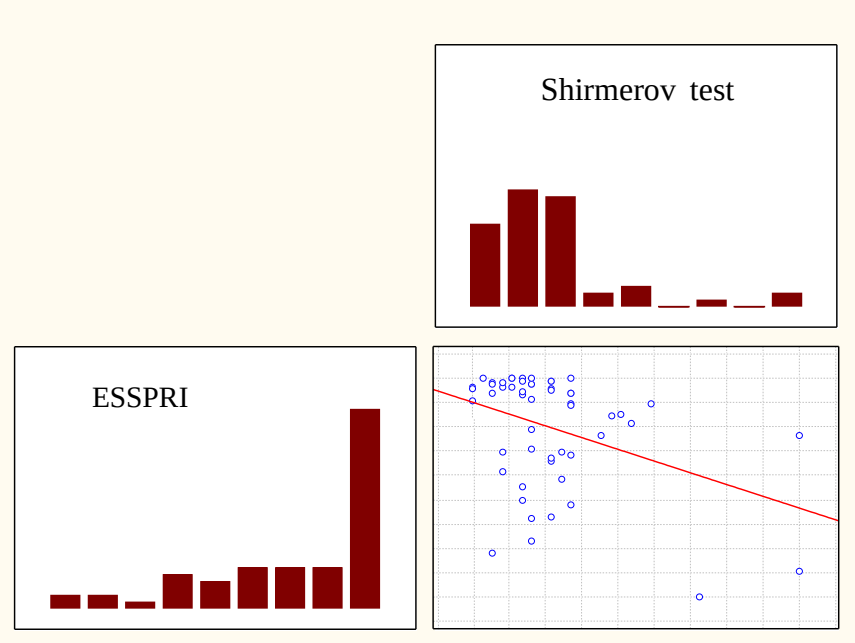
Metodom korelacije pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova nije se dobila pozitivna korelacija između koncentracije serotonina u trombocitima i Shirmerovog testa r = -0,129 (p = 0,3542), niti kvantuma salivacije r = 0,116 (p = 0,3865)(**Tablica 28**).

PSL utječe na rezultate ovih testova uz razine značajnosti prikazane u **Tablici 29**.

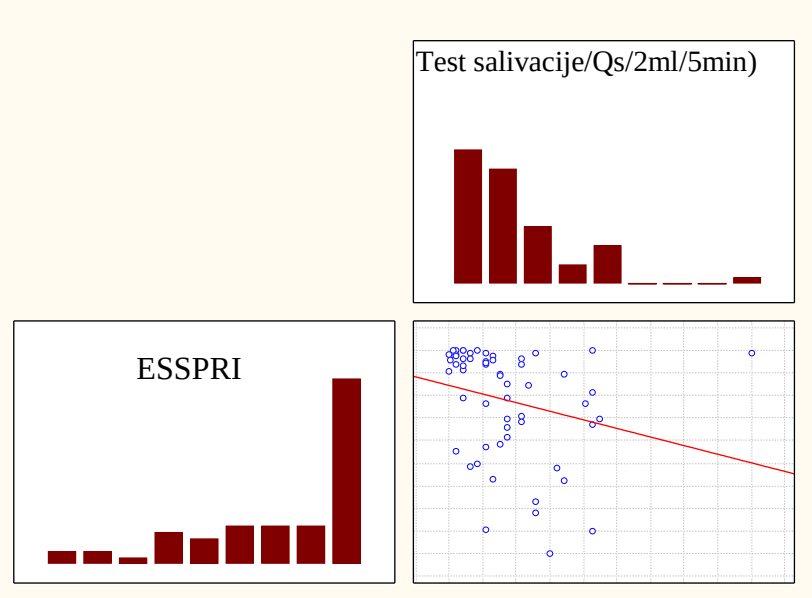
Tablica 29. Povezanost PSL sa Shirmer testom i kvantumom salivacije u skupini bolesnika s pSS

Varijabla	Shirmer test p-vrijednost	Test salivacije (Qs) p-vrijednost
PSL	0,3542	0,3865
SS-A	0,53	0,456
SS-B	0,301	0,205
ESSDAI	0,9548	0,297
ESSPRI	**0,041**	**0,0041**

Metodom korelacije pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova nije dobivena povezanost između PSL i rezultata Shirmer-ovog testa (p = 0,3542) i Testa Salivacije (Qs) (p = 0,3865), rezultata mjerenja suhoće i prisutnosti protutijela SS-A (p = 0,53 i p = 0,456) niti SS-B (p = 0,301 i p = 0,297) u skupini bolesnika s pSS, a nije dokazana niti povezanost ovih testova s kliničkom ljestvicom ESSDAI (p = 0,0,9548 i p = 0,2897), ali je dokazana povezanost rezultata objektivnih mjerenja tj. testova mjerenja s rezultatima samoocjenske ljestvice bolesnikovih tegoba ESSPRI pomoću ljestvice VAS za suhoću sluznica (**p = 0,041** i **p = 0,0041**) (**Tablica 29), (Slika 11 i Slika 12).**



Slika 11. Korelacija rezultata Shirmer testa i ESSPRI



Slika 12. Korelacija rezultata Testa salivacije (Qs) i rezultata ljestvice ESSPRI

Tablica 30. Deskriptivna statistika bolesnika po varijablama PSL i otoka parotida

Otok parotida	PSL (N)	Medijan	Minimum	Maksimum	SD
0 - Nema otoka	36	399,19	49,06	793,37	171,09
1 - Otok ≤ 3 cm	12	325,59	43,80	868,00	239,8
2 – Otok ≥ 3 cm	10	406,68	63,64	922,12	318,91

Nakon dobivenih rezultata is kliničke ljestvice ESSDAI, podijelili smo bolesnike s pSS na one sa otokom parotida (41%) i bez otoka parotida (59%) (**Tablica 30**).

Metodom analize varijance ANOVA nije dokazana povezanost PSL niti razine gama globulina s otokom parotida u bolesnika s pSS (**Tablica 31)**.

Tablica 31. Metoda analiza varijance ANOVA u procjeni povezanosti PSL i otoka parotida u bolesnika s pSS

Varijabla	PSL p-vrijednost	Gama globulini p-vrijednost
Otok parotida	0,3937	0,64

4.6.2 Povezanost PSL s kliničkim varijablama u bolesnika s pSS

Tablica 32. Povezanost PSL sa kliničkim varijablama Shirmer test, Test salivacije, ESSDAI, ESSPRI, suhoća-VAS, bol-VAS, otok parotida, somatski umor-VAS, mentalni umor-VAS, u bolesnika s pSS

Varijabla	PSL r	p-vrijednost
ESSDAI	0,11	0,4134
ESSPRI	-0,13	0,3260
BDI	-0,55	**0,0000**
6-items-VAS-SS	-0,15	9,3198
Somatski umor-VAS	-0,25	**0,051**
Mentalni umor-VAS	-0,17	0,1948
Bol-VAS	0,15	0,2578
Suhoća-VAS	-0,12	0,3376
Otok-parotida	-0,12	0,3438
PROFuk	-0,44	**0,0000**
PROFsom	-0,30	**0,0190**
PROFment	-0,42	**0,001**

ESSDAI – European League Against Rheumatism Sjogren's Syndrome Disease Activity Index, ESSPRI – European League Against Rheumatism Sjogren's Syndrome Patient Report Index, BDI – Beck Depression Inventory, 6-item-VAS-SS (modificirana ljestivca ESSPRI kojoj su uz uz domene suhoće, boli i somatskog umora, pridodane domene parestezija, artralgija i mialgija, VAS – Visual Analogue Scale, PROF – Profile of Fatigue, uk – ukupni umor, som – somatski umor, ment – mentalni umor

Metodom korelacije pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova, utvrđena je dobra korelacija između PSL i depresivnosti u bolesnika s pSS mjerenim Beck-ovom ljestvicom BDI **(p = 0,0000**, r = -0,55), umjerena korelacija s PROFuk i PROF ment (**p = 0,0000**, r = -0,44 i **p = 0,001**, r = -0,42) i slaba korelacija sa somatskim umorom mjerenim ljestvicama PROFsom i VAS (**p = 0,019**, r = -0,3 i **p = 0,051**, r = -0,25)(**Tablica 32**).

4.6.3 Varijable aktivnosti bolesti mjerene kliničkom ljestvicom ESSDAI

Prikaz kliničkih simptoma i sistemske zahvaćenosti koji se javljaju u pSS pomoću broja bodova na kliničkoj ljestvici ESSDAI nalazi se u **Tablici 33**.

Tablica 33. Deskriptivna statistika bolesnika s pSS prema ljestvici ESSDAI

ESSDAI	N	Medijan	Minimum	Maksimum	SD
Žene	55	6,036	1,0	16,0	3,543
Muškarci	6	6,0	2,0	9,0	2,449
Svi	61	6,033	1,0	16,00	3,435

Tablica 34. Tablica frekvencija pojedinih domena aktivnosti bolesti, ESSDAI

Varijabla	N	0	1	2	3
Opći simptomi	61	31	27	3	0
Limfadenopatija	61	31	25	5	0
Otok parotida	61	37	12	10	2
Zglobovi	61	32	18	5	0
Koža	61	44	6	6	5
Pluća	61	50	9	2	0
Bubrezi	61	55	1	0	5
Miozitis	61	56	1	0	5
PŽS	61	41	14	6	0
SŽS	61	32	37	2	0
Hematologija	61	45	14	1	1
Imunologija	61	43	14	4	0

PŽS- periferni živčani sustav, SŽS – središnji živčani sustav

Mjere povezanosti izračunate pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova pokazao je visoku korelaciju između ESSDAI i limfadenopatije r = 0,7361 (**p = 0,0000**), dobru korelaciju sa općim simptomima r = 0,609 (**p = 0,0000**), umjerenu korelaciju sa simptomima zglobova r = 0,5618 (**p = 0,0000**), plućnim simptomima r = 0,4246 (**p = 0,0006**) i renalnim simptomima r = 0,4202 (**p = 0,0007**), umjerenu do slabu korelaciju sa otokom parotida r = 0,3957

(**p = 0,0016**), biološkom domenom (imunološke varijable) r = 0,3949 (**p = 0,0018**) i simptomima perifernog živčanog sustava (PŽS) – neuropatije r = 0,34328 (**p = 0,0068**), slabu korelaciju s hematološkim parametrima (citopenija) r = 0,2965 (**p = 0,0203**), dok nije bilo korelacije s kožnim simptomima r = 0,212 (p = 0,10) i miopatijom r = 0,1801 (p = 0,1647) i simptomima SŽS r = 0,1464 (p = 0,26) (**Tablica 35**).

Tablica 35. Povezanost ESSDAI scora i pojedinih domena ESSDAI ljestice.

ESSDAI	r	p	β-koeficijent
Opći simptomi	0,6097	**0,0000**	0,1455
Limfadenopatija	0,7362	**0,0000**	0,1741
Otok parotida	0,3957	**0,0016**	0,3243
Zglobovi	0,5617	**0,0000**	0,2477
Koža	0,2120	0,10	0,2025
Pluća	0,4246	**0,0007**	0,2468
Bubrezi	0,422	**0,0008**	0,1451
Miozitis	0,1802	0,1647	0,0670
PŽS	0,3433	**0,0068**	0,2739
SŽS	0,1464	0,26	0,1108
Citopenija	0,2965	**0,02**	0,126
Imunologija	0,3949	**0,0018**	0,0953

PŽS- periferni živčani sustav, SŽS -središnji živčani sustav

Tablica 36. Povezanost PSL i domena aktivnosti bolesti objektiviziranih pomoću kliničke ljestivice ESSDAI.

Varijabla	PSL (N)	r	p-vrijednost
Opći simptomi	61	-0,12	0,3523
Limfadenopatija	61	0,057	0,6625
Otok parotida	61	-0,123	0,3438
Zglobovi	61	0,147	0,2577
Koža	61	-0,008	0,567
Pluća	61	0,098	0,453
Bubrezi	61	0,059	0,648
Miozitis	61	0,109	0,402
PŽS	61	0,054	0,674
SŽS	61	0,113	0,382
Hematološka domena	61	0,235	0,068
Biološka domena	61	0,134	0,305

Mjere povezanosti izračunate pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova nisu pokazale korelaciju PSL niti sa jednom od domena kliničke ljestivce ESSDAI (**Tablica 36**).

Deskriptivna statistika za PSL prema stupnju otoka parotida (stupnjevi od 0-3) u bolesnika s pSS mjerenim prema ESSDAI ljestvici prikazana je u **Tablici 37.**

Tablica 37. Deskriptivna statistika za PSL prema stupnju otoka parotida (stupnjevi od 0-3) u bolesnika sa pSS mjerenim prema ESSDAI ljestvici.

Otok parotida	(N=61)	Sredina	Minimum	Maksimum	SD
Stupanj 0	36	399,19	49,05	793,37	171,1
Stupanj 1	12	325,59	43,81	868,0	239,8
Stupanj 2	10	406,68	63,64	922,12	318,9
Stupanj 3	3	410,52	206,21	476,11	105,12

Analizom povezanosti rangova pomoću Kruskall-Wallis ANOVA testa korelacije rangova, nije utvrđena statistički značajna razlika u PSL u skupini bolesnika s pSS sa otokom ili bez otoka parotida (p = 0,3937) (**Tablica 38**).

Tablica 38. Povezanost srumskih varijabli SS-A i gama globulina s otokom parotida u bolesnika sa pSS

Otok parotida	SS-A (N)	p-vrijednost	gama globulini (N)	p-vrijednost
UKUPNO	22	0,1731	56	0,6232
Stupanj 0	15		33	
Stupanj 1	2		10	
Stupanj 2	5		10	
Stupanj 3	0		3	

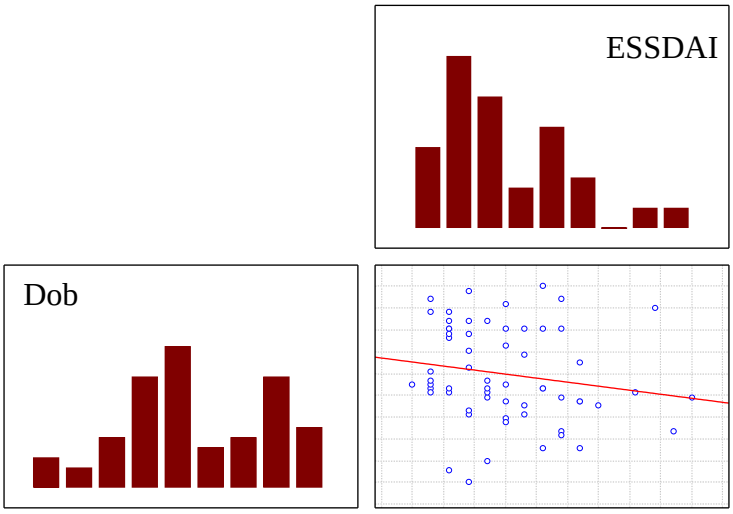
Analizom frekvencija pomoću X^2 testa nije utvrđena veća otoka parotida u odnosu na prisutnost SS-A protutijela (p = 0,1731) (**Tablica 38**). Analizom pomoću Kruskal-Wallis ANOVA testa korelacije rangova, nije dokazana povezanost otoka parotida i povišene razine gama globulina u bolesnika s pSS (**p = 0,6232**) (**Tablica 38**).

Tablica 39. Povezanost reztultata objektivne ljestvice ESSDAI s dobi bolesnika sa pSS, PSL, ESSPRI, BDI, te somatskim i mentalnim umorom mjerenim samoocjenskom ljestvicom VAS.

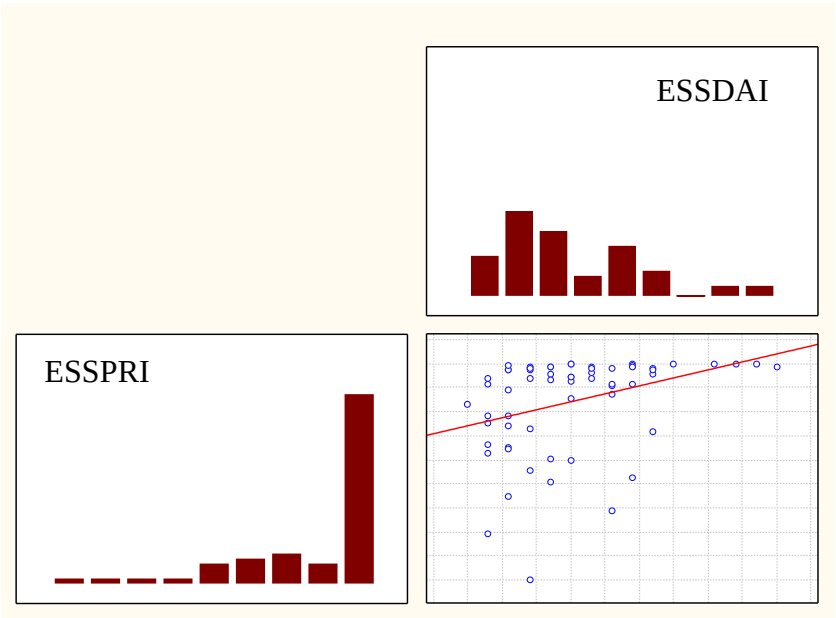
Varijabla	ESSDAI (N)	r	p-vrijednost
Dob bolesnika	61	-0,25	**0,0492**
PSL	61	0,11	0,4133
Shirmer test	53	-0,01	0,9548
Test salivacije	58	-0,14	0,2896
ESSPRI	61	0,46	**0,0002**
BDI	61	0,14	0,2866
Somatski umor (VAS)	61	0,36	**0,0046**
Mentalni umor (VAS)	61	0,43	**0,0005**
PROFuk	61	0,18	0,154
PROFsom	61	0,15	0,25
PROFment	61	0,18	0,157

PROFuk – Profile of Fatigue ukupno somatski i mentalni umor, PROFsom – PROF somatski umor, PROFment – PROF mentalni umor

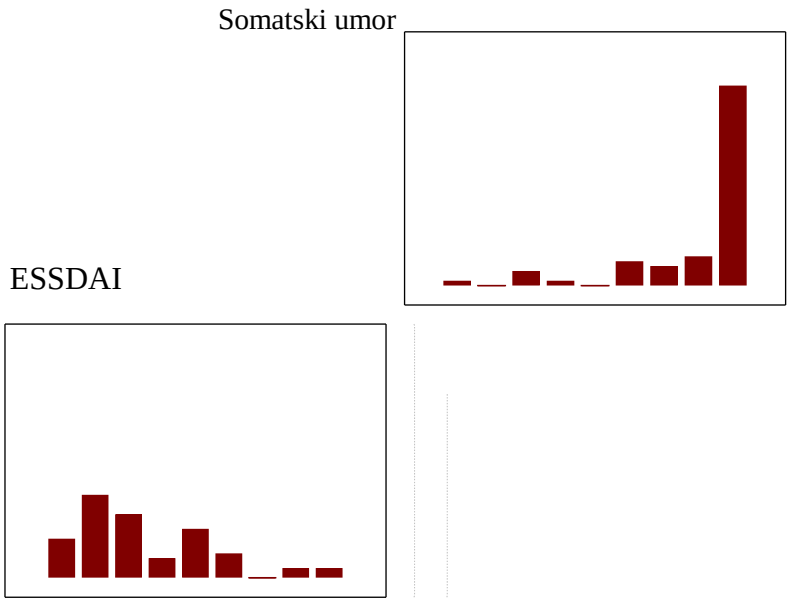
Pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova dobili smo slabu korelaciju između ESSDAI s dobi bolesnika s pSS (**p = 0,0492, r = - 0,25**) i umjerenu s ESSPRI (**p = 0,0002**, r = 0,46), somatskim umorom-VAS (**p = 0,0046**, r = 0,236) i mentalnim umorom-VAS (**p = 0,0005**, r = 0,43), bez povezanosti s umorom mjerenim PROFuk, PROFsom, PROFment (**Tablica 39). (Slika 13-16).**



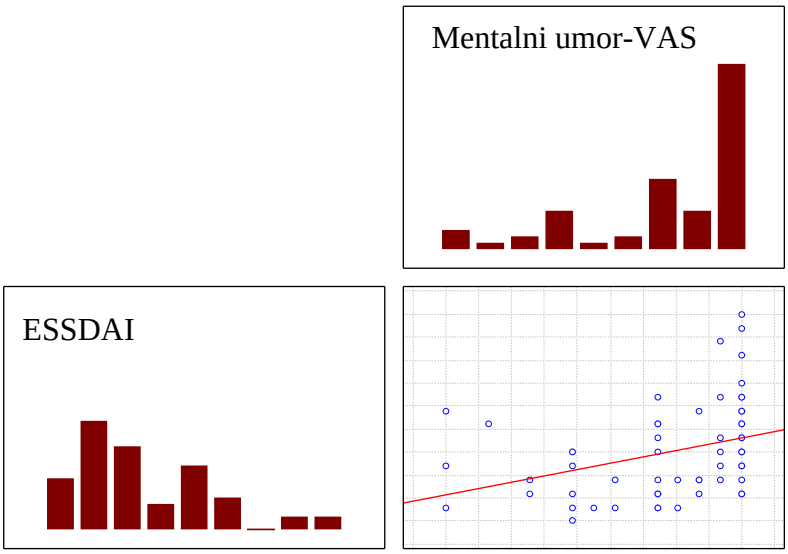
Slika 13. Prikaz korelacije aktivnosti bolesti mjerene kliničkom ljestvicom ESSDAI i dobi u bolesnika s pSS.



Slika 14. Prikaz povezanosti rezultata kliničke ljestvice ESSDAI i rezultata samoocjenske ljestvice ESSPRI



Slika 15. Prikaz povezanosti rezultata kliničke ljestivce ESSDAI i somatskog umora-VAS



Slika 16. Prikaz povezanosti rezultata kliničke ljestvice ESSDAI i mentalnog umora mjerenog ljestvicom VAS.

4.6.4 Varijable subjektivnih bolesnikovih tegoba mjerenih ljestvicom ESSPRI

Prikaz kliničkih simptoma i sistemske zahvaćenosti u bolesnika s pSS pomoću broja bodova na kliničkoj ljestvici ESSDAI nalazi se u **Tablici 40**.

Tablica 40. Deskriptivna statistika bolesnika s pSS prema ljestvici ESSPRI i prema pojedinim domenama ljestvice ESSPRI

Varijabla	(N)	Sredina	Medijan	Minimum	Maksimum	SD
ESSPRI	61	34,82	37,5	19,0	40,0	5,59
Suhoća-VAS	61	9,3	10	7	10	0,91
Bol-VAS	61	8,18	9	2,23	10	2,03
Somatski umorVAS	61	9	10	3	10	1,59

Metodom korelacije pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova, nije dobivena značajno pozitivna korelacija između PSL i subjektivnih tegoba bolesnika sa pSS na ESSPRI samoocjenskoj ljestvici (p = 0,3260, r = -0,13), (**Tablica 41**).

Tablica 41. Korelacija ukupnog rezultata ESSPRI samoocjenske ljestivce i pojedinih domena ESSPRI ljestvice i doprinos varijabli ljestvice ESSPRI u bolesnika sa pSS

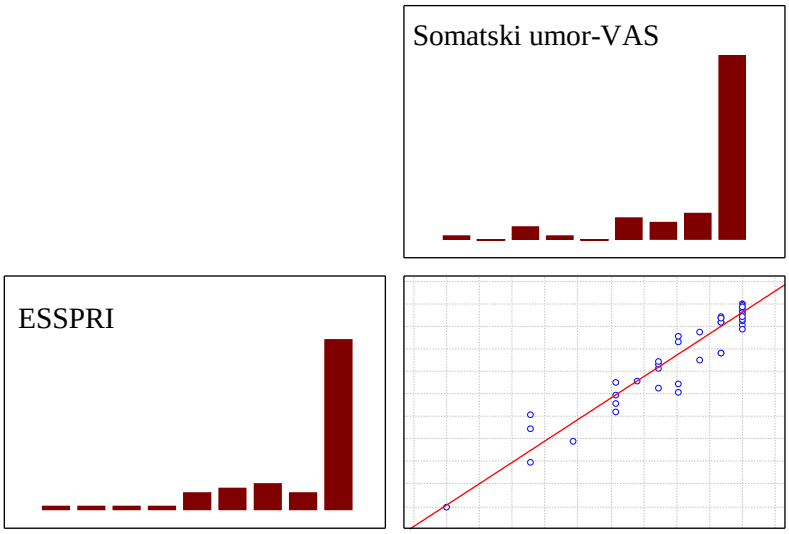
Varijabla	ESSPRI (N)	p-vrijednost	β-koeficijent
ESSPRI			
Suhoća sluznica-VAS	61	**0,0000**	0,3175
Bol-VAS	61	**0,0000**	0,4070
Somatski umor-VAS	61	**0,0000**	0,4399

Metodom multiple regresije, uz razinu vjerojatnosti od p < 0,05, u skupini bolesnika sa pSS dokazana je visoka korelacija između subjektivnih bolesnikovih tegoba (suhoća sluznica, somatski umor i bolnost) mjerenih samoocjenskom ljestvicom VAS, a koje su sastavni dio samoocjenske ljestvice ESSPRI uz razinu značajnosti za suhoću sluznice **(p = 0,0000**), somatskog umora **(p = 0,0000**) i bolnosti (**p = 0,0000**) (**Tablica 41**). Parametrizacijskim testom utvrđen je najveći doprinos domene somatskog umora-VAS (ß-koeficijent = 0,4399), nešto manji domene boli-VAS (ß-koeficijent =0,407) i najmanji za suhoću sluznica (ß-koeficijent=0,3175) (**Tablica 41**).

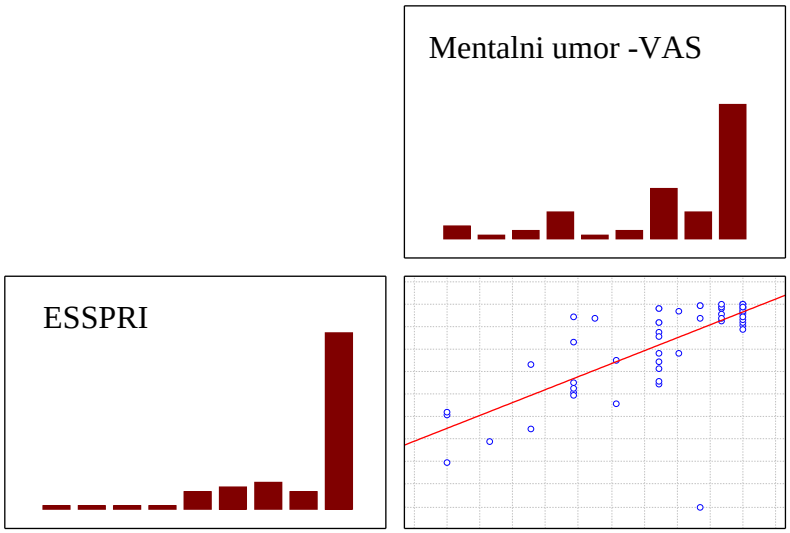
Tablica 42. Povezanost kliničkih varijabli i rezultata ljestvice ESSPRI u bolesnika sa pSS

Varijabla	ESSPRI (N)	r	p-vrijednost
Suhoća	61	0,696	**0,0000**
Bol	61	0,875	**0,0000**
Somatski umor (VAS)	61	0,886	**0,0000**
Mentalni umor (VAS)	61	0,743	**0,0000**
PROF ukupno	61	0,699	**0,0000**
PROF somatski	61	0,706	**0,0000**
PROF mentalni	61	0,742	**0,0000**
PSL	61	-0,128	0,3260
Dob bolesnika	61	-0,251	**0,0509**
ESSDAI	61	0,459	**0,0002**
BDI	61	0,508	**0,0000**
Shirmerov test	61	-0,282	**0,0408**
Test salivacije (Qs)	61	-0,371	**0,0041**

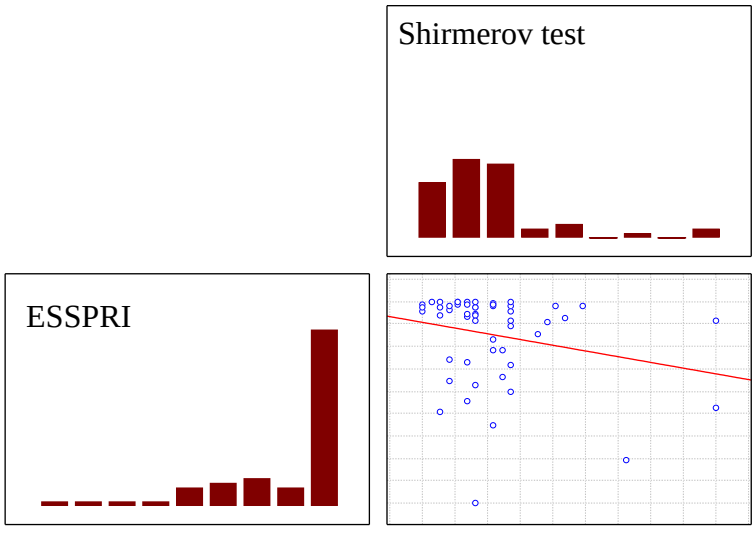
Metodom korelacije pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova, nije utvrđena povezanost između ESSPRI i PSL (p = 0,326), dok je dobivena značajna korelacija sa sve tri domene ESSPRI ljestvice (**p = 0,0000**) i mentalnim umorom-VAS (**p = 0,0000**), umorom mjerenim samoocjenskom ljestvicom PROF (eng. Profile of Fatigue) koja jedio samoocjenske ljestvice PROFAD (engl. Profile of Fatigue and Discomfort), a sastoji se od dvije domene somatskog i mentalnog umora. Metodom korelacije dokazana je visoka korelacija ESSPRI imentalnog PROFment (**p = 0,0000**, r = 0,742) i somatskog umora PROFsom (**p = 0,0000**, r = 0,706) uz visoki koeficijent korelacije. Dokazana je i umjerena povezanost s depresivnosti mjerenom pomoću samoocjenske Beck-ove ljestvice depresivnosti (BDI) uz umjerenu razinu korelacije (**p = 0,0000**, r = 0,51), ESSDAI (p = **0,0002**, r = 0,459) i umjerenu negativnu korelaciju s rezultatima Testa salivacije (**p = 0,0041**, r = -0,37) i slabu s rezultatima Shirmerovog testa (**p = 0,0408**, r = -0,282) i negativnu slabu korelaciju s dobi bolesnika (**p = 0,509**, r = -0,251)(**Tablica 42**)(**Slika 18-21)**.



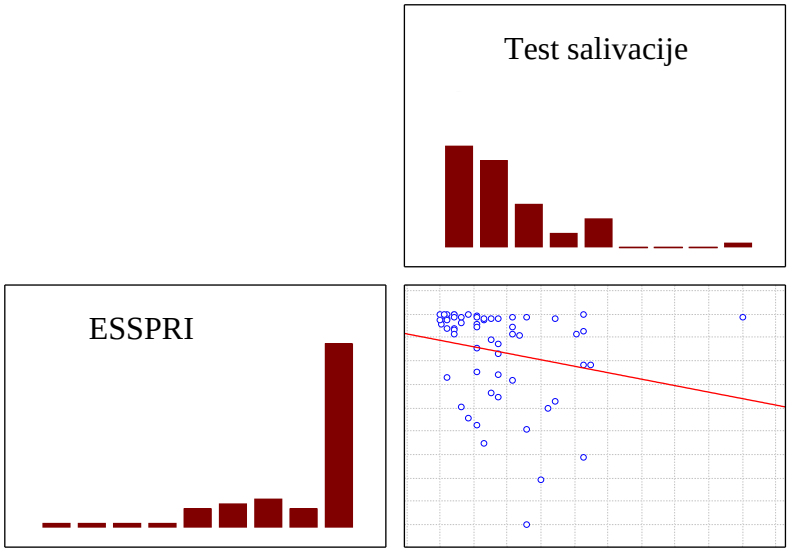
Slika 17. Prikaz povezanosti subjektivnih tegoba bolesnika s pSS mjerenih samoocjenskom ljestvicom ESSPRI i somatskog umora mjerenog samoocjenskom ljestvicom VAS



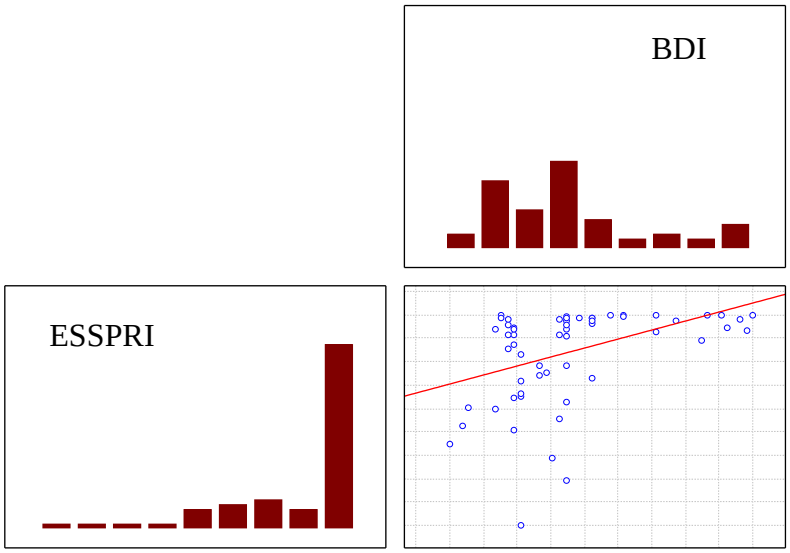
Slika 18. Prikaz povezanosti subjektivnih tegoba bolesnika s pSS mjerenih samoocjenskom ljestvicom ESSPRI i mentalnog umora mjerenog samoocjenskom ljestvicom VAS.



Slika 19. Prikaz povezanosti subjektivnih bolesnikovih tegoba mjerenih pomoću ESSPRI i Shirmer testa



Slika 20. Prikaz povezanosti subjektivnih tegoba bolesnika s pSS mjerenih pomoću ljestivce ESSPRI i Testa salivacije (Qs)



Slika 21. Prikaz povezanosti subjektivnih bolesnikovih tegoba mjerenih ljestvicom ESSPRI i depresivnosti mjerene Beck-ovom samoocjenskom ljestvicom depresije (BDI)

4.6.5 Varijable subjektivnih tegoba bolesnika sa pSS mjerenih ljestvicom 6-items-VAS-SS

Tablica 43. Deskriptivna statistika bolesnika prema ljestvici 6-items-VAS-SS i prema pojedinim domenama ljestvice

Varijabla	(N)	Sredina	Medijan	Minimum	Maksimum	SD
6-items-VAS-SS	61	51,49	55,5	25	60,5	9,27
Suhoća	61	9,31	10	7	10	0,91
Artralgije	61	8,97	9,5	5	10	1,28
Mialgije	61	7,63	8,5	0	10	2,83
Parestezije	61	8,22	9,5	0	10	2,60
Somatski umor	61	9,01	10	3	10	1,59
Mentalni umor	61	8,32	9	3	10	2,01

Metodom multiple regresije, a uz razinu vjerojatnosti od $p < 0,05$, u skupini bolesnika s pSS dokazana je visoka korelacija između subjektivnih bolesnikovih tegoba mjerenih samoocjenskom ljestvicom VAS koje su sastavni dio ljestvice 6-items-VAS-SS i to; suhoće sluznica očiju i usta, artralgija, mialgija, parestezija, somatskog i mentalnog umora sve uz razinu značajnosti (**p = 0,0000**) (**Tablica 44**).

Tablica 44. Korelacija kliničkih simptoma u bolesnika sa pSS i rezultata ljestvice 6-items-VAS-SS

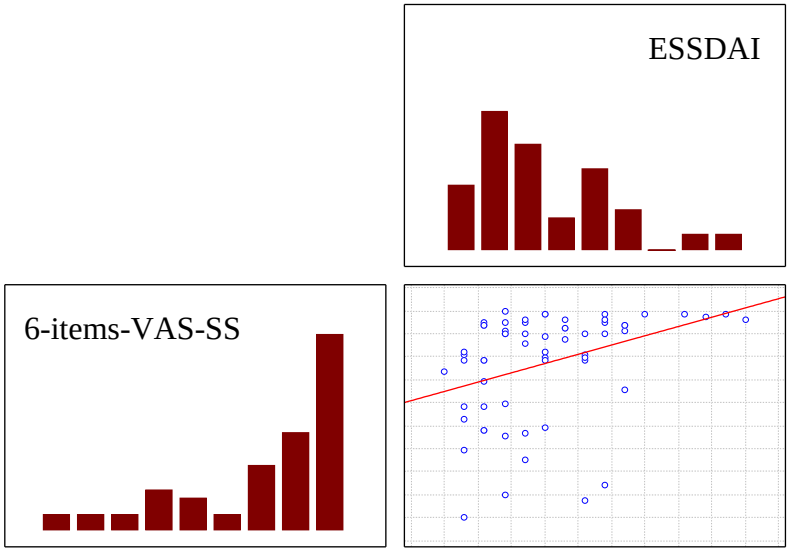
Varijabla	(N)	p-vrijednost	ß-koeficijent
Suhoća	61	**0,0000**	0,10
Artralgije	61	**0,0000**	0,14
Mialgije	61	**0,0000**	0,30
Parestezije	61	**0,0000**	0,28
Somatski umor	61	**0,0000**	0,17
Mentalni umor	61	**0,0000**	0,21

Metodom multiple regresije izračunat je najveći doprinos domene mialgija uz ß-koeficijent=0,30 u ukupnom zbroju bodova samoocjenske ljestvice 6-items-VAS-SS, zatim parestezije (ß-koeficijent=0,28), mentalni umor, somatski umor, artralgije i najmanje suhoća sluznica **(Tablica 44**).

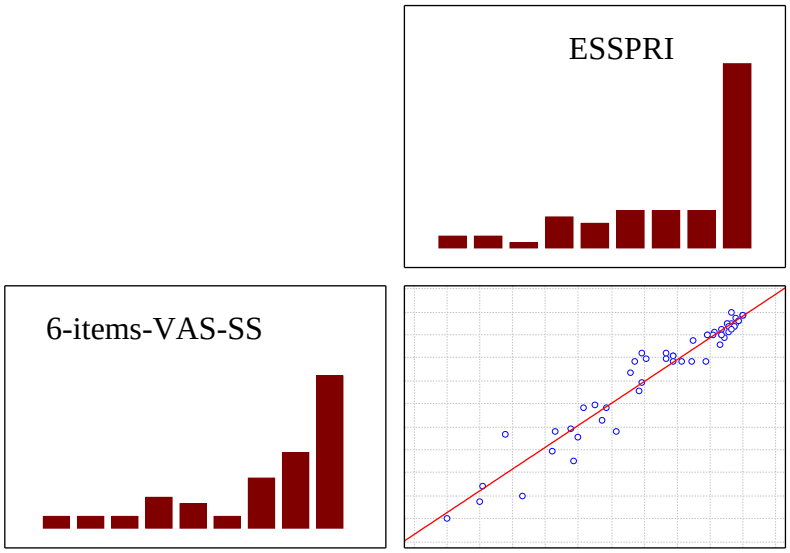
Tablica 45. Povezanost kliničkih varijabli bolesnika s pSS s rezultatima ljestvice 6-items-VAS-SS

Varijabla	6-items-VAS-SS (N)	r	p-vrijednost
Dob bolesnika	61	-0,92	0,0602
PSL	61	-0,75	0,4582
ESSDAI	61	0,97	**0,0000**
ESSPRI	61	0,46	**0,0002**
BDI	61	0,496	**0,0005**

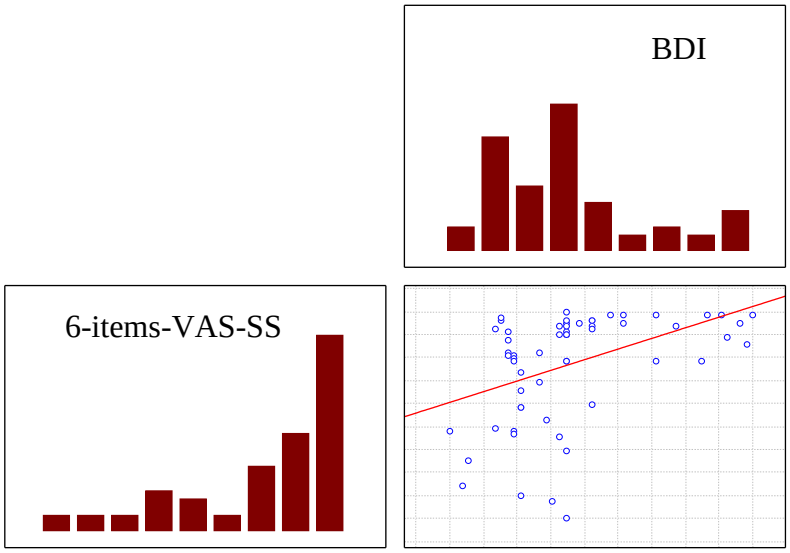
Metodom korelacije pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova, dobivena je značajna pozitivna korelacija 6-items-VAS-SS ljestvice s aktivnosti bolesti mjerene pomoću objektivne ljestivce ESSDAI uz vrlo visoku razinu značajnosti (**p = 0,0000**, r = 0,97) koja povezanost je viša u odnosu na ljestvicu ESSPRI, zatim umjerenu korelaciju s depresivnosti **(p = 0,0005**, r = 0,496) i ljestvicom ESSPRI (**p = 0,0002**, r = 0,46) (**Tablica 45**) (**Slika 22-24**).



Slika 22. Prikaz povezanosti rezultata samoocjenske ljestvice 6-items-VAS-SS i aktivnosti bolesti mjerene pomoću ESSDAI ljestivce.



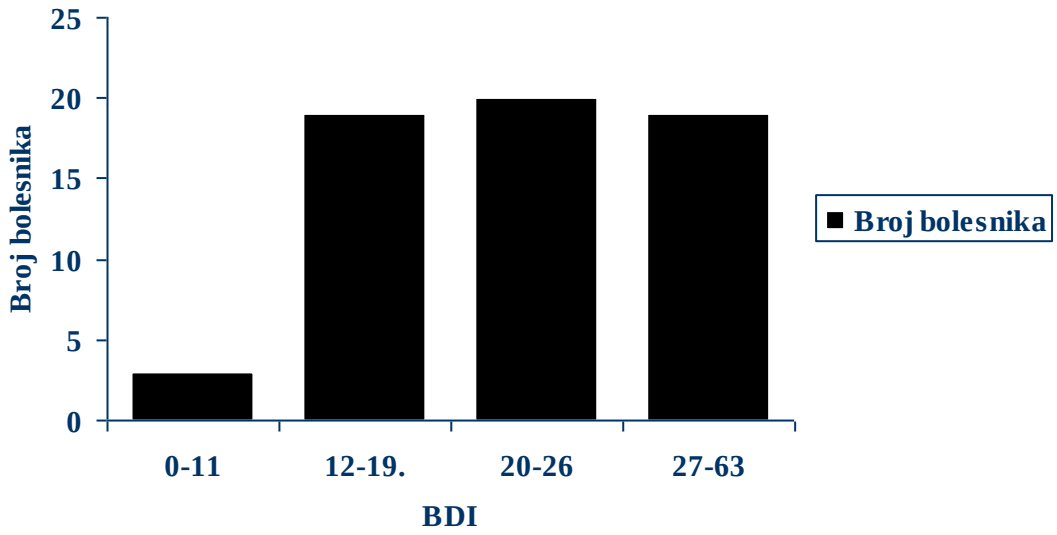
Slika 23. Prikaz povezanosti rezultata samoocjenske ljestvice 6-items-VAS-SS i rezultata ljestvice ESSPRI



Slika 24. Prikaz povezanosti rezultata samoocjenske ljestvice 6-items-VAS-SS i depresivnosti mjerene pomoću Beck-ove ljestvice (BDI)

4.7 Varijable depresivnosti u bolesnika s Sjögrenovim sindromom

Na osnovi bodova samoocjenske Beckove ljestvice depresije (BDI), bolesnici sa pSS su podijeljeni na bolesnike bez depresije (0-11 bodova) 3 bolesnika (5 %), 19 bolesnika (31 %) s blagom depresijom (12-19 bodova), 20 bolesnika (33 %) s umjerenom depresijom (20-26 bodova) i 19 bolesnika (31 %) s teškom depresijom (27-63 bodova) (**Slika 25**).



