

# Spolni hormoni i aktivnost bolesti u sistemskoj sklerozu i sistemskom eritemskom lupusu u postmenopausalnih žena

---

**Perković, Dijana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2015**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:909631>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-02**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Dijana Perković**

**SPOLNI HORMONI I AKTIVNOST BOLESTI U SISTEMSKOJ  
SKLEROZI I SISTEMSKOM ERITEMSKOM LUPUSU U POST-  
MENOPAUZALNIH ŽENA**

**Doktorska disertacija**

**U Splitu, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Dijana Perković**

**SPOLNI HORMONI I AKTIVNOST BOLESTI U SISTEMSKOJ  
SKLEROZI I SISTEMSKOM ERITEMSKOM LUPUSU U POST-  
MENOPAUZALNIH ŽENA**

**Doktorska disertacija**

**Mentor:**

**prof. dr. sc. Dušanka Martinović Kaliterna**

**U Splitu, 2015.**

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za reumatologiju i kliničku imunologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Split pod mentorstvom prof. dr. sc. Dušanke Martinović Kaliterne.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Dušanki Martinović Kaliterni na svesrdnoj pomoći i podršci. Zahvaljujem svim suradnicima na pomoći i strpljenju te obitelji na podršci.

Ovaj rad posvećujem ocu Filipu.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Sistemska skleroza .....	1
1.1.1. Patogeneza .....	2
1.1.1.1. Imunološki poremećaji u patogenezi SSc-e .....	3
1.1.1.2. Vaskularni poremećaji u patogenezi SSc-e .....	4
1.1.1.3. Mehanizam fibroze u SSc-i .....	5
1.1.2. Kliničke manifestacije SSc-e.....	6
1.1.2.1. Kožne i krvožilne promjene .....	6
1.1.2.2. Promjene unutarnjih organa .....	7
1.1.3. Serološki pokazatelji SSc-e .....	8
1.1.4. Liječenje .....	9
1.1.4.1. Simptomatsko liječenje .....	9
1.1.4.2. Liječenje digitalne vaskulopatije .....	9
1.1.4.3. Liječenje PAH.....	9
1.1.4.4. Liječenje fibrozirajućeg alveolitisa/plućne fibroze .....	10
1.1.4.5. Liječenje bubrežne krize.....	10
1.1.4.6. Eksperimentalno liječenje.....	10
1.2. Sistemski eritemski lupus.....	10
1.2.1. Etiopatogeneza .....	11
1.2.1.1. Prirođena osjetljivost.....	11
1.2.1.2. Vanjski čimbenici .....	12
1.2.1.3. Autoimuni odgovor.....	12
1.2.2. Serološki pokazatelji-autoprotutijela.....	13
1.2.3. Kliničke manifestacije SLE-a.....	15
1.2.3.1. Konstitucijske promjene .....	15
1.2.3.2. Koštanomišićne i kožne manifestacije.....	15
1.2.3.3. Bubrežne promjene.....	16
1.2.3.4. Plućne promjene.....	16
1.2.3.5. Kardiovaskularni poremećaji .....	16

1.2.3.6. Neuropsihijatrijski poremećaji .....	17
1.2.3.7. Gastrointestinalni poremećaji.....	18
1.2.3.8. Hematološki poremećaji .....	18
1.2.4. Liječenje .....	18
1.2.4.1. Biološka i eksperimentalna terapija u SLE-u.....	20
1.3. Upalne reumatske bolesti i spolni hormoni .....	21
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	25
2.1. Ustroj i ishod istraživanja.....	25
3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA .....	27
3.1. Ispitanici .....	27
3.2. Postupci .....	32
3.2.1. Mjerenje spolnih hormona u serumu .....	32
3.2.2. Mjerenje autoprotutijela u serumu .....	32
3.2.4. Statistička obrada podataka .....	33
4. ETIČKA NAČELA .....	34
5. REZULTATI.....	35
5.1. Rezultati za SLE.....	36
5.2. Rezultati za SSc.....	39
5.3. Rezultati: usporedba istraživanih parametra između SLE, SSc i kontrole .....	44
6. RASPRAVA.....	47
7. ZAKLJUČAK .....	52
8. SAŽETAK.....	53
9. SUMMARY .....	55
10. POPIS LITERATURE .....	57
11. ŽIVOTOPIS .....	78

## POPIS KRATICA

SSc-sistemska skleroza

HLA-humani leukocitni antigen

ANA-antinuklearna protutijela

DNA-deoksiribonukleinska kiselina

ACA-anticentromerna protutijela

anti-Sc170-protutijela na topoizomerazu I

PAH-plućna arterijska hipertenzija

IL-interleukin

TGF-transformirajući faktor rasta

GvH-graft-vs-host

GvHD-graft-vs-host bolest

CMV-citomegalovirus

EBV-Epstein-Barr virus

PDGE-trombocitni faktor rasta

mRNA-glasnička ribonukleinska kiselina

TNF-tumor nekrotizirajući faktor

EGF-epidermalni faktor rasta

dSSc-difuzna SSc

ISSc-lokalizirana SSc

CREST-kalcinoza, Raynaud-ov sindrom, ezofagealna disfunkcija, sklerodaktilija, teleangiektazija

DLCO-difuzija ugljičnog monoksida

ACE-enzim angiotenzin konvertaze

U1 RNP-U1 ribonuklearni protein

IgG-imunoglobulin G

MMF-mikofenolat mofetil

ATG-antitimocitni globulin

SLE-Sistemska eritemski lupus

anti-dsDNA-protutijela protiv dvostruke uzvojnice DNA

anti-Sm-anti *Smith* protutijela

CTLA-4-citotoksični T limfocitni antigen

CTLA4-Ig-citotoksični T limfocitni antigen-imunoglobulin  
UV- ultravioletno zračenje  
snRNP-nuklearni ribonukleoprotein  
IFN- $\alpha$ -interferon-alfa  
TCR-T-stanični receptor  
BCR- B-stanični receptor  
RNP-ribonukleoprotein  
Anti-PL-antikardiolipinska protutijela  
NPSLE- neuropsihijatrijski SLE  
APS-antifosfolipidni sindrom  
CRP-C reaktivni protein  
NSAIDs-nesteroidni antireumatici  
LUMINA- *Lupus in Minorities: Nature versus Nurture* studija  
WHO-*World Health Organisation*  
GN-glomerulonefritis  
BlyS-B limfocitni stimulator  
DHEA-dihidroepiandrosteron  
DHEAS-dihidroepiandrosteron sulfat  
RA-reumatoidni artritis  
EUSTAR-*European Scleroderma Trial and Research*  
SLEDAI-*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*  
ACR-*American College of Rheumatology*  
RIA-radioimunoesej  
IIF-indirektna imunoflorescencija  
mRSS-modificirani Rodnan *skin* skor