Slika 25. Prikaz bolesnika sa pSS prema Beckovoj ljestvici depresije

Prema Beckovoj ljestvici depresije, bolesnike sa pSS podijelili smo na bolesnike bez depresije i s blagom depresijom (BDI≤19) 35,95% i na bolesnike s umjerenom i teškom depresijom 64% (BDI ≥ 20) (**Tablica 46**).

Tablica 46. Deskriptivna statistika za PSL i BDI

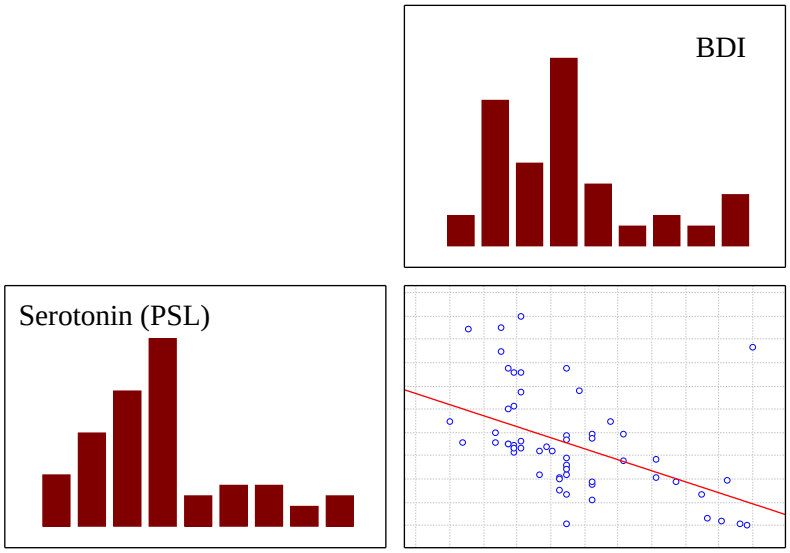
Depresivnost	(N)
BDI	61
0 – 11	3
12 – 19	20
20 – 26	20
27 – 63	18

4.7.1 Utjecaj PSL na depresivnost u bolesnika s pSS

Spearmanova korelacija u analizi povezanosti PSL i depresivnosti prema Beck-ovoj samoocjenskoj ljestvici BDI pokazala je umjerenu negativnu korelaciju (**p = 0,0000,** r = - 0,5522) (**Tablica 47**)(**Slika 26**).

Tablica 47. Povezanost PSL i depresivnosti mjerene BDI ljestivcom u bolesnika s pSS

Varijabla	PSL (N)	r	p-vrijednost
BDI	61	-0,5522	**0,0000**



Slika 26. Prikaz povezanosti PSL i depresije mjerene pomoću Beck-ove samoocjenske ljestvice BDI

4.7.2 Utjecaj polimorfizma 5-HTTLPR na depresivnost u bolesnika s pSS

Deskriptivna statistika vrijednosti BDI prema grupiranim faznim haplotipovima 5-HTTLPR prikazana je u **Tablici 48**.

Tablica 48. Deskriptivna statistika depresivnosti bolesnika s pSS obzirom na polimorfizam 5-HTTLPR

Varijabla	BDI(N=61)	Sredina	Minimum	Maksimum	SD
L'L'	20	27,35	11	55	10,87
L'S'	30	26,4	8	54	11,42
S'S'	11	26,27	15	51	12,78

Tablica 49. Povezanost depresivnosti mjerene pomoću BDI ljestivce s 5-HTTLPR

Polimorfizam	BDI	p-vrijednost
5-HTTLPR		
Genotipovi		0,7463
L'L'		0,5237
L'S'		0,891
S'S'		0,5483

Metodom korelacije rangova Kruskal-Wallis ANOVA, nije dokazana povezanost rezultata BDI ljestvice depresivnosti sa niti jednim od grupiranih faznih haplotipova 5-HTTLPR polimorfizma u skupini bolesnika s pSS (**Tablica 49**).

4.7.3 Utjecaj polimorfizma 5-HTTin2VNTR na depresivnost u bolesnika s pSS

Multiplom komparacijom pomoću Kruskal-Wallis testa nije dokazana povezanost rezultata Beck-ove ljestvice depresivnosti s genotipovima na intronu 5-HTTin2VNTR **(Tablica 42).**

Tablica 50. Povezanost rezultata Beck-ove ljestvice depresije s 5-HTTin2VNTR

Polimorfizam	BDI (BDI)	p-vrijednost
5-HTTin2VNTR		
Aleli		
l		0,9109
s		0,4663
Genotipovi		
ll		0,4663
ls		0,4003
ss		0,901

4.7.4 Utjecaj serumskih varijabli na depresivnost u bolesnika s pSS

Ispitivana je povezanost rezultata Beck-ove samoocjsnke ljestvice depresije (eng. Beck Depression Inventory, BDI) s PSL i varijablama seruma; SE, CRP, haptoglobin, RF, C3, C4, gama globulini (**Tablica 51**).

Tablica 51. Korelacija rezultata depresivnosti mjerene pomoću BDI s PSL i varijablama seruma

Varijable BDI	r	p-vrijednost
SE	0,31	**0,057**
CRP	-0,16	0,351
Hpt	0,18	0,267
RF	-0,12	0,488
C3	-0,34	**0,039**
C4	-0,09	0,603
GGB	0,35	**0,03**

SE – sedimentacija eritrocita, CRP – C reaktivni protein, Hpt – haptoglobin, RF – reumatoidni faktor, C3 i C4 – komplement, GGB – gama globulini

Korelacijskom analizom dokazana je statistički značajna, ali slaba korelacija depresivnosti (BDI) s razinom serumskih gama globulina (p = 0,03 r = 0,35), C3 (**p = 0,039** r = -0,34) i granično sa SE (**p = 0,057** r = 0,31) (**Tablica 51**).

Tablica 52. Korelacija depresivnosti (BDI) s protutijelima SS-A i SS-B

Varijabla	BDI	p-vrijednost
SS-A		0,1035
SS-B		0,4656

Analizom pomoću Mann-Whitney U-testa nije dokazana povezanost između rezultata mjerenih Beck-ovom ljestvicom depresivnosti i prisutnosti protutijela SS-A i SS-B u bolesnika s pSS (**Tablica 52**).

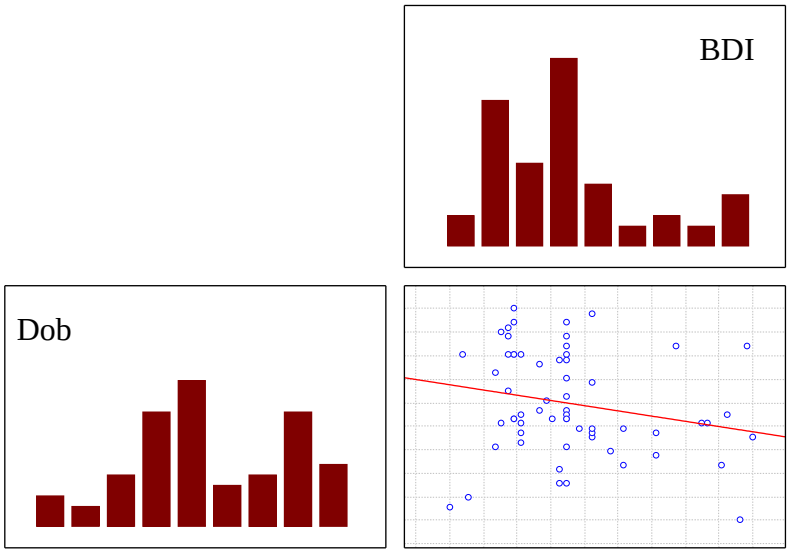
4.7.5 Utjecaj aktivnosti bolesti i subjektivnih tegoba na depresivnost u bolesnika s pSS

Ispitivan je utjecaj aktivnosti bolesti pomoću objektivne kliničke ljestivce ESSDAI i utjecaj bolesnikovih subjektivnih tegoba mjerenih samoocjenskom ljestvicom ESSPRI na depreivnost u bolesnika s pSS.

Tablica 53. Povezanost aktivnosti bolesti mjerene ljestvicom ESSDAI i bolesnikovih tegoba mjerenih ljestvicom ESSPRI s depresivnosti u bolesnika s pSS

Varijable	**BDI** **r**	**p-vrijednost**
ESSDAI	0,14	0,2867
ESSPRI	0,51	**0,0000**
DOB	-0,32	**0,018**

Metodom korelacije pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova dokazana je umjerena pozitivna korelacija između depresivnosti mjerene pomoću ljestivce BDI i bolesnikovih subjektivnih tegoba mjerenih ljestvicom ESSPRI **(p = 0,0000** i r = 0,51) i dobi bolesnika (**p =0,018**, r = -0,32), ali nije bilo povezanosti s kliničkom ljestvicom aktivnosti bolesti ESSDAI (p = 0,2867) što upućuje na mogući utjecaj i različitih psiho-socijalnih čimbenika na depresivnost u bolesnika s pSS (**Tablica 53**)(**Slika 27**).

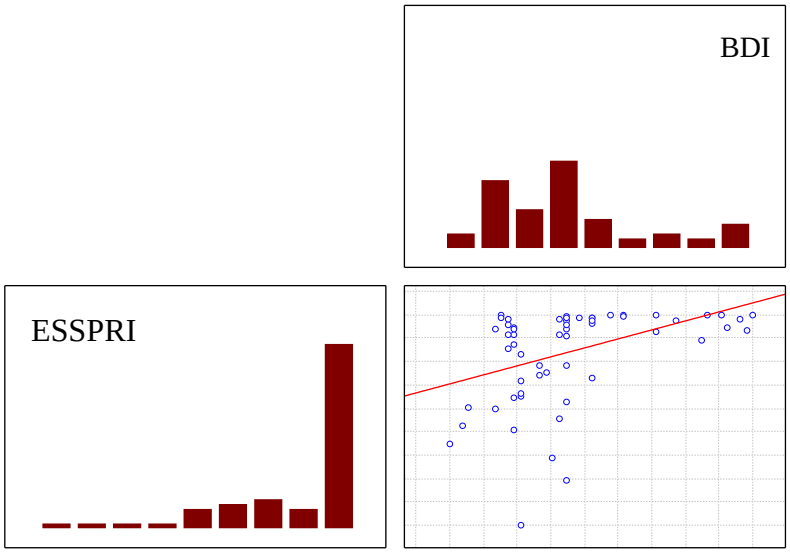


Slika 27. Prikaz povezanosti depresivnosti mjerne pomoću BDI i dobi bolesnika s pSS

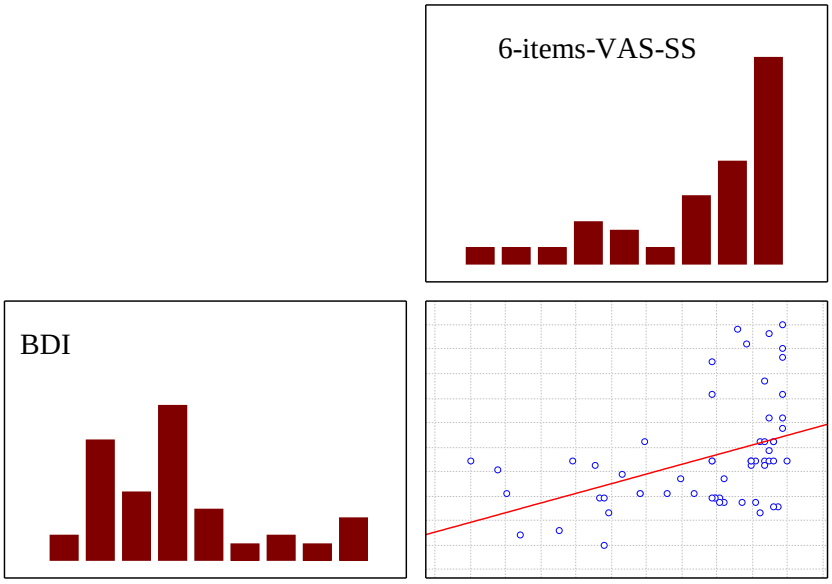
Mjere povezanosti izračunate pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova pokazao je umjerenu korelaciju između BDI i mentalnog umora, tj. da depresija utječe na rezultate mentalnog umora r = 0,6167 (**p = 0,0000**), ESSPRI r = 0,5083 (**p = 0,0000**) **(Slika 28)**, somatskog umora r = 0,5699 (**p = 0,0000**), 6-items-VAS-SS r = 0,4966 (**p = 0,0005**), dok nije dokazana korelacija r = 0,1386 (p = 0,2866) između BDI i ESSDAI, tj. aktivnost bolesti ne utječe na depresiju u pSS. (**Tablica 54**) (**Slika 28-34**).

Tablica 54. Povezanost BDI sa ESSPRI, ESSDAI, 6-items-VAS-SS, VAS-somatskim umoRom i VAS-mentalnim umorom.

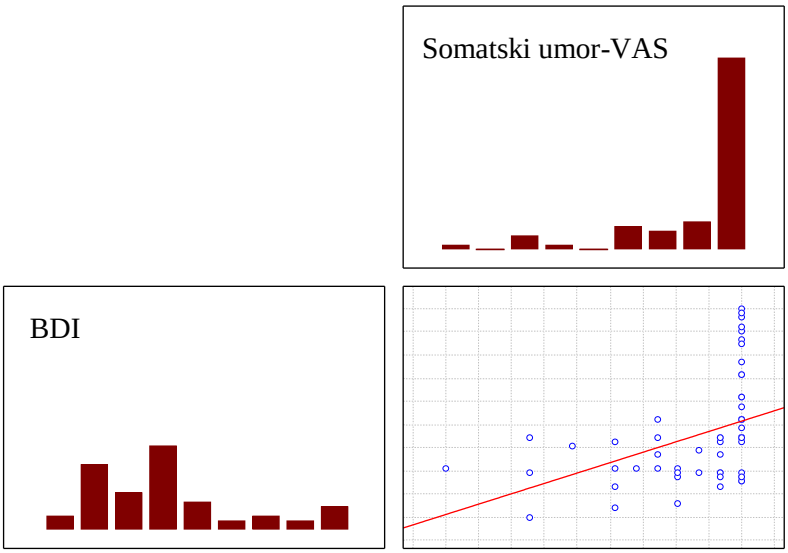
Varijabla BDI (N=61)	r	p-vrijednost
ESSPRI	0,51	**0,0000**
Somatski umor-VAS	0,57	**0,0000**
Mentalni umor-VAS	0,62	**0,0000**
6-items-VAS-SS	0,50	**0,0001**
PROFuk	0,54	**0,0000**
PROFsom	0,58	**0,0000**
PROFment	0,58	**0,0000**
ESSDAI	0,14	**0,2866**



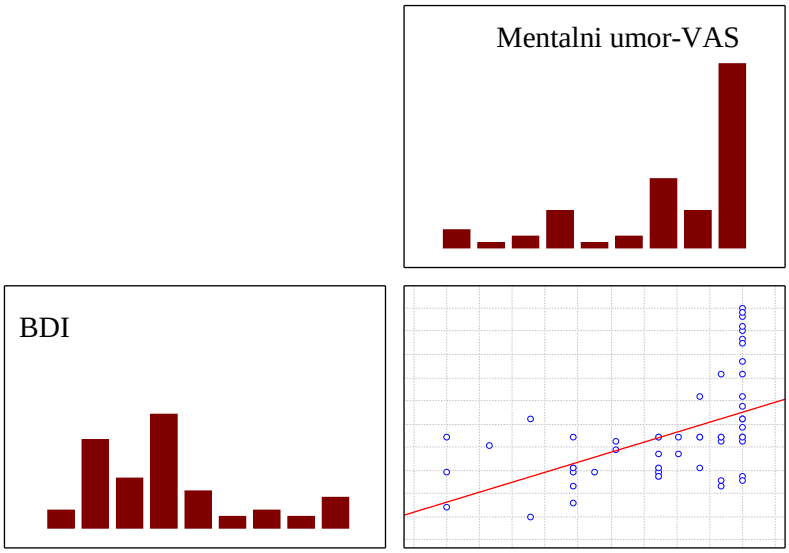
Slika 28. Povezanost subjektivnih tegoba bolesnika s pSS mjerenih samoocjenskom ljestvicom ESSPRI i depresije mjerene samoocjenskom ljestvicom BDI



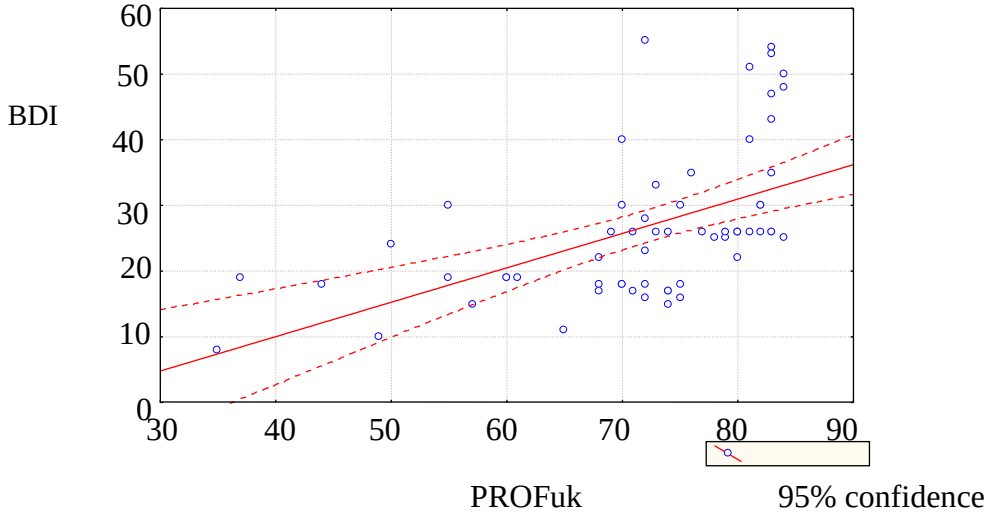
Slika 29. Prikaz povezanosti depresivnosti mjerene pomoću ljestvice BDI i subjektivnih tegoba bolesnika mjerenih ljestvicom 6-items-VAS-SS



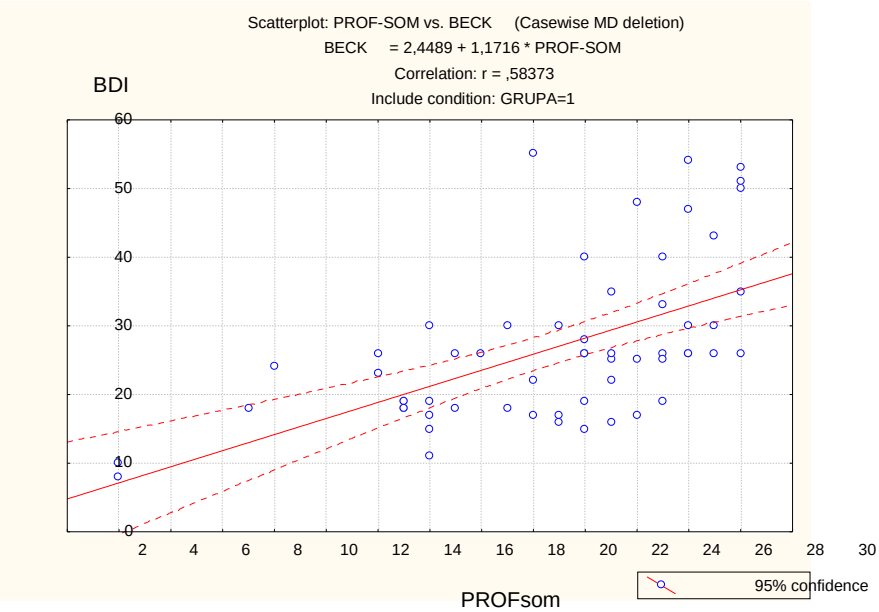
Slika 30. Prikaz povezanosti depresivnosti mjerene pomoću ljestvice BDI i somatskog umora mjerenog samoocjenskom ljestvicom VAS



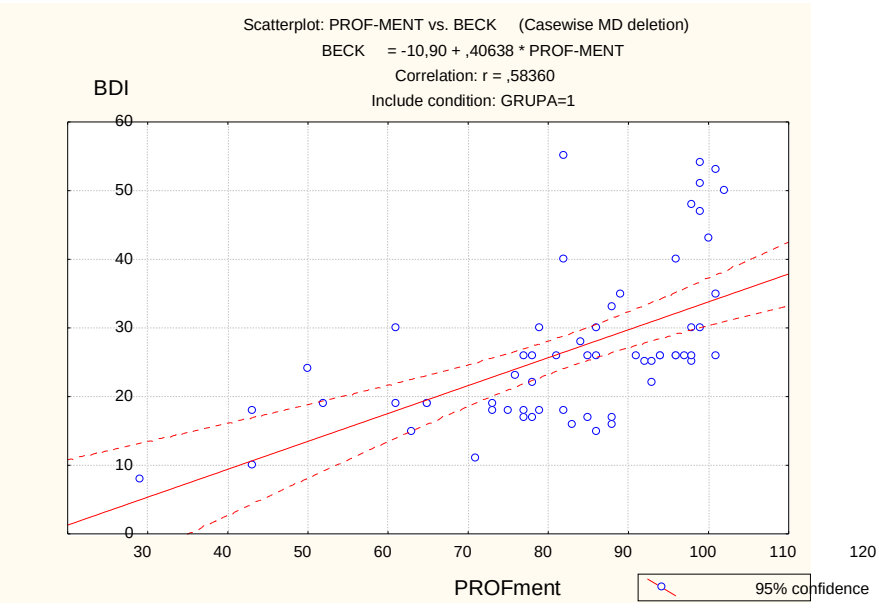
Slika 31. Prikaz povezanosti depresivnosti mjerene pomoću ljestvice BDI i mentalnog umora mjerenog samoocjenskom ljestvicom VAS



Slika 32. Prikaz povezanosti depresivnosti mjerene pomoću ljestvice BDI i mentalnog umora mjerenog samoocjenskom ljestvicom PROF ukupno umor



Slika 33. Prikaz povezanosti depresivnosti mjerene pomoću ljestvice BDI i somatskog umora mjerenog samoocjenskom ljestvicom PROF somatski umor



Slika 34. Prikaz povezanosti depresivnosti mjerene pomoću ljestvice BDI i mentalnog umora mjerenog samoocjenskom ljestvicom PROF mentalni umor

4.8 Varijable umora u bolesnika s pSS

Tablica 55. Deskriptivna statistika za umor mjeren pomoću ljestvice PROF po spolu i dobi u skupini bolesnika s pSS

Varijabla	DOB	p
PROFuk		0,87
PROFsom		0,456
PROFment		0,887

Metodom korelacije rangova nije dokazan utjecaj dobi na umor mjeren ljestvicama PROFuk (**Slika 35**) i PROFment (**Slika 36**). (**Tablica 55**).

Tablica 56. Deskriptivna statistika bolesnika s pSS s umorom prema ljestvici VAS

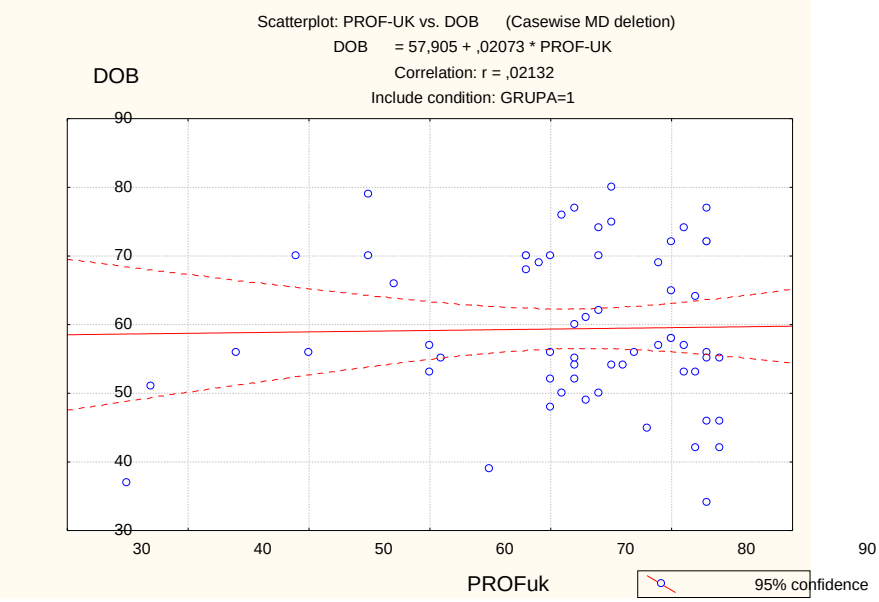
Varijabla	BOLESNICI N(%)
VAS somatski umor < 4	1 (2)
VAS somatski umor ≥ 4	60 (98)
VAS mentalni umor < 4	5 (8)
VAS mentalni umor ≥ 4	56 (92)

Raspodjelom bolesnika s pSS na umorne i bez umora, dobili smo umor, somatski i mentalni, prisutan u gotovo svih bolesnika s pSS; somatski u 98% i mentalni u 92% bolesnika (**Tablica 56).**

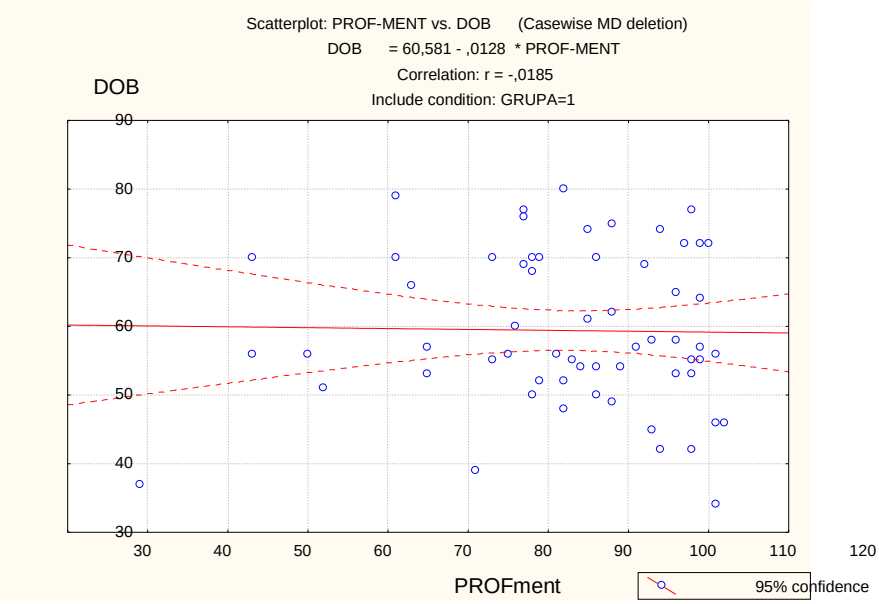
Analizom pomoću Man-Whitney U testa dokazan je statistički značajna i granično značajna razlika u rezultatima umora mjerenim ljestvicama PROFuk (**p = 0,048)(Slika 37)** i PROFment i **(p = 0,053)** (**Slika 39**), ali ne i sa PROF som (**Slika 38**) obzirom na spol, a bolesnici s pSS muškog spola imaju izraženiji umor **(Tablica 57**).

Tablica 57. Povezanost umora mjerenog pomoću ljestvica umora PROFuk, PROFsom i PROFment sa spolom

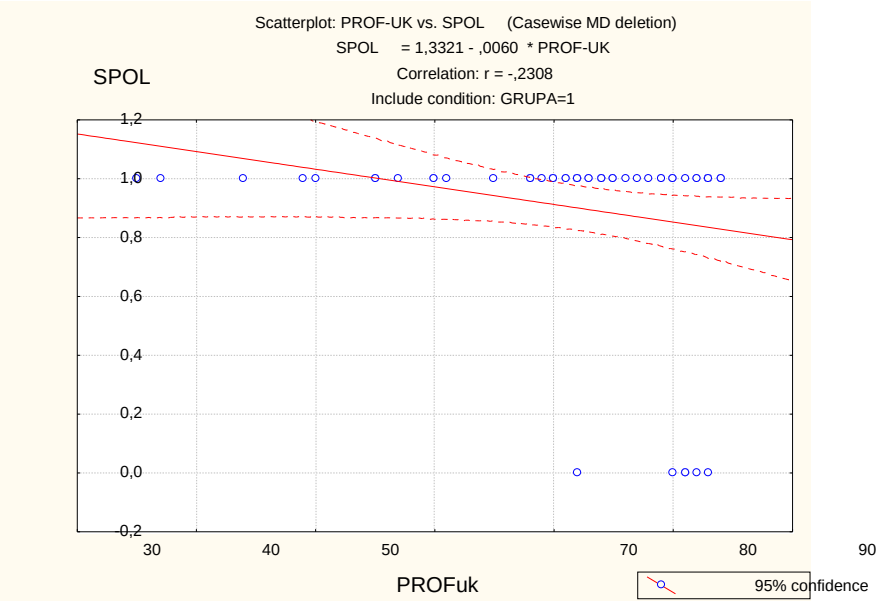
Varijabla	SPOL	p-vrijednost
PROFuk		**0,0465**
PROFsom		0,092
PROFment		**0,0526**



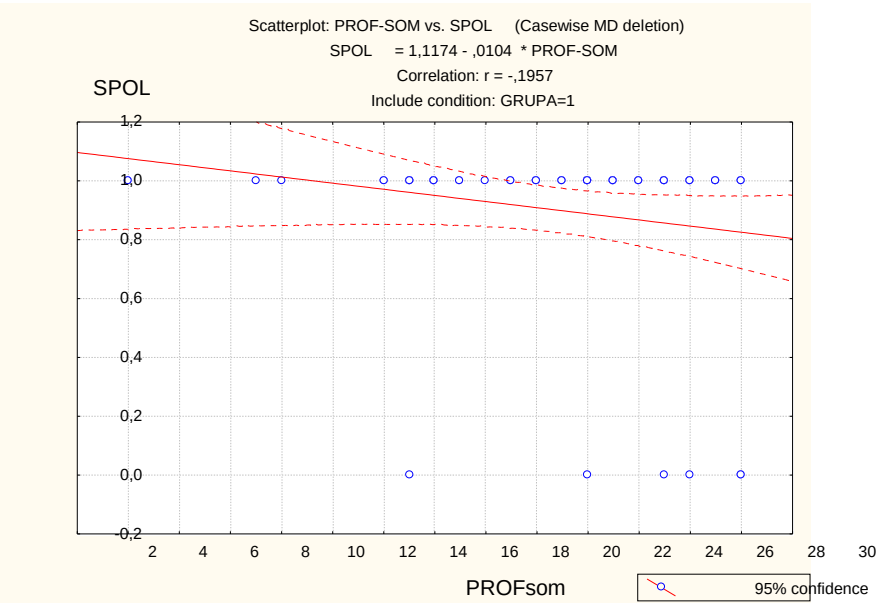
Slika 35. Prikaz povezanosti dobi i umora mjerenog ljestvicom umora PROFuk u bolesnika s pSS



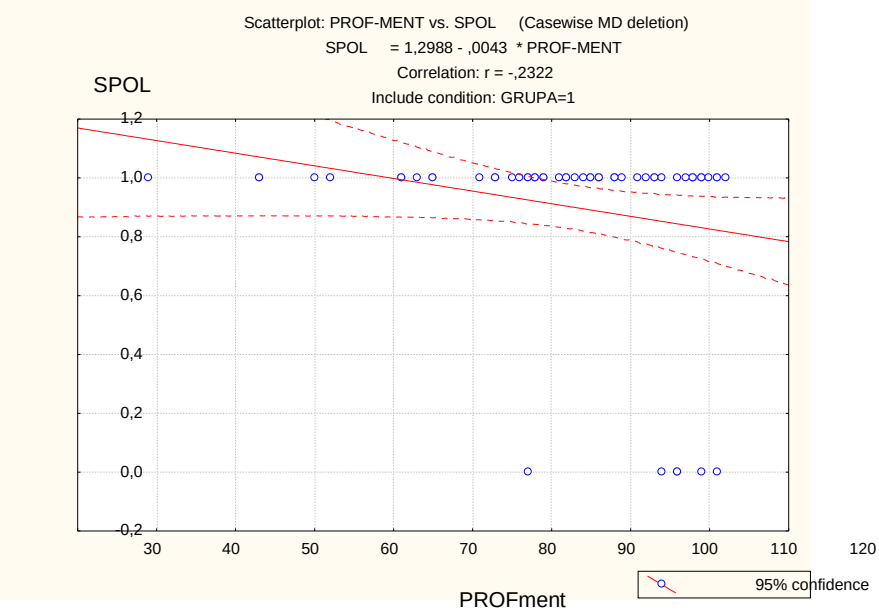
Slika 36. Prikaz povezanosti dobi i umora mjerenog ljestvicom PROFment u bolesnika s pSS



Slika 37. Prikaz povezanosti spola i umora PROFuk u bolesnika s pSS



Slika 38. Prikaz povezanosti spola i umora mjerenog PROFsom u bolesnika s pSS

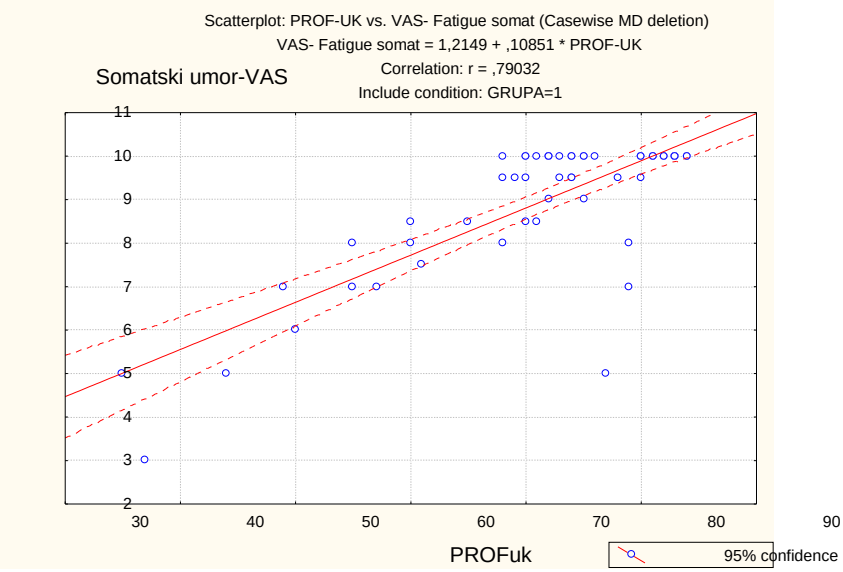


Slika 39. Prikaz povezanosti spola i umora mjerenog PROFment u bolesnika s pSS

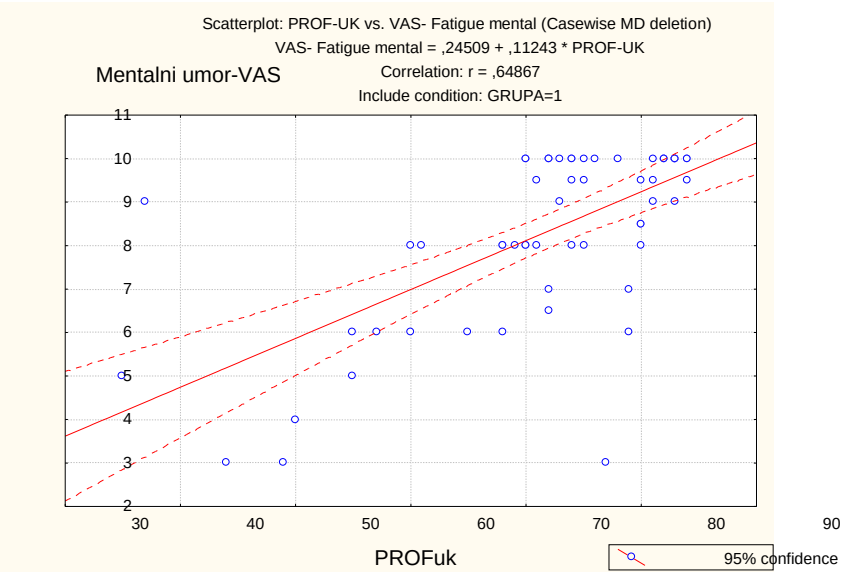
Tablica 58. Korelacije umora mjerenog pomoću ljestvica umora PROFuk, PROFsom i PROFment s umorom mjerenim VAS ljestvicom; somatski umor-VAS i mentalni umor-VAS

Varijabla	Somatski umor-VAS		Mentalni umor-VAS	
	p-vrijednost	r	p-vrijednost	r
PROFuk	**0,0000**	0,79	**0,0000**	0,65
PROFsom	**0,0000**	0,58	**0,0000**	0,81
PROFment	**0,0000**	0,76	**0,0000**	0,74

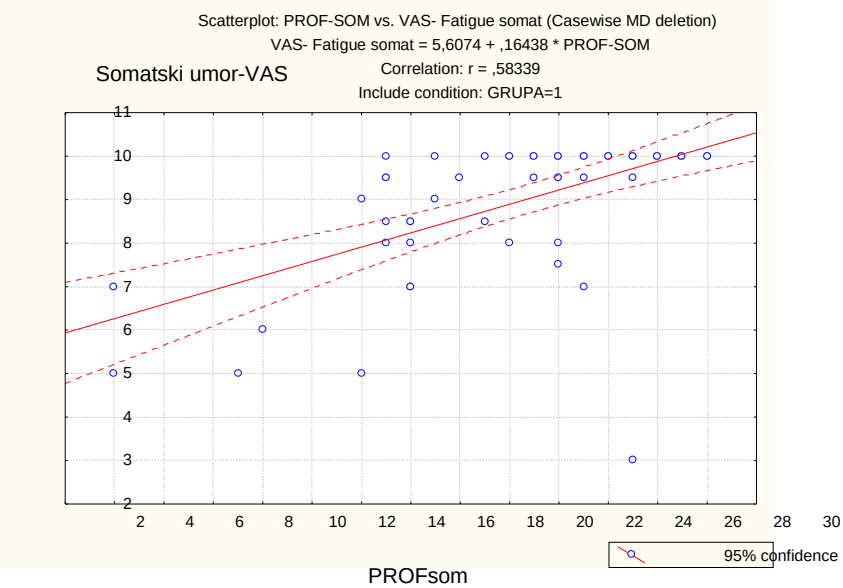
Metodom korelacije rangova dokazana je visoka povezanost između PROFuk, PROFsom i PROFment sa somatskim i mentalnim umorom mjerenim ljestvicom VAS (**p = 0,000**) (r = 0,58 – 0,81) (**Tablica 58)** (**Slika 40-44**).



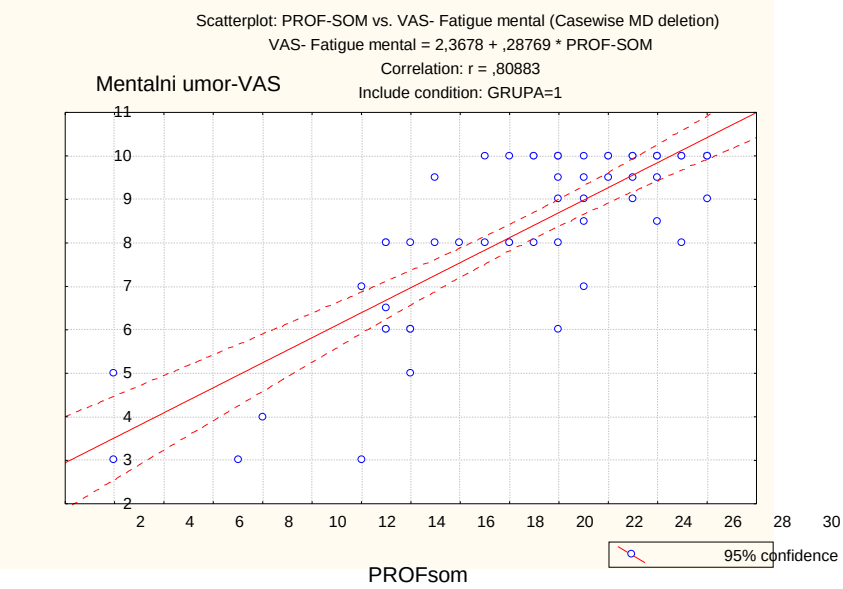
Slika 40. Prikaz povezanosti umora PROFuk i somatskog umora-VAS



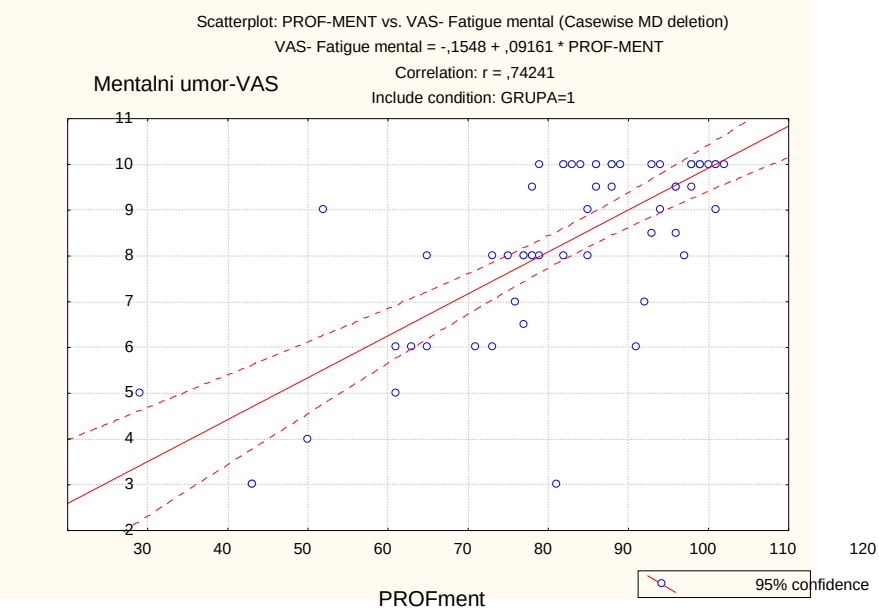
Slika 41. Prikaz povezanosti umora PROFuk i mentalnog umora-VAS



Slika 42. Prikaz povezanosti somatskog umora PROFsom i somatskog umora-VAS



Slika 43. Prikaz povezanosti somatskog umora PROFsom i mentalnog umora-VAS



Slika 44. Prikaz povezanosti mentalnog umora PROFment i mentalnog umora-VAS

4.8.1 Utjecaj PSL na umor u bolesnika s pSS

Ispitana je povezanost PSL prema svim ljestvicama umora.

Spearmanova korelacija u analizi povezanosti PSL i umora mjerenog ljestvicama VAS pokazala je slabu, ali značajnu povezanost između PSL i somatskog umora-VAS (**p = 0,051**), dok nije dokazana povezanost između PSL i mentalnog umora-VAS (**Tablica 59**).

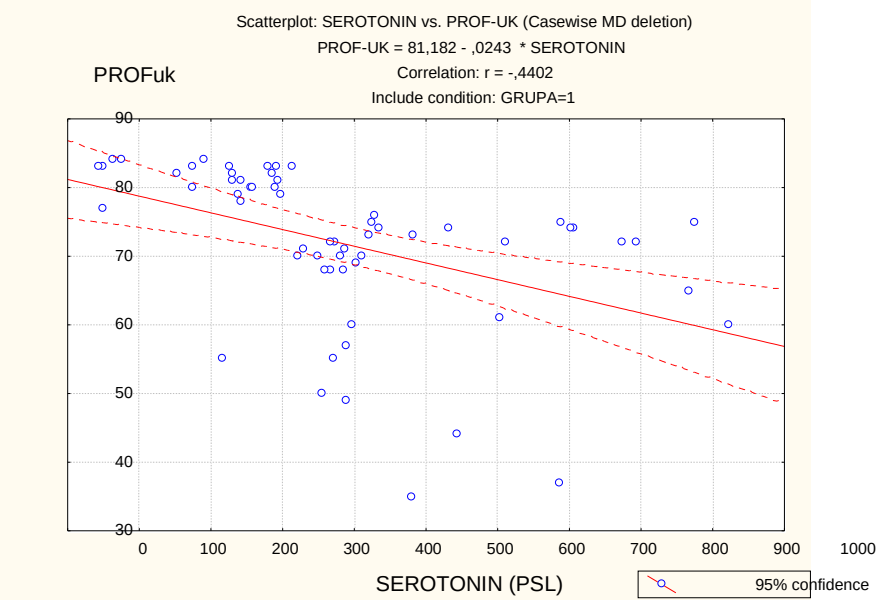
Tablica 59. Prikaz povezanosti umora s PSL i dobi u bolesnika s pSS

Varijabla	(N)	PSL		Dob
		r	p-vrijednost	
Somatski umor-VAS	61	0,25	**0,051**	0,305
Mentalni umor-VAS	56	-0,17	0,195	0,259

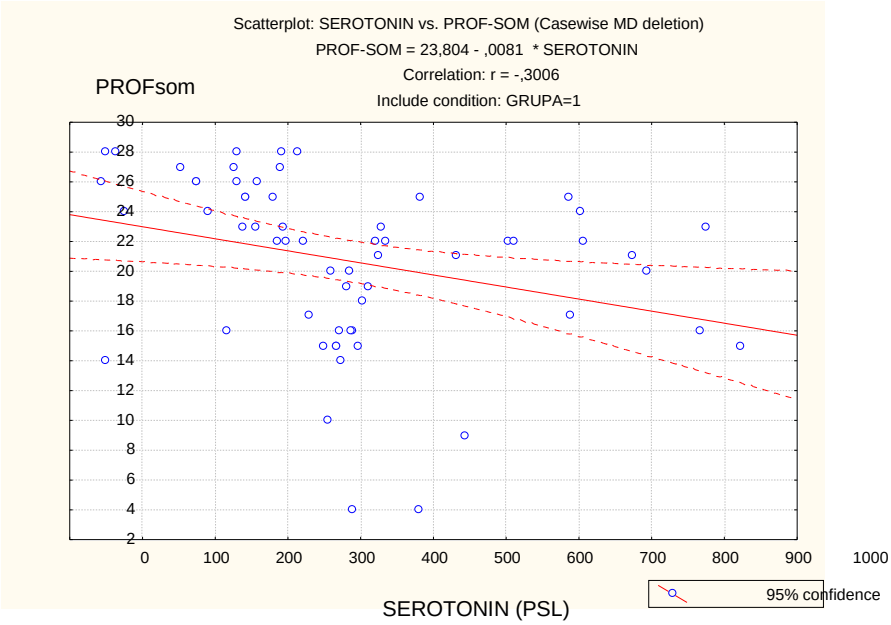
Spearmanova korelacija u analizi povezanosti PSL i umora, dokazala je umjerenu povezanost PSL i PROF uk (**p = 0,000**) r = -0,44 (**Slika 45)** i PROFment **(p = 0,001**) r = -0,42 (**Slika 47**) i slabu povezanost s PROFsom (**p = 0,019**) r = -0,3 (**Slika 46**) (**Tablica 60).**

Tablica 60. Povezanost PSL i umora prema ljestvicama umora u bolesnika s pSS

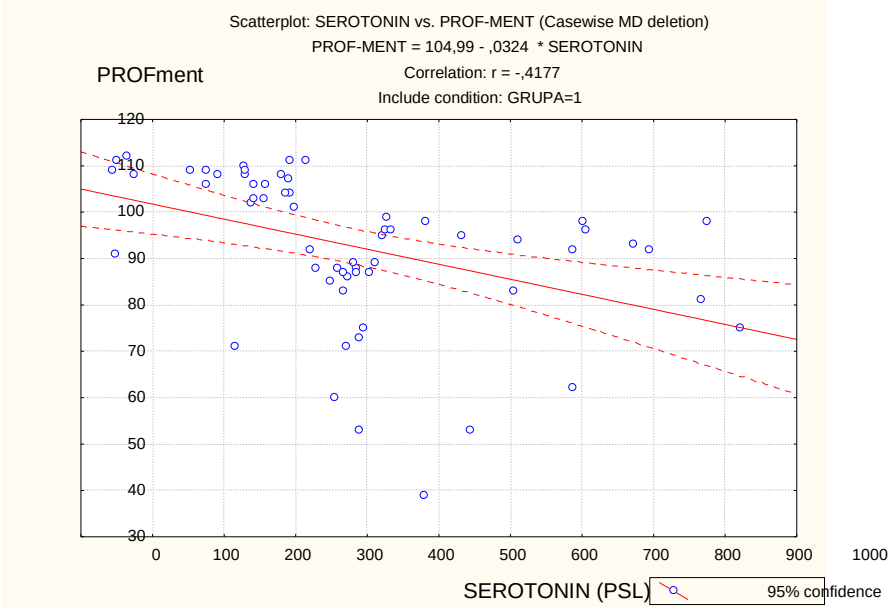
Varijabla	PSL	r	p-vrijednost
PROFuk		-0,44	**0,0000**
PROFsom		-0,30	**0,019**
PROFment		-0,42	**0,001**



Slika 45. Prikaz povezanosti umora mjerenog pomoću ljestvica PROFuk i PSL



Slika 46. Prikaz povezanosti umora mjerenog pomoću ljestvica PROFsom i PSL



Slika 47. Prikaz povezanosti umora mjerenog pomoću ljestvica PROFment i PSL

4.8.2 Utjecaj polimorfizma 5-HTTLPR na umor u bolesnika s pSS

Tablica 61. Deskriptivna statistika umora prema ljestvicamam umora u bolesnika s pSS.

Umor (N=61)	Sredina	Minimum	Maksimum	SD
Somatski umor-VAS	9,008	3,0	10,0	1,59
Mentalni umor-VAS	8,32	3,0	10,0	2,00
PROFuk	71,95	35	28	11,8
PROFsom	21,0	4	28	5,6
PROFment	92,5	39	111	16,4

Tablica 62. Povezanost umora prema ljestvicama umora s genotipovima 5-HTTLPR polimorfizma

Varijabla	L'L'	L'S'	S'S'
	p-vrijednost		
Somatski umor-VAS	0,1813	0,4137	0,7641
Mentalni umor-VAS	0,0759	0,1373	0,5994
PROFuk	0,2891	0,1596	0,5929
PROFsom	0,5439	0,1354	0,2299
PROFment	0,3106	0,1227	0,4418

Analizom pomoću Mann-Whitney U testa nije dokazana razlika u umoru mjerenim svim ljestvicama umora obzirom na grupirane fazne haplotipove 5-HTTLPR u skupini bolesnika s pSS (**Tablica 62**).

4.8.3 Utjecaj polimorfizma 5-HTTin2VNTR na umor u bolesnika s pSS

Tablica 63. Povezanost umora prema ljestvicama umora s genotipovima 5-HTTin2VNTR polimorfizma

Varijabla	ll	ls	ss	l	s
	p-vrijednost				
Somatski umor-VAS	0,7238	0,6255	0,8708	0,8708	0,7238
Mentalni umor-VAS	0,5639	0,9461	0,4703	0,4703	0,5639
PROFuk	0,6086	0,6149	0,9676	0,9676	0,6086
PROFsom	0,9024	0,8159	0,6255	0,6255	0,9024
PROFment	0,7674	0,8218	0,9109	0,9109	0,7674

Analizom pomoću Mann-Whitney U testa nije dokazana značajna razlika u umoru prema svim ljestvicama umora obzirom na grupirane fazne haplotipove 5-HTTLPR u skupini bolesnika s pSS (**Tablica 63**).

4.8.4 Utjecaj serumskih varijabli na umor u bolesnika s pSS

Tablica 64. Povezanost umora prema ljestvicama umora sa serumskim varijablama bolesnika s pSS

Varijable	SE	CRP	Hpt	RF	C3	C4	GGB
PROFuk	0,732	0,443	0,44	0,211	0,692	**0,055**	0,759
PROFsom	0,371	0,543	0,11	0,352	0,686	0,201	0,902
PROFment	0,582	0,464	**0,024**	0,241	0,681	0,081	0,803
Somatski umor-VAS	0,105	0,722	**0,048**	0,094	0,283	**0,017**	0,501
Mentalni umor-VAS	0,064	0,911	0,158	0,15	0,14	**0,017**	0,336

Analizom korelacije rangova uz razinu vjerojatnosti od p<0,05, dokazana je umjerena povezanost između PROFuk sa: C4 **(p = 0,055**), PROFment i haptoglobina (**p = 0,024**), somatskog umora-VAS i haptoglobina (**p = 0,048**), somatskog umora-VAS i C4 (**p = 0,017**) i mentalnog umora-VAS i C4 (**p = 0,017**) (**Tablica 64**).

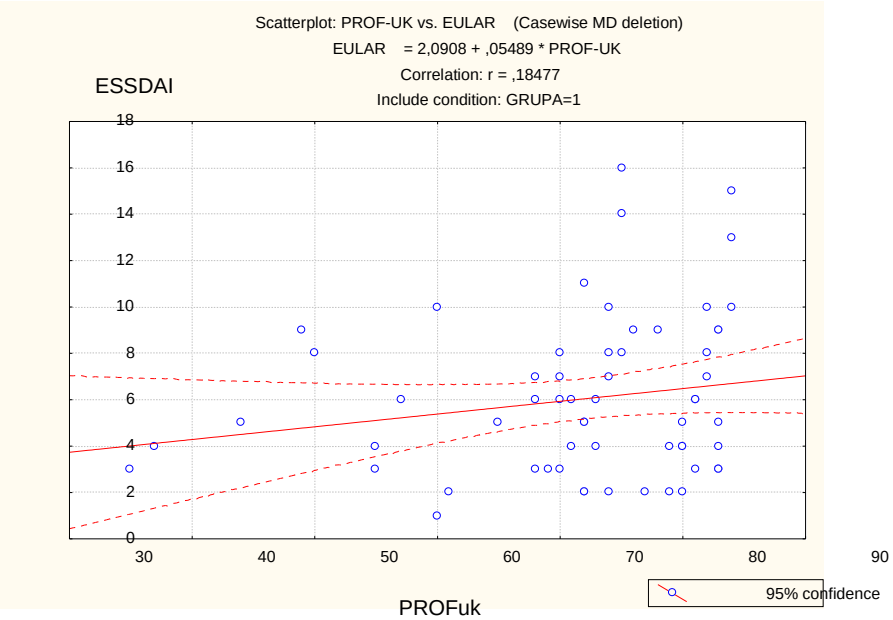
4.8.5 Utjecaj ativnosti bolesti i subjektivnih tegoba na umor u bolesnika s pSS

Povezanost umora mjerenih samoocjenskim ljestvicamam umora PROF ukupno, PROF somatski umor, PROF mentalni umor, somatski umor-VAS, mentalni umor-VAS s kliničkim ljestvicama ESSDAI i ESSPRI

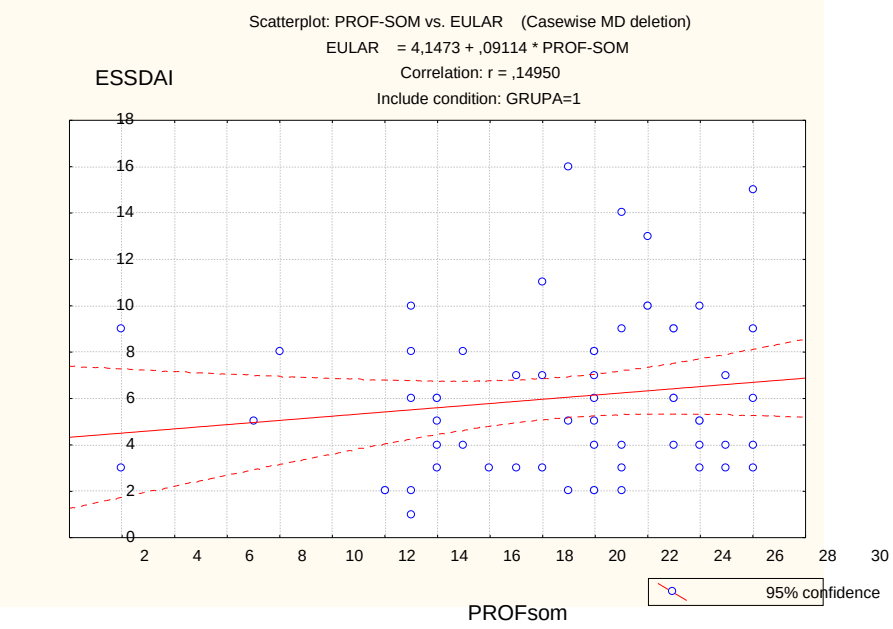
Tablica 65. Povezanost umora prema ljestvicama ESSDAI i ESSPRI u bolesnika s pSS

UMOR	ESSDAI		ESSPRI	
	r	p-vrijednost	r	p-vrijednost
PROF ukupno	0,18	0,154	0,69	**0,0000**
PROF somatski umor	0,15	0,25	0,71	**0,0000**
PROF mentalni umor	0,18	0,157	0,74	**0,0000**
Somatski umor-VAS	0,36	**0,0046**	0,87	**0,0000**
Mentalni umor-VAS	0,43	**0,0000**	0,88	**0,0000**

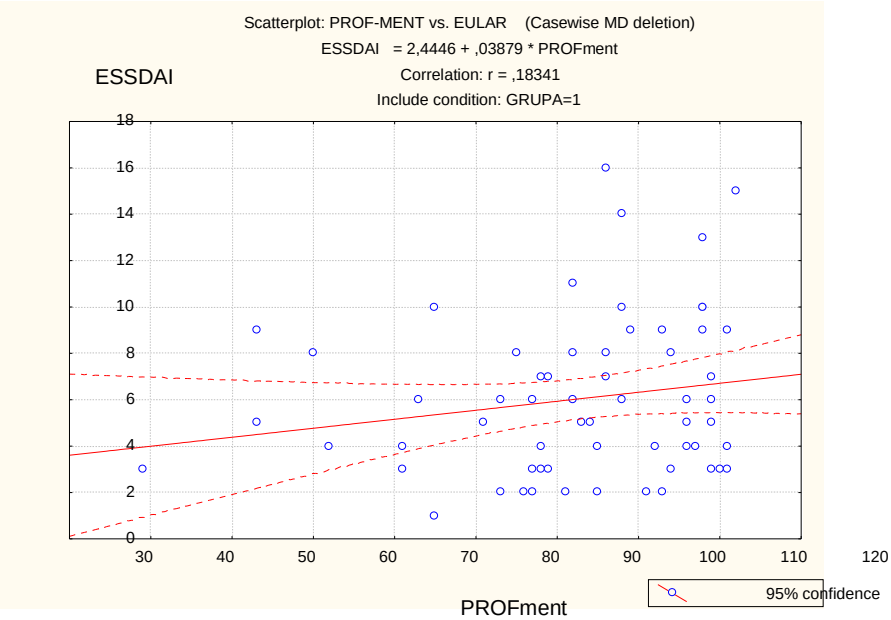
Analizom korelacije rangova uz razinu vjerojatnosti od p<0,05, dokazana je visoka pozitivna korelacija svih ljestvica umora s ljestvicom ESSPRI (**p = 0,0000**, r = 0,69 – 0,88)(**Slika 50-52**), dok je bila slaba pozitivna korelacija između somatskog umora-VAS i ESSDAI (**p = 0,0046**, r = 0,36) (**Slika 47-49**) (**Tablica 65).**



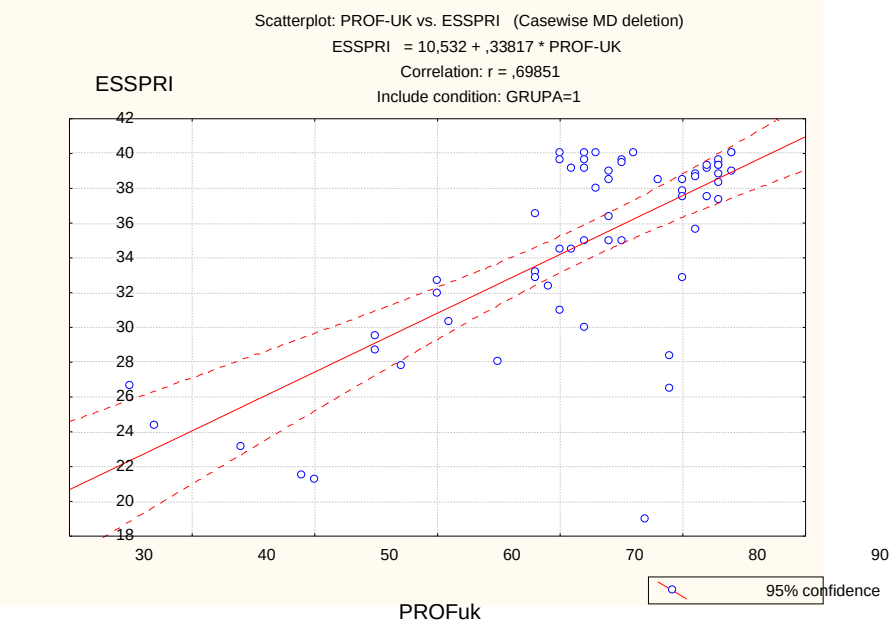
Slika 47. Prikaz povezanosti PROFuk i ESSDAI



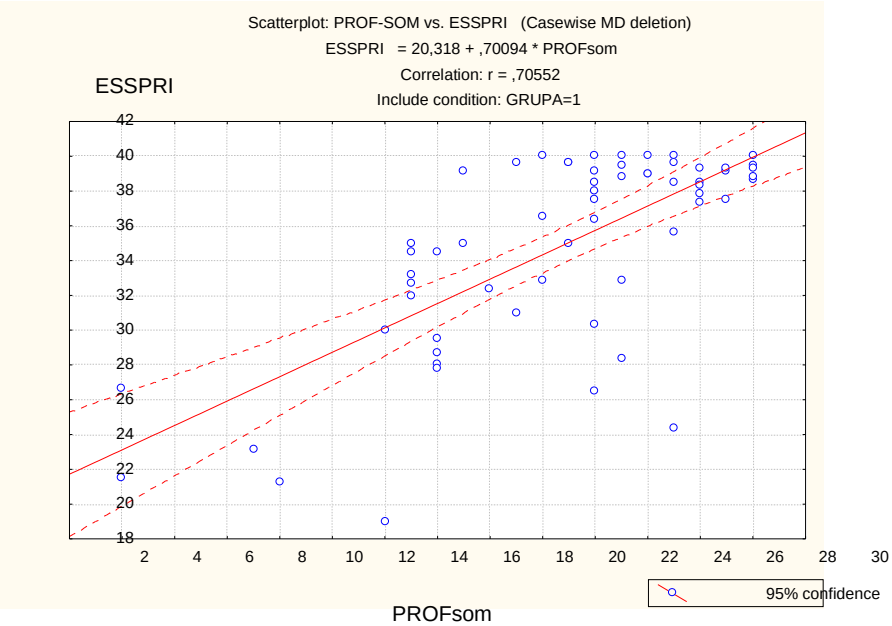
Slika 48. Prikaz povezanosti PROFsom i ESSDAI



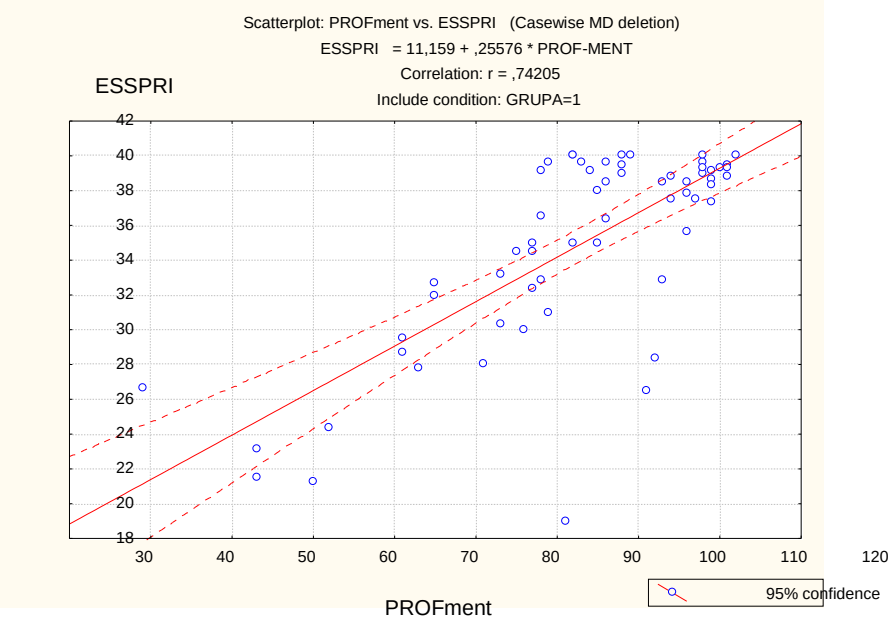
Slika 49. Prikaz povezanosti PROFment i ESSDAI



Slika 50. Prikaz povezanosti PROFukupni i ESSPRI



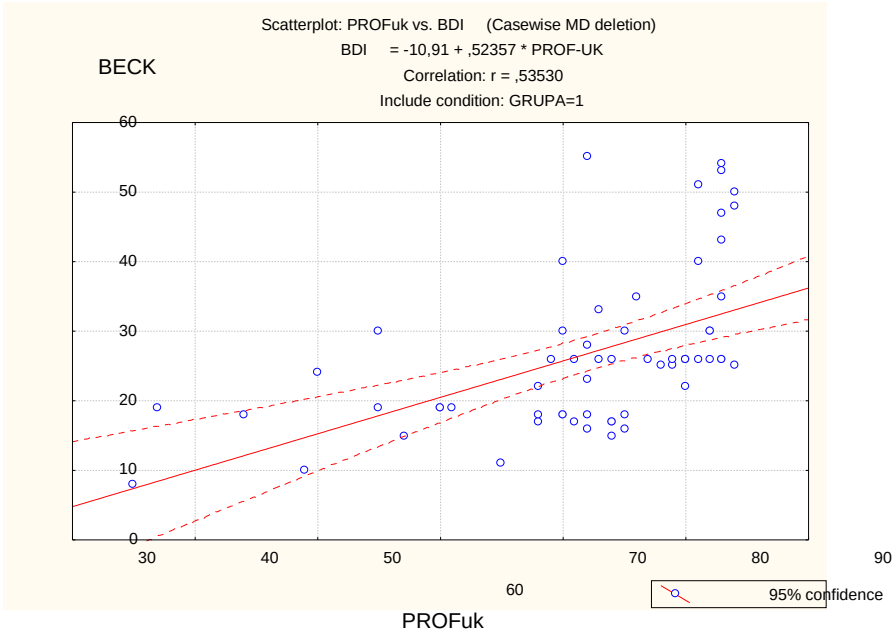
Slika 51. Prikaz povezanosti PROFsom i ESSPRI



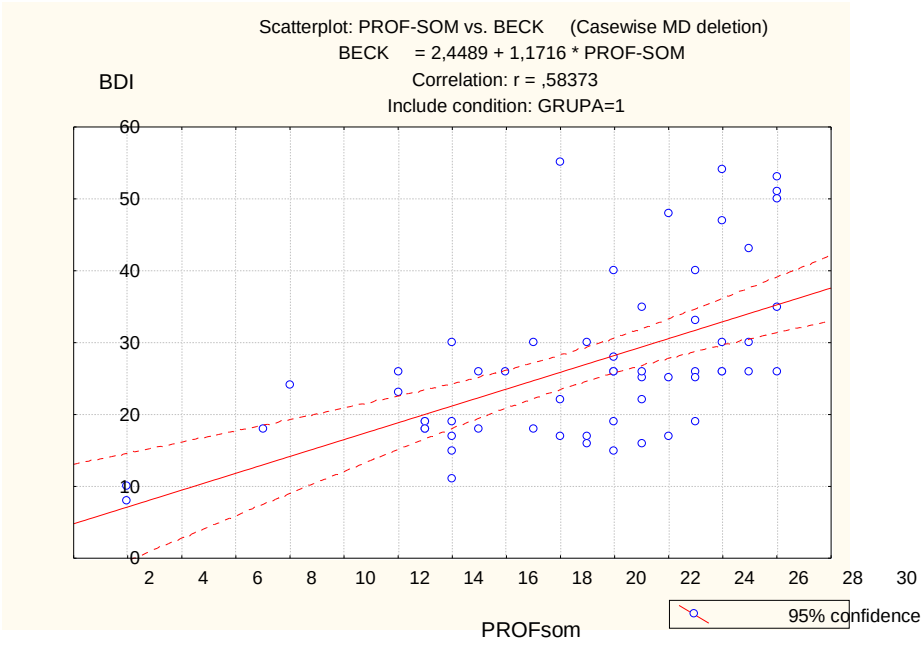
Slika 52. Prikaz povezanosti PROFsom i ESSPRI

4.8.6 Utjecaj depresivnosti na umor u bolesnika s pSS

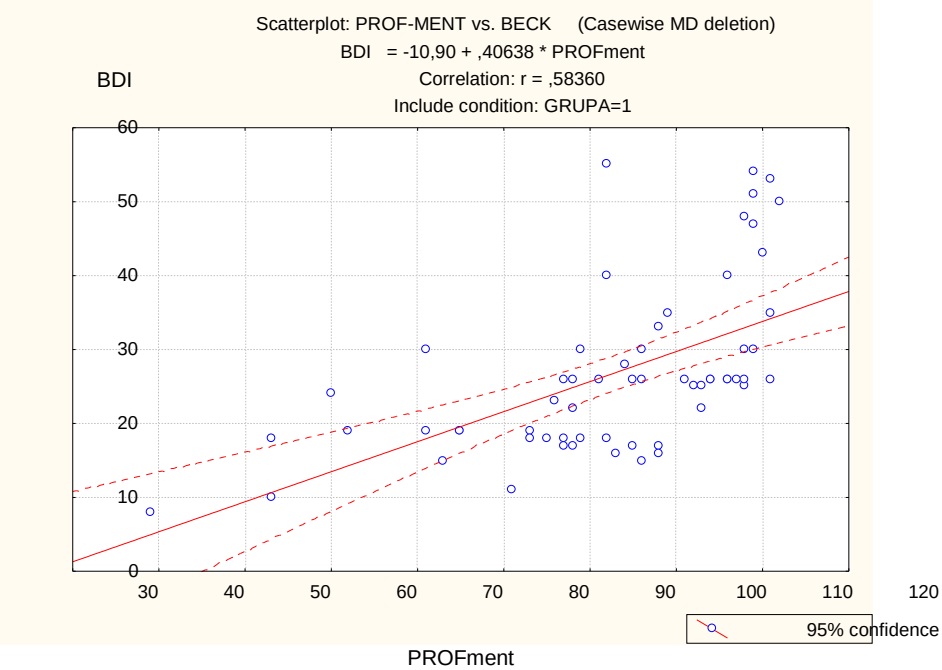
Analizirali smo utjecaj depresivnosti, kao sekundarnim uzrokom, na umor mjeren ljestvicama umora PROF.



Slika 53. Prikaz povezanosti PROFsom i ESSPRI



Slika 54. Prikaz utjecaja depresivnosti na umor PROFsom



Slika 55. Prikaz utjecaja depresivnosti na umor PROFment

Metodom korelacije rangova dokazana je dobra povezanost depresije mjerene pomoću BDI i umora mjerenog ljestvicama PROFuk, PROFsom i PROFment (p = 0,0000) r = 0,54-0,58 (**Slika 53-55)**.

4.9 Neuroradiološke varijable bolesnika s pSS

MR mozga učinjen je u 22 (19 žena i 3 muškarca) prosječne dobi od 51 godinu (43 do 61 godinu) od ukupno 61 bolesnika s pSS koji su imali učestale glavobolje i ispunjavali kriterije za učestalu epizodičnu tenzijsku glavobolju (Headache Classification, 2004).

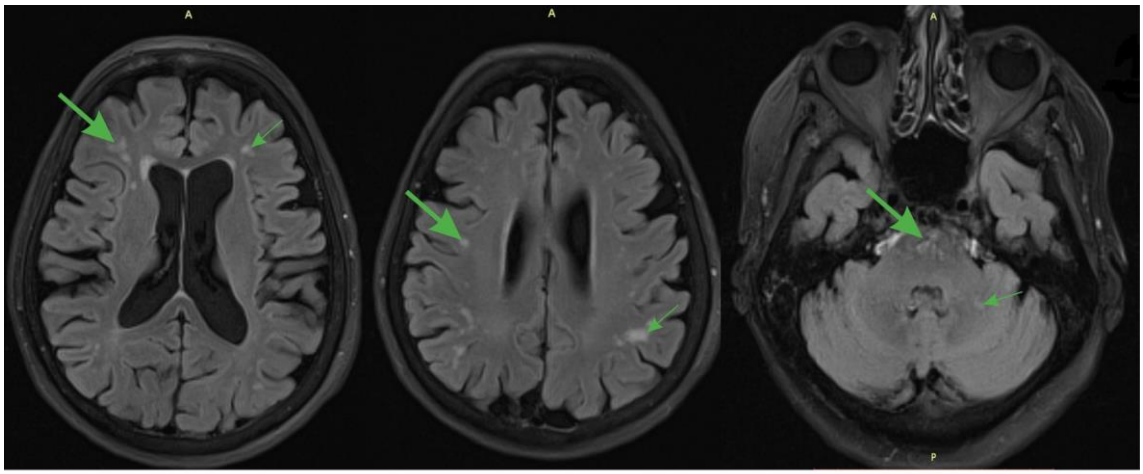
U kontrolnoj skupini bilo je 20 ispitanika (14 žena i 6 muškaraca) prosječne dobi od 57.5 godina (44 do 71 godinu) koji su također ispunjavali kriterije za učestalu epizodičnu tenzijsku glavobolju.

Tablica 66. Prikaz hiperintenziteta bijele tvari mozga u bolesnika s pSS

	p-vrijednost			
SH	**Ukupni broj SH**	**SH <2 mm**	**SH 2-5 mm**	**SH >5 mm**
Ukupno	0,23	0,71	0,18	0,29
Periventrikularno	0,34	0,78	0,61	0,89
Subkortikalno	0,71	0,81	0,20	0,43
Bazalni gangliji	0,21	0,34	0,43	**0,048**
Cerebelarno	0,81	-	-	0,81
Mezencefalon	0,34	-	0,34	-
Pons	0,34	0,34	-	-
Infratentorijski	**0,025**	0,17	0,09	0,17

SH (prema engl. signal hyperintensity = hiperintenzivne lezije)

Analiza SH na MRI mozga pokazala je veću prevalenciju SH u bolesnika s pSS u odnosu na kontrole. Analiza SH prema regijama mozga pokazala je veću prevalenciju SH infratentorijski (**p = 0,008**) i u bazalnim ganglijima **(p = 0,048**) u grupi bolesnika s pSS u odnosu na kontrole. Obzirom na broj SH, veći broj lezija nađen je u bolesnika s pSS u odnosu na kontrole (**Slika 59a,b,c),** ali bez statističke značajnosti (Sarac 2103).



a b c

Slika 59.a,b,c. Hiperintenziteti bijele tvari mozga u 68-godišnje bolesnice s pSS.

Ipak, značajna razlika u broju lezija između bolesnika s pSS i kontrola, nađena je u bazalnim ganglijima za lezije promjera >5 mm (p=0.048) i infratentorijski u ukupnom broju lezija (p=0.018) (**Tablica 66**) (**Slika 59c**). Ukupno 90 lezija nađeno je ukupno u bolesnika s pSS, prosječno 15.1 (u rasponu od 0-75 lezije) dok je u kontrolnoj skupini ukupni broj lezija bio 51, prosječno 8.95 (od 0 do 43 lezije) s razlikom (p=0.23) u X^2 testu. U grupi bolesnika s pSS, supratentorijski je nađeno 77 lezija (85.56%), 13 lezija infratentorijski (14.44%) i 2 lezije u moždanom deblu (2,2%). U kontrolnoj skušini nije nađena niti jedna lezija infratentorijski. U grupu bolesnika s pSS, u bazalnim ganglijima bilo je 20 lezija (22%), prosječno 0.9 (od 0–9 lezija), a samo 2 lezije u kontrolnoj skušini. Evaluacijom prema regijama mozga u skuini bolesnika s pSS utvrđena je veća prevalencija SH infratentorijski (**p = 0,025**), a u bazalnim ganglijima samo za lezije promjera >5 mm (p=0.048) u odnosu na kontrolnu skupinu. Statističkom analizom utvrđena je značajna povezanost broja periventrikularnih lezija u odnosu na PSL (**p = 0,019**) (**Slika 59a**). Također je utvrđena značajna povezanost broja lezija promjera >5 mm i 2-5 mm smještenih subkortikalno (**Slika 59b**) u odnosu na trajanje pSS (**p = 0,04** i **p = 0,035**) i s dobi (**p = 0,032**) u skupini bolesnika s pSS. Utvrđena je i statistička povezanost između broja lezija i aktivnosti bolesti procijenjene pomoću objektivne kliničke ljestvice ESSDAI, ali bez kliničke značajnosti, obzirom da je ESSDAI score viši u bolesnika mlađe dobi kod kojih je broj lezija manji bez obzira na aktualnu aktivnost bolesti.procijenjenu u vrijeme MR pretrage. Nije utvrđena statistički značajna povezanost sa serumskim varijablama kao što su: sedimentacija (SE), komplement C4, SS-B, RF, CRP (Sarac 2013) (**Tablica 67**). Karakteristike ispitanika prikazane su u (**Tablici 68**).

Tablica 67. Povezanost hiperintenzivnih lezija mozga u bolesnika s pSS sa serumskim varijablama

	ESSDAI	SS-A	SS-B	RF	CRP	C4	PSL
Ukupno lezije							
p-vrijednost	**0.004**	0.057	0.207	0.817	0.957	0.698	0.453
r	-0.58	-0.41	-0.28	-0.06	-0.01	0.09	-0.17
Periventrikularno							
p	0.07	0.450	0.717	0.605	0.757	0.777	**0.019**
r	-0.39	-0.17	-0.08	-0.14	- 0.07	0.07	-0.49
Bazalni gangliji							
p	**0.033**	0.188	0.256	0.799	0.779	0.767	0.749
r	-0.46	-0.29	-0.25	0.07	-0.06	-0.07	0.07
Subkortikalno							
p	0.09	0.486	0.738	0.475	0.722	0.908	0.658
r	-0.36	-0.157	-0.08	0.19	-0.08	0.03	0.66
Cerebelarno							
p	0.94	0.599	0.649	0.082	0.14	0.27	0.187
r	0.02	-0.118	-0.1	0.45	-0.33	0.259	0.29
Mezencefalon							
p	0.21	0.599	0.649	0.581	0.632	0.616	0.594
r	0.28	-0.12	-0.103	-0.15	-0.11	-0.12	0.12
Pons							
p	0.13	0.599	0.649	0.082	0.422	0.27	0.939
r	-0.33	-0.12	-0.1	0.45	-0.18	-0.26	0.02
Infratentorijski							
p	0.53	0.186	0.253	0.277	0.204	0.793	0.113
r	-0.14	-0.29	-0.25	0.29	-0.29	0.06	0.35

SH = signal hperintensity; ESSDAI = EULAR Sjögren's syndrome disease activity index; ESR = erythrocyte sedimentation rate; SS-A, SS-B, RF = rheumatoid factor; C4 = Complement C4, CRP = C-reactive protein, PSL = platelet serotonin level.

Tablica 68. Karakteristike bolesnika s pSS (Sarac 2013)

Karakteristike	Bolesnici s pSS	Kontrole
Broj ispitanika	22	20
Spol, žene/nuškarci)	19/3	14/6
Dob, godine, medijan (raspon)	51 (43-61)	57.5 (44-71)
Trajanje bolesti, medijan (raspon)	6.5 (2-15)	na
Trajanje sicca simptoma, medijan (raspon)	8.9 (2-23)	na
ESSDAI score, medijan (raspon)	9.5 (3-19)	na
Positivna anti-Ro/SS-A antitijela, broj (%)	6 (27.0)	na
Positivna anti-La/SS-B antitijela, broj (%)	5 (23.0)	na
Antinuklearna antitijela (ANA), broj (%)	12 (0.51)	na
Pozitivan reumatoidni faktor, (RF), broj (%)	15 (68.1)	na
SE, mm, median (range)	29 (0.4-11.7)	na
C-reaktivni protein, CRP, mg/L, sredina (SD)	3.78 (0.4-11.7)	na
Komplement, C3, g/l, sredina (SD)	1.19 (0.26)	na
Komplement, C4, g/l, sredina (SD)	0.28 (0.048)	na
Haptoglobin, g/L, medijan (range)	1.43 (0.5-2.9)	na
Serumski albumin, g/L, sredina (SD)	47,17 (4.01)	na
Serumski gama globulin, srednina (SD)	11.48 (6.22)	na
IgG, g/L, medijan (raspon)	11.61 (8.1-15.12)	na
IgA, g/L, medijan (raspon)	2.5 (1.01-3.85)	na
IgM, g/L, medijan (raspon)	2.5 (0.45-4.51)	na
IgE, g/L, median (raspone) N (%)	465.5(7.55-666)	na
Trombocitni serotonin (PSL) sredina, (SD)	353,1 (158,06)	na
Broj limfocitnih fokusa (biopsija) 1 ili više	16	na
Biopsija malih slinovnica-stupanj 3	11 (50.0)	na
Biopsija malih slinovnica-stupanj 4	5 (23.0)	na

ESSDAI zbroj = European League Against Rheumatism Sjogren's syndrome disease activity index; SS-A = Sjogren's syndrome autoantibody A, SS-B = Sjogren's syndrome autoantibody B, SE = sedimentacija, Ig = serumski imunoglobulin na = (engl. not aplicable, nije primijenjeno)

4.10. Elektromioneurografske (EMNG) varijable u bolesnika s pSS

Tablica 69. Deskriptivna statistika EMNG nalaza u bolesnika s pSS sa simptomima parestezija

EMNG (N=31)	**Neuropatija/Miopatija (N=12)%**
0 - Nema neuropatije	0
1- Fokalna demijelinizirajuća neuropatija (n.medianus)	6 (50%)
2 - Senzomotorna polineuropatija	3 (25%)
3 - Fokalna demijelinizirajuća. polineuropatija+senzorna demij. polineuropatija	1 (8,3%)
4 - Miopatija	1 (8,3%)
5 - Miopatija + fokalna demijelinizirajuća neuropatija (n.suralis)	1 (8,3%)

Deskriptivna statistika bolesnika s pSS pokazuje da je od ukupno 61 bolesnika s pSS, čak 31 bolesnik (51%) imalo simptome parestezija u ekstremitetima, od čega je neuropatija objektivizirana nalazom EMNG-a u 11 bolesnika (19,67%) i miopatija u 2 (3,3%) bolesnika (**Tablica 69**).

Tablica 70. Utjecaj serumskih i kliničkih pokazatelja na EMNG nalaz u smislu neuropatije i ili miopatije u bolesnika s pSS koji imaju simptome parestezija

	Parestezije/EMNG (N=31)	**Neuropatija vs (N=12)**	**Bez neuropatije (N=19)**
		p-vrijednost	
Serotonin (PSL)		0,8229	
ESSDAI		0,7951	
IgG		0,2228	
SE		0,3273	
SS-A		0,8252	

Analizom pomoću Man-Whitney U testa nije dokazan utjecaj niti jednog of tri mjerena periferna biološka pokazatelja; PSL, IgG, i SE, niti aktivnosti bolesti (ESSDAI) na nalaz EMNG u smislu neuropatije ili miopatije, niti utjecaj SS-A autoprotutijela analizom pomoću X^2 testa, u skupini bolesnika s parestezijma (N=31 bolesnik s pSS) (**Tablica 70**).

5 RASPRAVA

Cilj ove presječne studije je bio dokazati povezanost koncentracije trombocitnog serotonina (PSL) i dva osnovna polimorfizma gena za serotoninski transporter (5-HTT); 5-HTTLPR, rs25531 i 5-HTTin2VNTR i njihovu potencijalnu ulogu u nastanku depresivnosti i umora u bolesnika s primarnim Sjögrenovim sindromom (pSS). PSL je mjeren kvantitativno, metodom spektrofluorimetrije, a polimorfizmi gena za serotoninski prijenosnik određeni su PCR metodom.

Obzirom da slične studije u bolesnika s pSS nisu rađene nije bilo moguće uspoređivati rezultate.

Isključujući čimbenici bili su mogućnost bilo kakve povezanosti ili preklapanja s nekom drugom sistemskom autoimunom bolesti od većeg značaja, tzv. sekundarni Sjögrenov sindrom (sSS) i lijekovi kao uzroci sekundarnog umora: antidepresivi, antipsihotici, antiepileptici, kortikosteroidi, antihistaminici, terapija antikolinergicima, liječenje unutar 6 tjedana prije uključivanja u ispitivanje.