# 1. UVOD

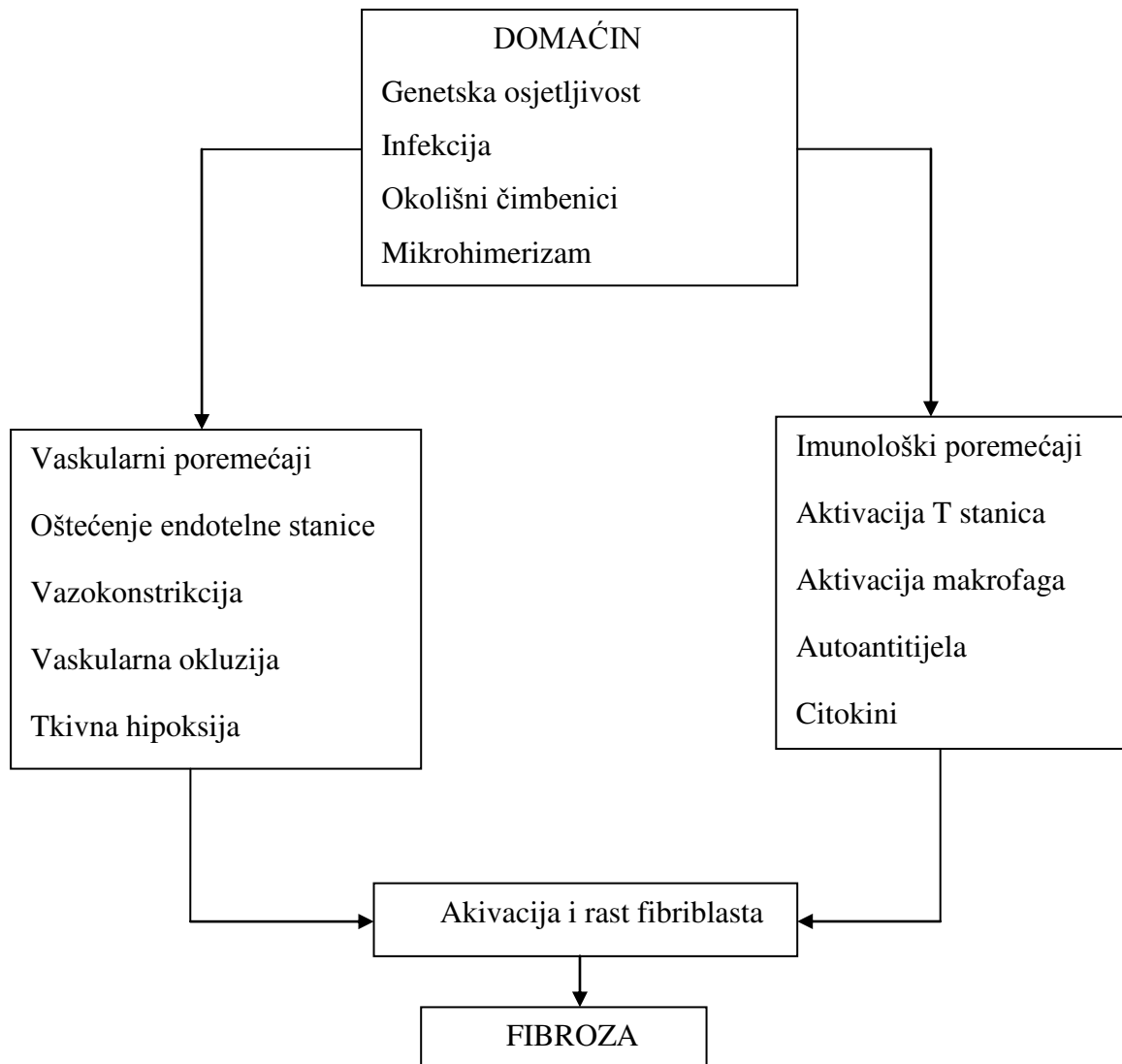
## 1.1. SISTEMSKA SKLEROZA

Sistemska skleroza (SSc) je bolest vezivnog tkiva obilježena imunološkim poremećajima, oštećenjem krvožilja te fibrozom kože i unutarnjih organa. Bolest je široko rasprostranjena i javlja se u svim rasama. Posljednjih desetljeća incidencija SSc-e se povećala s 2,7 na 18,7 novih slučajeva na million stanovnika. Češće se javlja u žena te je odnos žena i muškaraca 4:1, no taj odnos je znatno veći (10:1) u generativnoj dobi žena (1). Najčešće se dijagnosticira u dobi od 30-te do 50-te godine života, dok je u djetinjstvu iznimno rijetka (2). Etiologija bolesti je još uvijek nepoznata, no sve veći je broj novih spoznaja o etiopatogenezi. Genetski čimbenici imaju važnu ulogu u podložnosti za SSc-u i kliničkim očitovanjima bolesti. Pozitivna obiteljska anamneza je značajan faktor rizika za nastanak bolesti.(3) Neka istraživanja su pokazala povezanost SSc humanim leukocitnim antigenom (HLA), uključujući HLA-DR1, DR2, DR3, DR5 i DR52(4,5). No, nijedan od ovih genetskih čimbenika nije dovoljan za nastanak bolesti. Stoga se smatra da dodatni učinak imaju okolišni čimbenici i epigenetske promjene (6,7). Okolišni čimbenici se mogu klasificirati kao profesionalni (silicij, organska otapala), infekcijski (bakterije, virusi) i neprofesionalni/neinfekcijski (lijekovi, pesticidi, slikoni). Način na koji ovi čimbenici utječu na razvoj bolesti u genetski predisponiranih osoba nije jasan (8). Više od 90% bolesnika sa SSc-om imaju pozitivna antinuklearna protutijela (ANA) u serumu. Neka od njih su visoko specifična za samu bolest dok su druga više vezana uz kliničke manifestacije bolesti. Visoko specifična protutijela u SSc pokazuju reakciju s topoizomerazom deoksiribonukleinske kiseline, ali je zanimljivo kako su ta ista protutijela prisutna u samo 30-40% bolesnika sa SSc-om (9). Anticentromerna protutijela (ACA) su učestalija u bolesnika s ograničenom (80-90%) SSc-om (10). Izuzetno rijetko se protutijela na topoizomerazu I (anti-Sc170) i ACA javljaju zajedno u istih bolesnika (11).

Kliničke manifestacije uključuju zadebljanje kože (skleroderma), Raynaud-ov sindrom, plućnu arterijsku hipertenziju (PAH), plućnu fibrozu, bubrežnu bolest te oštećenje ostalih visceralnih organa (1). Riječ je o rijetkoj bolesti koja je obilježena kliničkom heterogenošću, nepredvidljivim tijekom, visokom smrtnošću i rezistencijom na terapiju (12).

### 1.1.1. PATOGENEZA

Tri su ključna patogenetska momenta (slika 1) u razvoju SSc-e: imunološki poremećaji, obliterirajuća mikrovaskulopatija i progresivna fibroza organa (13).



Slika1. Patogeneza sistemske skleroze (13).

Dok su upala, mikrovaskulopatija i autoimuni procesi obilježje ranog stadija bolesti, progresivna fibroza organa je osnovni proces u kasnijem stadiju bolesti (13). Osnovni patofiziološki poremećaj je proliferacija fibroblasta te pretjerano stvaranje kolagena i ostalih proteina ekstracelularnog matriksa u zahvaćenom tkivu (14).

#### **1.1.1.1. Imunološki poremećaji u patogenezi SSc-e**

Imunološki sustav ima značajnu ulogu u patogenezi SSc-e. Ključna uloga pripada aktivaciji T limfocita na što upućuje infiltracija kože ovim stanicama na samom početku bolesti i povišena serumska razina CD4<sup>+</sup> T limfocita. Povećan je omjer CD4<sup>+</sup> naspram CD8<sup>+</sup> T limfocita (15,16). Pored toga, u SSc-i su utvrđene povišene razine interleukina (IL)-2, IL-4, IL-10, IL-13 i IL-17 koje stvaraju aktivirani T limfociti (17,18). IL-4 i transformirajući faktor rasta- $\beta$  (eng. *transforming growth factor* TGF- $\beta$ ) su temeljni fibrogenički citokini u SSc-i. IL-4 povećava sintezu kolagena u fibroblastima i inducira stvaranje TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  stimulira stvaranje kolagena, proteoglikana i fibronektina te inhibira razgradnju ekstracelularnog matriksa. U perifernoj krvi i koži bolesnika sa SSc-om je povišena razina i IL-17 porijeklom iz T limfocita (19,20). Dakle, T limfociti mogu potaknuti fibrozu putem citokina ili direktnim učinkom na fibroblaste (21). Osim aktivacije T limfocita postoje dokazi i o aktivaciji B limfocita u SSc-i. Na tu činjenicu upućuje hipergamaglobulinemija, prisutstvo protutijela i pojačana ekspresija CD-19 molekule B limfocita u perifernoj krvi (22). Poznato je da B limfociti stvaraju IL-6 i IL-10. Oba citokina mogu potaknuti Th2 imuni odgovor koji potiče sintezu kolagena. Uz to, IL-6 kao i TGF- $\beta$  nastali od aktiviranih B limfocita mogu direktno inducirati tkivnu fibrozu u bolesnika sa SSc-om. B limfociti, za sintezu protutijela na DNA topoisomerasu I, a vjerovatno i ostalih protutijela u SSc-i trebaju T limfocite. Nakupljanje B limfocita u koži također može ovisiti o T limfocitima. To podržava hipotezu da je interreakcija T i B limfocita veoma važna u patogenezi SSc-e, dok uloga protutijela unatoč učestalosti pojavnosti nije jasna (21).