Početnom analizom podataka utvrđene su statistički značajno snižene vrijednosti PSL u žena i muškaraca oboljelih od pSS u odnosu na zdrave kontrole, dok nije bilo razlike u drugim varijablama trombocita uključujući broj i volumen trombocita između skupina (Sarac 2012), dok nije bilo razlike između skupina u drugim varijablama trombocita; broju i volumenu trombocita. Utvrdili smo utjecaj dobi i spola na vrijednosti PSL u skupini bolesnika s pSS, ali ne i u zdravih kontrola, vjerojatno jer su se skupine razlikovale po dobi i spolu. Bolesnici s pSS su očekivano, bili prosječno starije dobi i s većim udjelom žena u odnosu na kontrole. Smatramo da ove razlike nemaju značajnijeg kliničkog utjecaja oslanjajući se na rezultate ranijih studija provedenih na većem uzorku zdravih ispitanika (Guicheney P, 1988, Martin F 1990, Balija 2010) koje su pokazale da niti spol ni dob ne utječu značajnije na PSL, nego da PSL u najvećoj mjeri ovisi o aktivnosti serotoninskog prijenosnika (transportera, 5-HTTT). Trajanje simptoma bolesti i ukupne bolesti od postavljanja dijagnoze, nije utjecalo na vrijednosti PSL.

Od standardnih serumskih pokazatelja porast SE, CRP i haptoglobina zabilježen je u 31%, 29% i 16% bolesnika s pSS, a od imunoloških porast gama globulina (hipergamaglobulinemija)u 29% bolesnika, snižen C3 u 13% i povišen C4 kod 9% bolesnika s pSS iako se smatra boljim pokazateljem aktivnosti bolesti od C3. U bolesnika s pSS, najčešći patološki nalaz bio je ANA

(59%), RF (35%), SS-A (36,1%) i SS-B (27,9%) što je u skladu s ranijim podacima prema kojima bolesnici s pSS, uz učestalo povišeni titar poliklonskih IgG protutijela u serumu (hipergamaglobulinemija) imaju pozitivan titar ANA (oko 75%), RF (oko 60%), anti-Ro/SS-A (30-60%), anti-La/SS-B (5-50%), anti-CCP (eng. anti-cyclic citrulinated peptide) koji je specifičan za RA, ali se pojavljuje u 3-7% slučajeva pSS, alfa-fodrin protutijela koja obično prethode SS-A i SS-B i calpastatin koji se pojavljuje u svim upalnim reumatskim bolestima (Goeb V 2007) i ANCA rijetko. Nismo pronašli izravni utjecaj ANA, SS-A i SS-B na PSL u bolesnika s pSS. Autoprotutijela SS-A, iako pokazuju visoku osjetljivost, nisu sasvim specifična za pSS i u 30% slučajeva su prisutna i u SLE. Protutijela SS-B koegzistiraju s SS-A protutijelima u više od 50% slučajeva i indikativnija su za dijagnozu pSS, a povezuje se i s težim oblikom pSS, vaskulitisom i leukopenijom (Alexander 1983). Iako uloga ovih protutijela nije sasvim razjašnjena, smatra se kako upravo anti-Ro 52 (SS-A) izravno induciraju autoimune T i B stanice u pSS. Usprkos nalazima T limfocita u žljezdanim lezijama, dokazi upućuju na predominaciju B limfocita i humoralne imunosti u patogenezi pSS koji se ujedno izravno povezuju s hiposalivacijom. Ovu hipotezu podupiru i rezultati recentnih kliničkih studija s monoklonskim protutijelom anti-CD20 (rituximab) u redukciji nekih simptoma pSS blokirajući limfocitni stimulator citokin BAFF. (Isaksen K, 2008).

Serotonin je primarno neurotransmiter SŽS, ali je prisutan i u mnogim perifernim tkivima, uključujući i imuni sustav. Poznata je uloga 5-HT u: A) neuroimunim interakcijama (Ader 1995) gdje preko specifičnih receptora potiče proliferaciju i diferencijaciju imunih stanica-limfocita, B) SŽS može preko autonomnog živčanog sustava potaknuti osobađanje 5-HT u imunim stanicama, a 5-HT mogu preuzeti noradrenergička vlakna i ponovo ga otpustiti nakon aktivacije ovih vlakana stresom. C) Imuni sustav može utjecati na funkciju autonomnog živčanog sustava oslobađanjem pohranjenog 5-HT iz noradrenergičkih vlakana u limfoidnim tkivima (Cohen 1987). Tako 5-HT sudjeluje u bidirekcijskoj komunikaciji živčanog i imunog sustava. 5-HTr i 5-HTT su raspoređeni osim u neuronima i na imunim stanicama. Upalni odgovor i proupalni citokini na periferiji i u SŽS uzrokuju porast 5-HT u različitim regijama mozga mijenjajući središnju serotonergičku neurotransmisiju. Genetske varijacije 5-HT sustava; 5-HTT i 5-HTr, mogu utjecati osim na neurotransmisiju i time na bolesti SŽS, i na funkciju imunog sustava. (Collier 1996, Li 1997 i Lesch 1998).

Neravnoteža citokina može aktivirati enzim indolamin 2,3-dyoxygenazu (IDO) i utjecati na sniženje 5-HT skretanjem metabolizma triptofana prema kinureninu, smanjujući bioraspoloživost

triptofana za sintezu 5-HT u SŽS i periferno u enterokromafinim stanicama. Pad razine 5-HT može usporiti proliferaciju i diferencijaciju limfocita i poremetiti stvaranje i oslobađanje citokina iz limfocita, tj. povećati omjer proupalnih IL-6 u odnosu na protuupalne IL-10 citokine i potencirati upalu.

Prema našim rezultatima, aktivnost bolesti mjerena objektivnom ljestvicom ESSDAI ne utječe značajnije na sniženje PSL (Seror 2010), a niti PSL nije pokazao korelaciju sa subjektivnim bolesnikovim tegobama (suhoća, bol i umor) u svim samoocjenskim ljestvicama; ESSPRI (Seror 2011), modificirana 6-items-VAS-SS niti VAS ljestvica. Nije bilo povezanosti PSL s mentalnim umorom-VAS, boli-VAS i otokom parotida (0-2), ali smo dokazali da sniženje vrijednosti PSL utječe na simptome depresivnosti na Beckovoj ljestvici (BDI) u bolesnika s pSS, te da PSL granično korelira sa somatskim umorom-VAS i umorom na ljestvici PROF;NRS 0-7. Korelacija između PSL i depresije bila je dobra (r = -0,55), umjerena s PROFment i slaba negativna korelacija s PROFsom.

S obzirom na rezultate prethodnih studija koji pokazuju značajno snižene vrijednosti PSL u svim ispitivanim upalnim reumatskim bolestima kao što su SLE, RA, SSc i MCTD, pretpostavljamo da bi PSL mogao biti pokazatelj (biomarker) simptoma zajedničkim svim upalnim reumatskim bolestima kao što su depresija i umor. Više je potencijalnih mehanizama koji pridonose pojašnjenju mehanizma promjena u PSL u bolesnika s pSS i u drugim upalnim reumatskim bolestima:

1) Akutni stres aktivira noradrenergički stresni sustav uz pojačanu sekreciju kateholamina u SŽS (locus coeruleus) i na periferiji u imunim stanicama što potiče pojačano oslobađanje upalnih citokina, nastaje tzv. „proupalni bias“ uz porast omjera citokina IL-6/IL-10, što aktivira enzim indolamine 2,3-dioksigenazu (IDO) koja skreće metabolizam triptofana prema kinureninskom putu i smanjuje raspoloživost triptofana za sintezu serotonina (Dantzer 2008, Miller 2009a, Miller 2009b, Schiepers 2005, Raison 2009). U akutnom stresu se aktiviraju i 5-HT receptori (5-HTr) što uzrokuje promjenu stupnja fosforiliranosti 5-HTT a time i promjenu aktivnosti 5-HTT, mijenja se distribucija 5-HTT i njegov kapacitet unosa 5-HT u stanice, izvanstanična koncentracija 5-HT o kojoj i ovisi konačna eskpresija 5-HTT na staničnoj membrani. Akutni stresori uzrokuju porast proupalnih citokina, a nositelji SS genotipa za 5-HTTLPR u odnosu nanositelje LL genotipa mogu pokazivati proupalni bias/fenotip u stresu i izvan stresa, tj. nositelji SS genotipa imaju viši omjer

proupalnih prema protuupalnim citokinima (IL-6/IL-10) i pokazuju «sklonost proupalnom stanju», prije i nakon Trier Social Stress Test (TSST) (Fredericks 2009).

2) Kronični stres uzrokuje trajni porast razine glukokortikoida što može promijeniti konfiguraciju različitih receptora za neurotransmitore, spolne hormone, citokine na svim stanicama uključujući i imune stanice. Na imunim stanicamam ove promjene rezultiraju poremećajima proliferacije, diferencijacije i funkcije imunih stanica i do pojačanog oslobađanja proupalnih citokina koja kod nositelja rizičnog genotipa S/S ili s/s ili alela „S“ ili „s“na genu za 5-HTT može dodatno sniziti 5-HT u stanicama, pogodovati nastanku autoimunih poremećaja i komorbidnih sindrome vezane uz njih kao što su depresija i umor..

Obzirom na izostanak povezanosti vrijednosti PSL s bilo kojim od serumskih pokazatelja, a oslanjajući se na dokaze da na PSL prvenstveno utječe ekspresija (broj i funkcija) 5-HTT, u nastavku ispitivanja ispitivali smo dva osnovna polimorfizma 5-HTT, ključnim elementom serotonergičke transmisije i ključnim regulatorom razine 5-HT u svim stanicama (neuroni, trombociti, imune stanice i dr.) (Lesch, 1993). Prvi ispitivani funkcionalni polimorfizam bio je na promotoru 5-HTTLPR koji je obilježen sa dva moguća alela; alel sa 16 ponavljajućih pariva baza (bp) tj. jedinica, ili dugi alel (engl. long, L) i alel s 14 kopija, tzv. kratki alel (engl. short, S) (Lesch 1996). Polimorfizam 5-HTTLPR izravno modulira transkripcijsku aktivnost 5-HTT gena (SLC6A4), a polimorfno mjesto nalazi se na gornjem dijelu transkripcijskog startnog mjesta. Uz najčešće istraživani polimorfizam 5-HTTLPR ispitali smo i dodatni, recentno otkriveni polimorfizam rs25531 polimorfizam i 5-HTTin2VNTR. Nakon što smo utvrdili genotipsku i alelnu distribuciju polimorfizama 5-HTTLPR, rs25531 i 5-HTTin2VNTR u bolesnika s pSS i zdravih kontrola, analizirali smo distribuciju i feekvenciju procijenjenih i faznih haplotipova pretvarajući transformirajući klasifikaciju u trialelni/bialelni model prema razini ekspresije alela SLC6A4 5-HTLPR haplotipova S_AS_A, L_AL_A, L_AS_A, L_AL_G, L_GS_A i L_GL_G , na slijedeći način: S_AS_A kao S'S', L_AS_A i L_AL_G kao L'S, te L_AL_A kao L'L' (Hu 2006, Parsey 2006). Iznenađujuće, većina studija gena za serotoninski transporter nije istraživala haplotipove, analizirani su u manje od polovice studija.

U skupini naših bolesnika s pSS na 5-HTTLPR najčešći je haplotip L_A (57,38%) i fazni haplotip L_AS_A 24 (39,34%), a reklasifikacijom u bialelni sustav najčeći grupirani fazni haplotip je L'S' 30 (49,18%). U našem istraživanju koje je provedeno na etnički homogenoj populaciji podrijetlom iz Republike Hrvatske, dobivena je distribucija grupiranih faznih haplotipova (genotipova) za 5-HTTLPR u bolesnika s pSS / kontrola L'L' (32,79% / 27,66%), L'S' (49,18% /

45,74%) i S'S' (18,03% / 26,6%). Budući da je S alel na 5-HTTLPR zastupljen u vrlo malom postotku u bjelačkoj populaciji (Noskova 2008), ispitali smo i nosioce S alela (nosioci L'S' i S'S' genotipova) u odnosu na nosioce L'L' genotipova u obje skupine. Iako je u kontrolnoj skupini bilo više nosioca S'S' genotipa, nije bilo statistički značajne razlike među skupinama. Ova je distribucija slična onoj opisanoj u literaturi, kao što navode u svom radu (Noskova 2008) gdje su uzorak činili Europljani (Hrvati čije smo podatke usporedili, Rusi, Nijemci, Austrijanci, Englezi, Mađari, Španjolci, Talijani, Kinezi, Koreanci i Japanci kod kojih je pronađena slijedeća distribucija za 4 skupine L'L' (bijela populacija: 38,2% i azijska populacija: 13%, 4,8%, 4%), za L'S' genotip (47,5% i 31%, 40,9%, 30,7%) i S'S' genotip (14,3% i 56%, 54,4%, 65,3%). Značajne su razlike u raspodjeli genotipova između bijele i azijske tj. korejske i japanske populacije u kojoj je od 3 puta (Kinezi) do 9 puta (Koreanci i Japanci) veća učestalost S'S' genotipa prema Europljanima. Nakon analize haplotipova, nije bilo statistički značajne razlike između skupina bolesnika s pSS i kontrola u frekvenciji haplotipova L_A, L_G i S_A, zatim u frekvenciji grupiranih haplotipskih frekvencija L_A i (L_G +S_A), u frekvenciji faznih haplotipskih frekvencija S_AS_A, L_AL_A, L_AS_A, L_AL_G, L_GS_A i L_GL_G , niti učestalosti grupiranih faznih haplotipskih frekvencija L'L', L'S' i S'S' niti među nositeljima faznih haplotipova (S'S') *vs* (L'L'+L'S') i L'L' *vs* (L'S' + S'S').

Analizirali smo i polimorfizam intronske ili netranslacijske regije 5-HTTin2VNTR, koja djeluje samo kao transkripcijski regulator ili modulator, a može sadržavati različiti broj kopija bp: 9, 10 („s“, kratki alel) ili 12 kopija („l“, dugi alel) od 16 ili 17-ponavljanja parova baza (Ogilvie 1997). Iako intronski dio gena nije podložan transkripciji, oba alela „s“ i „l“ mogu povećati transkripcijsku sposobnost, a „l“ alel ima veći učinak od „s“ alela (MacKenzie 1999). Brojne su studije učestalosti polimorfizama intronske regije 5-HTTin2VNTR, ali funkcionalne posljedice ovog polimorfizama ispitivane su u samo dvije studije i nisu pokazale značajniji učinak ovog polimorfizma na unos 5-HT u trombocite (Ito 2002, Kaiser 2002) ili na koncentraciju 5-HIIA u cerebrospinalnom likvoru (Jonsson 1998). Kasnije studije dokazale su povezanost genotipa ll (12/12 bp) intronske regije 5-HTTin2VNTR sa značajno višom razinom metabolita norepinefrina. U jednoj studiji je dokazana povezanost „s“ alela na 5-HTTin2VNTR s osjetljivošću na razvoj veće depresivne epizode (Božina 2006). Praćenjem učestalosti pojavljivanja l i s alela l, i genotipova ll, ls, i ss na 5-HTTin2VNTR polimorfizmu za obje skupine, u skupini bolesnika s pSS učestalost alela je bila: l (67,21%) i s (32,79%), a frekvencija genotipova ll (49,18%), ls (36,06%) i ss (14,75%), a najčešći je genotip ls. U kontrolnoj skupini frekvencije alela l i s su su bile 60,1% i 39,9%, a genotipova ll (33,33%), ls (53,13%) i ss (13,54%), a najčešći genotip je ls (53,13%).

Usporedbom između skupina, neočekivano je dokazana veća učestalost alela „s“ u kontrolnoj skupini 5-HTTin2VNTR u odnosu na zdrave kontrole (p=0,0525), te se može se reći da postoji tendencija učestalijeg pojavljivanja alela s na 5-HTTin2VNTR u kontrolnoj skupini u odnosu na bolesnike s pSS, dok istovremeno nije utvrđena genotipska razlika.

S obzirom da smo dokazali statistički značajne razlike u PSL između skupina, a oslanjajući se na dokaze o snažnom utjecaju 5-HTT na PSL, ispitali smo genotipsku i alelnu povezanost PSL s polimorfizmima 5-HTTLPR, rs25531 i 5-HTTin2VNTR. Nije dokazana statistički značajna razlika u PSL unutar skupina niti između skupina obzirom na 5-HTTLPR/rs25531 frekvencije faznih haplotipova L' i S', niti prema grupiranim faznim haplotipovima (genotipovima) L'L', L'S' i S'S', iako je PSL u skupini bolesnika s pSS bio niži, ali ne i statistički niži prema alelnoj (L' i S') i genotipskoj korelaciji (L'L', L'S' i S'S') s PSL. Nadalje, nositelji oba haplotipa L' i S' u skupini bolesnika imali su značajno niže vrijednosti PSL. Unutar skupine bolesnika najniže vrijednosti PSL su utvrđena prema genotipu L'S' i kod nositelja S' alela, a najviše prema genotipu L'L', a unutar kontrolne skupine alelne i genotipske razlike u PSL su bile minimalne. Može se reći da je PSL niži u skupini bolesnika, ali da na PSL vrijednosti ne utječe polimorfizam 5-HTTLPR. S obzirom da takva odstupanja nisu primijećena u skupini zdravih kontrola, možemo reći da na promjene, tj. sniženje vrijednosti PSL u skupini bolesnika utječu neki drugi čimbenici, npr. stres, citokini, virusi i dr. Razlike u ekspresiji gena za 5-HTT ispitivane su u više studija (Lesch 1996, Greenberg 1999, Nobile 1999) i to za promotorsku regiju. Daljnje studije dokazale su funkcionalne učinke 5-HTTLPR na ekspresiju gena za serotoninski transporter u neuronima SŽS i na periferiji (Mortensen 1999, Little1998). Učinci intronske regije 5-HTTin2VNTR su opisani kao različite razine ekspresije gena u embrionalnim stanicama (Fiskerstrand 1999) i dokazano je da intronska regija djeluje kao transkripcijski regulator 5-HTT gena: alel „l”sa 12/12 bp pojačava aktivnost gena nasuprot alelu „s” sa 10/12 bp, ali je također dokazano da ne samo broj, nego i primarna struktura intronske regije može utjecati na transkripciju gena (Lovejoy 2003). Malobrojne studije koje su istraživale funkcionalne posljedice polimorfizama intronske regije, nisu dokazale zničajne učinke genotipova na unos 5-HT u trombocite (Kaiser 2002) ili na HIIA u likvoru (Jonnson 1998). Studije koje su ispitivale kombinirane učinke oba polimorfizma 5-HTT dokazale su kombinirane učinke 5-HTTLPR i 5-HTTin2VNTR polimorfizama na ekspresiju gena za serotoninski transporter na depresiju u bolesnika s iritabilnim kolonom, gdje su nositelji S/S genotipa 5-HTTLPR i s/s na 5-HTTin2VNTR imali daleko veću sklonost depresiji, ali ne i anksioznosti i suicidalnosti, zatim u sizofreniji (Hranilovic 2004) i tendenciju u grupi hrvatskih

žrtava suicida nositelja alela „L“ 5-HTTLPR i alela „s“ na 5-HTTin2VNTR (Hranilović 2003)) ili pojedinačni učinak „s“ alela VNTR na sklonost većoj depresivnoj epizodi (Božina 2006),

Analizom utjecaja polimorfizma 5-HTTin2VNTR na vrijednosti PSL po skupinama, dokazali smo značajne razlike u PSL između bolesnika s pSS i kontrola, pri čemu su bolesnici nosioci genotipa ss na 5-HTTin2VNTR imali statistički značajno niže vrijednosti PSL od zdravih kontrola ($p = 0,0056$), i tek tendenciju ka nižim vrijednostima PSL u bolesnika s pSS nositelja genotipa ls na 5-HTTin2VNTR. Nadalje, nositelji oba alela „l“ i „s“ u skupini bolesnika imali su niži PSL, čime je isključena alelna povezanost s PSL unutar skupina i između skupina. Dakle, dokazali smo kako postoji genotipska razlika u PSL kod nositelja genotipa ss i tek tendencija kod nositelja ls genotipa na intronu 5-HTTin2VNTR, a razlika u PSL je uočena samo usporedbom između skupina bolesnika i kontrola, do nije utvrđena razlika unutar skupina, te se može reći kako nema izravnog alelnog niti genotipskog utjecaja intronske regije 5-HTTin2VNTR na PSL, ali bolesnici s pSS nositelji genotipa s/s na 5-HTTin2VNTR imaju izraženu sklonost nižim vrijednostima PSL u odnosu na zdrave kontrole nositelje istog genotipa na intronu. Štoviše, unutar skupine bolesnika s pSS najniže vrijednosti PSL imali su nositelji ss genotipa na 5-HTTin2VNTR, a u kontrolnoj skupini nositelji s/s genotipa na intronu imali su najviše vrijednosti PSL.

Ovi rezultati podupiru model geni x okoliš (G x E) pri čemu interakcija više različitih utjecaja predstavlja patogenetsku osnovu određenih simptoma kao što su npr. upalom izazvana depresija i umor što će se analizirati u drugom dijelu istraživanja, ali prije smo ispitali mogući utjecaj aktivnosti bolesti na PSL (Caspi 2003).

Budući da za pSS, kao ni za ostale autoimune bolesti ne postoje specifični biološki niti klinički pokazatelji bolesti ili kumulativne destrukcije tkiva, već se koriste specifični kriteriji za procjenu općeg statusa osjetljivih na bilo koje promjene u kliničkom tijeku i procjenjuju važne kliničke razlike u bolesnikovom stanju. Prvo smo ispitali potencijalnu povezanost polimorfizama 5-HTTLPR i rs25531, te 5-HTTin2VNTR s kliničkim pokazateljima. Nije dokazana niti povezanost ovih polimorfizama s indeksom aktivnosti bolesti ESSDAI, indeksom subjektivnih bolesnikovih tegoba mjerenih ljestvicom ESSPRI, depresivnosti mjerenom pomoću ljestvice BDI, somatskim umorom-VAS, mentalnim umorom-VAS, PROFuk, PROFsom, PROFment.

Nadalje smo analizirali potencijalnu povezanost kliničkih pokazatelja s PSL i nekim od objektivnih kliničkih testova uključujući i Shirmer test i Test salivacije. Svi ispitanici imali su patološke vrijednosti u oba testa, rezultati kojih su dobro korelirali sa subjektivnim bolesnikovim

tegobama mjerenim pomoću ESSPRI ljestivce, što je suprotno ranijim rezultatima koji su pokazivali slabu povezanost između subjektivnih simptoma suhoće i objektivnih mjerenja lakrimalne i salivacijske funkcije (Hay 1998). Nije, međutim bilo povezanosti između objektivno mjerene suhoće sluznica s aktivnosti bolesti (ESSDAI), PSL, PSL, SS-A i SS-B. Klinički simptom otoka parotida zabilježen je u oko 1/3 bolesnika, ali ovaj simptom se nije moglo povezati sa sniženjem PSL, ili porastom protutijela SS-A, SS-B i gama globulina.

Ispitujući stupanj povezanosti sniženja PSL s objektivnim i subjektivnim pokazateljima, testirali smo stupanj povezanosti PSL sa dva različita indeksa; ESSDAI i ESSPRI. Oba indeksa su dobro definirana i validirana u kliničkoj praksi i istraživanjima u mjerenju aktivnosti bolesti i subjektivnih bolesnikovih tegoba za pSS.

Prvo smo mjerili aktualnu aktivnost bolesti u bolesnika s pSS pomoću recentno definirane kliničke i objektivne ljestvice koja predstavlja prvi i dobro definiran standardizirani instrument, indeks aktivnosti bolesti, tzv. *EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI*)(Seror 2010) koji se sastoji od 12 domena vezanih uz specifične organe koje pridonose ukupnoj aktivnosti bolesti, a svaka je klasificirana u 3 do 4 razine (0-3) prema težini simptoma, viša razina indicira teži stupanj. Ocijenili smo svaku od 12 domena posebno (0-3 boda maksimalno za najteži aspekt simptoma) i dobili ukupni zbroj bodova (prema engl. score) , maksimalni mogući zbroj bodova je 32, viši score znači višu aktivnost bolesti. Srednja vrijednost ESSDAI u skupini naših bolesnika s pSS bila je oko 6, minimalno 1, maksimalno 16 od mogućih 32. Validirali smo ljestvicu našim rezultatima i dobili visoku korelaciju s domenama limfadenopatije i općih-konstitucijskih simptoma, umjerenu s domenom statusa zglobova (bol i otok), pluća (intersticijska pneumonija), bubrezi (glomerulonefritis) i otok parotida, i slabu povezanost sa zahvaćenosti PŽS, hematološkom domenom (citopenija) i imunološkim pokzateljima (C3 i C4, porast gama globulina), dok nije bilo povezanosti s kožnim simptomima i zahvaćenosti SŽS. Nismo dokazali utjecaj aktivnosti bolesti (ESSDAI) na vrijednost PSL što je različito u usporedbi s rezultatima u drugim ispitivanim upalnim reumatskim bolestima poput SLE, RA, SSc i MCTD. Nismo utvrdili povezanost između PSL i aktivnosti bolesti prema ESSDAI ljestvici, što je suprotno rezultatima u SLE i RA, gdje su najniže vrijednosti PSL zabilježene u bolesnika s aktivnom bolesti (febrilitet, artritis, kožne promjene, neurološke manifestacije, leukopenija, trombocitopenija, eritrociturija, proteinurija) i multisistemskom zahvaćenosti, a osobito glomerulofnefritisom u SLE (Zeller 1983). Daljnjom analizom povezanosti indeksa aktivnosti bolesti ESSDAI dokazali smo umjerenu povezanost sa indeksom subjektivnih tegoba bolesnika s pSS ESSPRI, somatskim umorom-VAS, slabu

povezanost sa somatskim umorom-VAS i negativnu slabu povezanost ESSDAI s dobi bolesnika s pSS pri čemu je indeks aktivnosti bolesti bio viši u bolesnika mlađe dobi, što je sukladno podacima da aktivnost bolesti bije stabilna tijekom bolesti, da progredira tijekom prvih nekoliko godina od nakon početka, a potom se većina bolesnika stabilizira usprkos stalnoj hiperaktivnosti B limfocita bez obzira na liječenje (u SLE nije utvrđena povezanost sniženja trombocitnog serotonina (PSL) s povećanom oslobađanjem sadržaja trombocitnih granula u plazmi, C3 i C4, trombocitopenijom niti neuropsihijatrijskim manifestacijama. Nije utvrđen niti učinak kortikosteroidne terapije i NSAIR na PSL u SLE, iako je u serijskim mjerenjima PSL i u bolesnika s inaktivnom bolesti bio još uvijek niži prema zdravim kontrolama (Meyerhoff 1981, Zeller 1983). Tada je zaključeno kako je pojačana sekrecija iz trombocita, pa tako i otpuštanje 5-HT inducirano različitim kompleksima i protutijelima. Međutim naglašeno je kako pojačano otpuštanje 5-HT ne mora biti i jedini razlog pada PSL jer razina otpuštenog sadržaja iz trombocita ne korelira sa smanjenjem PSL. Pretpostavljeno je kako bi jedan od razloga bio poremećaj membranskog transporta 5-HT iz plazme u trombocite

U procjeni subjektivnih bolesnikovih tegoba koristili smo *EULAR Sjogren's syndrome Patient Reported Index (ESSPRI*)(Seror 2011) koji je definiran kao sredina triju postojećih ljestvica: *Patient Global Assesment (PGA), Sicca Symptoms Inventory (SSI) i Profile of Fatigue and Discomfort (PROFAD).* Suhoća, umor i mentalni umor identificirani su kao vodeći simptomi bolesnika s pSS u studijama koje su razvile Profile of Fatigue and Discomfort (PROFAD) i Sicca ymptoms Inventory (SSI). Predmnijeva se da je pojedinačna 0-10 brojčana ljestvica (VAS) za svaku domenu (suhoća, bol, somatski umor) dovoljna, i ove tri ljestvice su udružene u jednu, ESSPRI ljestvicu. Iz 12 zemalja, 230 bolesnika s pSS ispunilo je ESSPRI, SSI i PROFAD upitnike i 0-10 Patient global assessment (PGA) I dobile su se korelacije. Metodom multiple regresije, PGA je korišten kao "zlatni standard" u selekciji domena i procjeni njihove težine (Seror 2011).

ESSPRI je vrlo jednostavan indeks dizajniran za mjerenje bolesnikovih simptoma i predstavlja srednju vrijednost 3 ljestvice: suhoća, bolovi u ekstremitetima i umor, mjerenih pomoću VAS ljestvice za svaku domenu posebno. PGA dobro korelira sa suhoćom, bolovima u udovima, umorom i mentalnim umorom, ali ne korelira sa suhoćom. U multivarijantnoj analizi, suhoća, bolovi u udovima i somatski umor, ali ne i mentalni umor su značajno povezano s PGA. ESSPRi dokazano značajno korelira s PGA, PROFAD i SSI (Seror 2011).

Analizom utjecaja PSL na subjektivne bolesnikove tegobe, dobili smo dobru povezanost s depresijom mjerenom ljestvicom BDI (r = -0,55). Dokazali smo i dobru korelaciju sa bolesnikovim indeksom tegoba (ESSPRI; suhoća, bol i somatski umor mjerenim samoocjenskom ljestvicom VAS) i modificiranom ljestvicom bolesnikovih tegoba tzv. 6-items-VAS-SS koja se sastoji od 6 različitih domena, a u kojoj je subjektivni osjećaj boli razdijeljen u tri aspekta: parestezije, mialgije, artralgije, umor je radijeljen u dva aspekta: somatski i mentalni umor, a sadrži još i domenu suhoće sluznica). PSL je pokazao dobru korelaciju sa umorom mjerenim ljestvicama PROFuk, PROFsom, PROFment i somatskim umorom-VAS. Analizom povezanosti rezultata indeksa ESSPRI s različitim subjektivnim tegobama bolesnika s pSS, dobili smo visoku povezanost s mentalnim umorom, boli i somatskim umorom mjerenih ljestvicom VAS, PROFsom i PROFuk, umjerenu povezanost s ESSDAI i BDI i slabu povezanost s rezultatom Testa salivacije, Shirmerovog tetsa, a najmanju negativnu povezanost s dobi bolesnika, pri čemu su mlađi bolesnici imali viši score, što se objašnjava dokazano višim indeksom aktivnosti bolesti ESSDAI u mlađoj dobnoj skupini bolesnika s pSS. S obzirom na visoku učestalost simptoma parestezija, artralgija i mialgija kod bolesnika s pSS, domenu boli smo razdijelili u tri navedene domene, a domenu umora radijelili smo u dvije: somatski i mentalni umor kako bismo preciznije testirali povezanost ukupnog zbroja bodova modificirane ljestvice 6-items-VAS-SS s kliničkim i subjektivnim pokazateljima. Ukupni zbroj ljestvice 6-items-VAS-SS pokazao je visoku korelaciju sa svim domenama ljestvice, pri čemu su domene mialgija i parestezija imale najviši doprinos ukupnom scoru prema beta-koeficijentu, zatim mentalni umor, somatski umor, artralgije i najmanji suhoća sluznica. Dokazana je povezanost ukupnog scora ljestvice 6-items-VAS-S sa aktivnosti bolesti ESSDAI i to stupnja povezanosti u odnosu na ljestvicu ESSPRI, dobra povezanost sa depresivnosti (BDI) i umjerena s ESSPRI, dok nije bilo povezanosti s PSL. Nije dokazana niti povezanost 6-items-VAS-SS i dobi bolesnika s pSS suprotno ljestvici ESSPRI.

Podaci ranijih istraživanja pokazuju kako se PSL može koristiti kao biomarker određenih psihičkih simptoma kao što je depresija i sindrom kroničnog umora, stoga smo se u nastavku istraživanja usmjerili na analizu utjecaja PSL na simptome depresije i umora, kao najčešćih komorbidnih simptoma u bolesnika s pSS. Povezanost između simptoma depresije i umora i sistemske upale detaljno je ispitivana u zdravoj populaciji (Ng 2007). Umor je jedan od najvažnijih onesposobljavajućih simptoma u upalnim bolestima i strogo je povezan s depresijom (Al-Shair 2009) i bitno smanjuje funkcionalnu aktivnost i kvalitetu života. U našoj studiji ispitivali smo razinu PSL kao potencijalnog biomarkera depresije i umora i sistemske upale sa simptomima

depresije i umora u bolesnika s pSS. Naši rezultati pokazuju visoku povezanost depresije sa PSL, SE, gama globulinima i C3, te povezanost umora s PSL, C4 i haptoglobinom. Povezanost PSL s depresijom i umorom može biti rezultat činjenice da je pSS kronična, upalna, onesposobljavajuća bolest i da su depresija ili depresivni simptomi vrlo česti, čak i u bolesnika umjereno klinički stabilnima. Može se zaključiti kako je sistemska upala povezana s depresijom, kao što je dokazano u nekim drugim sistemskim upalnim bolestim kao što je COPD (Barnes 2009).

Podaci o povezanosti pSS s depresijom od ranije su poznati su iz literature. Prvu studiju neuropsihijatrijskih manifestacija u pSS proveo je Malinow i sur 1985, a naknadno su brojne druge studije dale dokaze o psihičkim poremećajima u bolesnika s pSS (Tzioufas 2008, Drosos 1998, Johnson 1998, Stoltze 1969, Johnson 199). Prema podacima više od 65% bolesnika s pSS ima psihičke smetnje, najčešće afektivne poremećaje (Malinov 1985) koji prema *American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder's* u većoj mjeri ispunjavaju kriterije za atipičnu depresiju, manje za veću depresivnu epizodu. PSS je kronična i sporo progresivna bolest, karakterizirana trajnom nelagodom zbog suhoće sluznica, bolovima u zglobovima i mišićima, ali je ipak umor uz depresiju vodeći simptom u bolesnika s pSS. Iskustvo stresnog događaja 6 do 12 mjeseci prije nastupa simptoma bolesti utvrđeno je u većine s pSS. Od psihičkih simptoma najčešći su anksioznost, umor, razdražljivost i poremećaj sna (Johnson 1998, Johnson 1992). Promjene ponašanja u bolesnika s pSS slične su onima kod atipične depresije i sindroma teškog, pretežito kroničnog umora, vjerojatno izazvanih kroničnom sistemskom upalom (Calabrese 1994). Rezultati studija o učestalosti depresije i umora u pSS su kontroverzni, ali prevladava klinički dojam kako je utjecaj upalne bolesti na psihičko stanje veće nego u RA i zdravoj populaciji, čemu u prilog govori i podatak da gotovo 30% bolesnika s pSS ima simptome depresije i oko 50% simptome anksioznosti (Valtysdottir 2000) ili prema drugim podacima 47% bolesnika s pSS ima tešku depresiju (Vitali 1989), što se značajno odražava i na njihovo socijalno, fizičko i mentalno stanje i kvalitetu života. Dokazana je i povezanost depresivnosti i nekih aspekata umora u pSS (Bowman 2004, Barendregt 1998, Bax 2002) što je u skladu s našim rezultatima. Osim što predstavlja čestu psihičku manifestaciju u bolesnika s pSS, depresivnost je uz umor, dobar pokazatelj općeg aspekta pogođenosti bolesnika kroničnom bolesti (Valdysdottir 2000). Međutim, koegzistencija depresije s umorom i raznim tjelesnim tegobama kroničnog tijeka, ponekad otežava postavljanje dijagnoze prave depresije, ipak se predmnijeva kako je depresija primarni simptom i sekundarni uzrok umora.

U našoj studiji od 61 bolesnika, samo 5% nisu imali simptome depresivnosti, a 31% bolesnika imali su simptome blage depresije, dok je čak 64% bolesnika s pSS imalo simptome umjerene i teške depresije mjerene samoocjenskom Beck-ovom ljestvicom depresije (prema engl. Beck Depression Inventory, BDI). Rezultati naše studije iz područja psihijatrije daju kontroverzne rezultate s aspekta povezanosti PSL i psihičkih poremećaja. Rezultati ove studije pokazali su statistički značajnu dobru korelaciju između PSL i depresije u bolesnika s pSS ($r = -0,55$ uz razinu značajnosti $p = 0,0000$) i u skladu su s nekim prethodnim rezultatima koji su pokazali niže vrijednosti PSL u bolesnika s depresijom, (Sarai and Kayano 1968, Takahashi 1976, Coppen 1976, Born 1980, Quan-Bui 1984, Quintana 1992), u suicidalnih bolesnika s depresijom sa ili bez psihotičnih reakcija (Mück-Seler 1996), u bolesnika s prvom epizodom psihoze (Marcinko 2007), u suicidalnih bolesnika sa ili bez postraumatskog stresnog poremećaja (PTSP), ali ne i u nesuicidalnih bolesnika s PTSP i zdravih kontrola (Kovacic Z 2008), dok druge studije nisu dokazale isto (Meltzer 1986, Mück-Seler 1991). Ipak, rezultati nekih psihijatrijskih studija pokazuju sasvim suprotne rezultate studija pa se naši rezultati ne podudaraju s nekim ranijim analizama između depresivnih i zdravih ispitanika (Franke 200, Franke 2003), između depresivnih i nedepresivnih bolesnika s kroničnom bolesti bubrega (Pivac 2001), prisutnosti depresije kao komorbidnog poremećaja ili anksiozno-depresivnog poremećaja gdje nisu utvrđene značajne razlike između koncentracije PSL u veterana s PTSP-om i komorbidnom depresijom i veterana s PTSP-om, ili veterana s PTPS-om i komorbidnim poremećajima i veterana s PTPS-om (Műck-Šeler 2003). Možemo pretpostaviti da poremećaj regulacije 5-HT sustava u bolesnika s pSS može utjecati na nastanak emocionalnih i poremećaja i odražava simptomatologiju depresivnosti definirane kao atipična depresija ili upalom inducirana depresija u oboljelih od pSS. Bolesnici s pSS bi mogli imati i genetsku ili intrinzičku tendenciju za razvoj depresivnosti. Promjene u razini metabolita u mozgu bolesnika s depresijom liječenih antidepresivima mogu se pratiti pomoću spektroskopije magnetskom rezonancijom (Henigsberg 2011).

Ranije studije dokazale su izravnu povezanost polimorfizama 5-HTT s različitim psihičkim i psihosomatskim bolestima, stoga smo analizirali mogući utjecaj polimorfizama 5-HTTLPR, rs25531 i 5-HTTin2VNTR na depresivnost, kao jedan od najčešćih simptoma bolesti u naših bolesnika s pSS. Naši rezultati, međutim nisu dokazali izravnu genotipsku niti alelnu povezanost niti jednog od ispitivanih polimorfizama 5-HTTLPR, rs25531 niti 5-HTTin2VNTR i depresivnosti u bolesnika s pSS, što je suprotno nekim ranijim studijama koje su dokazale povezanost „s“ alela na 5-HTTin2VNTR s većom depresivnom epizodom (MDD) (Božina 2006). Recentnim je

istraživanjima utvrđena povezanost„S“ alela 5-HTTLPR sa suicidalnosti (Hranilovic 2003, Kovacic 2008), somatoformnim simptomima (Hennings 2009), dijabetesom tipa II (Iordanidou 2010), iritabilnim kolonom (Jarret 2007), i „L“ alela na 5-HTTLPR s farmakorezistentnom mezio-temporalnom epilepsijom (Kauffman 2009). Polimorfizmi gena za 5-HTT se povezuju s abnormalnim odgovorima na stres s hiperaktivacijom HHN osi i povećanjem vulnerabilnosti za nastanak i razvoj depresije u osoba s nižom ekspresijom/aktivnosti 5-HTT i anamnezom teškog stresa. Homozigoti za «S» (engl. short) alel sa upadljivom anamnezom stresnog događaja pokazali su značajno povišenu sekreciju kortizola u odgovoru na stresu odnosu na sve druge grupe, ukazujući na značajnu interakciju geni-okoliš predstavlja premorbidni rizični čimbenik na endokrinu stresnu reaktivnost, odnosno pojedinci sa «SS» genotipon na 5-HTTLPR i stresnim životom mogli bi predstavljati specifičan endofenotip. S druge strane nije bilo većeg pojedinačnog učinka samo 5-HTTLPR (bialelni ili trialleni) ili samo stresa na hiperaktivnost HHN osi i pojačanu sekreciju kortizola (Alexander 2009). Rezultati ovih studija upućuju na povezanost 5-HT polimorfizama i simptoma kroničnog stresa i važnu ulogu serotonergičke neurotransmisije u aktivaciji i feedbacku HHN osi (Porter 2004, Fuller 1990). Nosioci «S» alela pokazuju uz disfunkciju i redukciju sive tvari amigdala i girusa cinguli (Pezawas 2005).

Raniji podaci govore da bi zdravi nositelji S/S genotipa mogli biti kronično izloženi pro-upalnom fiziološkom stanju, izvan stresa i u stresu, što bi u određenim patološkim okolnostima moglo facilitirati depresiju i neke autoimune reumatske bolesti (Fredericks 2009). Recentni su dokazi o povezanosti između polimorfizma na promotorskoj regiji serotoninskog transportera (5-HTTLPR) i upalnog odgovora na akutne psihosocijalne stresore u zdravih mladih žena i naglašava intrinzične imunobiološke razlike između zdravih nositelja dvaju kratkih alela S/S nasuprot nositeljima dva dugačka L/L alela na promotorskoj regiji 5-HTT-a. S obzirom na 5-HTTLPR nositelji SS genotipa imaju viši omjer proupalnih u odnosu na protuupalne citokine (IL-6/IL-10), tj. pokazuju pro-upalnu sklonost (prema engl. *inflammatory bias*) prije i nakon Trier Social Stress Test (TSST) (Fredericks 2009). Slijedom toga ispitali smo analizu utjecaja serumskih varijabli na depresivnost u bolesnika s pSS dokazali smo slabu korelaciju, odnosno utjecaj osobito gama globulina, ali ne i specifičnih protutijela SS-A i SS-B, te slabiji utjecaj SE i C3 na depresivnost u skupini naših bolesnika s pSS. Dokazali smo dobru međusobnu povezanost depresivnosti i ESSPRI, mentalnim umorom-VAS i somatskim umorom-VAS, te umorom mjerenim PROFsom, PROFment i PROFuk, ESSPRI, 6-items-VAS-SS i slabu negativnu povezanost depresivnosti s dobi bolesnika s pSS, dok nismo dokazali izravni utjecaj aktivnosti bolesti mjerene pomoću

ESSDAI na depresivnost u bolesnika s pSS. Može se reći da na depresivnost u bolesnika s pSS dodatno utječe subjektivni osjećaj bolesnikovih tegoba nasuprot objektivnim kliničkim pokazateljima što govori u prilog biopsihosocijalnog modela ovog složenog sindroma.

Oslanjajući se na te rezultate, i uzimajući u obzir naše rezultate, može se zaključiti da bolesnici s pSS nositelji s/s genotipa na 5-HTTVNTRin2 regiji gena za serotoninski transporter imaju niže vrijednosti PSL i učestalu depresiju i umor u odnosu na nositelje istog genotipa u zdravoj populaciji, što upućuje da su neki dodatni čimbenici u populaciji bolesnika s pSS doveli do sniženja koncentracije trombocitnog serotonina i potaknuli razvoj pSS i depresije vuključujući psihosocijalni stres, viruse, upalu i dr. Bolesnici s pSS nositelji „s“ alela na VNTR odnosno homozigoti ss na VNTR, ali ne i zdrave kontrole nositelji istog genotipa, pokazuju psihičke smetnje. Interakcija 5-HTTVNTRin2 gena za serotoninski transporter je značajno povezana s depresivnim fenotipom u bolesnika s pSS. Podaci upućuju da bi ekstremno niske koncentracije sinaptičkog serotonina mogle biti povezane s visokim scorom na ljestvici depresivnosti u bolesnika s pSS. Rezultati govore da je serotonergička disfunkcija utječe na vulnerabilnost za atipičnu ili upalom induciranu depresiju u bolesnika s pSS. Temeljem usporedbe PSL, pretpostavljamo da kronični uzroci kao što su stres, upala, hormoni, citokini, HHN insuficijencija, u pSS mogu uzrokovati dugotrajne promjene u serotonergičkom sustavu i da bolesnici s pSS homozigoti za „s“ alel na VNTR (s/s genotip na 5-HTTin2VNTR) bi mogli biti pod osobitim rizikom za upalom-induciranu depresiju i somatski umor. Sniženje PSL i polimorfizam 5-HTTVNTRin2 povezuju se sa simptomima upalom-inducirane depresije u pSS i somatskim umorom, ali ne i ESSDAI.

Umor je jedan od najčešćih simptoma u pSS i značajno narušava kvalitetu života bolesnika, a javlja se u oko 70% bolesnika s pSS. Umor je čest simptom i u ostalim upalnim reumatskim bolestima kao što su RA, SLE (Bowman 2004a, Bowman 2004b, Strömbeck 2000), u MS, hipotiroidizmu, psihijatrijskim bolestima (npr. depresija), može biti medicinski neobjašnjiv (npr. sindrom kroničnog umora, ali je čest i u općoj populaciji (Bates 1993). Na „20-item multidimensional fatigue inventory“ (MFI) nije dokazana značajna razlika na zbrojevima podljestvica u intenzitetu umora između bolesnika s pSS i RA (Barendregt 1998). Značajno narušena kvaliteta života dokazana je u bolesnika s pSS, koristeći 36-item form of the Medical Outcome Study Short-Form 36 (SF-36) questionnaire (Sutcliffe 1998, Strombeck 2000). Ove i druge studije (Barendregt 1998) opisuju umor kao vodeći onesposobljavajući simptom u većine bolesnika s pSS (Bjerrum 1990). U svrhu liječenja umora u pSS, potrebno ga je kvalificirati i kvantificirati. Umor se može procijeniti jednostavnim pitanjem „koliko ste umorni?“ npr. pomoću

VAS ljestvica, ali postoje i brojni multi-dimenzionalni upitnici umora za bolesnike s kroničnim umorom (Schwarz 1993, Krupp 1989, Piper 1989, Chalder 1993, Smets 1995) koji pružaju detaljnije podatke o prirodi umora i korisne su osobito u kliničkim studijama. Odgovor se interpretira kao mjerenje ili „umora“ u cjelini (Krupp 1989, Chandler 1993) ili kao različite komponente, ili podljestvice umora kao što je to u „20-item multidimensional fatigue inventory (MFI)“ (Smets 1995). Bolesnici s pSS dokazano imaju značajno teže simptome umora od zdravih kontrola na svih 5 podljestvica MFI: opći umor, fizički (somatski) umor, snižena aktivnost, mentalni umor i snižena motivacija, a zadnje tri samo ako se isključi depresija (Barendregt 1998).

Sukladno mnogim ranijim europskim (Bowman 2004a, Bowman 2004) i američkim studijama (Segal 2009), u našoj studiji procijenili smo umor pomoću dvije ljestvice umora; VAS i PROF. Oko 95% bolesnika pokazivalo je znakove umora u obje ljestvice u obje domene umora; somatskom i mentalnom umoru. Najjednostavniji način mjerenja-procjene umora, ali i drugih ekstraglandularnih simptoma u pSS (bol, artralgije, mialgije) je pomoću 10-cm VAS ljestvice. Koriste se i upitnici s više domena umora i fraza koje se odnose na pojedinu domenu-element umora, npr. Functional Assesment of Chronic Illnes Therapy scale (FACITS) (Yellen 1997) i Fatigue Severity Scale (FSS) (Krupp 1989), Profile of Fatigue and Discomfort (PROFAD). Ove ljestvice daju ukupni zbroj ili score koji većinom dobro korelira s rezultatima VAS ljestvice, stoga je VAS ljestvica prihvaćena kao jednako vrijedna kao i drugi duži upitnici, barem kad je u pitanju RA (Wolfe 2004), ali korištenjem drugih upitnika osigurava se dodatna validnost VAS ljestvice. Ranije studije pokazale su da neki drugi, širi upitnici daju ukupni score za umor kao i VAS samoocjenska ljestvica umora, što govori u prilog tomu da su VAS ljestvice, osobito VAS ljestvice somatskog i mentalnog umora učinkovite u reumatskim bolestima kao i drugi duži upitnici koji obuhvaćaju niz pitanja koji se odnose na simptom umora i koji, međutim mogu potvrditi validnost VAS ljetvice (Wolfe 2004) kao npr. Fatigue Severity Scale (Krupp 1989), Multidimensional Fatigue Inventory (MFI) (Smets 1995), Functional Assesment of Chronic IllnesTherapy scale (Yellen 1997), Profile of Fatigue and Discomfort Fatigue (ProF) (Bowman 2004), ali korištenje drugih dužih upitnika osigurava dodatnu vallidnost mjerenja. Prvo smo dobili graničnu povezanost između somatskog umora mjerenog VAS ljestvicom i PSL u bolesnika s pSS, povezanost je bila niska (r = 0,25), dok nije bilo povezanosti između PSL i mentalnog umora mjerenog VAS ljestvicom. Umor smo mjerili jednostavnom metodom, koristeći VAS (*engl. visual analogue scale*) -10 cm samoocjensku ljestvicu za somatski i mentalni umor, pitajući bolesnika da brojčano ocijeni simptome umora (od nula do maksimalno 10). Kako bismo dobili bolesnikov

detaljniji opis njegovih simptoma umora, upotrijebili smo noviji upitnik PROF kojim bolesnik opisuje svoje simptome umora, bez nelagode i boli koji su sastavnica PROFAD ljestvice. Rezultat PROF je zbroj bodova (0-7) („score“) za svaku od 16 fraza svih aspekata umora (12 fraza za somatski i 4 fraze za mentalni umor). PROFuk je obuhvatio dvije domene: somatski i mentalni umor, a svaka je karakterizirana s više aspekata. PROF somatski umor razdijeljen je u 4-potencijalno različita aspekta: potreba za odmorom, slaba smanjena izdržljivost, niska izdržljivost, mišićna slabost, a mentalni umor s 2 aspekta: slaba koncentracija i slabo pamćenje. Psihometrijska analiza težine ovih simptoma temelji se na 6 aspekata (djelomično se odnose na MFI-ovih 5 ljestvica), dok nismo analizirali i dva opća aspekta nelagode u pSS koje su slične verbalne strukture kao u SLE i RA. Mjerenje domena somatskog umora obuhvatilo je: potrebu za odmorom, inertnost, smanjenu izdržljivost i mišićnu slabost. Domena mentalnog umora obuhvatila je: smetnje koncentracije i pamćenja.

Naši rezultati pokazali su dobru povezanost umora s PSL, ali i sa nekim serumskim pokazateljima kao što su C4 i haptoglobin, što nije u skladu s rezultatima multicentrične studije prema kojoj je umor bolji pokazatelj funkcioniranja u bolesnika s pSS od bioloških testova kao što su SE, hemoglobin ili antinuklearna antitijela (ANA). Studije su dokazale tek slabu povezanost između umora i aktivnosti bolesti u RA, već su bolesnici s najboljim prediktorom umora imali depresivne simptome, bolnost i ženski spol (Barrendregt 1998 i Huyser 1998). Neki su autori razvili i validirali ljestvice sistemske aktivnosti bolesti (Sjogren Clinical Activity Index –SCAI) (Bowman 2007) i dokazali povezanost između umora, artralgija i Raynaudovog fenomena SCAI-a i komparabilnih domena PROFAD-a. Ipak, u našoj studiji nije bilo povezanosti između umora i ESSDAI, moguće zbog različitih nebioloških kontributora umora uključujući osobnost, slabo raspoloženje, stres i socijalne čimbenike. U jednoj studiji ispitiva je odnos između umora i bioloških (npr. aktivnost bolesti, san), psiholoških (npr. depresija i osobnost) i socijalnih čimbenika (npr. obiteljske okolnosti, životni događaji) (Wessely 1998). U smislu kako aktivnost bolesti ili biološki čimbenici mogu doprinositi umoru u pSS, analizirana je povezanost između razine umora i bioloških mjerenja. Malobrojne studije su analizirale takove povezanosti u pSS tražeći korelacije između umora i razine upalnih markera (SE, CRP, antitijela, IgG, anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, citokini Il-1b, IL-2, IL-6, IL-10 i TNFα. Ove studije nisu uspjele dokazati bilo kakvu povezanost umora s ovim parametrima (Barendregt 1998, Hartkamp 2004, Bax 2002), dok je u MS umor izrazitiji tijekom relapsa i povezan je s povećanom imunološkom aktivacijom TNF-α, IL-1 i IL-6 (Krupp 2003). Neki su autori razvili PROFAD, mjeru umora (Jonsson 2005, Bowman 2004) koja

je pokazala da karakter ili profil umora između bolesnika sa pSS je sličan onome u SLE. Iako ne precizira da li je uzrok umora u biološkim ili psihosocijalnim čimbenicima, sugerira da ako umor u pSS ima slične karakteristike u ovim dvjema bolestima, mogu dijeliti i sličnu etiopatogenezu.

U pSS utvrđena je povezanost umora s bolovima u zglobovima (artralgije) i Raynaudovim fenomenom između komparabilnih domena ljestvica Sjogren Clinical Activity Index (SCAI) i PROFAD, ali ne i povezanot umora s aktivnosti bolesti, vjerojatno zbog različitih nebioloških kontributora umora uključujući osobnost, slabo raspoloženje, pospanost i socijalne čimbenike (Andersson 2001), a slično je dokazano i u RA gdje umor korelira s depresivnosti, boli i ženskim spolom, bez korelacije s aktivnosti bolesti (Huyser 1998). Aktualno se ispituje povezanost umora s biološkim i psihosocijalnim čimbenicima i pokazateljima u pSS (ESSDAI, ESSPRI), kao i povoljni učinci terapije na poboljšanje simptoma umora u pSS.

Koegzistencija depresije s umorom i povezanost s raznim tjelesnim tegobama kroničnog tijeka, ponekad otežava postavljanje dijagnoze prave depresije. Nije bilo, međutim moguće isključiti bolesnika s pSS i depresijom jer ih je čak 65 imalo simptome umjerene do teške depresije i 95% simptome umora. U pSS utvrđena je povezanost umora s boli (artralgije i mialgije) i Raynaudovim fenomenom između komparabilnih domena ljestvica *Sjogren Clinical Activity Index (SCAI*) i PROFAD, ali ne i povezanot umora s aktivnosti bolesti, vjerojatno zbog različitih nebioloških kontributora umora uključujući osobnost, slabo raspoloženje, pospanost i socijalne čimbenike (Andersson 2001), a slično je dokazano i u RA gdje umor korelira s depresivnosti, boli i ženskim spolom, bez korelacije s aktivnosti bolesti (Huyser 1998).

U našoj studiji umor korelira sa svim pokazateljima (ESSDAI, ESSPRI, VAS, BDI i PSL) što znači da je umor dobar pokazatelj funkcioniranja bolesnika s pSS i govori u prilog činjenici da uzrok umoru u pSS multifaktorijelan, odnosno da može biti u biološkim i psihosocijalnim čimbenicima. Neki podaci sugeriraju da socijalni čimbenici također igraju ulogu u razini umora i drugih ključnih simptoma pSS (Andersson 2001), ali nije poznato u kojem opsegu umor odražava biološke ili psihosocijalne čimbenike u pSS.

Aktualno se provode brojne studije povezanosti umora s biološkim i psihosocijalnim čimbenicima i pokazateljimau pSS, kao i povoljni učinci terapije na poboljšanje simptoma umora u pSS. Ali slične studije koje su ispitivale povezanost neurohumoralne regulacije s depresijom i umorom u pSS nisu rađene. Obzirom da je u ovoj studiji ispitivana povezanost depresije i umora s PSL u skupini bolesnika s pSS, moguća su dva mehanizma koji to objašnjavaju.

Prvi je aktivacija HHN osi putem proupalnih citokina TNF-α, IL-1, IL-6 koji su dokazano povišeni u umoru. Dokazano je da je aktivnost HHN osi povećana u upali, zbog čega dolazi do pojačanog otpuštanja CRH, ACTH i kortizola (Hotopf 1998). Endogeni glukokortikoidi svojim protuupalnim djelovanjem suprimiraju imuni odgovor. Poznato je da neurotransmiteri imaju imunoregulacijsku ulogu i to izravno preko receptora na limfocitima i preko HHN osi. Centralno noradrenalin i dopamin stimuliraju hipotalamus, a serotonin u fiziološkim koncentracijama inhibira prekomjerno oslobađanje CRH i ACTH (Marazziti 2010, Davis 2000, Qui 1996, Mössner 1998). Snižene koncentracije 5-HT povezuju se s depresijom, umorom, anksioznosti i nesanicom što je posljedica porasta proupalnih citokina ili aktivacije HHN osi. SSRI poboljšavaju simptome depresije i umora u bolesnika s kroničnim upalnim bolestima. Depresiju i umor uzrokuju i snižena koncentracija noradrenalina. Sve ove promjene u neurotransmisiji mogu utjecati na imuni odgovor izravno preko receptora na imunim stanicama i neizravno, preko citokina ili HHN osi, utječu na imune stanice na staničnu i humoralnu imunost.

Ranije stajalište bilo je da bi u podlozi disfunkcije u atipičnoj depresiji i drugim sindromima povezanih s umorom kao što su fibromialgija i sindrom kroničnog umora mogla biti centralna insufucijencija nadbubrežne žlijezde, kao posljedica oštećene funkcije HHN osi (Vanderpool 1991, Gold 1988, Griep 1993, Chrousos 1992) te da bi i autoimune reumatske bolesti mogle biti povezane adrenalnom insuficijencijom, gdje se CRH-aktivacija HHN osi, odnosno sekrecija ACTH i kortizola se ne odvija normalno (Chrousos 1995, Sternberg 1992, Cash 1992). Spominje se multipla disregulacija HHN osi u bolesnika s depresijom (Holsboer 2001), a neki su utvrdili povišenu sekreciju kortizola u depresiji (Restrepo 1987, Jiang 2000, Nemeroff 1993). U zdravih osoba pri akutnom stresu i upali, očekivani odgovor je pojačana aktivnost HHN osi aktivacijom noradrenergičnog sustava, pojačanom sekrecijom glukokortikoida i pojačanom središnjom i perifernom aktivnosti cirkulirajućih citokina IL-1 i TNF-α, IL-6 koji bi mogli imati važnu ulogu posredujući u interakciji između aktiviranog imunog sustava, hipofize i steroidogeneze (Imura 1991, Perlstein 1993). Psihički stres povisuje i razinu IL-6 kojeg oslobađaju imune stanice nakon izravne stimulacije preko središnjih i perifernih kateholamina bez sudjelovanja HHN osi i neovisno o oštećenju tkiva, endotoksemiji ili upali (Takaki 1994). Citokini imaju središnju ulogu u inicijaciji i održavanju upale u slinovnicama, jer je dokazano da neki bolesnici s pSS imaju značajnu disfunkciju sekrecije sklinovnica čak i bez veće žljezdane destrukcije limfocitima. (Humphrey-Beher 1999, Fox 1996), a poznato je da imaju i značajnu ulogu u sistemskim komplikacijama povezanih s vaskulitisom. Neuroendokrina disfunkcija na mjestu upale u tkivima, posredovana je i

neurotransmiterima na krajevima živčanih vlakana koji oslobađaju kateholamine i acetilkolin što bi moglo biti objašnjenje da suhoća sluznica u pSS ne ovisi o težini upale slinovnicama niti broju limfocitnih fokusa.

Za vrijeme upale različiti cirkulirajući citokini; proupalni citokini kao što su IL-1, IL-6, TNFα, imaju ulogu izravne aktivacije HHN osi preko citokinskih receptora u hipotalamusu stimulirajući CRH prirodni stimulator ACTH i kortizola, na razinu sličnu ili višu od maksimalne. Ovaj kaskadni mehanizam rezultira supresijom imunog odgovora kroz potentne protuupalne imunosupresivne efekte endogenih glukokortikoida. Upala međutim može stimulirati HHN os i neizravno i to najprije stimulacijom središnjeg noradrenergičnog stresnog sustava citokinima i drugim medijatorima koji najprije djeluju na noradrenergičke neurone, izvan ili unutar krvno-moždane barijere, kroz endotelno-glijalnu-neuronalnu kaskadu. Pored toga, upalna mjesta sadrže somatosenzorne aferentne neurone koji stimuliraju noradrenergički i CRH sustav kroz ascendentne spinalne ili moždane neuronske puteve i perifernog neuroendokrinog sustava (npr.imune stanice pokazuju ekspresiju neurotransmitorskih receptora uključujući i 5-HT) (Sternberg 2011, Chrousos 1995). U bolesnika s kroničnim reumatskim bolestima, izostaje normalna adaptacija HHN osi na stres i upalu. U kroničnoj upalnoj bolest kao što je RA, smanjena je sekrecija kortizola, unatoč povišenom ACTH u plazmi (Gudbjörnsson 1996) što bi moglo biti posljedica kronične upale, ali bi moglo biti povezano i s nekim genetskim ili konstitucijskim čimbenicima (Masi 1996). U bolesnika s pSS, smanjena je sekrecija ne samo kortizola nego i ACTH, za što ima nekoliko obrazloženja. Bolesnici s pSS mogli imati sistemsku upalnu reakciju nižeg stupnja u odnosu na bolesnike s RA kod kojih je snižena samo sekrecija kortizola vjerojatno centralnog hipotalamičkog uzroka, uslijed oštećenog negativnog feedbacka (Valtysdottir 2001). Stoga se može pretpostaviti da bi neki drugi mehanizmi, osim upalnih i citokina, mogli biti u pozadini poremećaja HHN osi. Prvo, bolesnici sa pSS često pokazuju neurospihijatrijske simptome kao što su, umor, anksioznost i depresivno raspoloženje (Gudbjörnsson 1993, Hietaharju 1990, Drosos 1989) i ovi simptomi kroničnog stresa mogli bi biti povezani s različitim poremećajima neuroendokrine reaktivnosti. Drugo, mehanizmi se mogu dovesti u vezu s genetskim ili intrinzičnim tendencijama. U akutnom stresu raste razina glukokortikoida u krvi koji prekospecifičnih receptora u hipokampusu aktiviraju hipotalamus na sekreciju CRH, a potom na sekreciju hormona hipofize (ACTH) koji stimulira sekreciju kortizola. Međutim, prolongirani stresuzrokuje neurohormonalnu disfunkciju centralno i periferno u tkivima i imunim stanicama. Kronični stres mijenja odgovor različitih receptora uključujući glukokortikoidne receptore, receptore spolnih hormona (androgeni, estrogeni i

prolaktin), receptore citokina centralno (hipotalamus) i na periferiji(imune stanice), koji umjesto visoko adaptivnih postaju maladaptivni pa izostaje negativni «feedback». Nastavlja se pojačana produkcija CRH i glukokortikoida. Glukokortikoidi reguliraju i utječu na brojne neurotransmitorske sustave uključujući i serotonergički, regulirajući i modulirajući njihove receptore u kojima mogu uzrokovati i promjene strukture tj. konfiguracije receptora u SŽS i na periferiji (npr. receptori gluikokortikoida, receptori spolnih hormona i receptori citokina na imunim stanicama) (Alexander 2009). Naime kronični i izraziti porast glukokortikoida dovodi do destrukcije neurona u hipokampusu uključujući i serotonergične, dolazi do redukcije 5-HT_{1A} receptora u hipokampusu, izostaje stimulacije hipotalamusa što rezultira insuficijencijom HPA axisa, a s druge strane dolazi do porasta 5-HT_{2A} receptora u moždanom korteksu. Smanjenje broja 5-HT_{1A}receptora u hipokampusu objašnjava se kao adaptivni pokušaj smanjenja efekta hiperaktivnosti HHN osi. Dinamička interakcija i mehanizmi inetrakcije između serotoninske neurotransmisije i HPA axisa nije razjašnjena. Pretpostavlja se da 5-HT aktivira HHN os stimulacijom 5-HT_{2C} receptora (5-HT_{2C}Rs) u PVH (Heisler 2007) te da su upravo ti treceptori neophodni za serotoninom induciranu aktivaciju HPA axisa. Smanjena aktivacija 5-HT_{2CA}R serotoninom dovodi do snižene sekrecije CRH, ACTH i kortizola (Heisler 2007). Upravo ovi podaci bi mogli biti najbolja podloga za objašnjenje neurohormonalne mreže posredovanu složenim neurohormonalnim odgovorom na stres u bolesnika pSS.

Manifestacije SŽS u pSS nisu česte, ali nisu zanemarive. Obzirom da oštećenja SŽS u pSS nisu dobro istražena i predmetom su kontroverzi između istraživačkih grupa, cilj nam je bio odrediti prevalenciju hiperintenziteta bijele tvari mozga analizom neuroradioloških nalaza MRI mozga u 22 bolesnika s pSS koji su imali i simptome učestale epizodične tenzijske glavobolje i 20 kontrola s istim simptomima glavobolje, dokazali smo da su hiperintenzivne lezije mozga u bolesnika s pSS češće u specifičnim regijama mozga i to infratentorijski za ukupni broj lezija i u bazalnim ganglijima za lezije veće od 5 mm u promjeru (Šarac 2013). Dosadašnji podaci pokazuju kako su u populaciji oboljelih od pSS s neurološkim manifestacijama, česti multifokalni hiperintenziteti bijele tvari u T2 sekvencama u periventrikularnim i subkortikalnim regijama mozga, te povećanje ventrikula i proširenje sulkusa (Mataro 2003, Morgan 2004), dok se rjeđe spominju lezije smještene infratentorijski i u bazalnim ganglijima. Naši podaci upućuju na teži oblik cerebralne vaskulopatije u bolesnika s pSS. MRI mozga je osjetljivi instrument u otkrivanju hiperintenzivnih lezija mozga u bolesnika s pSS, što je sukladno dostupnim podacima iz literature (Delalande 2004, Soliotis 2004). Snižene vrijednosti PSL u naših bolesnika s pSS koji su imali

simptome učestale epizodične tenzijske glavobolje, u našem istraživanju negativno korelira s brojem i proširenosti periventrikularnih lezija mozga, a to bi moglo biti u skladu s tezom o povezanosti pojačanog oslobađanja serotonina i pada PSL s patofiziologijom oštećenja moždane tvari u specifičnim regijama mozga u bolesnika s pSS i učestalom epizodičkom tenzijskom glavoboljom (Šarac 2013). Iako je etiologija periventrikularnih lezija u pSS nepoznata, one bi mogle biti posljedica: vaskuitisa, tj. perivaskularna infiltracije oko arterija i vena (Leeds 1985, Mirfakhraee 1977), a infiltracijom kroz Virchow-Robinove prostore mogu nasttai i pravi subklinički infarkti (Herring 1969, Rosenbloom 1983, Kirkpatrick 1987). Periventrikularne lezije mogu biti i upalne prirode kada su vidljive u perivaskularnim prostorima. Pozitivna korelacija između hiperintenzivnih lezija mozga s dobi bolesnika i trajanjem bolesti i odsutnost povezanosti između lezija bijele tvari mozga i aktivnosti bolesti mjerene pomoću ESSDAI kao i svim analiziranim upalnim i imunološkim pokazateljima bolesti, suprotno od SLE i RA, može upućivati na odvojene značajke karakteristične za pSS nasuprot drugim upalnim reumatskim bolestima. Može također upućivati da bi se zbog promjenjivog karaktera bolesti tijekom vremena, bilo uputnije koristiti kumulativni indeks ESSDAI kako bi se bolje povezalo tijek bolesti s hiperintenzitetima bijele tvari mozga u bolesnika s pSS s ciljem boljeg razumijevanja patogeneze ovog sindroma i osiguralo bolje pokazatelje u procjeni distribucije i proširenosti hiperintenziteta mozga u bolesnika s pSS i njihovo optimalno liječenje (Šarac 2013). Prevalencija hiperintenziteta bijele tvari na MRI mozga se kreće od „nedetektabilnih“ do „čestih“ (Delalande 2004, Soliotis 2004). Dio podataka iz starije literature nije potvrđen novijim ispitivanjima, zbog mogućih različitosti uzorka bolesnika s pSS. Oštećenja moždanog tkiva u pSS posljedica je različitih patigenetskih čimbenika i mehanizama; izravna infiltracija SŽS mononuklearima oštećenje endotela krvnih žila, vaskulitis i stanjenje malih krvnih žila u prisutnosti antitijela i i posljednično ishemija (Alexander 1988, Bachine 1991).

Zahvaćenost PŽS je česta komplikacija u bolesnika s pSS. Raniji rezultati potvrđuju simptome i znakove periferne neuropatije kod 27% bolesnika s pSS temeljem samo kliničkog pregleda, a u 55% bolesnika iste grupe periferna neuropatija je objektivizirana elektromioneurografski (EMNG) (Gøransson 2006). Prema drugoj studiji periferna neuropatija je prethodila dijagnozi pSS samo u 5% slučajeva. Sedam je glavnih kliničkih prezentacija periferne neuropatije: senzorna ataksijska neuronopatija, trigeminalna neuropatija, bolna senzorna neuropatija bez senzorne ataksije, multipla mononeuropatija, multipla kranijska neuropatija, autonomna neuropatija i radikuloneuropatija (Mori 2005). U našoj studiji koja je obuhvatila 61

bolesnika s pSS, simptome periferne neuropatije imao je 31 bolesnik s pSS (51%), a koja je objektivizirana pomoću EMNG-a u samo 12 bolesnika (19,7% bolesnika s pSS). Najčešća klinička prezentacija periferne neuropatije u naših bolesnika s pSS bila fokalna demijelinizirajuća neuropatija n.medianus, izolirana ili udružena (66,7% svih neuropatija), slijedi bolna senzorna polineuropatija (25% svih neuropatija), i rjeđe miopatija 16,7%, čime su naši rezultati različiti od ranijih prema kojima je senzorna bolna neuropatija bez senzorne ataksije bila najčešća periferna neuropatija u bolesnika s pSS, a klinički se manifestira distalnim gubitkom osjeta boli i temperature, uz očuvane miotatske reflekse i uredan EMNG nalaz urednih senzornih amplituda i brzina provođenja (Chai 2005, Mori 2005, Lopate 2006, Chai 2005, utvrdili su da mnogi bolesnici imaju smanjenu gustoću epidermalnih vlakana u bioptatu kože; malih, tankih senzornih vlakana (*engl. small fibers neuropathy*), a ne tzv. «*dying back*» vlakana u senzornoj aksonopatiji povezanoj s dijabetičkom neuropatijom, a ovu neurološku komplikaciju utvrdili su u oko 80% bolesnika s neuropatijom vezanom uz pSS, dok su drugi autori utvrdili puno manju učestalost neuropatije malih, tankih vlakana (Gøransson 2006), a naknadnim ispitivanjima utvrđena je periferna neuropatija u oko 75% svih bolesnika s pSS, 45% s izoliranom neuropatijom malih, tankih vlakana, a samo u 4% bolesnika s pSS neuropatija je dijagnosticirana prije postavljanja dijagnoze pSS (Lopate 2006). Našim ispitivanjem nismo dokazali bilo kakvu povezanost periferne neuropatije u bolesnika s pSS s aktivnosti bolesti (ESSDAI), PSL, SS-A, SE i IgG.

Prema brojnim hipotezama, mnogobrojni su biološki mehanizmi uključeni u nastanak depresije i umora, simptoma kroničnog stresa. Brojni su dokazi o utjecaju recentnih stresnih događaja na nastanak depresije i suicidalnih ideja u nositelja S alela 5-HTTLPR (Caspi 2003). Brojni su i dokazi o povezanosti terapijskog odgovora na *SSRI* i polimorfizma 5-HTTLPR u bolesnika s depresijom (Lesch 2005). Istraživanja genetskih faktora u nastanku psihičkih bolesti dala su kontroverzne rezultate. Do danas su publicirani rezultati 17 studija koji su nastojali ispitati rezultate koje je objavio (Caspi 2003, Caspi 2006). U 15 velikih studija podupire se hipoteza G x E upućujući na povezanost „s“ alela s osjetljivošću na stresne događaje koje može rezultirati nastanku depresije i drugih psihičkih poremećaja. Ove studije dokazale su ulogu interakcije polimorfizama za 5-HTT i stresnih događaja u nastanku depresije i drugih psihičkih poremećaja, a nosioci „s“ alela na 5-HTTLPR, koji ima slabiju transkripcijsku aktivnost, su skloniji nastanku depresije nakon izloženosti stresnim događajima (Caspi 2003). Ipak, dvije velike studije dale su suprotne rezultate, prema kojima nije dokazana povezanost između depresije i simptoma stresnog događaja (Gillespie 2005, Surtees 1999). Općenito, rezultati interakcije G x E konzistentni su u

mladih odraslih ispitanika, a kontradiktorni u starijih ispitanika. Nije poznato niti pitanje dominanntog alela pojedinih genotipova. Dakle ne može se govoriti o jednodimenzionalnim simptomima vezanim samo za poremećaj neurotransmisije, nego su vjerojatnije posljedica teške neuro-imuno-endokrine disregulacije u kojoj interakcija G x E stvara preduvjete za njihov nastanak. Dokazani su brojni čimbenici okoliša koji predstavljaju rizik za nastanak depresije kao što su kumulativno, ponavljano ili produljeno izlaganje stresorima i kronične somatske bolesti (Caspi 2003, Gillespie 2005) koji su jači patogeni nego blaži akutni događaj. Pretpostavljamo da bi depresija i umor, kao česti simptomi u pSS i u svim upalnim reumatskim bolestima, mogli predstavljati komorbidne nespecifične simtpome povezane s upalom i genetskom podlogom.

Naši rezultati kojima smo potvrdili početnu hipotezu istraživanja da se polimorfizam 5-HTT, u ovom slučaju s/s genotip intronske regije 5-HTTin2VNTR povezuje s većom vjerojatnošću pojave simptoma depresije i umora u bolesnika s pSS, ali ne i zdravih kontrola (Šarac 2012) i u skladu su s ranijim podacima prema kojima postoje dokazi o zajedničkom međudjelovanju polimorfizama serotoninskog prijenosnika i čimbenika okoliša, uključujući stres i upalu (Božina 2006, Caspi 2003, Surtees 1999) na simptome depresije i umora. Kako su tjelesni simptomi i intenzitet upalne reakcije u pSS u većini slučajeva manje izraženi nego u ostalim upalnim reumatskim bolestima, dolaze u obzir drugi mehanizmi, osim mišićnoskeletne boli, koji bi mogli uzrokovati psihičke smetnje; depresiju i umor u bolesnika s pSS. Mehanizmi koji stoje iza ove povezanosti sistemske upale, depresije i umora bi mogli biti neuro-imuno-endokrini, gdje proupalni citokini imaju izravni učink na SŽS uključujući neraspoloženje i na imune stanice i poreduju između živčanog i imunog sustava (Anisman 2002, Kiecolt-Glaser 2002, Connor 1998). Neravnoteža citokina može skrenuti metabolizam triptofana prema kinureninu i tako smanjiti bioraspoloživost triptofana za sintezu 5-HT čime se snizuje njegova razina u SŽS i periferno u enterokromafinim stanicama. Isto vrijedi i obrnuto, manjak 5-HT može oslabiti proliferaciju i diferencijaciju limfocita i time dovesti do disbalansa citokina, tj. povećati omjer proupalnih IL-6 citokina u odnosu na protuupalne IL-10 citokine i potencirati imunu hiperaktivnost i upalnu reakciju. Depresivni, ali somatski zdravi bolesnici pokazuju porast koncentracije cirkulirajućih proupalnih čimbenika u stresu i izvan njega (Pace 2006).

Obzirom da je dokazana povezanost depresije i umora s sniženim vrijednostima PSL samo u bolesnika s pSS, ali ne i zdravih kontrola, najvjerojantije se radi o nespecifičnim simptomima kroničnog stresa, ali nije poznato da li su uzrok ili posljedica kronične upalne bolesti, a nastaju u sklopu neurohumoralne disregulacije u SŽS i periferiji posredovano mrežom zajedničkih signalnih

molekula; neurotransmitera, citokina i hormona. Izloženost životnim stresovima uz genetsku predispoziciju, povećava rizik za psihičke poremećaje, ali utječe i na stanice imunog sustava (Segerstrom 2004). Akutni stres dovodi do značajne aktivacije upalnih signalnih puteva u imunim stanicama (Bierhaus 2003), porasta cirkulirajućih upalnih čimbenika i koncentracije kateholamina (Steptoe 2007), promjene citokina, pojačanoj upali koja ima značajnu ulogu u patofiziologiji depresije (Raison 2006). Povezanost PSL s depresijom i umorom može biti rezultat činjenice da je pSS kronična upalna, onesposobljavajuća bolest i da su depresija i umor vrlo česti komorbiditeti u pSS, čak i u bolesnika koji su klinički stabilni. Može se zaključiti kako je sistemska upala povezana s umorom i depresijom vezanom uz upalu što je već dokazano u nekim drugim sistemskim upalnim bolestima (Barnes 2009). Stres potiče upalu i predisponira pojedinca za razvoj depresije, ipak, sklonost upali i nastanku depresije je strogo individualna. Kronični stres s dugotrajnim porastom glukokortikoida uzrokuje promjenu konfiguracije različitih receptora za neurotransmitore, spolne hormone, citokine na svim stanicama uključujući i imune stanice, što rezultira poremećajima proliferacije, diferencijacije i funkcije imunih stanica i do pojačanog oslobađanja proupalnih citokina. Upravo ova neravnoteža citokina može kod nositelja rizičnog genotipa «ss» ili alela „s“na genu za 5-HTT dodatno sniziti 5-HT u stanicama i pridonijeti nastanku autoimunih poremećaja kao što je i pSS i komorbidnih sindroma tipa depresije i umora. Bolesnici s pSS imaju kroničnu sporo progresivnu upalnu bolest koja u velikoj mjeri narušava kvalitetu njihovog života. Bolesnici s pSS nosioci ss genotipa na 5-HTTin2VNTR bi mogli predstavljati specifičan endofenotip koji pokazuje sklonost depresiji i umoru, vodećim simptomima kroničnog stresa. Također smo dokazali da nema izravnog ni pojedinačnog učinka polimorfizama gena za serotoninski transporter na PSL u zdravoj opulaciji, već samo u bolesnika s pSS, o čemu govore rezultati na zdravim ispitanicima nosiocima istog genotipa koji kod njih nije značajnije utjecao na sniženje PSL u odnosu na bolesnike s pSS. U našoj studiji izostao je izravni učinak oba osnovna polimorfizma 5-HTT na simptome depresije i umora u bolesnika s pSS, ali moguće je da postoje dodanti učinci u kombinaciji s drugim lokusima. Alternativna je pretpostavka kako bi ovi polimorfizmi mogli imati izravni učinak samo na specifične fenotipove depresije i umora. Drugo moguće objašnjenje je u interakciji geni-okoliš (G x E) kao posrednika genetskih učinaka 5-HTT, pri čemu se genetski učinak pojačava u prisutnosti čimbenika okoliša. Rezultati ovog istraživanja govore u prilog biopsihosocijalnog modela u pSS, prema kojem polimorfizam 5-HTTin2VNTR, uz čimbenike okoliša utječe na PSL i modificira rizik za nastanak depresije i umora u pSS. Ovi rezultati mogu pomoći u individualizaciji terapije depresije i umora u bolesnika s pSS, temeljenim na rezultatima farmakogenetike što je aktualno u fokusu interesa u liječenju depresije i umora,

simptoma kroničnog stresa. Rezultate ove studije vrijedilo bi potvrditi prospektivnim istraživanjem na većem uzorku ispitanika.

Daljnja istraživanja komorbidnih simptoma u kroničnim bolestima, kao što su depresija i umor neophodna su za bolje razumijevanje patogenetskih mehanizama multifaktorijelnih bolesti koje uključuju interakciju G x E, gdje geni u interakciji s čimbenicima okoliša zajednički pridonose oblikovanju fenotipova (Uher 2008).

Prednosti i ograničenja istraživanja

Prednost ovog istraživanja jest u činjenici da je u istraživanje uključena dovoljno velika, etnički homogena skupina bolesnika s pSS, te da su jednaki dijagnostički postupci i procjene primijenjeni kod svih bolesnika s pSS. Treba istaknuti i činjenicu da su na dovoljno velikom broju ispitanika određeni periferni biokemijski pokazatelji (koncentracija trombocitnog serotonina). Osim toga ispitivani su i brojni serumski pokazatelji uključujući akutne upalne pokazatelje i imunološke pokazatelje. Osobita prednost ovog ispitivanja je da smo ispitivali dva osnovna i dodatni recentno utvrđeni polimorfizam gena za serotoninski transporter 5-HTTLPR, rs25531 i 5-HTTin2VNTR i njihov utjecaj na koncentraciju trombocitnog serotonina i na depresivnost i umor u bolesnika s pSS. Osim navedenog, u prednost ovog istraživanja treba istaknuti i činjenicu da je kod svih bolesnika s pSS koji su imali simptome učestale epizodičke tenzijske glavobolje učinjen MRI mozga kako bi se utvrdila frekvencija hiperintenzivnih lezija mozga i usporedila sa zdravim kontrolama koji su imali samo simptome učestale epizodičke tenzijske glavobolje. Nadalje, u bolesnika s pSS koji su imali parestezije u ekstremitetima učinjen je EMNG kako bi se objektivizirale neuropatske promjene i njihova povezanost sa perifernim biokemijskim pokazateljima.

Ograničenja ovog istraživanja je dobna i spolna nehomogenost između skupina bolesnika s pSS i zdravih kontrola zbog ograničenog broja zdravih ispitanika dobrovoljnih darivatelja krvi na dan uzorkovanja krvi, ali rezultatima ranijih studija smatraju validnima obzirom da je u više ranijih istraživanja dokazano da ni spol niti dob značajnije ne utječu na vrijednosti trombocitnog serotonina u zdravih ispitanika. Isto tako ograničenje istraživanja je u tome što simptomi depresije i umora nisu ispitivani u našoj skupini zdravih kontrola, već su kao osnova korišteni raniji rezultati drugih studija na zdravim ispitanicima.

6 ZAKLJUČAK

1. Trombocitni serotonin (PSL) je značajno snižen i povezan s polimorfizmom 5-HTTin2VNTR u bolesnika s primarnim Sjogrenovim sindromom (pSS) u odnosu na zdrave ispitanike.

2. Genotip s/s na 5-HTTin2VNTR je čimbenik rizika za sniženje PSL u bolesnika sa pSS u odnosu na zdrave ispitanike.

3. Polimorfizmi 5-HTTLPR, rs25531 i 5-HTTin2VNTR ne utječu izravno na depresiju i umor u bolesnika sa pSS.

4. Sniženje PSL je značajno povezano s depresijom i umorom u pSS i može se koristiti kao biomarker ova dva najčešća komorbiditeta u bolesnika s pSS, ali nije sa ESSDAI niti SE, CRP, RF, hpt, GGB, SS-A, SS-B, ANA, C3 i C4.

5. Umor korelira s porastom C4 i haptoglobinom, a depresija s porastom C3, SE i GGB, što se može povezati sa skretanjem metabolizma triptofana prema kinureninu, umjesto serotoninu.

6. Polimorfizmi 5-HTTLPR i 5-HTTin2VNTR nisu povezani s aktivnosti bolesti (ESSDAI) niti sa subjektivnim bolesnikovim tegobama (ESSPRI).

7. ESSDAI je viši kod bolesnika s pSS mlađe dobi, a korelira sa ESSPRI, somatskim i mentalnim umorom prema VAS ljestvici.

8. ESSPRI je povezan sa ESSDAI, depresijom, umorom i objektiviziranom suhoćom sluznica.

9. Bolesnici sa pSS i učestalim epizodičkim tenzijskim glavoboljama imaju brojnije hiperintenzitete na MRI mozga infratentorijski i u bazalnim ganglijima, a broj periventrikularnih lezija je značajno povezan sa sniženjem PSL.

11. Polimorfizam 5-HTTin2VNTR, uz čimbenike okoliša utječe na PSL i modificira rizik za nastanak depresije i umora u bolesnika sa pSS. Ovi rezultati se mogu koristii u individualizaciji terapije depresije i umora u bolesnika s pSS, temeljenim na rezultatima farmakogenetike, što bi vrijedilo potvrditi prospektivnim istraživanjem na većem uzorku ispitanika.

7 SAŽETAK

Koncentracija trombocitnog serotonina (engl. platelet serotonin level, PSL) je snižena u svim, do sada ispitivanim upalnim reumatskim bolestima kao što su reumatoidni artritis (RA), sistemski lupus (SLE), sistemska skleroza (SSc) i miješana bolest vezivnog tkiva (MCTD). Polazeći od pretpostavke da je PSL snižena i u primarnom Sjogrenovom sindromu (pSS), cilj ove studije bio je odrediti PSL i istražiti polimorfizme gena za serotoninski transporter (5-HTT); 5-HTTLPR, rs25531 i 5-HTTin2VNTR, utvrditi međusobnu povezanost između PSL i 5-HTT polimorfizama i njihov mogući utjecaj na depresiju i umor u bolesnika s pSS. Poseban cilj bio je i ispitati učestalost hiperintenziteta bijele tvari mozga u bolesnika s pSS s učestalom epizodičkom tenzijskom glavoboljom i njihovu moguću povezanost s PSL.

Utvrdili smo jasnu razliku u PSL između bolesnika sa Sjogrenovim sindromom u odnosu na zdrave kontrole, pri čemu je PSL bila statistički značajno snižena u bolesnika s pSS. PSL je bio značajno niži u bolesnika s pSS nositelja s/s genotipa na intronu, 5-HTTin2VNTR u odnosu na kontole nositelje istog genotipa, što pruža snažne dokaze o ulozi interakcije geni x okoliš (G x E) u nastanku specifičnih fenotipova, gdje na gensku ekspresiju utječu vanjski čimbenici, pojačavajući njihovu aktivnost. PSL je značajno povezan s nastankom depresije i u mora u bolesnika s pSS, što upućuje na činjenicu da bi se PSL mogao koristiti kao važan biomarker depresije i umora u oboljelih od pSS. Ovi rezultati podupiru bipsihosocijalni model u pSS, pri čemu polimorfizmi gena za 5-HTT modificiraju rizik za nastanak depresije i umora u bolesnika s pSS. Dugoročno, PSl i polimorfizmi 5-HTT mogu se koristiti kao važni klinički parametri u individualizaciji terapije bolesnika s pSS sa simptomima depresije i umora. Ovim istraživanjem dokazali smo veću učestalost hiperintenziteta bijele tvari mozga u oboljelih of pSS koji imaju učestale epizodičke tenzijske glavobolje u odnosu na kontrole koji nemaju pSS, ali imaju isti tip glavobolja. Ovi podaci upućuju na opsežniju cerebralnu vaskulopatiju u grupi bolesnika sa Sjögrenovim sindromom, a MRI mozga je kao neuroradiološka metoda dovoljno osjetljiva u otkrivanju lezija bijele tvari mozga. Povezanost trombocitnog serotonina i periventrikularnih lezija u ovoj studiji je u skladu s hipotezom o međuzavisnosti pojačanog otpuštanja serotonina iz trombocita i patofiziologije oštećenja moždane tvari u bolesnika s pSS.