Novije spoznaje upućuju na sve veće značenje mikrohimerizma u podlozi SSc-e. Alogeničke stanice majke i djeteta za vrijeme trudnoće prolaze kroz placentu. U cirkulaciji i tkivima perzistiraju kao rezultat HLA II (DRB1) podudarnosti majke i djeteta. U cirkulaciji djeteta izolirane su mikrokimerične stanice majčinog porijekla što bi moglo objasniti pojavu SSc-e u nulipara i muškaraca. Određena zbivanja mogu aktivirati ove (mikrokimerične) stanice i započeti graft-vs-host (GvH) reakciju usmjerenu prema majci ili djetetu što se može

očitovati kao SSc-a. Značajna klinička, histopatološka i serološka sličnost GvH bolesti (GvHD) sa SSc-om podržava ovu hipotezu (23). Naime, oko 30% bolesnika kojima je presađena koštana srž imaju kožne promjene kakve se vide u bolesnika sa SSc-om (24). U dijela ovih bolesnika se razvija fibroza pluća, probavnog sustava, zglobova i mišića, Raynaud-ov fenomen te krvožilne promjene (primjerice fibrozna proliferacija intime bubrežnih arterija). Konačno, u oko 80% bolesnika s presađenom koštanom srži su nađena ANA. No, neke značajke SSc-e i humane GvHD su različite. Iako se u mnogih bolesnika s GvHD nalaze ANA, zanemarivo malen broj ih stvara protutijela na centromeru ili topoizomerazu I. Također u GvHD se bilježi značajno manja učestalost vaskularnih promjena i zahvaćenosti unutarnjih organa. Konačno, upala i fibroza u GvHD-reakciji počinju ispod epidermisa i napreduju prema subkutanom tkivu, dok kod SSc-e počinju u donjem dermisu i napreduju prema epidermisu (25).

Kao mogući pokretač imunoloških poremećaja SSc-e u genetski predisponiranih osoba pored okolišnih čimbenika i mikrokimerizma navodi se i infekcija. Homologija između virusa i određenih autoprotutijela upućuje da molekulska mimikrija može potaknuti stvaranje protutijela u bolestima s difuznim krvožilnim poremećajima uključujući SSc-u. Nadalje, endotelne stanice mogu biti inficirane virusima ili bakterijama te, uslijed direktnog oštećenja ili pokretanjem imunološkog sustava, inducirati pojavu vaskulitisa. Uloga infekcije u patogenezi SSc-e uključuje molekulska mimikriju, oštećenje endotelnih stanica, postojanje superantigena i mikrokimerizam (26,27). Najčešće spominjani uzročni agensi su citomegalovirus (CMV), Parvovirus B19, Epstein-Barr virus (EBV) i retrovirusi, a novija istraživanja ukazuju i na *Helicobacter pylori* (28,29).

### **1.1.1.2. Vaskularni poremećaji u patogenezi SSc-e**

Vaskularno oštećenje se nalazi u svih bolesnika sa SSc-om i vjeruje se da prethodi fibrozi (30). Promjene se mogu vidjeti na malim arterijama, arteriolama i kapilarama kože, probavnog sustava, bubrega, srca i pluća. Drži se da se promjene endotelnih stanica i bazalne membrane javljaju u samim početcima bolesti. Slijedi je proliferacija intime i glatkih mišića te odlaganje ekstracelularnog matriksa i perivaskularna fibroza. Ove promjene dovode do obliteracije krvnih žila s posljedičnom ishemijom tj. hipoksijom (31). Oksidativni stres zbog pretjeranog stvaranja slobodnih kisikovih radikala doprinosi tkivnom oštećenju u SSc-i te djeluje kao snažan stimulans stvaranja kolagena i fibrinogeneze (32,33). Stoga je moguće da

je fibroza uslijed kronične cirkulatorne insuficijencije i oštećenja tkiva dio obnavljajućeg procesa (34).

U serumu bolesnika sa SSc-om mogu se naći povišene razine faktora VIII/von Willebrandt-ova faktora,  $\beta$ -tromboglobulina i tkivnog aktivatora plazminogena (35). Ujedno su opažene smanjene vrijednosti trombocitnog serotonina i povećanje agregabilnosti trombocita inducirane serotoninom. Ove promjene odražavaju endotelno oštećenje ali i regeneraciju (36). Aktiviran je sustav zgrušavanja i pojačano stvaranje trombina što zajedno s opisanim vaskularnim promjenama doprinosi procesu fibroze. Naime, trombin potiče aktivaciju trombocita koji oslobađaju trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor*-PDGF), TGF- $\beta$  i serotonin koji potiču fibrozu i stvaranje ekstracelularnog matriksa (37). Spoznaja da je u velike većine bolesnika inicijalni simptom Raynaud-ov fenomen te da prethodi zadebljanju kože govori u prilog mogućnosti da ozljeda endotela i posljedična krvožilna insuficijencija vode u fibrozu kože (38,39). Naime, fibroza intime digitalnih arterija nađena je u svih bolesnika sa SSc-om, a fibroza adventicije u velike većine (40,41).

### **1.1.1.3. Mehanizam fibroze u SSc-i**

Fibroza u SSc-i je kompleksni poremećaj obilježen prekomjernim stvaranjem kolagena (42,43). U procesu fibroze normalna arhitektura vezivnog tkiva je zamjenjena s obilnim acelularnim kolagenom bogatim vezivom što dovodi do gubitka funkcionalne cjelovitosti zahvaćenog tkiva. Biokemijska analiza upućuje na nagomilavanje fibrilarnog kolagena (tip I i tip III), tipa V i VII kolagena i fibrila elastina. Ujedno je povišena razina lizil hidroksilaze i lizil oksidaze koje kataliziraju posttranslacijsku modulaciju kolagena (44). Serum bolesnika s aktivnom SSc-om sadržava povišenu razinu aminopropeptida prokolagena, produkta koji nastaje kada iz prokolagena nastaje kolagen (45).

Ključnu ulogu u nastanku fibroze imaju fibroblasti čiju aktivaciju potiče TGF- $\beta$  (46). Utvrđeno je da fibroblasti iz kože bolesnika sa SSc-om *in vitro* pokazuju veću količinu glasničke ribonukleinske kiseline (mRNA) za prokolagen tipa I i III te da stvaraju povećane količine kolagena, fibronektina i hijaluronske kiseline (42,47). Štoviše, fibroblasti u SSc-i stvaraju citokine i kemokine te pokazuju spontanu transdiferencijaciju u miofibroblaste (12). Nedavna istraživanja su pokazala da fibrociti i monociti mogu iz koštane srži doći u oštećeno tkivo te se „*in situ*“ diferencirati u aktivirane fibroblaste i miofibroblaste. Nefibrotičke stanice kao što su endotelne, epitelne stanice i adipociti se također mogu diferencirati u fibro i

miofibroblaste. Jedan od ključnih čimbenika u procesu diferencijacije i aktivacije je već spomenuti TGF- $\beta$  te se može reći da je TGF- $\beta$  temeljni citokin za sintezu vezivnog tkiva, kako u fiziološkom ciljeljenju tako i u patološkoj fibrozi (48-50).

Pored TGF- $\beta$ , rast fibroblasta može potaknuti PDGF, IL1, tumor nekrotizirajući faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i epidermalni čimbenik rasta (engl. *epidermal growth factor*–EGF) (51-53). Konačno, unutarstanične promjene fibroblasta u SSc-i, perzistentna aktivacija, hipoksija i mehaničke ozljede, funkcijski deficit endogenih supresora diferencijacije fibroblasta i stvaranja kolagena doprinose progresivnoj fibrozi te imaju značajnu ulogu u patogenezi SSc-e (54).

Značajnu ulogu u nastanku fibroze imaju i čimbenici koji se oslobađaju iz upalnih stanica. Naime, aktivirani T limfociti mogu se naći u koži bolesnika u ranim stadijima bolesti, a razine citokina u serumu bolesnika su značajno veće nego u kontrolnoj skupini (55).

Istraživanje Jelasko i suradnika je pokazalo povećanu proliferaciju i kapacitet stvaranja kolagena fibroblasta izloženih serumu bolesnika sa SSc-om. Ovi podatci govore u prilog tezi da neki čimbenici iz seruma bolesnika potiču rast fibroblasta koji imaju povećan kapacitet stvaranja kolagena (56).

### **1.1.2. Kliničke manifestacije SSc-e**

SSc-a je heterogena bolest koja se očituje različitim kliničkim manifestacijama. Temeljno obilježje bolesti su Rynaud-ov sindrom i zadebljanje kože (skleroderma). Zahvaćenost unutarnjih organa je povezana s prognozom bolesti odnosno preživljenjem. Plućna fibroza i PAH su najčešći uzroci smrtnosti u SSc-i (57).