8 SUMMARY

Platelet serotonin level (PSL) is decreased in all examined inflammatory rheumatic disorders such as rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematodes (SLE), systemic sclerosis (SSc) and mixed connective tissue disorders (MCTD). The main goal of this study was to examine PSL main polymorphisms of serotonin transporter gene, 5-HTTLPR, rs25531 and 5-HTTin2VNTR to determine their potential association with depression and fatigue in patients with primary Sjögren's syndrome (pSS). Special goal in this study was to explore the frequency of signal hyperintensities (SH) of the brain in patients with primary Sjogren's syndrome who suffered frequent episodic tensio-type headache (FETTH) enough to sustain brain MRI, and association between SH and PSL.

Clear difference between pSS patients and healthy controls was found, with PSL values being significantly lower in patient groups. Decreased PSL in Sjogrens' group, not in control group, is strongly influenced by the „low expressing“genotype s/s 5-HTTin2VNTR, indicating the important role of interaction gene x environment (G x E) on disease fenotypes, whereas genetic effects are potentially facilitated by environmental factors. PSL has strongly influenced on depression and fatigue in Sjogrens' patients, which suggests that PSL could be used as biomarker of the depression and fatigue in these patients. These results support a biopsychosocial model od pSS in which 5-HTT genotypes modifies risk for depression and fatigue. Long term, practiotioners may individualize treatment of pSS patients with depression and fatigue by sing PSL and 5-HTT genotype as two valuable parameters. Furthermore, the current study demonstrated that signal hyperintensities (SH) on brain MRI are more common in specific region of the brain of Sjögren's patients with frequent episodic tension-type headache (FETTH) than in age-matched controls with FETTH, indicating more widespread cerebral vasculopathy in Sjögren's group. Brain MRI represents a sensitive screening tool for detection of SH in pSS patients with FETTH. Association between PSL and periventricular lesions in this study is in line with hypothesis of interrelation between increased platelet serotonin release and pathophysiology of brain tissue damage in specific region of the brain in pSS patient with FETTH.

LITERATURA

Acs Z. Stark E. Possible role of gamma-aminobutyric acid synthesis in the mechanism of dexamethasone feedback inhibiton. J Endocrinol 1978;77:137-141.

Ader R, Felten D & Cohen N. Interactions between the brain and the immune system. Ann Rev. Pharmacol. Toxicol 1990;30:561-602.

Al Attia HM, Dabbash AK, Khadim RA. Associated autoimmune disorders in patients with classic lupus erythematosus. J Clin Rheumatol 2005;11(1):63–4.

Al-shair K, Dockry R, Mallia-Milanes B, Kolsum U, Singh D, Vestbo J: Depression and its relationship with poor exercize capacity, BODE index and muscle wasting in COPD.

Alda M. Genetics factors and treatment of mood fidorsers. Bipolar Disord 2001;3:318-324.patients with first episode of psychosis. Psychiatry Res 2007;159:105-8.

Alexander N, Kueppper Y, Schmitz A, Osinsky R, Kozyra E, Hennig J. Gene-environment interactions predicts cortisol responses after acute stress: Implications for the etiology of depression. Psychoneuroendocrinology 2009;34:1294-1303.

Alexander EL, Ranzenbach MR, Kumar AJ, Kozachuk WE, Rosenbaum AE, Patronas N, etal. Anti Ro (SSA) autoantibodies in central nervous systemdisease associated with Sjögren's syndrome: clinical, neuroimaging, andangiographic correlates. Neurology 1994;44: 899-908.

Alexander EL, Beall SS, Gordon B, et al. Magnetic resonance imaging of cerebral lesions in patients with Sjögren's syndrome. Ann Intern Med 1988;108(6):815-823.

Alexander EL, Malinow K, Lejewski JE, et al. Primary Sjögren's syndrome with central nervous system disease mimicking multiple sclerosis. Ann Intern Med 1986;104(3):323-330.

Alexander EL, Arnett FC, Provost TT, Stevens MB. Sjogren'y syndrome: association of anti-Ro/SS-A antibodies with vasculitis, hematologic abnormalities, and serologic hyperactivity. Ann Intern Med 1983;98:155-9.

Alexander El, Provost TT, Stevens MB, Alexander GE. Neurologic complications of primary Sjögren's syndrome. Medicine (Baltimore) 19982;61(4):247-257.

Alexander GE, Provost TT, Stevens MB, Alexander El. Sjögren syndrome: central nervous system manifestations. Neurology 1981;31(11):1391-1396.

Alvarez JC, Cremniter D, Lesieur P, Gregoire A, Gilton A, Macquin-Mavier. Low blood cholesterol and low platelet serotonin levels in violent suicide attempts. Biol Psychiatry 1999;45:1066-9.

Amft N, Bowman SJ. Chemokines and cell trafficking in Sjögren's syndrome. Scand J Immunol 2001;54(1–2):62–9.

Anchordoquy HC, McGreary C, Liping L, Krauter KS., Smolen A. Genotyping of three candidate genes after whole-genome preamplification of DNA collected from buccal cells. Behav. Genet. 2003;33:73–78.

Andersson SI, Manthorpe R, Theander E. Situational patterns in coping with primary Sjögren's syndrome. Psychol Health Med 2001;6(1):29–40.

Anisman H, Hayley S, Turrin N, Merali Z: Cytokines as a stresor: implications for depresive illness. Int J Neuropsychopharmacol 2002;5(4):357-73.

Armengol MP, Juan M, Lucas-Martin A, et al. Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. Am J Pathol 2001;159(3):861–73.

BachineS, DuyckaertsC, HassineL, ChaunuMP, TurellE, WechslerB, etal. Central and peripheral neurologic lesions in primary Gougerot-Sjögren syndrome. Clinicopathological study of a case. Rev Neurol 1991;147:368-375.

Baechler EC, BAtliwalla FM, Reed AM, et al. Gene expression profiling in human autoimmunity. Immunol Rev 2006;210:120-37.

Balija M. Serotoninski sustav u trombocitima zdravih ljudi. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2003.

Balija M, Bordukalo-Niksic T, Mokrovic G, Banovic M, Cicin-Sain L, Jernej B. Serotonin level and serotonin uptake in human platelets: a variable interrelation under marked physiological influences. Clin Chim Acta. 2011 Jan 30;412(3-4):299-304.

Bamberger C, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular Determinants of Glucocorticoid Receptor Function and Tissue Sensitivity to Glucocorticoid. Endocrine Reviews June 1996; 17(3):245-261.

Barendregt PJ, Visser MR, Smets EM, et al. Fatigue in primary Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 1998;57:291–5.

Barreto M , Santos E, Ferreira R, et al. Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. Eur J Hum Genet 2004;12(8):620-6.

Barone F, Bombardieri M, Manzo A, et al. Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2005;52(6):1773–84.

Barendregt PJ, Visser MR, Smets EM, et al. Fatigue in primary Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 1998;57:291–5.

Barker EL, Blakely RD. Identification of a single amino acid, phenylalanine 586, that is responsible for high affinity interactions of trycyclic antidepressants with the human serotonin transporter. Mol. Pharmacol 1996;50:957-965.

Barry RJ, Sutcliffe N, Isenberg DA, et al. The Sjogren's syndrome Damage Index (SSDI)-a damge index foru se in clinical trials and observational studies in primary Sjogren's syndrome. Rheumatology 2008;47(8)-1193-8.

Bates DW, Schmitt W, Buchwald D, et al. Prevalence of fatigue and chronic fatigue syndrome in a primary care practice. Arch Intern Med 1993;153(24): 2759–65.

Barendregt PJ, Visser MRm, Smets EMA, Tulen JHM, van den Meiracker AH, Boomsma F, Markusse HM. Fatigue in primary Sjögren's syndrome. Annals of the Rheumatic Diseases 1998;57:291-5.

Bax HI, Vriesendorp TM, Kallenberg CGM, et al. Fatigue and immune activity in Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2002;61:284.

Bave U, Nordmark G, Lovgren T, Ronnelid J, Cajander S, Eloranta ML, Alm GV, Ronnblom L. Activation of the type 1 interferon system in primary Sjögren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. Arthritis Rheum 2005;52:1185-95.

Beck AT, Steer RA and Brown GK. „Manual for the Beck Depression Inventory-II". San Antonio, TX: the Psychological Corporation 1996

Benedetti F, Serretti A, Colombo C, Campori E, Barbini B, di BBella S, Smeraldi E. Influence of a functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene on the effects of total sleep deprivation in bipolar depression. Am J Psychiatry 1998;156:1450-1452.

Bjerrum K, Prause JU. Primary Sjögren's syndrome: a subjective description of the disease. Clin Exp Rheumatol 1990;8:283–8.

Betancur C, Corbex M, Spielewoy C, Philippe A, Laplanche J-L, Launay JM, Gillberg C, Mouren-Simeoni MC, Hamon M, Giros B, Nosten-Bertrand M, Leboyer M and the Paris Autism Research International Sibpair (PARIS) Study. Serotonin transporter gene polymorphisms and hyperserotonemia in autistic disorder. Molecular Psychiatry 2002;7(1):67-71.

Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, Ferstl R, von Eynatten M, Wendt T, Rudofsky G, Joswig M, Morcos M, Schwaninger M, McEwen B, Kirschbaum C, Nawroth PP. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Americ 2003;100:1920-1925.

Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. Eur Respir J 2009;33(5):1165-85.

Bave U, Nordmark G, Lovgren T, et al. Activation of the type 1 interferon system in primary Sjögren's syndrome: a posible etipathogenic mechanism. Arthritis Rheum 2005;52(4):1185-95.

Beck AT, Steer RA and Brown GK. «Manual for the Beck Depression Inventory-II». San Antonio, TX: Psychological Corporation, 1996.

Ben-Chetrit E, Chan EK, Suzllivan KF, et al. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. J Exp Med 19898;167(5):1560-71.

Berczi I. Immunology of prolactin. Semin Reprod Endocrinol 1992;10:196.

Beroukas D, Goodfellow R, Hiscock J, Jonsson R, Gordon TP, Waterman SA. Up-regulation of M3-muscarinic receptor sin labial salivary gland acini in primary Sjögren's syndrome. Lab Invest 2002;82:203-210.

Besana C, Salmaggi C, Pellegrino C, et al. Chronic bilateral dacro-adenitis in identical twins: a possible incomplete form of Sjögren's syndrome. Eur J Pediatr 1991;150(9):652-5.

Bet PM, Penninx BWJH, Bochdanovits Z, Uitterlinden AG, Beekman ATF, van Schoor

NM, Deeg DJH, Hoogendijk WJG. Glucocorticoid Receptor GenePolymorphisms and Childhood Adversity Are Associated With Depression: New Evidence for a Gene–Environment Interaction. Am J Med Genet 2009; Part B 150B:660–669.

Biočina-Lukenda D, Cekić-Arambasin A, Markeljević J, Buković D. Serum immunoglobulins IgG, IgA and IgM in patients with oral lichen ruber. Coll Antropl 2008;32(1):161-3.

Blakely RD, DeFelice LJ, Hartzell CH. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. J Exp Biol 1994;196:263-281.

Bloch KJ, Buchanan WW, Wohl MJ, et al. Sjo¨gren's syndrome, a clinical, pathological and serological study of sixty-two cases. Medicine 1965;44:187–231.

Blomhoff A A, Kemp EH, Gawkrodger DJ, et al. CTLA4 polymorphisms are associated with vitiligo, in patients with concomitant autoimmune diseases. Pigment Cell Res 2005;18(1):55-8.

Bockaert J, Claeysen S, Compan V, Dumuis A. 5-HT4 receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2004;3:39-51.

Bodeutsch C, de Wilde PC, Kater L, et al. Quantitative immunohistologic criteria are superior to the lymphocytic focus score criterion for the diagnosis of Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 1992;35(9):1075–87.

Boling EP, Wen J, Revielle JD, et al. Primary Sjögren's syndrome and autoimmune hemolytic anemia in sisters. A family study. Am J Med 1983;74(6):1066-71.

Bolstad AI, Jonsson R.Genetic aspects of Sjogren's syndrome. Arthritis Res 2002;4(6):353-9.

Bombardieri M, Barone F, Pittoni V, Alessandri C, Conigliaro P, Blades MC, Priori R, McInnes IB, Valesini G, Pitzalis C. Increased circulating levels and salivarygland expression of interleukin-18 in patients with Sjögren's syndrome:relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate. Arthritis Res Ther 2004;6:R447-56.

Bonvicini C, Minelli A, Scasselati C, Bortolomasi M, Segala M, Sartori R, Giacopuzzi M, Gennarelli M. Serotonin transporter gene polymorphisms and treatment-resistant depression. Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry 2010;34:934-939.

Bottini N, Musumeci L, Alonso A, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes. Nat Genet 2004;36(4):337-8.

Bowman SJ. Patient-reported outcomes including fatigue in primary Sjogren's syndrome. Rheum Dis Clin North Am 2008;34:949-62.

Bowman SJ, Sutcliffe N, Isenberg DA, et al. Sjögren's Systemic Clinical Activity Index (SCAI): a systemic disease activity measure for use in clinical trials in primary Sjögren's syndrome. Rheumatology 2007;46(12):1845–51.

Bowman SJ, Booth DA, Platts RG, UK Sjögren's Interest Group. Measurement of fatigue and discomfort in primary Sjögren's syndrome using a new questionnaire tool. Rheumatology 2004;43:758–64.

Bowman SJ, Booth DA, Platts RG, UK Sjögren's Interest Group. Measurement of fatigue and discomfort in primary Sjögren's syndrome using a new questionnaire tool. Rheumatology 2004a;43:758–64.

Bowman SJ, Booth DA, Platts RG, et al. UK Sjögren's Interest Group. Validation of the Sicca Symptoms Inventory (SSI) for clinical studies of Sjögren's syndrome. J Rheumatol 2003;30:1259–66.

Bowman S, Pillemer S, Jonsson R, et al. Revisiting Sjögren's syndrome in the new millennium: perspectives on assessment and outcome measures. Report of a workshop held on 23 March 2000 at Oxford, UK. Rheumatology 2001;40: 1180–8.

Bozina N, Jovanovic N, Podlesek A, Rojnic Kuzman M, Kudumija Slijepcevic M, Roguljic A, Dimitrovic A, Bozina T, Lovric J, Ljubic H, Medved V. Suicide ideators and attempters with schizophrenia – The role of 5-HTTLPR, rs25531, and 5-HTT VNTR Intron 2 variants. J Psychiatr Res xxx (2012) 1-7. In press.

Bozina N, Peles AM, Sagud M, Bilusic H, Jakovljevic. Association study of paroxetine therapeutic response with SERT gene polymorphisms in patients with major depressive disorder. World J Biol Psychiatry 2008;9(3):190-7.

Bozina N, Mihaljevic-Peles A, Sagud M, Jakovljević M, Sertic J. Serotonin transporter polymorphism in Croatian patients with major depressive disorder. Psychiatr Danub 2006;18(1-2):83-9.

Bozina N, Medved V, Kuzman MR, Sain I, Sertic J. Association study of olanzapine-induced weight gain and therapeutic response with SERT gene polymorphisms in female schizophrenic patients. J Psychopharmacol. 2007;21(7):728-34.

Brass LF. Thrombin and platelet activation. Chest, 2003;124:18S-25S.

Braunig P, Rao ML, Fimmers R. Blood serotonin levels in suicidal schizophrenic patients. Acta Scand 1989;79:186-9.

Brayer JB, Cha S, Nagashima H, et al. IL-4-dependent effector phase in autoimmune exocrinopathy as defined by the NOD.IL-4-gene knockout mouse model of Sjögren's syndrome. Scand J Immunol 2001;54(1-2):133–40.

Calabrese LH, Davis ME, Wilke WS: Chronic fatigue syndrome and a disorder resembling Sjogren's syndrome. Preliminary report. Clin Infect Dis 1994:18(Suppl):S28.

Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. Eur J Pharmacol, 2003;463:235-272.

Carlsten H, Nillson N, Jonsson R, Backman K, Holmdahl R, Tarkowski A: Estrogen accelerates immune complex glomerulonephritis but ameliorates T cell-mediated vasculitis and sialoadenitis in autoimmune MRL lpr/lpr mice. Cell Immunol 1992;144:190-202.

Casciola-Rosen L, Nagaraju K, Plotz P, Wang K, Levine S, GAbrielson E, Corse A, Rosen A. Enhanced autoantigens expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy. J Exp Med 2005;201:591-601.

Cash JM, Crofford LJ, Gallucci WT, et al. Pituitary-adrenal axis responsiveness to ovine CRH in patients with rheumatoid arthritis treated with low-dose prednisone. J Rheumatol 1992;19:1692.

Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwate A, Pulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science 2003;301:386-389.

Caspi a, Moffitt TE. Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. Nat Rev Neurosci 2006;7:583-590.

Chalder T, Berelowitz G, Pawlikowska T et al. Development of a fatigue scale. J Psychosom Res 1993;37:147–53.

Chai J, Herrmann DN, Stanton M, et al. Painful small-fiber neuropathy in Sjögren's syndrome. Neurology 2005;65(6):925-927.

Chambers SA, Charman SC, Rahman A, et al. Development of additional autoimmune diseases in a multiethnic cohort of patients with systemic lupus erythematosus with reference to damage and mortality. Ann Rheum Dis 2007;66(9):1173–7.

Charney D. Monoamine dysfunction and the patophysiology and treatment of depression. J Clin Psychiatry 1998;59 Suppl 14:11-4.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. N Engl J Med 2006;354(6):610–21.

Chatenoud L, Bluestone JA. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. Nat Rev Immunol 2007;7(8):622–32.

Chatenoud L. Immune therapies of autoimmune diseases: are we approaching a real cure? Curr Opin Immunol 2006;18(6):710–7.

Chen K, Wu HF, Shih JC. The deduced aminoacid sequences og human platelet and frontal cortex monoamine oxidase B are identical. J Neurochem 1993;61:187-190.

Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. N Engl J Med 1995;332:1351-1362.

Chung SH, Polgar J & Reed GL. Protein-kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets. J Biol Chem, 2000;2275:25286-25291.

Chused TM, Kassan SS, Opelz G, et al. Sjögren's syndrome association with HLA-Dw3. N Engl J Med 1977;296(16):895-7.

Cikes N, Bosnic D, Sentic M. Non-MS autoimmune demyelination.Clin Neurol Neurosurg. 2008;110:905-12.

Clemetson KJ, Clemetson JM. Plateletreceptors. In Michelson AD (Eds), Platelets, 2nd Edition, 2007; (pp.117-143). New York: Elsevier.

de Clerk F, Xhonneux B, Leysen J, Janssen PAJ. Evidence for functional 5-HT-2A receptor sites on human blood platelets. Biochem Pharm 1984;33:2807-2811.

Cobb et al. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. Nature 1999;401(6756):921-3.

Cohen RA, Zitnay Km & Weisbrod RM. Accumulation of 5-hydroxytryptamine leads to dysfunction of adrenergic nerves in canine artery following intimal damage in vivo. Circ. Res. 1987;61:829-833.

Colman RW, et al. In: Colman RW, et al, eds. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Philadelphia J.D. Lippincott Co., 1994:3.

Comings DE, Gade R, Muhleman D, Chiu C, Wu S, To M, Spence M, Dietz G, Winn-Deen E, Rosenthal R, Lesieur HR, Rugle L, Sverd J, Ferry L, Johnson JP, MacMurray JP. Exon and intron variants in the human tryptophan 2,3-dioxygenase gene: potential association with Tourette syndrome, substance abuse and other disorders. Pharmacogenetics 1996;6(4):307-319.

Cook EH, Fletcher KE, Wainwright M, Marks N, Yan S, Leventhal BL. Primary strucutre of the humkan platelet serotonin 5-HT-2A receptor. Identity with frontal cortex serotonin 5-HT-2A receptor. J Neurochem 1994;63:465-469.

Connor TJ, Leonard BE. Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders. Life Sci 1998;62(7):583-806.

Costal B, Naylor RJ. 5-HT3 receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2004;3:27-37.

Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, et al. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple.

Crofford LJ, Pillemer SR, Kalogeras KT, Cash JM, Michelson D, Kling MA, Sternberg EM, Gold PW, Chrousos GP, Wilder RL. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis perturbations in patients with fibromyalgia. Arthritis Rheum 1994;37:15983-1592.

Curtis JR, Xi J, Patkar N, et al. Drug-specific and time-dependent risks of bacterial infection among patients with rheumatoid arthritis who were exposed to tumor necrosis factor alpha antagonists. Arthritis Rheum 2007;56(12):4226–7.

Dafni UG, Tzioufas AG, Staikos P, et al.Astimation of the prevalence of primary Sjogren's syndrome in two age-different community-based populations using two sets of classification criteria: the Hordaland Health Study.Scand J Rheumatol 2008;37(1):30-4.

Daniels TE, Fox PC. Salivary and oral components of Sjögren's syndrome. Rheum Dis Clin North Am 1992;18:571-89.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat Rev Neurosci 2008;9:46-56.

Daridon C, Devauchelle V, Hutin P, Le Berre R, Martins-Carvalho C, Bendaoud B, Dueymes M, Saraux A, Youinou P, Pers JO. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2007;54:2289-94.

Davies NW, Guillemin G, Brew BJ. Tryptophan, Neurodegeneration and HIV-Associated Neurocognitive Disorder. Int J Tryptophan Res. 2010;3:121-40.

Davis J, Alderson M, Nathan L, Welsh NL, Ralp S. Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations. Am J Clin Nutr 2000;72:573S-578.

Dawson LJ, Fox PC, Smith PM. Sjogren's syndrome-the non-apoptotic model of glandular hypofunctin. Rheumatology (Oxford) 2006;45(7):792-8.

Dawson LJ, Stanbury J, Venn N, et al. Antimuscarinic antibodies in primary Sjögren's syndrome reversibly inhibit the mechanism of fluid secretion by human submandibular salivary acinar cells. Arthritis Rheum 2006;54(4):1165–73.

Dawson LJ, Allison HE, Stanbury J, Fitzgerald D, Smith PM. Putative anti-muscarinic antibodies cannot be detected in patients with primary Sjogren's syndrome using conventional immunological approaches. Rheumatology (oxford) 2004;43:1488-1495.

Deakin JF. The role of serotonin in panic, anxiety and depression. Int Clin Psychopharmacol. 1998;13(Suppl 14):1-5.

De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. Endocr Rev 1998;19:269-301.

Delalande D, de Seze J, Fauchais AL, Hachulla E, Stojkovic T, Ferrib D, et al. Neurologic manifestations in primary Sjögren syndrome: A study of 82 patients. Medicine 2004;83(5):280-291.

Delaleu N, Immervoll H, Cornelius J, et al. Biomarker profiles in serum and saliva of experimental Sjögren's syndrome: associations with specific autoimmune manifestations. Arthritis Res Ther 2008a;10(1):R22.

Delaleu N, Madureira AC, Immervoll H, et al. Inhibition of experimental Sjögren's syndrome through immunization with HSP60 and its peptide amino acids. Arthritis Rheum 2008b;58(8):2318-28.

Delaleu N, Jonsson R, Koller MM. Sjogren's syndrome. Eur J Oral Sci 2005;113(2):101-13.

Delalande S, de Seze J, Fauchais AL, et al. Neurologic manifestations in primary Sjögren syndrome: a study of 82 patients, Medicine (Baltimore) 2004;83(5):280-291.

Denney RM, Denney CB. An update on the identity crisis of monoamine oxidase: New and old evidence for the independence of MAO A and B. Pharmacol Ther 1985;30:227-258.

DeRijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, de Kloet ER, Emery P, Sternberg EM, Detera-Wadleigh SD. 2001. A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 28(11):2383–2388.

DeRijk, R.H., Schaaf, M. and de Kloet, E.R. Glucocorticoid receptor variants: clinical implications, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2002;81:103–122.

Deshmukh US, Nandula SR, Thimmalapura PR, et al. Activation of innate immune response through Toll-like receptor 3 causes a rapid loss of salivary gland function. J Oral Pathol Med 2009;38:42-47.

Devauchelle-Pensec V, Pennec Y, Morvan J, et al. Improvement of Sjögren's syndrome after two infusions of rituximab (anti-CD-20). Arthritis Rheum 2007;57(2):310-7.

DeVries E, Schipperijn A, Breedveld F. Antinuclear antobodies in psychiatric patients. Acta Psychiatrica Scand 1994:14:57-62.

Di Comite G, Grazia Sabbadini M, Corti A, Rovere-Querini P, Manfredi AA: Converation galante:how the immune and the neuroendocrine systems talk to each other. Autoimmun Rev 2007;7:23-29.

Dinan T. Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model. Br J Psychiatry 1994;164:365-71.

Drosos A, Angelopoulos N, Liakos A, Maoutsopoulos H. Personality structure disturbances and psychiatric manifestations in Primary Sjogren's syndrome. J Rheumatology 1989;2:489-493.

Drosos AA, Van Vliet-Dascalopoulou E, Andonopoulos AP, et al: Nandrolone decanoate (deca-durabolin) in primary Sjogren's syndrome: A double-blind pilot study. Clin Exp Rheumatol 1988;6:53.

Dyck PJ. The clinical heterogeneity of immune sensory and autonomic neuropathies with (or without) sicca. Brain 2005;128(pt 11):24480:2482.

Esch T. Pathogenetic factors in Sjögren's syndrome: recent developments. Crit Rev Oral Biol Med 2001;12:244-251.

Espinosa A, Zhou W, Ek M, et al. The Sjögren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death. J Immunol 2006;176(10):6277–5.

Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. Nat Rev Immunol 2002;2(5):364–71.

Field EA, Rostron JL, Longman LP, et al. The development and initial validation of the Liverpool Sicca index to assess symptoms and dysfunction in patients with primary Sjögren's syndrome. J Oral Pathol Med 2003;32:154–62.

Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. Arterioscler, Thromb Vasc Biol, 2003;23:1152-1160.

Fox RP. Head and neck findings in systemic lupus erythematosus: Sjögren's syndrome and the eye, ear, and larynx. Philadelphia: Lipincott, Williams; Wilkins; 2008.

Fox PC, Speight PM. Current concepts of autoimmune exocrinopathy:immunologic mechanisms in the salivary pathology of Sjögren's syndrome.Crit Rev Oral Biol Med 1996;7:144-58.

Fox PC, Busch KA, Baum BJ. Subjective reports of xerostomia and objective measures of salivary gland performance. J Am Dent Assoc 1987;115:581–4.

Fox RI, Kang HI, Ando D, et al. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. J Immunol 1994;152(11):5532–9.

Fredericks CA, Drabant EM, Edge MD, Tillie JM, Hallmayer J, Ramel W, Kuo JK, Mackey S, Gross JJ, Dhabhar FS. Healthy young women with serotonin transporter SS polymorphism show a pro-inflamatory bias under resting and stress conditions. Brain, Behaviour, and Immunity 2010;24:350-357.

Franke L, Scheve HJ, Műller B, Campman V, Kitzrow W, Uebelhack R et all. Serotonergic platelet variables in unmedicated patients sufferibng from major depression and healthy subjects: relationship between 5HT content and 5HT uptake. Life Sci. 2000;67:301-5.

Franke L, Scheve HJ, Uebelhack R, Műller-Oerlinghausen B. High platelet-serotonin uptake activity is associated with rapid response in depressed patients treated with amytryptyline. Neurosci Lett. 2003;345:105-8.

Fuller RW. Serotonin receptors and neuroendocrine responses. Neuropsychopharmacology 1990;3-495-502.

Funder JW. Adrenocorticoid receptor sin the brain. In: Ganong WF, Martini L, editors. Frontiers in: Neuroendocrinology. New York: Raven Press 1986;169-189.

Fye KH, Terasaki PI, Michalski JP, et al. Relationshipp of HLA-Dw3 and HLA-B8 to Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 1978;21(3):337-42.Garcia-Carrasco M, Ramos Casals M, Rasas J, et al. Primary Sjo¨gren's syndrome: clinical and immunologic disease patterns in a cohort of 400 patients. Medicine (Baltimore) 2002;81(4):270–80.

Gaddum JH, Picarelli ZP, Two kinds of tryptamine receptors. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy 1957;12(3): 323–328.

Gao J, Killedar S, Cornelius JG, et al. Sjögren's syndrome in the NOD mouse model is an interleukin-4 time-dependent, antibody isotype-specific autoimmune disease. J Autoimmun 2006;26(2):90–103.

Gelenter J, Cubells JF, Kidd JR, Pakstis AJ, Kidd KK. Population studies of polymorphisms of the serotonin transporter protein gene. Am J Med Genet 1999;88:61-66.

Gereda JE, Leung Dym, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD, et al. Relationship between house dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. Lancet 2000;355:1680-1683

Gillespie NA, Whitfield JB, Williams B, Heath AC, Martin NG. The relationship between stressful life events, the serotonin transporter (5HTTLPR) genotpye and major depression. Psychol Med 2005;35:101-111.

Ginsberg MH, O'Nalley M: Serum factors releasing serotonin from normal platelets. Ann Intern Med 1977;87:564-567.

Giordano R, Marzotti S, Berardelli R, Karamouzis I, Brozzetti A, D'Angelo V, Mengozzi G, Mandrile G, Giachino D, Migliaretti G, Bini V, Falorni A, Ghigo E, Arvat E. *BClI* polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with increased obesity, impaired glucose metabolism and dyslipidaemia in patients with Addison's disease. Clinical Endocrinology 2012; 77:863-870.

Gold P, Goodwin FK, Chrousos GP. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress. N Engl J Med 1988;319:384-53.

Goeb V, Salle V, Duhaut P, Jouen F, Smail A, Ducroix JP, Tron F, Le Loet X, Vittecoq O. Clinical significance of autoantibodies recognizing Sjögren's syndrome A (SSA), SSB, calpastatin and alpha-fodrin in primary Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol 2007;148(2):281-287.

Gold P, Goodwin FK, Chrousos GP. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress. N Engl J Med 1988;319:413-20.

Gökcay F, Celebisoy N, Gökcay A, et al. Primary Sjögren's syndrome presenting as neuromyelitis optica. Pediatr Neurol 2007;36(1):58-60.

Goodchild CE, Treharne GJ, Booth DA, kitas GD and Bowman SJ. Measuring fatigue among women with Sjogren's syndrome or rheumatoid arthritis: a comparison of the Profile of Fatigue (ProF) and the Multidimensional Fatigue Inventory (MFI). Musculoskelet. Care 2008;6(1):31-38.

Gøransson LG, Herigstad A, Tjensvoli AB, et al. Peripheral neuropathy in primary Sjögren's syndrome: a population-based study. Arch Neurol 2006;63(11):1612-1615.).

Gota C, Calabrese L. Induction of clinical autoimmune disease by therapeutic interferon-alpha. Autoimmunity 2003; 36:511-8.

Gottenberg JE, Pallier C, Ittah M, et al. Failure to confirm coxackievirus infection in primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2006;54(6):2026-8.

Gottenberg JE, Busson M, Loiseau P, et al. Association of transforming growth factor beta 1 and tumor necrosis factor alpha polymorphisms with anti-La/SS-B antibody secretionin patients with primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2001;44(1):176-9.

Goveas JS, Csermansky JG, Coccaro EF. Platelet serotonin content correlates inversely with the life history of aggression in personality-disorderes subjects. Psychiatry Res 2004;126:23-32.

Grant IA, Hunder GG, Homburger HA, Dyck PJ. Peripheral neuropathy associated with sicca complex. Neurology 1997;48(4):855-862.

Greenberg BD, Tolliver TJ, Huang SJ, Li Q, Bengel D, Murphy DL:Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets. Am J Med Genet 1999;8:83-87

Griep EN, Boersma JW, de Kloet ER. Altered reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the primary fibromyalgia syndrome. J Rheumatol 1993;20:469.

Griffin JW, Cornblath DR, Alexander E, et al. Ataxic sensory neuropathy and dorsal root ganglionitis associated with Sjögren's syndrome. Ann Neurol 1990;27(3):304-315.

Gudbjörnsson B, Skogseid B, Öberg K, Wide L, Hällgren R. Intact adrenocorticotropic hormone secretion but impaired cortisol response in patients with active rheumatoid arthritis. Effect of glucocorticoids. J Rheumatol 1996;23:596-602.

Gudbjörnsson B, Broman H, Hetta J, Hällgren R. Sleep disturbance in patients with primary Sjögren's syndrome. Br J Rheumatol 1993;32:1072-1076.

Guggenbuhl P, Jean S, Jego P, et al. Primary Sjögren's syndrome: role of the HLA-DRB1*0301-*1501 heterozygotes. J Rheumatol 1998;25(5):900-5.

Guicheney P. Human platelet serotonin content: methodological aspects and physiological variations. Meth Experim Clin Pharmac. 1998;10:253-258.

Gutierezz MA, garcia ME, Rodriguez JA, Mardonez G, Jacobelli S, Rivero S. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and prolactin secretion in systemic lupus erythematosus. Lupus 1998;7:404-408.

Gutierezz MA, garcia ME, Rodriguez JA, Mardonez G, Jacobelli S, Rivero S. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with active rheumatoid arthritis: a controlled study using insulin hypoglycemia stress and prolactin stimulation. J Rheumatol 1999;26:277-281.

Haddad J, Deny P, Munz-Gotheil C, et al. Lymphocytic sialoadenitis of Sjogren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. Lancet 1992;339(8789):321-3.

Hagen NA, Stevens JC, Michet CJ Jr. Trigeminal sensory neuropathy associated with connective tissue diseases. Neurology 1990;40(6):891-896.

Halse AK, Herlenius MW and Jonsson R. Ro/SS-A i La/SS-B- reactive B lymphocytes in peripheral blood of patients with Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol 1999:115(1):208-213.

Hamon M, Bourgoin S, et Mestikawy S, Goetz C. Central serotonin receptors. Oxford: Blackwell Science. pp. 1982;107-143.

Hanna GL; Himle JA, Curtis GC, Koram DQ, Veenstra-Vander Weele J, Leventhal BL, Cook EH. Serotonin transporter and seasonal variation in blood serotonin in families with obsessive-compulsive disorder. Neuropsychopharmacology 1998;18:102-111.

Harangi M, Kaminski WE, Fleck M, et al. Homozygosity for the 168His variant of the minor histocompatibility antigen HA-1 is associated with reduced risk of primary Sjögren's syndrome. Eur J immunol 2005;35(1):305-17.

Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A, Kolachana B, Fera F, Goldman D, et al: Serotonin transporter genetic variation and the response of the humanamygdala. Science 2002;297:400-403.

Haugen AJ, Peen E, Hulten B, et al. Estimation of the prevalence of primary Sjögren's syndrome in two age-different community-based populations using two sets of classification criteria:the Hordaland Health Study. Scand J Rheumatol 2008;37(1):30-4.

Hay EM, Thomas E, Pal B, et al. Weak association between subjective symptoms of and objective testing for dry eyes and dry mouth: results from a population based study. Ann Rheum Dis 1998;57:20–4.

Hartkamp A, Geenen R, Bijl M, et al. Serum cytokine levels related to multiple dimensions of fatigue in patients with primary Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2004;63:1335–7.

Hartkamp A, Greenen R, Goadert GL, Bootsma H, Kruize AA, Bijlsma JW, Derksen RH. Effect of dehydroepiandrosterone administration on fatigue, well-being, anf functioning in women with primary Sjögren's syndrome: a randomised controlled trial. Ann Rheum Dis 2008;67:91-97.

Hayakawa I, Tedder TF, Zhuang Y. B-lymphocyte depletion ameliorates Sjögren's syndrome in Id3 knockout mice. Immunology 2007;122(1):73-9. Headache Classification Subcommittee of the International HeadacheSociety. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. Cephalalgia 2004;24(Suppl 1):9-160.

Heils A, Jones DW, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, et al. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. J Neurochem 1996;66:2621-2624.

Heinz A,Jones DW,Mazzanti C,Goldman D,Ragan P,Hommer D, et al: A relationship between serotonin transporter genotype and in vivo protein expression and alcohol neurotoxicity. Biol Psychiatry 2000;47:643-649.

Heinz A, Jones DW, Mazzanti C, Goldman D, Ragan P, Hommer D, Linnoila M, Weinberger DR. A relationship between serotonin transporter genotype and in vivo protein expression and alcohol neurotoxicity. Biol Psychiatry 1999;47:643-649.

Heisler LK, Pronchuk N, NonogakiK, Zhou L, Raber J, Tung L, Yeo HGH, O'Rahilly S, Colmers WF, Elmquist JK and Tecott LH. Serotonin Activates the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis via Serotonin 2C Receptor Stimulation. The Journal of Neuroscience 2007;27(26):6956-6964.

Henigsberg N, Bajs M, Hrabac P, Kalember P, Rados M, Rados M, Radonic E. Changes in brain metabolites measured with magnetic resonance spectroscopy in antidepressant responders with comorbid major depression and postraumtic stress disorder. Coll Antropl 2011;35:1:145-8.

Henigsberg N, Mahableshwarkar AR, Jacobsen P, Chen Y, Thase ME. J Clin Psychiatry 2012;73(7):953-9.

Hensler JG. Regulation of 5-HT1A receptor function in brain following agonst or antidepressant administration. Life Sci 2003;72:1665-1682.

Henson BS, Inglehart MR, Eisbruch A, et al. Preserved salivary output and xerostomia-related quality of life in head and neck cancer patients receiving parotidsparing radiotherapy. Oral Oncol 2001;37:84–93.

Henson P, and Spiegelberg HL. Release of serotonin from human platelets induced by aggregated immunoglobulins of different classes and subclasses. J Clin Invest 1973;52:1282.

Herring AB, urich H. Sarcoidosis of the central nervous system. J Neurol Sci 1969;9:405-422.

Hernandez E, Lastra S, Urbina M, Carreira I and Lima L. Serotonin, - hydroxyindoleacetic acid and serotonin transporter in blood peripheral lymphocytes of patients with generalized anxiety disorder. Int. Immunopharmacol. 2002;2:893-900.

Hietaharju A, Ali-Kerttula U, Hakkinen V, Frey H. Nervous system manifestations in Sjögren's syndrome. Acta Neurol Scand 1990;81:144-52.

Holsboer F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptor sin depression: implications for therapy. J. Affect. Disord. 2001;62:77-91.

Hotopf M, Wessely S, Sharpe M. Chronic fatigue and its syndromes. Oxford [Oxsfordshire]: Oxford University Press; 1998.

Houghton KM, Cabral DA, PEtty RE, et al. Primary Sjögren's syndrome in dizygotic adolescent twins: one case with lymphocytic interstitial pneumonia. J Rheumatol 2005;32(8):1603-6.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PPA, VII International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonine). The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 1994;46:157-203.

Hranilović D, Schwab SG, Jernej B, Knapp M, Lerer B, Albus M, et al. Serotonin transporter gene and schizophrenia: Evidence for association/linkage disequilibrium in families with affected siblings. Mol Psych 2000;5:91-95.

Hranilović D, Štefulj J, Schwab S, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Jernej B, Wildenauer D. Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. Biol Psychiatry 2004;1;55(11):1090-4.

Hrdina PD. Platelet serotonergic markers in psychiatric disorders: use, abuse and limitations. J Psychiatry Neurosci. 1994;19:87-88.

Hu X, Oroszi G, Chun J, Smith TL, Goldman D, Schuckit MA. An expanded evaluation of the relationship of four alleles to the level of response to alcochol and the alcocholism risk. Alcochol Clin Exp Res 2005;29:8-16.

Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, et al. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. Am J Hum Genet 2006;78(5):815-26.

Hu S, Wang J, Meijer J, Ieong S, Xie Y, Yu T, Zhou H, Henry S, Vissink A, Pijpe J, et al. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2007;56:3588-600.

Hughes T, Chin R. Interactions of neuropeptides and lymphokines. In: Scharrer B, Smith E, Stefano G, editors. Neuropeptides and Immunoregulation. Berlin: Springer; 1994. P. 100.

Hulkkonen J, Petrovaara M, Antonen J, et al. Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2001;44(1):176-9.

Hulkkonen J, Petrovaara M, Antonen J, et al. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjögren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. Rheumatology (Oxford) 2001;40(6):656-61.

Humphrey-Beher MG, Brayer J, Yamachika S, Peck AB, Jonsson R.An alternative Perspective to the immune response in autoimmune exocrinopathy:induction of functional quiescence rather than destructive autoaggression.Scand J Immunol 1999;49:7-10.

Hranilović D, Novak R, Babić M, Novokmet M, Bujas-Petković Z and Jernej B. Hyperserotonemia in Autism: The Potential Role of 5-HT related Gene Variants. Coll. Antropl Suppl. 32;1:75-80.

Hranilović D, Štefulj J, Furač I, Kubat M, Balija M, Jernej B. Serotonin transporter gene promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR) polymorphisms in Croatian suicide victims. Biol Psychiatry 2003;1:54(9):884-9.

Hrdina PD. Platelet serotonergic markers in psychiatric disorders: use, abuse and limitations. J Psychiatry Neurosci 1994;19:87-8.

Hu X, Oroszi G, Chun J, Smith TL, Goldman D, Schuckit MA. An expanded evaluation of the relationship of four alleles to the level of response to alcohol and the alcoholism risk. Alcohol Clin Exp Res 2005;29(1):8-16.

Hu S, Wang J, Meijer J, et al. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2007;56(11):3588-600.

Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, Xu K, Arnold PD, Richter MA, Kennedy JL, Murphy DL and GoldmanD. Serotonin Transporter Promoter Gain-of-Function Genotypes Are Linked to Obsessive-Compulsive Disorder. Am J Hum Genet. 2006 May; 78(5): 815–826.

Hunt KA, McGovern DP, Kumar PJ, et al. A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. Eur J hum Genet 2005;13(4):440-4.

Huyser BA, Parker JC, Thoreson R, et al. Predictors of subjective fatigue among individuals with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1998;41(12):2230–7.

Imura HH, Fukata J, Mori T. Cytokine and endocrine functions: an interaction between the immune and neuroendocrine systems.Clin Endocrinol 1991;35:107-15.

Inoue H, Tsubota K, Ono M, et al. Possible involvement of EBV-mediated aplha-fodrin cleavage for organ-specific autoantigen in Sjögren's syndrome. J Immunol 2001;166:5801-5809.

Ioannidis JP, Vassiliou VA, Moutsopoulos HM. Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjögren’s syndrome. Arthritis Rheum 2002;46(3):741–7.

Iordanidou M, Tavridou A, Petridis I, Arvanitidis KI, Christakidis D, Vargemezis V, Manolopoulos VG. The serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) is associated with type 2 diabetes. Clin Chim Acta 2010;411(3-4):167-71.

Isaksen K, Jonsson R, Omdal R. Anti-CD20 treatment in primary Sjögren's syndrome.Scand J Immunol200868(6):554-64.