#### **1.1.2.1. Kožne i krvožilne promjene**

U ranoj fazi bolesti najčešće se može vidjeti otok prstiju i šaka. Promjene kože obično počinju na distalnom dijelu udova i šire se proksimalno. Koža je tvrda, zadebljana i čvrsto vezana za pripadajuće vezivno tkivo.

Najranija promjena je edem dermisa, potom dolazi do umnožavanja međustanične tvari. Napredovanje bolesti dovodi do umnažanja kolagena, atrofije epidermisa i gubitka kožnih adneksa. U difuznoj SSc-i (dSSc) promjene kože zahvaćaju lice i trup (58). Napetost kože prstiju rezultira fleksijskom kontrakturom, dok se na volarnim stranama prstiju i koštanim

izbočinama razvijaju ulceracije. U dijela bolesnika može doći do resorpcije terminalnih falangi. Istovremeno se pojavljuje otvrdnuće kože lica, nosa i usnica. Smanjuje se pokretljivost prsnog koša, sužava se usni otvor (*microstomia*) te dolazi do ušiljavanja nosa (59). U CREST sindromu (engl. *calcinosis, Raynaud' syndrome, esophageal malfunction, sclerodactylia, teleangiectasia*) koji je dio lokaliziranog oblika SSc-e (ISSc) često se nalaze potkožni kalcifikati (60). Raynaud-ov fenomen javlja se u većine bolesnika prije vidljivih kožnih promjena. Nastaje kao posljedica reverzibilnog spazma krvnih žila. Nakon izlaganja hladnoći prsti pobijele usljed vazospazma, potom postaju cijanotični zbog venske staze, a na kraju postaju crveni zbog reaktivne vazodilatacije. Fibroza stijenke krvnih žila dovodi do ishemije tkiva koja konačno uzrokuje ulceracije i akrolizu (61).

### **1.1.2.2. Promjene unutarnjih organa**

U dSSc-i se često javljaju promjene na unutarnjim organima (plućima, probavnom sustavu, bubrezima) te mišićnokoštanom sustavu. Ove promjene se opažaju u 80-90% bolesnika (62). Zahvaćenost mišića najčešće se očituje miopatijom, obično s normalnim vrijednostima kreatin fosfokinaze. Javlja se u oko 80% bolesnika. U dijela bolesnika razvija se klinička slika miozitisa sa slabošću proksimalnih mišića (63). Osim ograničene pokretljivosti zglobova zbog kožnih promjena, može se razviti i artritis, prvenstveno malih zglobova šaka (62,64).

Oštećenje plućne funkcije prisutno je u gotovo svih bolesnika sa SSc-om, ali najčešće bez simptoma. Napredovanjem bolesti razvija se difuzna intersticijska fibroza pluća te zadebljanje stijenki malih intrapulmonalnih krvnih žila. Klinički se očituje kratkoćom daha i neproduktivnim kašljem. U ovih bolesnika povećana je učestalost karcinoma alveolarnih stanica i bronhogenih karcinoma. U nekih bolesnika se razvija plućna hipertenzija s hipertrofijom i insuficijencijom desne klijetke (62,65). Sniženje difuzije ugljičnog monoksida (DLCO) je najraniji poremećaj plućne funkcije koji može pomoći u otkrivanju ovih promjena (66).

SSc-a može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava (67). Najčešće su promjene na jednjaku, a očituju se poremećajem motiliteta, refluksnim ezofagitisom, strikturama i dilatacijom jednjaka. Posljedica su atrofije stijenke jednjaka koja započinje u submukozi i mišićnom sloju. Klinički se očituju smetnjama gutanja i retrosternalnom boli. Zahvaćenost

tankog crijeva dovodi do smetnji pasaže s proljevima i opstipacijom te malapsorpcijom. Na debelom crijevu je česta divertikuloza i pseudoopstrukcija (68).

Bubrežne promjene u SSc-i su loš prognostički čimbenik, a najozbiljnija manifestacija je sklerodermijska bubrežna kriza koja je do otkrića inhibitora enzima angiotenzin konvertaze (ACE) bila vodeći uzrok smrti (69). Sklerodermijska bubrežna kriza manifestira se malignom hipertenzijom, zatajenjem bubrežne funkcije i mikroangiopatskom hemolitičkom anemijom (70). Veći rizik nastanka sklerodermijske bubrežne krize imaju bolesnici s brzim napredovanjem kožnih promjena, a udružena je s prisustvom protutijela usmjerenih na RNA polimerazu (71).

Osim hipertrofije desnog srca u sklopu plućnih promjena, u SSc su rijetka srčana očitovanja. Njačešća je fibroza miokarda s posljedičnim aritmijama, kongestivnim zatajenjem srca i rijetko kalcificirajućim perikarditisom (72).

### **1.1.3. Serološki pokazatelji SSc-e**

U 95% bolesnika sa SSc-om prisutna su antinuklearna protutijela među kojima najveću specifičnost imaju protutijela na topoizomerazu I i anticentromerna protutijela. Anti-Scl70 protutijela su usmjerena na jezgrin enzim DNA topoizomerazu I. Prisutna su u oko 20-40% bolesnika, a povezana su sa difuznim promjenama kože, zahvaćanjem unutarnjih organa i povećanom smrtnošću. Rijetko se nalaze u drugim bolestima (9,73,74). ACA su prisutna u približno 20-30% bolesnika sa SSc-om, povezana su sa CREST sindromom i ograničenim oblikom bolesti, a usmjerena su na proteinske antigene locirane u kinetokornoj regiji kromosoma (10). U SSc-i se mogu naći i druga antinuklearna protutijela kao anti-RNA polimeraza I koja se povezuju s većom učestalošću promjena na bubrežima i srcu, zatim anti-PM-Scl koja upućuju na pridruženi polimiozitis i bubrežnu bolest.

Anti-U3 nuklearna protutijela su češća u Afroamerikanaca, a povezuje ih sa zahvaćanjem skeletnih mišića i PAH dok su u bolesnika koji imaju značajke miješane bolesti vezivnog tkiva prisutna protutijela na U1 ribonuklearni protein (anti-U1 RNP) (11,75,76). Antiendotelna protutijela u SSc-i mogu potaknuti apoptozu endotelnih stanica (77).

U gotovo polovice bolesnika nalazi se hipergamaglobulinemija, pretežno imunoglobulina G (IgG), a u oko 25% bolesnika prisutan je reumatoidni faktor u niskom titru (78).



#### **1.1.4. Liječenje**

Liječenje SSc-e je kompleksno i zahtijeva rano utvrđivanje zahvaćenosti unutarnjih organa te identifikaciju bolesnika s rizikom progresivne bolesti (79). Unatoč brojnim kliničkim istraživanjima koji su doprinijeli novim spoznajama u liječenju SSc-e, još uvijek nije dostupna terapija koja značajnije mijenja tijek bolesti (80-86). Stoga je liječenje SSc-e usmjereno na tretiranje simptoma bolesti.

##### **1.1.4.1. Simptomatsko liječenje**

Nesteroidni antireumatici se često koriste za smanjivanje boli. Korist od upotrebe glukokortikoida je mala, a primjenjuju se u slučajevima pridruženog artritisa, miozitisa i pneumonitisa. U ranoj fazi difuzne bolesti primjena metotreksata može poboljšati kožne promjene (87).

##### **1.1.4.2. Liječenje digitalne vaskulopatije**

Atake Raynaud-ovog sindroma ponekad mogu odgovoriti na nifedipin ili druge blokatore kalcijjskih kanala dihidropirinske skupine (88). U bolesnika u kojih izostane učinak blokatora kalcijjskih kanala preporuča se primjena prostanoida (ilprost, cikaprost) (89,90). Randomizirana klinička ispitivanja pokazala su učinkovitost intravenskih prostanoida u cjeljenju digitalnih ulceracija (91). Antagonist endotelinskih receptora (bosentan) se primjenjuje u prevenciji recidiva digitalnih ulceracija, posebice u bolesnika s multiplim ulceracijama (92).