Ishimaru N, Arakaki R, Yoshida S, et al. Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. J Exp Med 2008;205:2915-1927.

Ishimaru N, Arakaki R, Watanabe M, Kobayashi M, Miyazaki K, Hayashi Y: Development of autoimmune exocrinoparthy resembling Sjögren's syndrome in estrogen-deficient mice of healthy background. Am J Pathol 2003;163:1481-1490.

Ito K, Yoshida K, Sato K,Takahashi H, Kamata M, Higuchi H, Shimizu T, Itoh K, Inoue K, Tezuka T, Suzuki T, Ohkubo T, Sugawara K, Otani K. A varibale number of tandem repeats in the serotonin transporter gene does not affect the antidepressant response to fluvoxamine Psychiatry Research 2002;111:235-239.

Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg JE, et al. Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR and type-I IFN-dependent and –independent pathways. Eur J Immunol 2008;38:1058-1064.

Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg JE, et al. B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. Arthritis Res Ther 2006;8:R51.

Iwakiri D, Zhou L, Samanta M, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. J Exp Med 2009;206:2091-2099.

Jara LJ, Lavalle C, Fraga A, et al: Prolactin, immunoregulation and autoimmune diseases. Semin Arthritis Rheum 1991;20:273.

Jarrett ME, Kohen R, Cain KC, Burr RL, Poppe A, Navaja GP, Heitkemper MM. Relationship of SERT polymorphisms to depressive and anxiety symptoms in irritable bowel syndrome. Biol Res Nurs 2007;9(2):161-9.

Jean S, Quelvennec E, Alizadeh M, et al. DRB1*15 and DRB1*03 extended haplotype interaction in primary Sjögren's syndrome genetic susceptibility. Clin Exp Rheumatol 1998;16(6):725-8.

Jernej B, Banović M, Čičin-Šain L, Hranilović D, Balija M, Orešković D, Folnegović-Šmalc V. Physiological characteristics of platelet/circulatory serotonin: study on large human population. Psych Research 2000;94:153-162.

Jernej B, Banović M, Balija M, Čičin-Šain L, Nazor A, Grgičević D. Physiological characteristic of platelet serotonin (5HT) level, platelet 5HT uptake and platelet monoamine oxidase (MAO-B) activity in humans. Eur Neuropsyhopharmacol 1995; 5: 416-417.

Jernej B, Čičin-Šain L, Banović M. Platelet aggregation in rats genetically selected for high or low platelet serotonin levels. Can J Physiol Pharm 72. suppl 1994;1:145.

Jiang H, Wang J, Lin J. Central mechanism of hypothalamic-pituitary-adrenocortical system hyperfunction in depressed patients. Psychiatry Clin Neurosci 2000;54(2):227-34.

Johnson EO, Kostandi M, Moutsopoulos HM. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in Sjogren's syndrome: mechanisms of neuroendocrine and immune system homeostasis. Ann NY Acad Sci 2006;1088:41-51.

Johnson EO, Moutsopoulos HM. Neuroendocrine manifestations in Sjögren's syndrome. Relation to the neurobiology of stress. Ann N Y Acad Sci 2000;917:797-808.

Johnson EO, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Neuroendocrine manifestations in Sjögren's syndrome. Rheum Dis Clin North Am 2000;26(4):927-49.

Jones CA, Holloway JA, Warner JO. Does atopic disease start in foetal life? Allergy 2000;55:2-10.

Jonsson EG, Nothem MM, Gustavsson JP, Neidt H, Bunzel R, Propping P,Sedvall GC. Polymorphisms in the dopamine, serotonin and norepinephrine transporter genes and their relationships to monoaminemetabolite concentrations in CSF of healthy volunteers. Psychiatry Res 1998;79:1-9.

Jonsson R, Bowman SJ, Gordon TP. Sjögren's syndrome. In: Koopman WJ, Moreland LW, editors. Arthritis and Allied Conditions. 15th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1681–705, Chapter 78.

Jonsson MV, Skarstein K, Jonsson R, et al. Serological implications of germinal center-like structures in primary Sjögren's syndrome. J Rheumatol 2007;34(10):2044–9.

Jonsson MV, Salomonsson S, Oijordsbakken G, et al. Elevated serum levels of soluble E-cadherin in patients with primary Sjoören's syndrome. Scand J Immunol 2005;62(6):552–9.

Johnson EO, Vlachoyiannopoulos PG, Skopouli FN, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM: Hypofunction of the stress axis in Sjögren's syndrome. J Rheumatol 1998;25:1508-1514.

Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, et al: Mechanisms of stress: A dynamic overiew of hormonal and behavioral homeostasis. Neurosci Biobehav Rev 1992;16:115.

Johnson EO, Moutsopoulos HM: Neuroimmunological axis and rheumatic diseases [editorial]. Eur J Clin Invest 1992;22:2.

Kaiser R, Muller-Oerlinghausen B, Filler D, Tremblay PB, Berghofer A, Roots I, Brockmoller J.Correlation between serotonin uptake in humanblood platelets with the 44-bp polymorphism and the 17-bp variablenumber of tandem repat of the serotonin transporter. Am J Med Genet2002;114:323-328.

Kagaya A, Mikuni M, Yamamoto H, Muraoka S, Yamawaki S & Takahashi K. Heterologous supersenzitization between serotonin2 and α2.adrenegic receptor-mediated intracellular calcium mobilzation in human platelets. J Neurol Transm Gen Sect, 1992;88:25-36.

Kawakami A, Nakashima K, Tamai M, et al. Toll-like receptor in salivary glands from patients with Sjo¨gren's syndrome: functional analysis by human salivary gland cell line. J Rheumatol 2007;34(5):1019–26.

Kamilaris TC, DeBold CR, Johnson EO, et al: Effects of short and long duration hypothyroidism and hyperthyroidism on the plasma adrenocorticotropin and cortico-sterone responses to ovine corticotropin-releasing hormone in rats. Endocrinology128:2567- 1991.

Kauffman MA, Consalvo D, Gonzales-Moron D, Aguirre F, D'Alessio L, Kochen S. Serotonin transporter gene variation and refractory mesial temporal epilepsy with hippocampal sclerosis. Epilepsy Res 2009;85(2-3):231-4.

Keller-Wood ME, Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. Endocr Rev 1984;5:1-23.

Kemeny ME, Schedlowski M: Understanding the interaction between psychosocial atress and immune-related diseases: a stepwise progression. Brain Behav Immun 2007;21:1009-1018.

Kertula To, Collin P, Polvi A, Korpela M, Partanen J, Maki M. Distinct immunologc features of Finnish Sjogren's syndrome patients with HLA alleles DRB1*0301, DAQ1*0501, and DQB1*0201. Alterations in circulating T cell receptor gamma/delta subsets. Arthritis Rheum 1996;39:1733-1739.

Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. Depression and immune function: central pathways to morbidity and mortality.

Kirkpatrick JB, Hayman LA. White-matterlesions in MR imaging of clinically healthy brains of elderly subjects: possible pathologic basis. Radiology 1987;162:509-51.

Konttinen YT, Kemppinen P, Koski H, et al. T(H)1 cytokines are produced in labial salivary glands in Sjo¨gren's syndrome, but also in healthy individuals. Scand J Rheumatol 1999;28(2):106–12.

Korman BD, Alba MI, Le JM, et al. Variant form of STAT4 is associated with primary Sjogren's syndrome. Genes Immun 2008;9:267-270.

Krupp LB, LaRocca NG, Muir-Nash J, et al. The fatigue severity scale. Arch Neurol 1989;46:1121–3.

Krupp LB. Fatigue in multiple sclerosis: definition, pathophysiology and treatment. CNS Drugs. 203;17:225-34.

Korman BD, Alba MI, Le JM, et al. VAriant form of STAT4 is associated with primary Sjogren's syndrome. Genes Immun 2008;89(11):267-70.

Kovacic Z, Henigsberg N, Pivac N, Nedic G, Borovecki A. Platelet serotonin concentration and suicidal behavior in combat related posttraumatic stress disorder. Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry 2008;32:544-551.

Kuroki M. Okayama A, Nakamura E, et al. Detection of maternal-fetal microchimerism in the inflammatory lesions of patients with Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2002;61(12):1014-6.

Laine M, Porola P, Udby L, et al. Low salivary dehydroepiandrosterone and androgen-regulated cysteine-rich secretory protein 3 levels in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2007;56(8):2575-84.

Lanfurney L, Hamon M. 5-HT1 receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2004;3:1-10.

Lazarus MN, Isenberg DA. Development of additional autoimmune diseases in a population of patients with primary Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2005;64(7):1062–4.

Le Page C, Genin P, Baines MG, Hiscott J. Interferon activation and innate immunity. Rev Immunogenet 2000;2:374-86.

Lee CS , Lee YJ, Liu HF, et al. Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with rheumatoid arthritis in Chinese. Clin Rheumatol 2003;22(3):221-4.

Leeds NE, Zimmerman AD, Elkin CM, Nussbaum M, LeVan AM. Neuro- sarcoidosis of the brain and meninges. Seminar Roentgenol 1985; 20(4):387-392.

Leimola-Virtanen R, Salo T, Toikkanen S, Fulkkinen J, Syranen S. Expression of estrogen receptor (ER) ino ral mucosa and salivatory glands. Maturitas 2000;36:131-137.

Lesch KP, Gutknecht L. Pharmacogenetics of serotonin transporter. Prog Neuropsychophyrmacol Biol Psychiatry. 2005;29:1062-73.

Lesch, K.P. Neuroticism and serotonin:a developmental genetic Perspective. In: Plomin, DeFries,J.,Craig,I.,McGuffin,P. (Eds).Behavioral Genetics in the Postgenomic Era. American Psychiatric Press, Washington, DC, pp. 2003;389-423.

Lesch KO, Mossner R. Genetically driven variation in serotonin uptake: Is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? Biol Psychiatry 1998;44:179-192**.**

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. Science 1996;274:1527-1531.

Lesch KP Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P. Organization of the human serotonin transporter gene. J Neurol Trans Gen Sect 1994;95:157-162.

Lesch KP, Moessner R. Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders. Biol Psychiatry 1998;44:179-192.

Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P. Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. J Neurochem 1993;60:2319-2322.

Lesch KP ; Aulakh CS, Wolozin BL, Tolliver TJ, Hill JL, Murphy DL. Regional brain expression of serotonin transporter mRNA and its regulation by reuptake inhibiting antidepressant. Mol Brain Res 1993;17:31-35.

Lester S, Downie-Doyle Sm Gordon TP, et al. The IL4-Ra Q57R polymorphism is not associated with primary Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 2000;43(Suppl):s304.

Leysen JE. 5-HT2 receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2004;3:11-26.

Li H, Dai M, Zhuang Y. A T cell intrinsic role of Id3 in a mouse model for primary Sjögren's syndrome. Immunity 2004;21(4):551-60.

Li J, ha YM, Ku NY, Choi SY, Lee SJ, Oh SB, kim JS, Lee JH, Lee EB, Song YW, Park K. Inhibitory effects of autoantibodies on the muscarinic receptor sin Sjögren's syndrome. Lab Invest 2004;84:1430-1438.

Li X, Li X, Qian L, et al. T regulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjögren’s syndrome. J Rheumatol 2007; 34(12):2438–45.

Liang MH. Translating outcomes measurement in experimental therapeutics of systemic rheumatic disease to patient care. Rheum Dis Clin North Am 2006; 32(1):1–8.

Liang MH, Socher SA, Neal Roberts W, et al. Measurement of systemic lupus erythematosus activity in clinical research. Arthritis Rheum 1988;31(7):817–25.

Lichtenfeld JL, Kirchner RH, Wiernik PH. Familial Sjogren's syndrome with associated primary salivary gland lymphoma. Am J Med 1976;60(2):286-92.

Lima L and Urbina M. Serotonin Transporter Modulation in Blood Lymphocytes from Patients with Major Depression. Cellular and Molecular Neurobiology 2002:22:797-804.

Lima L, Schmeer C and Urbina M. 8-[^{3}H]Hydroxy-2-(Di-n-propylamino) tetralin binding sites in goldfish retina. Neurochem. Res. 1994;19:249-255.

Limaye V, Lester S, Downie-Doyle S, et al. Polymorphisms of the interleukin 10 gene promoter are not associated with anti-Ro autoantibodies in primary Sjogren's syndrome. J Rheumatol 2000;27(12):2945-6.

Little KY:Serotonin transporter promoter polymorphism,peripheral indexes of serotonin function,and personality measures in familieswith alcoholism. American J Med Genet 2002;114:230-234.

Locht H, Pelek R, Manthorpe R. Clinical manifestations correlated to the prevalence of autoantiibodies in a large (n 5321) cohort of patients with primary Sjögren's syndrome: a comparison of patients initially diagnosed according to the Copenhagen classification criteria with the American-European consensus criteria. Autoimmun Rev 2005;4(5):276-81.

Lonsdorf TB, Rück C, Bergström J, Andersson G, Ohman A, Schalling M, Lindefors N. The symptomatic profile of panic disorder is shaped by the 5-HTTLPR polymorphism. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2009;33(8):1479-83.

Looney RJ. Will targeting B cells be the answer for Sjögren’s syndrome? Arthritis Rheum 2007;56(5):1371–7.

Lopate G, Pestronk A, Al-Lozi M, et al. Peripheral neuropathy in an outpatient cohort of patients withGøransson LG, Herigstad A, Tjensvoli AB, et al. Peripheral neuropathy in primary Sjögren's syndrome. Muscle Nerve 2006;33(5):672-676.

Lovejoy EA, Scott AC,Fiskerstrand CE,Bubb VJ,Quinn JP:The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predispositionto affective disordes has distinct regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repat unit. Eur J Neuroscience 2003;17:417-420.

Lovgren T, Eloranta ML, Kastner B, et al. Induction of i nterferon-alpha by immune complexes or liposomes containing systemic lupus erythematosus autoantigenand Sjögren's syndrome autoantigen-associated RNA. Arthritis Rheum 2006;54(6):1917-27.

MacKenzie A, Quinn J. A serotonin transporter gene introne 2 polymorphic region, correlated with affective disoders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embyo. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:15251-15255.

Maddock, C.,and Pariante, C.M. How does stress affects you? An overview of stress, immunity, depression and disease. Epidemol. Psichiatr. 2001;10:153-162.

Malinow KL, Molina R, Gordon B, et al: Neuropsychiatric dysfunction in primary Sjögren's syndrome. Ann Intern Med 1985;103:344.

Mandl T, Bornmyr SV, Castenfors J, Jacobsson LT, Manthorpe R, Wollmer P. Sympathetic dysfunction in patients with primary Sjögren's syndrome. J Rheumatol 2001;28(2):296-301.

Manoussakis MN, Boiu S, Korkolopoulou P, Kapsogeorgou EK, Kavantzas N, Ziakas P, Patsouris E, Moutsopoulos HM. Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukein-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjogren's syndrome: corrleation with ceratin features of immune hyperactivity and factors associated with high risk of lymphoma development. Arthritis Rheum 2007;56:3977-88.

Manthorpe R, Frost-Larsen K, Isager H, et al. Sjögren's syndrome. A review with emphasis onm immmunological features. Allergy 1981;36(3):139-53.

Manthorpe R, Morling N, Platz P, et al. HLA-D antigen frequencies in Sjögren's syndrome: differences between the primary and the secondary form. Scand J Rheumatol 1981;10:124–8.

Marcinko D, Pivac N, Martinac M, Jakovljević M, Mihaljević-Peleš A, Muck-Seler D. Platelet serotonin and serum cholesterol concentration in suicidal and non-suicidal male.

Markeljević J. U: Vrhovac B, Francetić I, Jakšić B, Labar B, Vucelić B, (ur.). Interna medicina, Zagreb 2003;3:1393-4.

Markeljević J. Batinić D. Užarević B. Božikov J. Čikeš N. Babić-Naglić D. Horvat Z. Marušić M. Peripheral blood CD5+ B-cell subset in the remission phase of systemic connective tissue diseases. J Rheumatology 1994;21(12):2225-2230.

Markeljevic J, Marusic M, Uzarevic B, Petrovecki M, Trutin-Ostovic K, Cikes N, Batinic D. Babic-Naglic D, Horvat Z. T-cell subset composition in remission phase of systemic connective tissue diseases. J Clin Lab Immunology 1991;35(1):33-9.

Markeljević J, Marušić M, Užarević B, Petrovečki M, Čikeš N, Babić-Naglić D, Horvat Z. Natural killer cell number and activity in remission phase of systemic connective tissue diseases. J Clin Lab Immunology 1991; 35(3):133-8.

Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. Nat Med 2001;7(8):899-905.

Marazziti D, Rossi A, Masala I, Rotondo A, Palego L, Mazzoni M, Giannaccini G, Lucacchini A, Cassano GB. Regulation of platelet serotonin transporter by protein kinase C in the young and elderly. Biol Psychiatry 1999;45:443-447.

Marazziti D, Consoli G, Masala I, Catena Dell'Osso M, Baroni S. Latest advancements on serotonin and dopamine transporters in lymphocytes. Mini Rev Med Chem 2010;10(1):32-40.

Mariette X, Ravaud P, Steinfeld S, et al. Inefficacy of infliximab in primary Sjögren's syndrome: results of the randomized, controlled trial of remicade in primary Sjögren's syndrome (TRIPSS). Arthritis Rheum 2004;50(4):1270–6.

Martin F, Rozas G, Miguez J, Aldegunde M. Plasma serotonin: factors affecting its level. Biogenic Amines 1990;7:57-62.

Mariette X and Gottenberg JE. Pathogenesis of Sjögren's syndrome and therapeutic consequences. Curr Opin Theumatol 2010;22:471-477.

Mariette X, Roux S, Zhang J, et al. The level of BlyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2003;62:168-171.

Matarò M, Escudero D, Aziz M, et al. Magnetic resonance abnormalities associated with cognitive dysfunction in primary Sjögren syndrome. J Neurol 2003;25(9):1070-1076.

Mazzucchelli L, Blaser A, Kappeler A, et al. BCA-1 is highly expressed in Helicobacter pylori-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. J Clin Invest 1999;104(10):R49–54.

Mason AM, Golding PL. Multiple immunological abnormalities in a family. J Clin Pathol 1971;24(8);732-5.

Masago R, Aiba-Masago S, Talal N, et al. Elevated proapoptotic BAx and caspase 3 activation in the NOD.scid model of Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2001;44(3):693-702.

Masi A, Chrousos G. Hypothalamic-pituitary-adrenal-glucocorticoid axis function in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1996;23:577-81.

Matsubara T et al. Reduced glucocorticoid receptor alpha expression in mood disorder patients and first-degree relatives. Biol PSychiatry 2006;59:689-695.

Mavragani CP, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. The management of Sjögren's syndrome. Nat Clin Pract Rheumatol 2006;2(5):252-261.

Mawe GM, Coates MD et Moses PL. Review article: intestinal signaling in irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther 2006;23:1067-1076.

Mellman TA, Kumar AM. Platelet serotonin measures in posttraumtic stress disorders. Psychiatry Res 1994;53:99-101

Meyerhoff J and Dorsch CA. Decreased platelet serotonin levels in systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism 1981;24:12.

Meyerhoff J and Dorsch CA. Decreased platelet serotonin levels in systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism 1981;24(12):1495-1500.

Miceli-Richard C, Gestermann N, Ittah M, et al. The CGGGG insertion/deletion polymorphism of the IRF5 promoter is a strong risk factor for primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2009;60:1991-1997.

Miller AH. Norman Cousins Lecture. Mechanisms of cytokine-induced behavioral changes: psychoneuroimmunology at the translational interface. Brain Behav Immun 2009a;23:149-158.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. Nucl Acid Res 1988;16: 1215

Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytrokines in the pathophysiology of major depression. Biol Psychiatry 2009b;65:732-741.

Mirfakhraee M, Crofford MJ, Guinto FC, Nauta HJW, Weedn VW. Virchow- Robin space: a path of spread in neurosarcoidosis. Radiology 1986; 158:715-720 26. Delaney P. Neurologic manifestations in sarcoidosis. Ann Intern Med 1977;87:336-345.

Miro J, Pena-Sagredo JL, Berciano J, et al. Prevalence of primary Sjögren's syndrome in patients with multiple sclerosis. Ann Neurol 1990;27(5):582-584.

Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, et al. The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjo¨gren's syndrome. Clin Exp Immunol 2002;128(3):562–8.

Mitsias DI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: why autoimmune epithelitis? Oral Dis 2006;12(6):523–32.

Mochizuki A. Hayashi A, Hisahara S, Shoji S. Steroid-responsive Devic's variant in Sjögren's syndrome. Neurology 2000;54(6):1391-1392.

Molina R, Provost TT and Alexander EL. Peripheral inflammatory vascular disease in Sjögren's syndrome: Associations with nervous system complications. Arthritis Rheum 1981;24:1495-1500.

Morgen K, McFarland HF, Pillemer SR. Central nervous system disease in primary Sjögren's syndrome: the role of magnetic resonance imaging. Semin Arthritis Rheum 2004;34(3):623-630.

Mori K, Ilijima M, Koike H, et al. The widw spectrum of clinical manifestations in Sjögren's syndrome-associated neuropathy. Brain 2005;128(pt 11):2518-2534.

Mössner R and Lesch, K. Role of serotonin in the immune system and neuroimmune interactions. Brain Behav Immun 1998;2:249-271.

Moutsopoulos HM, Webber BL, Vlagopoulos TP, et al. Differences in the clinical manifestations of sicca syndrome in the presence and absence of rheumatoid arthritis. Am J Med 1979;66:733–6.

Mustard JF, Morat JF, MacMorine HZ, Senyi A: Release of permeability factors from blood platelets. Proc Soc Exp Biol Med 1965;119:988-991.

Mück-Seler D, Pivac N, Jakovljević M, Sagud M, Mihaljevic-Peles A. Platelet 5-HT concentration and comorbid depression in war veterans with or without posttraumatic stress disorder. J Affect Disord. 2003;75:171-9.

Nakken B, Jonsson R, Bolstad AI. Polymorphisms of the Ro52 gene associated with anti-Ro 52-kd autoantibodies in patients with primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2001;44(3):638-46.

Nachman RL, Weksler B, Ferris B: Characterization of human platelet vascular permeability-enhabcing activity. J Clin Invest 1971;51:549-556.

Neck G, Federlin K, Grief V, Rusch D, Schmidt KL. Adrenal secretion of cortisol in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1990;17-24-29.

Neidhart M: Bromocriptine microcapsules inhibit ornithine decarboxylase activity induced by Freund's complete adjuvant in lymphoid tissues of male rats. Endocrinology 1989;125:2846)

Nelson DL, 5-HT5 receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2004;3:53-58.

Nemeroff CB, Bremner JD, Foa EB, Mayberg HS, North CS, Stein MB. Posttraumatic stress disorder: a state-of-the science review. J Psychiatr Res. 2006;40:1-21.

Nemeroff C, Krishan K, Reed D, Leder R, Beam C, Dunnick N. Adrenal gland enlargement in major depression. A computed tomographic study. Arch Gen Psychiatry 1993;49(5):384-7.

Ng TP, Niti M, Tan WC, Cao Z, Ong KC, Eng P. Depressive symptoms and chronic obstrucitve pulmonary disease: effect on mortality, hospital readmission, symptom burden, functional status, and quality of life. Arch Intern Med 2007;167(1):60-7.

Nguyen CQ, Hu MH, Li Y, et al. Salivary gland tissue expression of interleukin–23 and interleukin–17 in Sjögren's syndrome: findings in humans and mice. Arthritis Rheum 2008;58(3):734–43.

Nguyen CQ, Gao JH, Kim H, et al. IL-4-STAT6 signal transduction-dependent induction of the clinical phase of Sjögren's syndrome-like disease of the nonobese diabetic mouse. J Immunol 2007;179(1):382–90.

Nikolov NO, Illei GG. Pathogenesis of Sjogren's syndrome. Curr Opin Rheumatol 2009;21:465-470.

Nikolov NP and Gabor GI. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. Current Opinion in Rheumatology 2009;21:465-470.

Nobile M, Begni B, Giorda R, Frigerio A, Marino C, Molteni M, et al:Effects of serotonin transporter promoter genotype on platelet serotonin transporter functionality in depressed children and adolescents.J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 1999;96-674.

NordmarkG, Kristjansdottir G, Theander E, et al. Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2007;56:3989-3994.

Noseworthy JH, Bass BH, Vandervoort MK, et al. The prevalence of primary Sjögren's syndrome in a multiple scelrosis population. Ann Neurol 1989;25(1):95-98.

Ogilvie AD, Harmar AJ. Association between the serotoni transporter gene and affective disorder: the evidence so far. Molecular Medicine 1997;3:90-93.

Orozco G, Sanchez E, Gonzales-Gay MA, et al. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis ans systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2005;52(1):219-24.

Ortiz J, Artigas F, Gelpi E. Serotonergic status in human blood. Life Sci, 1988:43:983-990.

Oxholm P. Primary Sjogren's syndrome-clinical and laboratory markers of disease activity. Semin Arthritis Rheum 1992;22:114-126

Ozaki Y, Ito T, Son Y, et al. Decrease of blood dendritic cells and increase of tissue-infiltrating dendritic cells are involved in the induction of Sjögren's syndrome but not in the maintenance. Clin Exp Immunol 2010;159:315-326.

Pace TWW, Mletzko TC, Alaghe O, Musselman DL, Nemeroff CB, Miller AH, Heim CM. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. American Journal of Psychiatry 2006;163:1630-1633.

Pai S, Ghezzi EM, Ship JA. Development of a visual analogue scale questionnaire for subjective assessment of salivary dysfunction. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001;91:311–6.

Pariante CM. Risk factors for development of depression and psychosis: glucocorticoid receptors and pituitary implications for treatment woth antidepressant and glucocorticoids. Ann N Y Acad Sc. Glucocorticoids and Mood: Clinical Manifestations, Risk factors, and Molecular Mechanisms. In press.

Pariante CM. The glucocorticoid receptor: part of the solution or part of the problem? J Psychopharmacol 2006;20:79-84.

Parker KJ & K Twardowska. The dexamethasone / corticotropin-releasing hormone test in acute and remitted manic patients, in acute depression, and in normal controls: I. Biol Psychiatry 1995;38:797-802.

Parsey RV, Hastings RS, Oquendo MA, Hu X, Goldman D, Huang YY, Simpson N, Arcement J, Huang Y, Ogden RT, Van Heerum RL, Arango V, Mann JJ. Effect of a triallelic functional polymorphism of the serotonin-transporter-linked promoter region on expression of serotonin transporter in the human brain. Am J Psychiatry 2006;163:48-51.

Pellizza L, Bonacini F, Ferrari A. Psychiatric disorderas clinical presentation of primary Sjögren's syndrome: two case reports. Annals of General Psychiatry 2010;9:12.

Perlstein R R, Whitnall M, Abrams J, Mougey E, Neta R. Synergictic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. Endocrinology 1993;132:946-52.

Peroutka SJ, Howell TA. The molecular evolution of G-protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. Neuropharmacology 1994: 33:319-324

Pezawas L, Meye-Lindenberg A, Draband EM, Verchinski BA, Munoz KE, Kolachana BS et al. 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulated-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. Nat. Neurosci. 2004;828-834.

Pflugfelder SC, Crouse CA, Monroy D, et al. Epstein-Barr virus and the lacrimal gland pathology of Sjögren's syndrome. Am Pathol 1993;143(1):49-64.

Pillemer SR, Smith J, Fox PC, et al. Outcome measures for Sjögren’s syndrome, April 10–11, 2003, Bethesda, Maryland, U S A. J Rheumatol 2005;32:143–9.

Piper BF, Lindsey AM, Dodd MJ, Ferketich S, Paul SM, Weller, S. The development of an instrument to measure the subjective dimension of fatigue. In: Funk S, Tornquist E, Champagne M et al., eds. Key Aspects of Comfort. New York: Springer, 1989:199–208.

Pivac N, Műck-Šeler D, Barišić I, Jakovljević M, Puretić Z. Platelet serotonin concentration in dialysis patients with somatic symptoms of depression. Life Sci. 2001;68:2423-33.

Pletscher A. Platelets as peripheral models for neuropsychiatry: A brief rewiew. Biol Psychiat 1991;2:354-356.

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution of the serotonin 5-HT2 receptor family mRNAs: comparison between 5-HT2A and 5-HT2C receptors. Brain Res Mol Brain Res 1994;23:163-178.

Poncz M, Solowiejezyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S. Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood. Analysis of B-like globin genes. Hemoglobin 1992;6:27-36.

Porter RJ, Gallagher P, Watson AA, Young AH. Corticosteroid-serotonin interactions in depression: a review of the human evidence. Psychopharmacology 2004;173:1-17.

Praschak-Rieder N, Kennedy J, Wilson AA, Hussey D, Boovariawala A, Willeit M, Ginovart N, Tharmalingam S, Masellis M, Houle S, Meyer JH. Novel 5-HTTLPR allele

asociates with higher serotonin transporter binding in putamen: a [(11)C] DASB positron emission tomography study. Biological Psychiatry 2007;15:327-331.

Prokunina L, Alarcon-Riquelme M. The genetic basis of systemic lupus erythematosus-knowledge of today and thoughts for tomorrow.Hum Mol Genet 2004;13(Spec No 1):R143-8.

Ramos-Casals M, Brito-Zeron P. Emerging biological therapies in primary Sjögren's syndrome. Rheumatology (Oxford) 2007;46(9):1389–96.

Ramos-Casals M, Font J, Brito-Zeron P, et al. Interleukin-4 receptor alpha polymorphisms in primary Sjögren's syndrome. Clin Exp Rheumatol 2004;22(3):374.

Rauch JL, Johnson ME, Fei YJ, Li JQ, Shendarkar N, Hobby HM, Ganapathy V and Leibach FH. Initial Conditions of Serotonin Transporter Kinetics and Genotype: Influence on SSRI Treatment Trial Outcome. Biol Psychiatry 2002;51:723-732.

Raison CL, Capuron L. Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. Trend sin Immunology 2006;27:24-31.

Ramamoorthy S, Blakely R. Phosphorilation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. Science 1999;285:763-766.

Rammamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, et al. Antidepressant-and-cocaine-sensitive human serotonin transporter: Molecular cloning, expression, and chromosomal localization. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:2542-2546.

Ramsis N, El-HAwary AA & Ismail E. Relation between carotid intima-media thickness, platelet surface activation and endothelial cell markers. Haemostasis 1998;28:268-275.

Rauch JL, Johnson ME, Fei You-Jun, et al. Initial conditions of serotonin transporter kinetics and genotype: influence on SSRI trial outcome. Biol Psychiatry 2002;51:723-732.

Rattray M, Wotherspoon G, Savery D, Baldessari S, Marden C, Priestly JV, Bendotti C. Chronic D-fenfluramine decreases serotonin transporter messenger RNA expression in dorsal raphe nucleus. Eur J Pharmacol 1994;268:439-442.

Reed GL. Platelet secretion. In Michelson AD (Eds), Platelets, 2nd Edition, 2007; (pp.303-318). New York: Elsevier.

Restrepo C. Armario A. Chronic stress alters pituitary-adrenal function in prepubertal male rats. Psychoneuroendocrinology 1987;12(5):393-8.

Reul JM HM & E Holsboer. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. Curr Opin Pharmacol.2002;2:23-33.

Reveille JD. The molecular genetics of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. Curr Opin Rheumatol 1992;4(5):644-56.

Rohleder N, Wolf JM and Kirschbaum C. Glucocorticoid Sensitivity in Humans-Interindividual Differences and Acute Stress Effects Stress, 2003; 6 (3):207–222.

Rosa JP, George JN, Bainton DF, et al. Gray platelet syndrome. Demonstration of alpha granule membranes that can fuse with cell surface. J Clin Invest, 1987;80:1138-1146.

Rosenbloom MA, Uphoff OF. Association of progressive multifocal Ieuko- encephalopathy and sarcoidosis. Chest 1983;83:572-575.

Roth BL, Hanizavareth SM, Blum AE. Serotonin receptors represent highly favorable molecular targets for cognitive enhancement in schizophrenia and other disorders. Psychopharmacology (Berl) 2004;174:17-24.

Sabio JM, Milla E, Jimenez-Alonso J. A multicase family with primary Sjögren's syndrome. J Rheumatol 2011;28(8):1932-4.

Sanchez-Guerrero J, Perez-Dosal MR, CArdenas-Velasquez F, et al. Prevalence of Sjögren's syndrome in ambulatory patients according to the American-European Consensus Group criteria. Rheumatology (Oxford) 2005;44(2):235-40.

Sandberg-Wollheim. Axell T, Hansen BU, et al. Primary Sjögren's syndrome in patients with multiple sclerosis. Neurology 1992;42(4):845-847.

Sarac H, Markeljevic J, Erdeljic V, Mokrović G, Božina N, Cicin-Sain L. Platelet serotonin in primary Sjögren's syndrome: level and relation with disease activity. Journal of Neuroimmunology 2012;251:87–89.

Sarac H, Markeljevic J, Erdeljic V, Josipovic-Jelic Z, Hajnsek S, Klapan T, Batinica M, Barsic I, Sertic J and Dobrila Dintinjana R. Signal hyperintensities on brain MRI in patients with primary Sjögren's syndrome and frequent episodic tension-type headache: relation with platelet serotonin level and disease activitiy. J Rheumatology 2013;40: (August) in press.

Scheltens P, Barkhof F, Leys D, Pruvo JP, Nauta JJ, Vermersch P, *et al*. Neurol Sci. 1993 Jan;114(1):7-12.

Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2005;29:201-217.

Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, et al. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. Arch Ophthalmol 2000;118:615–21.

Schobitz B, De Kloet E, Holsboer F. Gene expression and function of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in the brain. Prog Neurobiol 1994;44(4):397-432.

Schulkin J, PW Gold & BS McEwen. Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load. Psychoneuroendocrinology 1998;23:219-243.

Schwartz JE, Jandorf L, Krupp L.B. The measurement of fatigue: a new instrument. J Psychosom Res 1993;37:753–62.

Segal B, Bowman SJ, Fox FC, Vivino FB, Murukutla N, Brodscholl J, Ogale S and McLean L. Primary Sjögren's syndrome: health experiences and predicotrs of health quality among patients in the United States. Health and Quality of Life Outcomes 2009;7:46. doi:10.1186/1477-7525-7-46.

Segerstrom SC, Miller GE. Psychological stress and the human immune system: a meta – analytic study of 30 years of inquiry. Psychological Bulletin 2004;130:601-630.

Sellam J, Miceli-Richard C, Gottenberg JE, et al. Decreased B cell activating factor receptor expression on peripheral lymphocytes associated with increased disease activity in primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 2007;66:790-797.

Sestak AL, Shaver TS, Moser KL, et al. Familial aggregation of lupus and autoimmunity in an unusual multiplex pedigree. J Rheumatol 1999;26(7):1495-9.

Seror R, RavaudF, MarietteX, BootsmaH, TheanderE, HansenA, Ramos-CasalsM, DörnerT[8], BombardieriS, HachullaE, BrunJG, KruizeAA, PraprotnikS, TomsicM, GottenbergJE, DevauchelleV, DevitaS, VollenweiderC, MandlT, TzioufasA, CarsonsS, SarauxA, SutcliffeN, VitaliC, Bowman S J on behalf of the EULAR Sjögren's Task Force. EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI): development of a consensus patient index for primary Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis, 2011;70:968-972.

Seror R, Sordet C, Guillevin L, et al. Tolerance and efficacy of rituximab and changes in serum B cell biomarkers in patients with systemic complications of primary Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2007;66(3):351–7.

Seror R, Ravaud P, Bowman S, Baron G, Tzioufas A, Theander E, Gottenberg JE, Bootsma H, Mariette X, Vitali C on behalf of the EULAR Sjögren's Task Force. EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI): Development of a consensus systemic disease activity index in primary Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2010;69(6):1103-1109.

Sharma R, Zheng L, Guo X, et al. Novel animal models for Sjögren's syndrome: expression and transfer of salivary gland dysfunction from regulatory T celldeficient mice. J Autoimmun 2006;27(4):289–96.

Sheline YI et al. Depression duration but not age predicts hippocampal volume los sin medically healthy women with recurrent major depression. J Neurol Sci 1999;19:5034-5043.

Shim GJ, Warner M, kim HJ, Andersson S, Liu I, Ekman J, Imamov O, Jones ME, Simpson ER, Gustafsson JA: Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjögren's syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:12628-12633.

Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. Athritis Rheum 2010;62:234-244.

Slade GD, Spencer AJ. Development and evaluation of the Oral Health Impact Profile. Community Dent Health 1994;11:3–11.

Smets EMA, Garssen B, de Haes JCJM. Application of the Multidimensional Fatigue Inventory (MFI-20) in cancer patients receiving radiotherapy. British Journal of Cancer 1996;73:241-5.

Smith AF, Castor CW. Connective tissue activation XII. Platelet abnormalities in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 1978;5(2):177-83.

Soliotis FC, Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Central nervous system involvements in Sjögren syndrome. AnnRheumDis 2004;63:616-620.

Song C, Lin A, Bonaccorso S, Heide C, Verkerk R, Kenis G, et al. The inflammatory response system and the availability of plasma tryptofan in patients with primary sleep disorders and major depression. J Affect Disord 1998;49:211-9.

Spachidou MP, Bourazopoulou E, Maratheftis CI, et al. Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells

derived from patients with primary Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol 2007;147(3):497–503.

Spijker AT and van Rossum EFC. Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. Glucocorticoids and mood: Ann. N. Y. Acad. Sci. 2009;1179:199-215.

Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. Nat Rev Immunol 2006;6:318-328.

Sternberg Em. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. J Endocrinol 2001;169:429-435.Sternberg EM, Chrousos GP, Wilder RL, et al. The stress response and the regulation of inflammatory disease. Ann Int Med 1992;177:854.

Stevens A, Ray DW, Zeggini E. Glucocorticoid Sensitivity Is Determined by a Specific Glucocorticoid Receptor Haplotype. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(2):892–897.

Streyer L. Enzymes: Basic concepts and kinetics. U: Streyer L. Ured. Biochemistry 4th ed. New York: W.H. Freeman and Co. 1995;181-206.

Stoltenberg SF, Twitchell GR, Hanna GL, Cook EH, Fitzgerald HE, Zucker RA, Little KY: Serotonin transporter promoter polymorphism, peripheral indexes of serotonin function,and personality measures in families with alcoholism. American J Med Genet 2002;114:230-234.

Stoltze CA, Hanlon DG, Pease GL, et al: Keratoconjuctivits sicca and Sjögren's syndrome. Ann NY Acad Sci 1969;106:513.

Strömbeck B, Ekdahl C, Manthorpe R, et al. Health-related quality of life in primary Sjo¨gren's syndrome, rheumatoid arthritis and fibromyalgia compared to normal population data using SF-36. Scand J Rheumatol 2000;29:20–8.

Sternberg Em: Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. J Endocrinol 2001;169:429-435.Sullivan DA, Wickham LA, Rocha EM et al.: Androgens and dry eye in Sjögren's syndrome. Ann NY Acad Sci 1999;876:312.

Surtees PG, Wainwright NW. Surviving adversity: event decay, vulnerability and the onset of anxiety and depressive disorder. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 1999;249:86-95.

Sutcliffe N, Vitali C, Bowman SJ on behalf of the EULAR Sjogren's Task Force. EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI): development of a consensus patient index for primary Sjögren's syndrome.

Symmonds DPM. Disease assessment indices: activity, damage and severity. Ballieres Clin Rheumatol 1995;9(2):267–85.

Szodoray P, Jellestad S, Teague MO, et al. Attenuated apoptosis of B cell activating factor-expressing cells in primary Sjögren's syndrome. Lab Invest 2003;83(3):357–65.

Szodoray P, Alex P, Jonsson MV, et al. Distinct profiles of Sjögren's syndrome patients with ectopic salivary gland germinal centers revealed by serum cytokines and BAFF. Clin Immunol 2005;117(2):168–76.

Tak PP. IFN-beta in rheumatoid arthritis. Front Biosci 2004;9:3242-7.

Takaki A, Huang OH, Somogyndri-Vigh A, Arimura A. Immobilization stress may increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines. Neuroimmunomodulation 1994;1:335-342.

Takemura S, Braun A, Crowson C, et al. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. J Immunol 2001;167(2):1072–80.

Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, O, et al. Lymphoma and other malignancies in primary Sjogren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. Ann Rheum Dis 2006;65(6):796-803.

Thomson WM, Chalmers JM, Spencer AJ, et al. The Xerostomia Inventory: a multiitem approach to measuring dry mouth. Community Dent Health 1999;16:12–7.

Thomas DR, Hagan JJ. 5-HT7 receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2004;3:81-90.

Triantafyllopoulou A, Tapinos N, Moutsopoulos HM. Evidence for coxackievirus infection in primary Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 2004;50(9):2897-902.

Tsinti M, Kassi E, Korkolopoulou P, et al. Functional estrogen receptors alpha and beta are expressed in normal human salivary gland epithelium and apparently mediate immunomodulatory effects. Eur J Oral Sci 2009;117:498-505.

Tu H, Rady PL, Juelich T, Smith EM, Tyring SK, Hughes TK. Cytokine regulation of tryptophan metabolism in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: implications for protective and toxic consequences in neuroendocrine regulation.Cell Mol Neurobiol. 2005 ;25(3-4):673-80.

Tzioufas AG, Tsonis J, Moutsopoulos HM. Neuroendocrine Dysfunction in Sjögren's Syndrome. Neuroimmunomodulation 2008;15:37-45.

Tzioufas AG, Voulgarelis M. Update on Sjögren's syndrome autoimmune epithelitis: from classification to increased neoplasia. Best Pract Res Clin Rheumatol 2007;21:989-1010.

Uher R and McGuffin P. The moderation by the serotonin trasnporter gene of environmental adversity in the aetiology of mental illness: review and methodological analysis. Molecular Psychiatry 2008;13:131-146.

Valtýsdóttir ST. Primary Sjogren's syndrome. University dissertation from Uppsala : Acta Universitatis Upsaliensis. Author: Uppsala Universitet. 2001

Valtýsdótir ST, Gudbjörnsson B, Lindquist U, Hällgren R and Hetta J. Anxiety and depression in patients with primary Sjögren's syndrome. J Rheumatol 2000;27:165-9.

Valtýsdótir ST, Wide L, Hällgren R. Low serum dehydroepiandrosterone sulfate in women with primary Sjögren's syndrome as an isolated sign of impaired HPA axis function. J Rheumatol 2001;28:1259-1265.

Van Praag HM. Can stress cause depression? Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psych. 2004;28:891-907.

Van Rossum EFC, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, Salyakina D, Lamberts SWJ and Florian Holsboer. Polymorphisms of the Glucocorticoid Receptor Gene and Major Depression. Biol Psychiatry 2006;59:681–688.

Van West D, Van Den EF, Del Favero J, Souery D, Norrback KF, Van Duijn C, Sluijs S, Adolfsson R, Mendlewicz J, Deboutte D, Van Broeckhoven C, Claes S. Glucocorticoid receptor gene-based SNP analysis in patients with recurrent major depression. Neuropsychopharmacology 2006;31(3):620–627.

Vanderpool J, Rosenthal N, Chrousos GP, et al. Evidence for hypothalamic CRH deficiency in patients with seasonal affective disorder. J Clin Endocrinol MEtab 1991;72:1382.

Vangs DM, Rodgers SE, Duncan EM, Lloyd JV, Bochner F. Potentiation of ADP-induced aggregation in human platelet rich plasma by 5-hydroxytryptamine and adrenaline. Br J Pharmacol 1992;106:917-923.

Veenstra TD. Global and targeted quantitative proteomic for biomarkers discovery. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007;847(1):3-11.

Vidović A, Gotovac K, Vilibić M, Sabioncello A, Jovanović T, Rabatić S, Folnegović-Šmalc V, Dekaris D. Repeated assesments of endocrine-and immune-related changes in postraumatic stress disorder. Neuroimmunomodulation 2011;18(4):199-211.

Vitale S, Goodman LA, Reed GF, et al. Comparison of the NEI-VFQ and OSDI questionnaires in patients with Sjögren's syndrome-related dry eye. Health Qual Life Outcomes 2004;2:44.

Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerned action supported by the European Community. Arthritis Rheum 1993;36(3):340-7.

Vitali C, Bombardieri S, Jonsson E, et al. European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification Criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. Ann Rheum Dis 2002;61(6):554-558.

Vitali C, Tavoni A, Neri R, Castrogiovanni P, Pasero G, Bombardieri S. Fibromyalgia features in patients with primary Sjögren's syndrome.+

Scand J Rheumatol 1989;18:21-7.

Vivino FB, Al-Hashimi I, Khan Z, et al. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren's syndrome. Arch Intern Med 1999;159:174–81.

Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. J Neurosci 1996;16:2352-2364.

Waldeier PC, Graf T, Germer M, Feldtrauer JJ, Howald H. Serotonin uptake inhibition by the monoamine oxidase inhibitor brofaromine. Biol Psychiat 1993;33:973-979.

Walker SE, Allen SH, McMurray RW:Prolactin and autoimmune disease. TrendsEndocrinol Metab 1993;4:147.

Walker TR & Watson SP. Synergy between Ca^{2+} and protein kinase C is the major factor in determining the level of secretion from human platelets. Biochem J, 1993;289:277-282.

Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. Annu Rev Immunol 2007;25:821–52.

Weiss HJ: Platelet physiology and abnormalities of platelet function. N Engl J Med 1975;293:531-591.

Wessely S, Hotopf M, Sharpe M. Chronic fatigue and its syndromes. Oxford: Oxford University Press; 1998.

Westhoff G, Dörner T, Zink A. Fatigue and depression predict physician visits and work disability in women with primary Sjögren's syndrome: results from a cohort study. Rheumatology, 2012;51(2):262-9.

Wicki AN, Walz A, Gerber-Huber SN, Wenger RH, Vornhagen R & Clemetson KJ. Isolation and characterization of human blood platelet mRNA and construction of a cDNA in lambda gt11. Confirmation of the platelet derivation by identification of GP1b coding mRNA and cloning of a GP1b coding cDNA insert. Thromb Haemost, 1989;61:448-453.

Willhouse EW, Milton NG. Effect of acetylcholine and 5-hydroxytryptamine on the secretion of corticotropin-releasing factor-41 and arginine vasopresin from the rat hypothalamus in vitro. J Neuroendocrinol 1989;122:713-718.

White JG. The dense bodies of human platelets. U: Meyers KM, Barnes CD, ured. The Platelet Amine Sorage Granule. Boca Raton: CRC Press, 1992; 1-29.

White JG. The dense bodies of human platelets. In K.M.Myers & C.D. Barnes (Eds.), The platelet amine storage granule 1992; (pp.31-50). Boca Raton, FL: CRC Press.

Wildenberg ME, van Helden-Meeuwsen CG, van de Merwe JP, Drexhage HA, Versnel MA. Systemic increase in type I interferon activity in Sjogren's syndrome: a putative role for plasmacytoid dendritic cells. Eur J Immunol 2008;38:2024-33.

Willeit M, Stastny J, Pirker W, Praschak-Rieder N, Neumeister A, Asenbaum S, et al.: No evidence for in vivo regulation of midbrain serotonin transporter availability by serotonin transporter promoter gene polymorphism. Biol Psychiatry 2001;50:8 –12.

Williams RB, Marchuk DA, Gadde KM, Barefoot JC, Grichnik K, Helms MJ, Kuhn CM, Lewis JG, Schanberg SM, Stafford-Smith M, Suarez EC, Clary GL, Svenson JK, Siegler IC. Central nervous system serotonin function and cardiovascular responses to stress. Psychosom. Med. 2001;63:300-305.

Wingerchuk DM, Lennon VA, Luccinetti CF, et al. The spectrum of neuromyelitis optica. Lancet Neurol 2007;(9):805-815.

Woolley ML, Marsden CA, Fone KC. 5-ht6 receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2004:3:59-79.

Wolfe F. Fatigue assessments in rheumatoid arthritis: comparative performance of visual analogue scales and longer fatigue questionnaires in 7760 patients. J Rheumatol 2004;31:1896–902.

Yellen SB, Cella DF, Webster K, et al. Measuring fatigue and other anemia-related symptoms with the Functional Assessment of Cancer Therapy (FACT) measurement system. J Pain Symptom Manage 1997;13:63–74.

Youn J, Hwang SH, Cho CS, et al. Association of the interleukin-4 receptor alpha variant Q576R with Th1/Th2 imbalance in connective tissue disease. Immunogenetics 2000;51(8-9):743-6.

Yamada S, Akita H, Kanazawa K, Ishida T, Hirata K, Ito K, Kawashima S & Yokoyama M. T102C polymorphism of the serotonin 5-HT_{2A} receptor gene in patients with non-fatal acute myocardial infarction. Atherosclerosis, 2000;150:143-148.

Yamamoto T, Ito S, Hattori T. Neurological picture. Acute longitudinal myelitis as the initial manifestation of Sjögren's syndrome. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2006;77:6:780.

Yamawaki S, Kagaya A, Okamoto Y, Shimizu M, Nishida A, Uchitomi Y. Enhanced Calcium Response to Serotonin in Platelets from PAtients with Affective Disorders. J Psychiatry Neurosci, 1996;Vol.21(5):321-324.

Yellen SB, Cella DF, Webster K, et al. Measuring fatigue and other anemia-related symptoms with the Functional Assessment of Cancer Therapy (FACT) measurement system. J Pain Symptom Manage 1997;13:63–74.

Youn J, Hwang SH, Cho CS, et al. Association of the interleukin-4 receptor alpha variant Q576R with Th1/Th2 imbalance in connective tissue disease. Immunogenetics 2000;51(8-9):743-6.

Zalcman S, Green-Johnson J, Murray L, Nance D, Dyck D, Anisman H, et al. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. Brain Res 1994;643:40-9.

Zaharia MD, Ravindran AV,Griffiths J, Merali Z, and Anisman H. Lymphocyte proliferation among major depressive and dysthymic patients with typical or atypical features. J. Affect. Disord. 2000;58:1-10.

Zeller J, Weissbarth E, Baruth B, Mielke H and Deicher H. Serotonin content of platelets in inflammatory rheumatic diseases. Arthritis and Rheumatism 1983; 26:532-540.

Zhou Y, Huang D, Paris PL, et al. An analysis of CTLA-4 and proinflammatory cytokine gene sin Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum 2004;50(8):2645-50.

DODATAK

Prilog 1: Klasifikacijski kriteriji za Sjögrenov sindrom

Revidirani međunarodni klasifikacijski kriteriji za Sjögrenov sindrom

I. Očni simptomi: pozitivan odgovor na najmanje jedno od pitanja:

1. Jeste li imali svakodnevno, trajno suhe oči duže od 3 mjeseca?
2. Imate li osjećaj pijeska u očima?
3. Koristite li umjetne suze više od 3 puta dnevno?

II. Oralni simptomi: pozitivan odgovor na najmanje jedno pitanje:

1. Imate li svakodnevni osjećaj suhoće u ustima duže od 3 mjeseca?
2. Jeste li imali trajni otok parotidnih žlijezda u odrasloj dobi?
3. Pijete li često kako biste olakšali gutanjer hrane?

III. Očni znaci - objektivni dokaz okularne zahvaćenosti definirano kao pozitivan rezultat za najmanje jedan od dva testa:

1. Shirmerov test, bez anestezije (≤ 5 mm u 5 minuta)
2. Rose bengal score (≥ prema Bijeterveldovom sistemu bodovanja)

IV. Zahvaćenost žlijezda slinovnica: objektivni dokaz zahvaćenosti žlijezda slinovnica definirano kao pozitivan rezultat za najmanje jedan od dijagnostičkih testova:

1. Nestimulirana salivacija (1,5 ml u 15 minuta)
2. Sialografija parotida – difuzne sialoektazije (punktiformne, kavitarne ili destruktivni uzorak), bez dokaza opstrukcije glavnih kanalića
3. Salivacijska scintigrafija pokazuje odgođeni unos, smanjenu koncentraciju i/ili odgođeno izlučivanje radioaktivnog liganda

V. Histopatološki: uzorak manjih slinovnica, dobiven iz sluznice normalnog izgleda, evaluiran od citologa; fokalni limfocitarni sialoadenitis, sa fokus scorom ≥ 1, definirano kao broj fokusa koji se nalaze uz mukozne acinuse normalnog izgleda i sadrže više od 50 limfocita) po 4 mm^2 žljezdanog tkiva

VI. Autoprotutijela: u serumu prisutna autoprotutijela na Ro/-SS-A i/ili La/SS-B)

Revidirana pravila za klasifikaciju

Za **primarni Sjögrenov sindrom** (pSS)
U bolesnika bez bilo kakve pridružene autoimune bolesti može biti:

a. Bilo koja 4 od 6 kriterija je indikativno za pSS; domena IV (histološki nalaz ili VI (serologija)
b. Bilo koja 3 od 4 objektivna kriterija (III, IV, V i VI)
c. Klasifikacijski postupak predstavlja korisnu alternativnu metodu za klasifikaciju, iako bi se trebalo koristiti u kliničko-epidemiološkim studijama

Za **sekundarni Sjögrenov sindrom (sSS)**
U bolesnika s potencijalno pridruženim autoimunim bolestima (npr. druga bolest vezivnog tkiva), prisutnost kriterija I ili II uz bilo koji od kriterija III, IV i V je indikativno za sSS

Isključujući kriteriji:
Prethodno zračenje u području glave i vrata
Hepatitis C
AIDS
Prethodni limfom
Sarkoidoza
Transplantacija organa
Upotreba antikolinergičkih lijekova (kraće od 4 puta poluvremena života lijeka)

Prilog 2. EULAR Sjogren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI): Development of a consensus systemic disease activity index in primary Sjogren's syndrome

Konstitucijskadomena [3] *Ne ocjenjuju se konstitucijski simptomi koji nisu u vezi s osnovnom bolešću (kao što su temperature zbog infekcije, voljni gubitak tjelesne težine, TT))*		
Nema aktivnosti	Odsutnost slijedećih simptoma	☐
Slaba aktivnost	Blagi ili intermitentni febrilitet (37.5°-38.5°C) / noćno znojenje Nevoljni gubitak tjelesne težine od 5 do 10%	☐
Srednja aktivnost	Teški febrilitet-groznica (>38.5°C) / noćno znijenje Nevoljni gubitak TT >10%	☐

Limfadenopatija [4]		
Nema aktivnosti	Odsutnost slijedećih simptoma	☐
Slaba aktivnost	- Limfadenopatija ≥ 1cm bilo koje regije ili ≥ 2cm ingvinalne regije	☐
Srednja aktivnost	- Limfadenopatija ≥ 2cm bilo koje regije ili ≥ 3cm ingvinalne regije, - i/ili splenomegalija (klinički palpabilna ili radiološki)	☐
Visoka aktivnost	- Maligna proliferativna bolest B-limfocita	☐

Žlijezde [2] *Moimo budite pažljivi kako ne biste ocjenjivali otok žlijezda koji se ne odnosi na Sjogrenov sindrom (kao npr. konkrementi ili infekcija)*		
Nema aktivnosti	Odsutnost otoka žlijezda	☐
Slaba aktivnost	Blagi otok žlijezda s: - Otok parotida (≤ 3cm), - ili ograničeni otok submandibularnih ili suznih žlijezda[1]	☐
Srednja aktivnost	Otok većih žlijezda s: - otok parotida (>3cm) - ili značajni otok submandibularnih ili suznih žlijezda[1]	☐

[1]Razlikovanje ograničenog i ograničenog otoka submandibularnih i suznih žlijezda u domeni je liječnika

Zglobovi [2] *Molimo budite pažljivi kako ne biste ocijenili zahvaćenost zglobova koja se ne odnosi na Sjogrenov sindrom, kao npr. osteoarthritis*		
Nema aktivnosti	Trenutna odsutnost aktivne zahvaćenosti zglobova	☐
Slaba aktivnost	Artralgije šaka, laktova, gležnjeva i stopala udružene s jutarnjom ukočenosti trajanja >30 min	☐

Srednja aktivnost	1 do 5 od ukupno 28 sinovitisa	☐
Visoka aktivnost	≥ 6 sinovitisa od ukupno 28	☐

Kožne promjene [3] *Pažljivo ocijenite "Nema aktivnosti" - dugotrajno stabilno, jer se odnosi više na oštećenje a ne na aktivnost bolesti, ili ako opisujete kožne promjene koje se ne odnose na osnovnu bolest vezivnog*		
Nema aktivnosti	Odsutnost trenutno aktivnih kožnih promjena	☐
Slaba aktivnost	Erythema multiforme	☐
Srednja aktivnost	Ograničeni (limitiran) kožni vaskulitis, uključujući urtikarijski vaksulitis[2], ili purpura ograničena na stopala i gležanj, ili subakutni kožni lupu	☐
Visoka aktivnost	Difuzni kožni vaskulitis uključujući urtikarijski vaskulitis[2], Ili difuzna purpura Ili vaskulitični ulkusi	☐

[2] Ograničeni kožni vaskulitis obuhvaća <18% površine kože; [3] Difuzni kožni vaskulitis koji obuhvaća >18% površine kože. BSA (prema engl. body-surface-area) je definirana pomoću pravila devet: Dlan (bez prstiju) = 1% BSA; svaka noga = 18% BSA; svaka ruka = 9% BSA; prednji dio trupa = 18% BSA; stražnji dio trupa = 18% BSA

Pluća [5] *Pažljivo ocijenite "Nema aktivnosti" stabilno duže vrijeme koje se odnosi prije na oštećenje, a ne aktivnost bolesti, ili respiratorne smetnje koje se ne odnose na osnovnu bolest vezivnoga tkiva (pušenje)*		
Nema aktivnosti	Trenutna bez aktivne zahvaćenosti pluća	☐
Slaba aktivnost	Perzistentni kašalj ili zahvaćenost bronha bez radioloških abnormalnosti Ili radiološki ili CT nalaz intersticijske bolesti pluća[3] sa: • Bez nedostatka zraka, i normalnim funkcionalnim testovima pluća.	☐
Srednja aktivnost	Srednje izražena aktivna zahvaćenost pluća, kao intersticijska bolest pluća dokazana na CT[3] sa: • Skraćenje daha u naporu (NHYA II) ili abnormalni funkcionalni testovi pluća ograničeni na: - 70% >DL_{CO}≥ 40% i/ili 80% > FVC ≥ 60%	☐
Visoka aktivnost	Visoko izražena zahvaćenost pluća, poput intersticijske bolesti pluća dokazane na CT[3] sa : • Skraćenje daha u mirovanju (NHYA III, IV) ili s abnormalnim funkcionalnim testovima pluća: - DL_{CO}< 40% i/ili FVC < 60%	☐

[3]Za dijagnozu intersticijske plućne bolesti potreban je CT ili radiološki nalaz učinjen u zadnje 2 godine.

DLCO= difuzijski CO kapacitet; FVC= forsirani vitalni kapacitet; HRCT= CT visoke rezolucije; NHYA= New York heart association classification;

Bubrezi [5] *Pažljivo ocijenite"Nema aktivnosti" stabilno duže vrijeme koje se odnosi prije na oštećenje, a ne aktivnost bolesti, i zahvaćenost bubrega koja nije povezana s osnovnom bolesti vezivnog tkiv. Ako je učinjena biopsija, ocijenite aktivnost najprije temeljem histološkog nalaza.*		
Nema aktivnosti	Odsutnost trenutno aktivne zahvaćenosti bubrega: - Proteinurija< 0.5g/dan, nema hematurije, nema leukociturije, nema acidoze. ili dugotrajna stabilna proteinurija zbog oštećenja	☐
Slaba aktivnost	Dokaz specifične aktivne zahvaćenosti bubrega ogrnaičene na: • Tubularna acidoza bez renalne disfunkcije (GFR[4] ⩾60ml/min) • Glomerularno oštećenje - s proteinurijom (između 0.5 i 1 g/dan) - bez hematurije ili renalne disfunkcije (GFR4 ≥60ml/min)	☐
Srednja aktivnost	Srednje izražena aktivna zahvaćenost bubrega: • Tubularna acidoza bez renalne disfunkcije (GFR[4]< 60 ml/min) • Glomerularno oštećenje - S proteinurijom između 1 i 1.5g/dan - Bez hematurije ili bubrežne disfunkcije (GFR4 ≥ 60ml/min) ili histološki dokaz - Extra-membranskog glomerulobefritisa - Upadljivi intersrticijski limfoidni infiltrati	☐
Visoka aktivnost	Visoka aktivna zahvaćenost bubrga: • Glomerularno oštećenje - S proteinurijom > 1.5 g/d ili hematurija ili bubrežna disfunkcija (GFR[4]< 60 ml/min) ili histološki dokaz: - proliferativnog glomerulonefritis - krioglobulilnemija zbog zahvaćenosti bubrega	☐

[4] Glomerularna filtracija (GFR) procijenjena s MDRD formulom.

Mišići [6] *Budite pažljivi kako ne biste ocijenili zahvaćenost mišića koja se ne odnosi na osnovnu bolest vezivnog tkiva, kao npr. slabost zbog kortikosteroida…*		
Nema aktivnosti	Odsutnost trenutno aktivne zahvaćenosti mišića	☐
Slaba aktivnost	Aktivni miozitis dokazan EMG ili biopsijom i: - bez slabosti - i kreatin-kinazom (CK) (N < CK ≤ 2N)	☐

Srednja aktivnost	Srednje izražen aktivni miozitis dokazan abnormalnim EMG ili biopsijom i: - slabost (maksimalni deficit 4/5), - ili porast CK (2N < CK ≤ 4N),	☐
Visoka aktivnost	Visoko izraženi aktivni miozitis dokazan abnormalnim EMG ili bioopsijom s: - slabost (deficit ≤ 3/5) - ili porast CK (> 4N)	☐

EMG= elektromiogram;

Periferni živčani sustav (PŽS) [5] *Budite pažljivi u ocjeni "Nema aktivnosti" stabilno kroz dulje vrijeme koje se odnosi na oštećenje a ne na aktivnost bolesti, ili zahvaćenost PŽS koje se ne odnosi na osnovnu bolest vezivnog tkiva*		
Nema aktivnosti	Odsutnost trenutno aktivne zahvaćenosti PŽS	☐
Slaba aktivnost	Dokaz aktivne zahvaćenosti PŽS, kao: - Čista senzorna aksonalna polineuropatija dokazana NCS - Neuralgija trigeminusa (n.V)	☐
Srednja aktivnost	Dokaz srednje izražene aktivne zahvaćenosti PŽS dokazane pomoću na NCS, kao: - Aksonalna senzomotorna neuropatija s max. motoričkim deficitom do 4/5, - Čista senzorna neuropatija s krioglobulinemijskim vaskulitisom, - Ganglionopatija[5] sa simptomima blage/srednje ataksije, - Upalna demijelinizirajuća polineuropatija[6] (CIDP) s blagim funkciojskim oštećenjem (max. motorički deficit 4/5ili blaga ataksija), ili zahvaćenost perifernih segmenata kranijskih živaca (osim neuralgije trigeminusa (n.V)	☐
Visoka aktivnost	Dokaz aktivne visoke zahvaćenosti PŽS dokazanim pomoću NCS, kao: - Aksonalna senzomotorna neuropatija s motoričkim deficitom ≤ 3/5 - Zahvačenost perifernih živaca vaskulitisom (mononeuritis multiplex, itd…) - Teška ataksija zbog ganglionopatije[5] - Upalni demijelinizirajući poliradikuloneuritis[6] (CIDP) s teškim funkcionalnim oštećenjem: motorički deficit ≤ 3/5 ili teška ataksija	☐

NCS: Nerve conduction studies.

[5] Čisti senzorni deficit s ataksijom i difuznim oštećenjem ili gubitkom osjetnih potencijala na NCS

[6]Poliradikuloneuropatija sa sugestivnim kliničkim simptomima (senzomotorni deficit sva 4 esktremiteta, proksimalni motorički deficit, generalilzirana arefleksija, inicijalni senzorni simptomi koji zahvaćaju gornje udove i/ili su udruženi sa zahvaćanjem kranijskih živaca, porast proteina i/ili dodatno abnormalni NCS (produžene motorne distalne latence, snižene brzine provođenja, produžena latenca F-vala, blok provođenja i/ili temporalna disperzija.)

Središnji živčanisustav (SŽS) [5] *Pažljivo ocijeniti "Nema aktivnosti" stabilno kroz dulje vrijeme koje se odnose na oštećenje a ne na aktivnost bolesti ili zahvaćenost SŽS koje se ne odnose na osnovnu bolest.*		
Nema aktivnosti	Odsutnost trenutno aktivne zahvaćenosti SŽS	☐
Srednja aktivnost	Srednje aktivna zahvaćenost SŽS, kao: - Centralna zahvaćenost kranijskih živaca - Optički neuritis - Multipli "sklerozi sličnim"sindromima, sa isključivo senzornim simptomima ili dokazanim kognitivnim smetnjama	☐
Visoka aktivnost	Visoko aktivne značajke SŽS: - Cerebralni vaskulitis s cerebrovaskularnim ispadima ili TIA-om - Epileptički napadaji - Transverzni mijelitis. - Limfocitički meningitis - Multipli "sklerozisličan" sindrom s motoričkim deficitom	☐

Hematološka domena [2] *Budite pažljivi u ocjeni::* *- "anemije", " trombocitopenije" i "neutropenije" (ocjenjuje se samo autoimuna citopenija)* *- ne ocjenjuje se citopenija koja nije povezana s osnovnom bolesti vezivnog tkiva (manjak vitamin ili Fe, iatrogena citopenija, npr. limfocitopenija povezana s ciklofosfamidom)*		
Nema aktivnosti	Odsutnost autoimmune citopenije	☐
Slaba aktivnost	Citopenija autoimune prirode s: - neutropenijom (1000 < neutrofila < 1500/mm3) - ili anemijom (10 < Hb < 12g/dl) - ili trombocitopenijom (100,000 < Trc < 150,000/mm3) ili limfopenijom (500< limfociti <1000/mm3)	☐
Srednja aktivnost	Citopenija autoimmune prirode s: - neutropenija (500 ≤ neutrofili ≤ 1000/mm3), - ili anemija (8 ≤ Hb ≤ 10g/dl) - ili trombocitopenija (50,000 ≤ Trc ≤ 100,000/mm3) ili limfopenija (≤500/mm3)	☐
Visoka aktivnost	Citopenija autoimune prirode s: - neutropenijom (neutrofili < 500/mm3), - ili anemijom (Hb < 8 g/dl) - ili trombocitopenijom (trc < 50,000/mm3),	☐

[7] Anemija s pozitivnim Coombs-ovim testom I porastom broja retikulocita

[8] Trombocitopenija perifernog porijekla bez druge etiologije ili u slučaju poteškoća s antitrombocitnim protutijelima i/ili prisutnosti megakariocita u aspiratu koštane srži i/ili povezano s autoimunom anemijom.

[9] Neutropenija bez druge etiologije

Biološka domena [1]		
Nema aktivnosti	Odsutnost svih bioloških značajki	☐

Slaba aktivnost	- Klonalna komponenta - ili hipokomplementemija (nizak C4 ili C3 ili CH50) - ili hipergamaglobulinemija ili razina IgG između 16 i 20g/L	☐
Srednja aktivnost	- krioglobulinemija - ili hipergamaglobulinemija ili visoka razina IgG > 20g/L - ili nedavni nastup[10] hipogamaglobulinemije ili nedavni pad razine IgGl (<5g/L)	☐

[10] U zadnjih 6 mjeseci

Izračun ukupnog zbroja (prema engl. "Scoring methodology"):

- "Score" svake domene je produkt težine domene na razini aktivnosti. Težine domena su prikazane u zagradama za svaku domenu.
- Razine aktivnosti bi trebale biti zbrojene na slijedeći način:
    - Nema aktivnosti = 0
    - Slaba aktivnost = 1
    - Srednja aktivnost = 2
    - Visoka aktivnost = 3

Ukupni ESSDAI "score" je zbroj "scor-a" svih domena (max 32 boda)

Prevedeno prema: Seror R, Ravaud P, Bowman S, Baron G, Tzioufas A, Theander E, Gottenberg JE, Bootsma H, Mariette X, Vitali C. EULAR Sjogren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI): Development of a consensus systemic disease activity index in primary Sjogren's syndrome. Ann Rheum Dis. 2009 Jun 28. [Epub ahead of print] PMID: 19561361.

Prilog 3. Samoocjenska ljestivca bolesnikovih tegoba ESSPRI

Sastoji se od tri brojčane dimenzije (suhoća, bol i somatski umor) koje se ocjenjuju od 0 – 10 dajući ukupni zbroj (score) od maksimalno 30 bodova, pri čemu viši score odražava izraženije tegobe.

	Nema									**Izrazito**
1.**Suhoća**	(1	2	3	4	5	6	7	8	9	10)
2. **Bol**	(1	2	3	4	5	6	7	8	9	10)
3. **Somatski umor**	(1	2	3	4	5	6	7	8	9	10)

Ukupni ESSPRI zbroj: minimalno do maksimalno 30

Preuzeto od Seror 2011.

Prilog 4. Modificirana samoocjenska ljestivca subjektivnih bolesnikovih tegoba 6-items-VAS-SS

Sastoji se od šest domena koje se ocjenjuju od 0 – 10 dajući ukupni zbroj (score) od maksimalno 60 bodova, pri čemu viši broj bodova (score) odražava izraženije tegobe.

	Nema									**Izrazito**
1.**Suhoća**	(1	2	3	4	5	6	7	8	9	10)
2. **Artralgije**	(1	2	3	4	5	6	7	8	9	10)
3. **Mialgije**	(1	2	3	4	5	6	7	8	9	10)
4. **Parestezije**	(1	2	3	4	5	6	7	8	9	10)
5. **Somatski umor**	(1	2	3	4	5	6	7	8	9	10)
3. **Mentalni umor**	(1	2	3	4	5	6	7	8	9	10)

6-items-VAS-SS zbroj: minimalno 0 do maksimalno 60

Prilog 5. **Beck-ova ljestvica depresije** (prema *engl. Beck Depression Inventory*, *BDI*) (Beck, 1996)

Ovaj se upitnik sastoji od tvrdnji raspoređenih u skupine. Pročitajte pozorno svaku skupinu. Zatim u svakoj od njih odaberite tvrdnju koja najbolje opisuje kako ste se osjećali dva tjedna, uključujući i današnji dan! Zaokružite broj tvrdnje koju ste izabrali. Ako Vam se prikladnim čini više od jedne tvrdnje, možete zaokružiti više brojeva.

A.
0 Ne osjećam se tužno
1 Osjećam se tužno većinu vremena
2 Osjećam se tužno cijelo vrijeme i ne mogu se trgnuti iz toga
3 Nepodnošljivo sam tužna i nesretna

B.
0 Nisam zabrinuta za svoju budućnost
1 Zabrinutija sam za budućnost nego inače
2 Osjećam da se nemam čemu veseliti
3 Osjećam da mi je budućnost beznadna i da se stvari ne mogu popraviti

C.
0 Osjećam se uspješnom osobom
1 Osjećam se neuspješnijim od prosječnog čovjeka
2 Kada pogledam unatrag vlastiti život, vidim mnogo neuspjeha
3 Kao osoba osjećam se kao potpuni promašaj

D.
0 Osjećam zadovoljstvo u svemu kao i ranije
1 Ne uživam više u nekim stvarima kao ranije
2 Većina stvari više mi ne donosi pravo zadovoljstvo
3 Ništa mi ne može pričiniti zadovoljstvo i sve mi je dosadno

E.
0 Ne osjećam krivicu za neke stvari / događaje
1 Dobar di ovremena osjećam krivicu za neke stvari / događaje
2 Većinom se osjećam krivom za neke stvari / događaje
3 Cijelo vrijeme osjećam se kriva za neke stvari / događaje

F.
0 Ne osjećam se kažnjena
1 Osjećam da sam možda kažnjena
2 Očekujem da bi mogla biti kažnjena
3 Osjećam da mi je ovo kazna

G.
0 Nisam razočarana sobom
1 Izgubila sam samopouzdanje
2 Razočarana sam sobom
3 Mrzim sebe

H.
0 Ne kritiziram sebe i ne sramim se više nego inače
1 Kritičnija sam prema sebi nego inače
2 Kritiziram sebe za sve svoje pogreške
3 Sramim se za sve loše što mi se događa

I.	0	Nikad ne pomišljam na samoubojstvo
	1	Pomišljam na samoubojstvo, ali ne bih ga počinila
	2	Htjela bih se ubiti
	3	Ubila bih se, da imam priliku
J.	0	Ne plačem više nego obično
	1	Sada plačem više nego ranije
	2	Plačem za svaku sitnicu
	3	Ranije sam mogla plakati, ali sada više ne mogu plakati čak i kada to želim
K.	0	Ne osjećam nemir više nego ranije
	1	Nemirnija sam nego ranije
	2	Toliko sam uznemirena i agitirana da ne mogu mirno stajati
	3	Toliko sam nemirna ili agitirana da se stalno moram kretati ili nešto raditi
L.	0	Nisam izgubila zanimanje za druge ljude ili aktivnosti
	1	Drugi me ljudi i događaji zanimaju manje nego ranije
	2	Uglavnom sam uzgubila zanimanje za druge ljude ili događaje
	3	Namam interes ni za što
M.	0	Donosim odluke jednako dobro kao i ranije
	1	Odlažem donošenje odluka više nego ranije
	2	Puno teže donosim odluke nego inače
	3	Teško mi je donositi bilo kakve odluke
N.	0	Nemam problema u razgovorljivosti
	1	Nisam tako razgovorljiva kao ranije
	2	Značajno sam manje razgovorljiva nego inače
	3	Potpuno sam nerazgovorljiva
O.	0	Mogu raditi jednako dobro kao i ranije
	1	Mram uložiti dodatni napor da bih počela nešto raditi
	2	Moram se svakodnevno tjerati da nešto radim
	3	Uopće ne mogu ništa raditi
P.	0	Nemam nikakvih smetnji spavanja
	1a	Spavam ponekad više nego inače ili
	1b	Spavam ponekad manje nego inače
	2a	Spavam puno više nego inače ili
	2b	Spavam puno manje nego inače
	3a	Spavam većinu dana ili
	3b	Budim se 1-2 sata ranije i ne mogu više spavati
Q.	0	Nisam mnogo smršavila – ako sam uopće smršavila
	1	Izgubila sam više od 2 kg
	2	Izgubila sam više od 5 kg
	3	Smršavila sam više od 7 kg

R. 0 Nemam promjene apetita
1a Apetit mi je ponekad slabiji nego inače
1b Apetit mi je ponekad veći nego inače
2a Apetiti mi je puno slabiji nego inače
2b Apetit mi je puno veći nego inače
3a Uopće nemam apetit
3b Stalno jedem

S. 0 Zdravlje me ne zabrinjava više nego obično
1 Brinem zbog fizioloških smetnji kao što su bolovi, nervoz aželuca ili zatvor
2 Vrlo sam zabrinuta zbog zdravstvenih problema i teško mi je razmišljati o drugim stvarima
3 Tako sam zabrinuta zbog zdravstvenih problema da više ne mogu ni o čemu drugom razmišljati

T. 0 Ne umaram se više nego obično
1 Umaram se lakše nego prije
2 Ako bilo što radim, umorim se
3 Preumorna sam da bih bilo što radila

U. 0 Nisam primijetila promjene u mom zanimanju za seks
1 Seks me zanima manje nego ranije
2 Jako sam izgubila zanimanje za seks
3 Potpuno sam izgubila zanimanje za seks

Ukupno 1-10:
Ukupno 11-21:
SVEUKUPNO 1-21:

Prosječni rezultati:

a) Nema depresije	0-11 bodova
b) Blaga depresija	12-19 bodova
c) Umjerena depresija	20-26 bodova
d) Teška depresija	27-63 bodova

A. Poremćaj raspoloženja
B. Gubitak nade
C. Osjećaj odbačenosti
D. Nesposobnost za uživanje
E. Osjećaj krivice
F. Potreba za kaznom
G. Mržnja prema sebi
H. Samoosuđivanje
I. Sklonost samoubojstvu
J. Plačljivost
K. Razdražljivost
L. Poremećaj u odnosu s drugim ljudima
M. Neodlučnost
N. Negativna slika o sebi
O. Nesposobnost za rad
P. Poremećaj sna
Q. Mršavljenje
R. Poremećaj apetita
T. Hipohondrija
U. Gubitak libida

Prilog 6: Vizualna analogna ljestvica (prema engl. Visual analogue scale) (Prema Pai 2001)

Koliki je intenzitet vaših tegoba (suhoće, boli, tjelesnog umora, trnjenja u rukama i nogama, bolova u zglobovima i mišićima) u protekla 2 tjedna.

Nema **Izrazito**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Prilog 7. **Profil umora (prema engl. Profile of Fatigue, PROF)**

PROF ljestvica koristi se za mjerenje umora u primarnom Sjögrenovom sindromu, a izvedena je od PROFAD ljestvice:

Domene i aspekti umora u zadnja dva tjedna:

Domena	**Aspekt**	**Fraze aspekta**	**Ocjena (0-7)**
Somatski umor	**1.Potreba za odmorom**	Potreba za odmorom, iscrpljenost, potreba za snom	
	2.Inertnost	Inertnost, anhedonija, dodatni napor, borba sa samim sobom	
	3.Smanjena izdržljivost	Smanjena izdržljivost, brzo umaranje, gubitak snage	
	4.Mišićna slabost	Manjak snage, mišićna slabost	
Mentalni umor	**5.Smetnje koncentracije**	Zaboravljivost, pravi greške	
	6.Smetnje pamćenja		
UKUPNO			

Preuzeto prevedeno prema Bowman 2004.

Prilog 8. Empirijski utvrđeni uvjeti umnažanja pojedinih DNA ulomaka metodom PCR

Gen-alel	Početna denaturacija T ºC / t‘	Broj ciklusa	Denaturacija T ºC / t’	Vezanje početnica T ºC / t’	Sinteza novog lanca T ºC / t’	Završna sinteza T ºC / t’
5-HTT						
5-HTTLPR PCR	94ºC - 2’	35	94ºC – 1’	66ºC–20’’	72ºC–3’	72ºC–4’
5-HTTin2 PCR	94ºC - 5’	35	94ºC – 30’’	60ºC–20’’	72ºC–3’	72ºC–5’
5-HTTLPR L_AL_G PCR-RFLP	94ºC -3’	35	94ºC – 20’’	55ºC–20’’	72ºC–3’	72ºC–5’
	94ºC – 3’	35	94ºC – 20’’	55ºC–20’’	72ºC–3’	72ºC–5’
5-HTT						
5-HTTLPR	94ºC - 2’	35	94ºC – 1’	66ºC–20’’	72ºC–3’	72ºC–4’
5-HTTin2	94ºC - 5’	35	94ºC – 30’’	60ºC–20’’	72ºC–3’	72ºC–5’

Prilog 9. Specifične početnice i probe za analizu gena 5-HTT i DAT, očekivani produkti PCR i veličine restrikcijskih ulomaka

Gen alel	Nukleotidni slijed početnica i proba	PCR produkt (pb)	Restrikcijski enzimi	Restrikcijski ulomci (pb)
5-HTT				
Stin2 l/s				
PCR				
	f 5'-GTCAGTATCACAGGCTGCGAG-3'	l - 420		
	r 5'-TGTTCCTAGTCTTACGCCAGTG-3'	s - 375		
5-HTT L/S				
PCR				
	f 5'- ATGCCAG CACCTAACCCCTAATGT-3'	L (12) - 300		
	r 5'-GGACCG CAAGGTGGGCGGGA-3'	S (10) – 267, S (9) – 250		
5-HTTLPR L_AL_G				
PCR-RFLP				
	f 5'-ggCgTTgCCgCTCTgAATgC-3'	S - 486	Msp1	L_A - 340, 127, 62
	r 5'-gAgggACTgAgCTggACAACCAC -3'	L -529		L_G - 174, 166, 127, 62
		S_A - 297, 127, 62		S_G - 166, 131, 127, 62
5-HTTLPR L_A L_G				
realtime PCR (Taqman)				
	f 5'- GCAACCTCCCAGCAACTCCCTGTA-3'			
	r 5'- GAGGTGCAGGGGGATGCTGGAA-3'			
	L_A FAM-CCCCCCTGCACCCCCaGCATCCC-NFQ			
5-HTTLPR - sekvencioniranje				
	f 5'- GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3'			
	r 5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC -3'			

ŽIVOTOPIS

Helena Šarac rođena je 1968. godine u Šibeniku, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet upisala je u Zagrebu 1986/1987 godine, a diplomirala 1992. godine. 1993.godine upisuje dvogodišnji poslijediplomski studij Socijalne psihijatrije, a 2003. godine i doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, područje neuroznanost. Obvezni pripravnički staž obavila je u KBC Zagreb 1993.godine i iste godine zaposlila na mjestu stručnog suradnika na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u Odjelu za informiranje i istraživanje koji surađuje s Ministarstvom zdravstva RH. Kao stručni suradnik tijekom 8 godina koordinirala je i vodila desetke međunarodnih i domaćih projekata iz područja socijalne psihijatrije i psihosocijalne pomoći do 2001.godine i istivremeno se educira u zemlji i inozemstvu iz područja zdravstvenog menađmenta u svjetskim institucijama kao što su Harvard School of Public Health u Bostonu i profesionalna edukacija pri Vijeću Europe u Strasbourgu. Od 1999.godine pozvana je na dužnost ravnateljice Poliklinike „Neuron“ na Hrvatskom Institutu za istraživanje mozga u Zagrebu, koju je obavljala tijekom 9 godina i istovremeno 2004.god. započinje specijalizaciju iz neurologije u KBC Zagreb. Specijalistički ispit iz neurologije je položila 2008.godine, a potom radi kao specijalist neurologije u Poliklinici „Neuron“ Hrvatskog Instituta za istraživanje mozga. Početkom 2011.god. zapošljava se u Klinici za neurologiju KBC Zagreb, u Odjelu za heredodegenerativne bolesti Zavoda za poremećaje pokreta. Od 2009. izabrana je u nastavno zvanje viši predavač iz neurologije na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu. Objavila je 12 znanstvenih radova, 8 navodi Current Contents baza, u 6 radova je prvi autor, a ističu se vodeći časopisi iz područja neuroimunologije Journal of Neuroimmunology i Journal of Rheumatology. Odradila je više pozivnih predavanja na različitim svjetskim znanstvenim skupovima, osobito iz područja serotonergičke neurotransmisije u Americi i Kini. Član je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog društva za neuroznanost, Hrvatskog neurološkog društva i Europskog neurološkog društva.

PUBLIKACIJE

A. Članci indeksirani u Current Contents:

1. **Sarac H**, Markeljevic J, Mokrovic G, Erdeljic V, Nada Bozina e, Lipa Cicin-Sain. Platelet serotonin in primary Sjögren's syndrome: Level and relation with disease activity. J Neuroimmunol 251 (2012) 87–89.

2. **Šarac H**, Neven Henigsberg, Jasenka Markeljević, Goran Pavliša, Patric R Hof[5], Goran Šimić. Fragile X-premutation tremor/ataxia syndrome (FXTA) in a young woman: clinical, genetics, MRI and ^{1}H-MR spectrocopy correlates, Coll. Antropol.35 (2011) Suppl.1:327-332.

3. **Šarac H**, Telarović S, J Markeljević, B Perić, Pavliša G, Radoš M, Symptomatic cappilary telangiectasia of the pons and intracerebral developmental venous anomaly: a rare association, Coll. Antropol.35 (2011) Suppl.1:333-338.

4. Telarović S**, Šarac H,** Žagar M, Markeljevic J, Vranješ D, Radoš Ma. Coexistence of intradural spinal arteriovenous malformation and other developmental anomalies: report of two cases. Coll. Antropol.35 (2011) Suppl.1:319-325.

5. Markeljević J, **Šarac H**, Henigsberg N, Radoš Ma. Tremor, seizures, and psychosis as presenting symptoms in a patient with chronic lyme neuroborreliosis (LNB), Coll. Antropol.35 (2011) Suppl.1:313-318.

6. **Šarac H**, Žagar M, Vranješ D, Henigsberg N, Bilić E, Pavliša G, MR Imaging and Spectroscopy in a Patient with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia, Coll. Antropl. 32 (2008) Suppl. 1:205-210.

7. **Šarac H**, Hajnšek S, Bašić S, Henigsberg N, Radoš Ma, Šimić G, Magnetic Resonance Spectroscopy and Measurement of Tau Epitopes of Auropsy Proven Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease in a Patient with Non-Specific initial EEG, MRI and Negative 14-3-3-Immunoblot, Coll. Antropl. 32 (2008) Suppl. 1:199-204.

8. **Šarac H,** Markeljević J, Erdeljić V, Josipović-Jelić Z, Hajnšek T, Klapan T, Batinica M, Baršić I, Sertić J and Renata Dobrila Dintinjana. Signal hyperintensities on brain MRI in patients with primary Sjögren's syndrome and frequent episodic tension-type headache: relation with platelet serotonin level and disease activitiy. J Rheumatol 2013;40:August. In press.

B. Članci indeksirani u drugim bazama:

1. **Šarac H,** Hajnšek S, Bašić S, Telarović S, Markeljević J, Vukić M, Radoš M, Bošnjak-Pašić M, Žarković K. Giant cavernoma of the skull and skeletal-extraskeletal angiomatosis associated with paraproteinemia. Translational neuroscienece 2011;2(3):265-269.

2. Šimić G, Boban M, **Šarac H**, Grbić K, Hof PR, Hamann C, Ackl N, Bader B, Danek A, (2007) CSF tau proteins in evaluation of patoents with suspected dementia. In: New Trends in Alzheimer and Parkinson related disorders .APDP 2007. Medimond, Bologna, pp. 239-243. (Conference Proceedings Citation Index-Thomson Reuters, Philadelphia).

3. Boban M, **Šarac H,** Mimica N, Mladinov M, Susmair C, Ackl N, Bader B, Huzak M, Danek A, Hif P, Šimić G. CSF tau proteins in differential diagnosis od dementia// Translational Neuroscience 1 (2010), 1;43-48.

4. Telarović S, **Šarac H.** Hereditarni i sekundarni sindrom nemirnih nogu u bolesnika sa sideropeničnom anemijom. Neurol Croat 2011;60(1):35-41.