##### **1.1.4.3. Liječenje PAH**

Standardna terapija PAH uključuje diuretike, oralne antikoagulanse, kisik i glikozide. Intravenski prostanoid (epoprostanol) je u kliničkom ispitivanju doveo do poboljšanja podnošljivosti tjelesnog opterećenja, hemodinamskih pokazatelja i funkcionalnog statusa (93). Bosentan, pored poboljšanja funkcionalnog stanja, povećava preživljavanje bolesnika s PAH te se preporuča za liječenje teških oblika ove komplikacije (94,95). U bolesnika s teškom PAH siladenfil u kombinaciji sa standardnom terapijom smanjuje masu desnog ventrikula, poboljšava kardijalnu funkciju i toleranciju tjelesnog opterećenja (96).

#### **1.1.4.4. Liječenje fibrozirajućeg alveolitisa/plućne fibroze**

U bolesnika s aktivnim alveolitom primjena ciklofosfamida u kombinaciji s glukokortikoidima može poboljšati ishod bolesti (97). Kombinacija ciklofosfamida s visokom dozom glukokortikoida učinkovitija je u odnosu na kombinaciju s malom dozom prednizona (98). Transplantacija pluća je moguća u strogo selekcioniranih bolesnika sa SSc-om s plućnom bolešću (99).

#### **1.1.4.5. Liječenje bubrežne krize**

U sklerodermijskoj bubrežnoj krizi ključna je primjena ACE inhibitora čak i nakon započinjanja liječenja hemodijalizom. Primjena ovih lijekova za vrijeme hemodijalize povećava mogućnost prekida nadomjesne bubrežne terapije (100).

#### **1.1.4.6. Eksperimentalno liječenje**

Manje studije su pokazale povoljne učinke primjene mikofenolat mofetila (MMF) i antitimocitnog globulina (ATG) na kožne promjene i progresiju sistemske bolesti (101). Autologna transplantacija matičnih hematopoetskih stanica pokazuje obećavajuće rezultate, no udružena je s toksičnošću i posljedičnom smrtnošću (102).

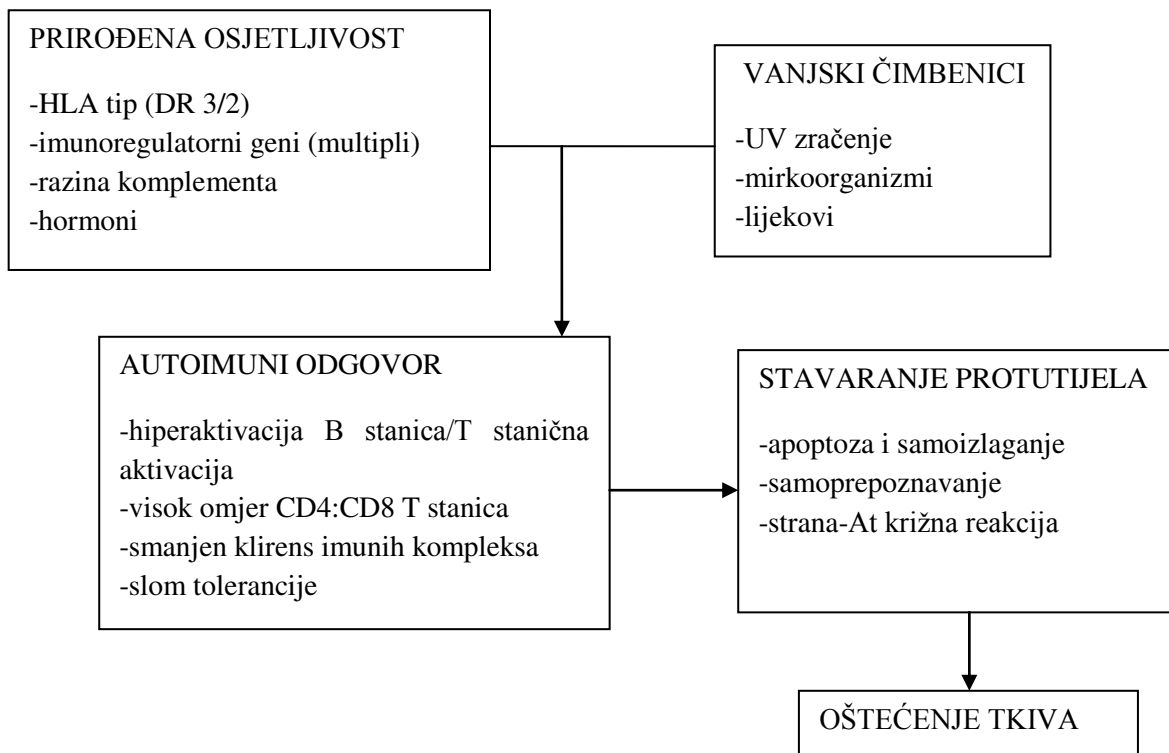
### **1.2. SISTEMSKI ERITEMSKI LUPUS**

Sistemska eritemski lupus (SLE) je kronična multisistemska autoimuna bolest sa širokim spektrom kliničkih manifestacija. Može zahvatiti bilo koji organski sustav. Tijek bolesti je nepredvidljiv te obilježen izmjenama pogoršanja i spontanijem remisijom (103,104). Karakteristično je stvaranje autoprotutijela na sastavnice stanične jezgre, citoplazme i membrane, ali i na cirkulirajuće proteine. Nastala autoprotutijela, uz imune komplekse, osnovni su patofiziološki supstrat odgovoran za aktivaciju sustava komplementa te upalni proces (105). U gotovo 95% bolesnika u serumu su prisutna ANA, a protutijela protiv dvostruke uzvojnice DNA (anti-dsDNA) i *Smith* protutijela (anti-Sm) su patognomonična za bolest i rijetko se nalaze u drugim stanjima (106). Autoprotutijela se mogu naći u cirkulaciji više godina prije ispoljavanja bolesti (107). Incidencija SLE-a varira od 2 do 7,6 na 100 000 stanovnika godišnje. Bolest se češće javlja u žena generativne dobi (15-35 godina), a odnos

žena i muškaraca je 9:1 (108). Uloga genetskih i okolišnih čimbenika važna je za nastanak SLE-a kao i za tijek bolesti (109,110). Dugoročna prognoza bolesti se značajno poboljšala posljednjih desetljeća zahvaljujući ranijem prepoznavanju bolesti i novim terapijskim dostignućima (111).

### 1.2.1. ETIOPATOGENEZA

Etiologija bolesti nije potpuno poznata. Neosporno je da značajnu ulogu u nastanku bolesti ima genetska predispozicija uz interakciju s okolišnim čimbenicima. Genetsku predispoziciju podržava činjenica o učestalijoj pojavi bolesti u jednojajčanih blizanaca (40% veći rizik) te u potomaka roditelja sa SLE-om (112,113).



Slika 2. Etiopatogeneza SLE-a: modificirano prema Mok CC, Lau CS; 2003 (114).

#### 1.2.1.1. Prirođena osjetljivost

Bolest je multigenetska i uključuje različite genske kombinacije. Poznato je najmanje 35 gena koji povećavaju rizik oboljevanja od SLE-a (112). Lupus je povezan s češćom pojavnosću određenih HLA poput HLA DR3 i HLA DR2 u odnosu na opću populaciju (115). Prirođeni nedostatak komplementa C1q, C4, C2 je udružen s povećanim rizikom od SLE-a

(116). Polimorfizam gena za Fcy receptore te citotoksični T limfocitni antigen (CTLA-4) također značajno povećavaju rizik od SLE-a (117). Uz navedene i brojni drugi geni sudjeluju u patogenezi SLE-a.

### **1.2.1.2. Vanjski čimbenici**

Bolesnici sa SLE-om imaju veći titar protutijela na EBV, veću količinu cirkulirajućih virusnih jedinica te pojačano stvaranje protutijela na retroviruse uključujući protutijela na proteine koji pokazuju homologiju s nuklearnim antigenima. Virusna infekcija dovodi do poremećaja na razini T stanica što rezultira poremećajem imunoregulacije B staničnog odgovora. Kronična infekcija može inducirati stvaranje anti-dsDNA protutijela i sindrom sličan lupusu (118). Manje je poznat učinak ostalih okolišnih čimbenika. Kao mogući rizični čimbenici spominju se kristali silicija, pušenje, lijekovi (119).

Neke studije su pokazale da primjena estrogena u postmenopauzalnih žena povećava rizik oboljevanja od SLE-a za razliku od dojenja koje smanjuje rizik (120). Nedvojbeno je pokazano da fotosenzitivnost potiče kožnu bolest. Ultravioletno zračenje (UV) stimulira keratinocite koji prekomjerno stvaraju nuklearni ribonukleoprotein (snRNP) na površini stanice te otpuštaju citokine koji stimuliraju stvaranje protutijela (121). Ritterhous i suradnici su pokazali da smanjene razine D vitamina povećavaju stvaranje protutijela u zdravih osoba, a također je povezano s pojačanom aktivnošću B stanica i interferona- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) u bolesnika sa SLE-om (122).

### **1.2.1.3. Autoimuni odgovor**

Poremećaj regulacije T stanica doprinosi autoimunom procesu u SLE-u. To se očituje smanjenjem broja T stanica u perifernoj krvi bolesnika sa SLE-om vjerovatno zbog prisustva anti-limfocitnih protutijela (123). Osim toga, dolazi do sloma imune tolerancije i patoloških promjena provođenja signala putem T-staničnih receptora (TCR) (124). Supresivna aktivnost CD8+ T stanica i „*natural killer*“ stanica je oštećena (125).

Poput T stanica, B stanice također pokazuju poremećaje funkcije. Broj B stanica u perifernoj krvi bolesnika sa SLE-om povećan je u svim stadijima aktivacije (126). Pokazano je da su fenotipski naivne B stanice nadomještene aktiviranim plazma stanicama koje nastaju uslijed abnormalne poliklonske diferencijacije i aktivacije B stanica. Stvaranje autoprotutijela

u SLE-u posredovano je procesima ovisnima i neovisnima o T stanicama. U središtu poremećaja B stanica je aberantni prijenos signala putem B-staničnog receptora (BCR) (127). Najvažniji citokini koji direktno ili indirektno sudjeluju u poremećenom imunom procesu u SLE-u su IL-2, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$ . Sinteza IL-2 je poremećena dijelom zbog oštećenja transkripcije što remeti funkciju T-stanica ovisnih o IL-2 kao što je proliferacija, diferencijacija i aktivacija inducirane smrti stanice (128). Stvaranje IFN- $\gamma$  u SLE-u je smanjeno. U aktivnoj bolesti IFN- $\alpha$  je glavni citokin te potiče ekspresiju gena reguliranih IFN-om (129,130).

Uloga IL-4 nije potpuno jasna u SLE-u, dok su povišene razine IL-6 i IL-10 povezane s povećanom aktivnošću bolesti. Smatra se da se ovaj učinak ostvaruje putem B stanica koje u bolesnika sa SLE-om imaju poremećen odgovor na IL-6 što se očituje povećanom ekspresijom IL-6 receptora na površini stanice (114).

Drži se da je poremećaj klirensa imunih kompleksa i apoptotičkih stanica ključno patogenetsko zbivanje u bolesnika sa SLE-om koje se povezuje sa smanjenjem broja i oštećenjem funkcije CR1 receptora za komplement. Oštećenje klirensa također može biti posljedica neadekvatne fagocitoze kompleksa koji sadrže IgG2 i IgG3 (131,132). Hermann i suradnici su pokazali da je fagocitoza apoptotičkih stanica oštećena u bolesnika sa SLE-om. Tijekom apoptoze dolazi do oslobađanja unutarstaničnog sadržaja u izvanstanično mikrookruženje, a njen poremećaj omogućava dostupnost sadržaja stanice imunološkom sustavu. Trajno cirkuliranje apoptotičkog materijala može inducirati autoreaktivne limfocite te poslužiti kao antigen za formiranje imunih kompleksa (133-135). Razlog oštećenja klirensa apoptotičkih stanica u SLE-u može biti rezultat kvantitativnog ili kvalitativnog defekta ranih komponenti komplementa kao što su C2, C4 ili C1q. Naime, bolesnici s homozigotnim deficitom određenih komponenti komplementa razvijaju teški lupusu sličan sindrom. C1q receptori na površini fagocita sačinjavaju sustav bitan za klirens apoptotičkih stanica (136). Oštećen klirens i povećane količine apoptotičkog materijala potiču stvaranje protutijela protiv nukleosoma koji sadrži histone i dsDNA (133).

### **1.2.2. Serološki pokazatelji-autoprotutijela**

Kao što je već spomenuto, osnovni imunološki poremećaj u bolesnika sa SLE-om je stvaranje protutijela. Ova protutijela su usmjerena na molekule koje su sastavni dio nukleusa, citoplazme i stanične površine, ali i na solubilne molekule poput IgG i faktora zgrušavanja.

ANA su prisutna u 95% bolesnika. Sadrže različite vrste protutijela usmjerenih na različite antigene koji uključuju DNA, histonske proteine, nukleosome (histon-DNA kompleks), centromerne proteine, ekstraktibilne nuklearne antigene [Sm, SSA (Ro), SSB (La), ribonukleoprotein (RNP)] (137).

Protutijela usmjeren na dsDNA i anti-Sm protutijela prisutna su samo u bolesnika sa SLE-om i uključena su u klasifikacijske kriterije SLE-a (138). Sm antigen je mali ribonukleoprotein i sastavni je dio uridinom bogate molekule RNA vezane u proteinima srži i ostalim proteinima udruženim s RNA molekulama. Anti-Sm protutijela vežu se na snRNP proteina srži. Anti-DNA protutijela vežu se na nukleinske kiseline prisutne u DNA. Titar anti-DNA protutijela mijenja se s vremenom i aktivnošću bolesti, dok se anti-Sm protutijela ne mijenjaju značajnije tijekom bolesti. Anti-DNA protutijela su povezana s glomerulonefritisom (139). Osim anti-DNA protutijela, povezanost s kliničkim očitovanjima bolesti pokazuju i druga prisutna protutijela. Anti-ribosomalna P protutijela su udružena s psihozom, a anti Ro protutijela s kongenitalnim srčanim blokom, subakutnim kožnim lupusom, serozitisom i hematološkim poremećajima. Anti-RNP protutijela su povezana s artritisom, Raynaud-ovim sindromom i zadebljanjem prstiju. Točan patogenetski mehanizam oštećenja uzrokovanog protutijelima, izuzev glomerulonefritisa, nije jasan (106).

Antikardiolipinska (anti-PL) protutijela prepoznaju anionske negativno nabijene fosfolipide uključujući kardiolipin, lupus antikoagulans, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol, fosfatidilglicerol i fosfatnu kiselinu (140).

Anti-PL protutijela su pozitivna u oko 30-40% bolesnika sa SLE-om, ali samo trećina njih razvija kliničku sliku antifosfolipidnog sindroma: venske i arterijske tromboze, rekurentne spontane pobačaje, trombocitopeniju, hemolitičku anemiju, livedo retikularis i kožne ulceracije. Uključena su i u razvoj cerebralne vaskularne bolesti te patogenezu fokalnih oštećenja u neuropsihijatrijskom SLE-u (NP SLE). Anti C1q protutijela su povezana sa smanjenjem klirensa apoptotičkih stanica. Naime, C1q je kationski glikoprotein kojega stvaraju makrofazi, monociti, dendritičke stanice, fibroblasti i epitelne stanice i vezna je molekula između apoptotičkog debrisa i makrofaga (141). Vezanjem za Fc fragment imunoglobulina u imunim kompleksima započinje aktivaciju komplementa klasičnim putem. Povišen titar anti-C1q protutijela obično je udružen s proliferativnim oblikom lopusnog nefritisa. Korisna su kao marker za praćenje aktivnosti SLE-a i progresiju bubrežne bolesti (142). Pored navedenih u SLE-u su prisutna brojna druga autoprotutijela koja se rijetko određuju i nije im jasno kliničko značenje.

### **1.2.3. Kliničke manifestacije SLE-a**

Pojava klasičnog trijasa koji uključuju vrućicu, osip i bolove u zglobovima u žena generativne dobi treba pobuditi sumnju na SLE. Bolest može započeti zahvaćenošću bilo kojeg organa tako da kliničke manifestacije uključuju konstitucijske, koštanomišićne, kožne, bubrežne, plućne, neuropsihijatrijske, gastrointestinalne, srčane i hematološke simptome.

#### **1.2.3.1. Konstitucijske promjene**

Umor, vrućica, bolovi u zglobovima i promjene težine su najčešći simptomi u bolesnika s novonastalim SLE-om ili pogoršanjem postojeće bolesti. Umor može biti uzrokovan aktivnom bolešću, lijekovima, načinom života, pridruženom fibromijalgijom ili afektivnim poremećajima. Umor i vrućica se obično javljaju zajedno s drugim kliničkim promjenama. Vrućica može biti znak aktivne bolesti, ali i pridružene infekcije te reakcije na lijekove. U bolesnika s aktivnom bolešću čest je gubitak težine dok se porast tjelesne težine može vidjeti uz terapiju glukokortikoidima te u nefrotskom sindromu.

#### **1.2.3.2. Koštanomišićne i kožne manifestacije**

U oko 90% bolesnika artritis i artralgie se javljaju kao prvi znak bolesti. Promjene mogu zahvatiti bilo koji zglob iako je za SLE karakterističan simetrični artritis malih zglobova šaka i koljena. Obično se radi o neerozivnom artritisu odnosno Jaccoud-ovoj artropatiji (143). Aseptička nekroza bedrene kosti u bolesnika sa SLE-om se javlja znatno češće nego u općoj populaciji. Često je posljedica glukokortikoidne terapije (144).

Tipična kožna promjena je “leptirasti” osip na licu, a mogu se javiti bulozne promjene kože te fotosenzitivni osip. Diskoidne promjene na izloženim dijelovima kože nalaze se u oko 25% bolesnika sa SLE-om. Česta je alopecija koja može biti difuzna ili ograničena, a usko je povezana s pogoršanjem bolesti. Na mukoznim membranama su vidljive ranice, a na noktima purpura, ulceracije vrška prstiju i “splinter” hemoragije (145,146).

### **1.2.3.3. Bubrežne promjene**

Bubrezi su najčešće zahvaćeni visceralni organ u SLE-u. Oko 50% bolesnika razvije klinički manifestnu bolest bubrega, no histološke promjene se mogu naći u gotovo svih bolesnika (103). Glomerularna bolest se razvija obično u prvih nekoliko godina od pojave lupusa i često je asimptomatska. Biopsiju bubrega treba razmotriti u svakog bolesnika s kliničkim ili laboratorijskim pokazateljima aktivnog lupusnog nefritisa. Najčešći oblici su membranoproliferativni i membranski glomerulonefritis. Prognoza lupusnog nefritisa ovisi o naravi histoloških promjena, njihovom trajanju i arterijskoj hipertenziji. Stoga je praćenje bubrežne funkcije neobično važno budući da rano otkrivanje i liječenje značajno poboljšava ishod bubrežne bolesti (147,148).

### **1.2.3.4 Plućne promjene**

SLE može dovesti do brojnih komplikacija na plućima uključujući pleuritis i pleuralne izljeve, pneumonitis, plućnu hipertenziju i intersticijsku bolest pluća. Kronična terapija glukokortikoidima povećava rizik atipičnih infekcija. Najčešća akutna manifestacija zahvaćenosti pluća je pleuritis, često s izljevom koji ima odlike eksudata. Praćen je bolovima u prsištu. Kašalj, vrućica i gubitak daha su uobičajeni simptomi zahvaćenosti pluća (103). Hemoptiza se rijetko javlja, a posljedica je alveolarne hemoragije. Plućna hipertenzija se obično razvija u sklopu antifosfolipidnog sindroma i teško ju je razlikovati od primarne plućne hipertenzije. Obilježena je kratkoćom daha i restriktivnim poremećajima plućnih funkcionalnih testova (149, 150).

### **1.2.3.5. Kardiovaskularni poremećaji**

Kardiovaskularne bolesti su jedan od vodećih uzroka smrtnosti u SLE-u (151). Perikarditis je najčešće kardijalno zbivanje, a obilježen je bolovima u prsištu. Miokarditis s kongestivnim zatajenjem srca je nešto rjeđi. U bolesnika s antifosfolipidnim sindromom (APS) i SLE-om se može naći Libman-Sacks-ov endokarditis. Koronarni vaskulitis koji se manifestira anginoznim tegobama je vrlo rijedak (143). Veliki problem predstavlja ishemička koronarna arterijska bolest u sklopu ubrzane ateroskleroze.



U patogenezu ateroskleroze u SLE-u uključena je vaskularna ozljeda izazvana upalnim zbivanjima poput vaskulitisa, odlaganje imunih kompleksa i antifosfolipidna protutijela. Ne treba zanemariti ni učinak glukokortikoida i prekomjerne tjelesne težine. Povišene razine anti-PL protutijela i anti- $\beta$ 2 glikoprotein 1 protutijela su značajniji predskazatelj ateroskleroze koronarnih krvnih žila od klasičnih faktora rizika kao što su hipertenzija i hiperlipidemija (152-154).

Već u djece sa SLE-om je potvrđeno značajno zadebljanje „*intima-media*“ karotidnih arterija u odnosu na kontrolnu skupinu. Upravo se ultrazvuk karotidnih arterija pokazao prikladnim za otkrivanje neopstruktivnih aterosklerotskih plakova te za mjerenje zadebljanja „*intima-media*“ arterija. Prisustvo ateroskleroze karotidnih arterija snažno korelira s koronarnom aterosklerozom. U mladih žena sa SLE-om se gotovo redovito zaboravlja na prevenciju ateroskleroze. Stoga je neophodno pored kontrole hipertenzije voditi računa o razinama LDL kolesterola i C reaktivnog proteina (CRP). Naime, CRP se pokazao značajnim predskazateljem kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih incidenata neovisno o standardnim čimbenicima rizika (155).

#### **1.2.3.6. Neuropsihijatrijski poremećaji**

Glavobolja i poremećaji raspoloženja su najčešće neurološke manifestacije SLE-a. Potom slijede kognitivni poremećaji. Psihološka testiranja su pokazala da čak do 67% bolesnika sa SLE-om imaju kognitivne poremećaje. Pored navedenih, u bolesnika sa SLE-om mogu nastati ozbiljni poremećaji središnjeg živčanog sustava koji uključuju vaskulitis, encefalopatiju i cerebritis, a česti su i epileptički napadaji koji mogu prethoditi kliničkim i serološkim manifestacijama bolesti. Aseptički meningitis, mijelopatija, optička neuropatija ili drugi demijelinizirajući poremećaji također predstavljaju hitna stanja u bolesnika sa SLE-om. Transverzalni mijelitis sa spastičkom paraparezom i koreja su rijetke komplikacije SLE-a i antifosfolipidnog sindroma. Cerebrovaskularni inzult i tranzitorna ishemička ataka su obično posljedica vaskulitisa ili tromboemboličkih zbivanja u sklopu antifosfolipidnog sindroma (156-158). U patogenezi NP lupusa je bitno vaskularno oštećenje za vrijeme aktivne bolesti. Novija istraživanja su pokazala da su neuropsihijatrijski poremećaji češći kod vaskulitičkih promjena kože. Povišen titar antifosfolipidnih protutijela je također važan predskazatelj neuropsihijatrijskih poremećaja u SLE-u (159).

### **1.2.3.7. Gastrointestinalni poremećaji**

Gastrointestinalni simptomi su češće posljedica terapije nego samog lupusa. Mučnina i povraćanje su česti simptomi aktivnog SLE-a. Peptički vrijed se može javiti u sklopu SLE-a posebice u bolesnika koji su liječeni nesteroidnim antireumaticima (NSADIs) i glukokortikoidima. Bolovi u trbuhu mogu biti posljedica peritonitisa, pankreatitisa, mezenteričkog vaskulitisa ili infarkta crijeva u sklopu aktivne bolesti. Rjeđe se javlja autoimuna bolest hepatobilijarnog sustava (160,161).

### **1.2.3.8. Hematološki poremećaji**

Hematološki poremećaji se često javljaju u sklopu SLE-a. Može se naći anemija, trombocitopenija, no tipična promjena je leukopenija s limfopenijom. Izolirana trombocitopenija najčešće nastaje u sklopu antifosfolipidnog sindroma (103).

### **1.2.4. Liječenje**

Liječenje SLE-a ovisi o težini bolesti i kliničkim manifestacijama. Radi se o kroničnoj bolesti te liječenje treba usmjeriti na kontrolu akutnog pogoršanja bolesti, smanjenje simptoma bolesti na prihvatljivu razinu i spriječavanje oštećenja ciljnih organa. Također je potrebno voditi računa o prevenciji komplikacija bolesti i samog liječenja (162). Važno je naglasiti da središnje mjesto u dugotrajnoj terapiji SLE-a ima hidroksiklorokin. LUMINA (*Lupus in Minorities: Nature versus Nurture*) studija je pokazala da primjena hidroksiklorokina smanjuje pogoršanje bolesti i produžuje život liječenih bolesnika (163).

Liječenje koštanomišićnih manifestacija (artritis, artralgijske, mijalgije) u SLE-u temelji se na primjeni protuupalnih lijekova. Najčešće se koriste aspirin, aspirinu slične supstance i NSAIDs (164). Uz protuupalne lijekove za kontrolu artritisa se dodaju antimalarici (klorokin, hidroksiklorokin, kinakrin). Ovi lijekovi ujedno reduciraju simptome umora kao i učestalost relapsa bolesti (165). Kod težih oblika artritisa, uz NSAIDs i antimalarike mogu se dodati metotreksat i leflunomid (166). Bolesnici s kožnim promjenama trebaju izbjegavati izlaganje suncu te koristiti zaštitna sredstva radi blokiranja UV-A i UV-B zračenja. Dodavanje antimalarika ima dobar učinak na kožnu bolest u SLE-u. Ponekad je potrebno uključiti i sistemske glukokortikoide. U liječenju težih, refraktornih kožnih oblika bolesti kao što su bulozni SLE, lupus profundus i akutni osip dobar učinak se može postići dapsonom,

talidomidom i retinoidima. Promjene koje ne reagiraju na navedenu terapiju zahtijevaju primjenu ostalih imunosupresivnih lijekova kao što su metotreksat, MMF i ciklofosfamid (166,167).

Blaži do srednje teški serozitis (pleuritis, perikarditis) može dobro odgovoriti na NSAIDs. U težim oblicima je potrebno uključiti sistemske glukokortikoide kao i kod akutnog pneumonitisa i miokarditisa. Ukoliko se javljaju česti recidivi korisno je dodati antimalarike. Teži oblici bolesti uz glukokortikoide zahtijevaju primjenu ostalih imunosupresivnih lijekova poput azatioprina i MMF-a (166,168).

Blaže hematološke poremećaje (limfopenija, granulocitopenija) u SLE-u nije potrebno liječiti. Trombocitopenija s velikim rizikom krvarenja (trombociti ispod  $10 \times 10^9/L$ ) te akutna hemolitička anemija se liječe visokom dozom glukokortikoida uključujući pulsnu primjenu, intravenskim imunoglobulinima i imunosupresivima (npr. azatioprin). Dio bolesnika su kandidati za splenektomiju (169).

Neuropsihijatrijski lupus predstavlja veliki terapijski problem. Za kontrolu psihoze i konvulzija od koristi su antipsihotici i antiepileptici ukoliko se ne radi o aktivnom lupusu. Ako je riječ o aktivnoj bolesti neophodne su visoke doze glukokortikoida i drugi imunosupresivi (npr. ciklofosfamid, azatioprin). Encefalopatija (organski moždani sindrom) i transverzalni mijelitis zahtijevaju pulsne doze glukokortikoida uz dodatak ciklofosfamida intravenski ako izostane učinak steroida. Ponekad dolazi u obzir plazmafereza (156,167).

Cilj liječenja lupusnog nefritisa je postizanje remisije i održavanje postignutog terapijskog odgovora ili remisije. Postiže se kombinacijom umjerene do visoke doze glukokortikoida i citotoksičkih lijekova. Klinički terapijski odgovor se definira kao 50% -tna redukcija proteinurije i stabilizacija bubrežne funkcije. Kompletna remisija se definira kao normalna bubrežna funkcija i odsutstvo proteinurije te uredan sediment urina. Odabir terapije ovisi o *World Health Organisation* (WHO) klasi patohistoloških promjena bubrega (170). Mezangioproliferativni glomerulonefritis (GN) i fokalni proliferativni GN pokazuju dobar odgovor na glukokortikoide, iako je u nekim slučajevima potrebno dodati azatioprin i MMF. Difuzni proliferativni GN zahtijeva agresivniji terapijski pristup koji uključuje ciklofosfamid (171,172). MMF je u studijama pokazao sličnu djelotvornost u usporedbi s ciklofosfamidom uz manju učestalost ozbiljnih infekcija i limfopenije (173). U terapiji održavanja najznačajnije mjesto imaju MMF i azatioprin iako podatci upućuju da azatioprin ne sprječava relaps bolesti (174).

#### 1.2.4.1. Biološka i eksperimentalna terapija u SLE-u

Rituximab je kimeričko monoklonsko CD20 protutijelo. CD20 se nalazi na pre i zreлим B limfocitima. Za razliku od reumatoidnog artritisa gdje je pokazao dobre učinke, u bolesnika sa SLE-om rezultati su kontroverzni. Prve studije u manjem broja bolesnika sa SLE-om pokazale su povoljne učinke rituximaba, no dvije velike studije provedene u bolesnika s umjerenim i teškim oblikom bolesti te proliferativnim lupusnim nefritisom nisu potvrdile očekivane rezultate (175-178).

Belimumab je humano monoklonsko protutijelo koje veže B limfocitni stimulator (BlyS) te inhibira njegovu biološku aktivnost. BlyS je važan za preživljavanje B limfocita. Studije su pokazale povoljne učinke u smanjenju aktivnosti lupusa. Indiciran je u aktivnom SLE-u s prisutnim protutijelima u kojem je izostao učinak standardne terapije (179-181).

U fazi III ispitivanja su i druge anti-BLyS molekule kao što je blisibimod i tabalumab (182). Posljednjih godina su u fazi ispitivanja i brojne druge biološke supstance. Usmjerene su na depleciju B i T limfocita, ko-stimulatornu blokadu, inhibiciju citokina ili modulaciju komplementa (183). Epratuzumab je anti CD22 monoklonsko protutijelo koje mijenja funkciju B limfocita. Pokazao je učinkovitost u smanjenju aktivnosti lupusa i smanjenju doze glukokortikoida (184,185). Abatacept je fuzijski protein CTLA4 i imunoglobulina (CTLA4-Ig). Inhibira interakciju između B i T limfocita. Nije pokazao značajniji učinak u smanjenju aktivnosti lupusa u bolesnika s umjereno aktivnom bolešću. No, u tijeku su studije u bolesnika s lupusnim nefritisom (186). Pored spomenutih, još nekoliko bioloških supstanci je u fazi ispitivanja, uključujući atacicept (TACI-Ig), abetimus (LJP 394; 20-mer dsDNA), TRU-015(CD20 SMIP), anti IFN- $\alpha$  (MEDI 545, rontalizumab), anti IL-10, edratide (hCDR1), eculizumab (anti-C5b), tocilizumab (anti-IL-6R), fresolimumab (humanizirano monoklonsko protutijelo koje neutralizira sve tri izoforme TGF $\beta$ ). Također su u tijeku studije o učinku malih molekula poput laquinimoda (derivat *quinolone-3-carboxamida*) i sintetskih retinoida (183,187-194). Inhibitori TNF- $\alpha$  mogu potaknuti stvaranje autoptoutijela, a opisano je i nekoliko slučajeva SLE-a nakon primjene u artritisu, stoga se ne očekuje njihova rutinska primjena u SLE-u (195).

Ciklosporin je inhibitor kalcineurina koji prekida aktivaciju T limfocita inhibicijom IL-2. Manje studije su pokazale pozitivan učinak u bolesnika s proliferativnim lupusnim nefritisom, posebice na smanjenje proteinurije (196). Takrolimus je drugi inhibitor kalcineurina koji se pokazao uspješan u bolesnika s lupusnim nefritisom (197). Obećavajuće

rezultate pruža autologna transplantacija matičnih stanica kao i transplantacija mezenhimalnih matičnih stanica u bolesnika s refraktornim životno ugrožavajućim oblikom bolesti (198,199).

### **1.3. UPALNE REUMATSKE BOLESTI I SPOLNI HORMONI**

Većina reumatskih bolesti poput SLE-a, reumatoidnog artritisa (RA), polimiozitisa, dematomiozitisa, SSc-e i Sjögren-ovog sindroma je učestalija u žena generativne dobi što upućuje da ženski spolni hormoni imaju značajnu ulogu u patogenezi, pojavnosti i kliničkom tijeku ovih bolesti (200,201). Poznato je da spolni hormoni, adrenalni androgeni i prolaktin imaju brojne imunomodulatorne funkcije (200,202).

Prolaktin i dihidroepiandrosteron (DHEA) mijenjaju imunološki odgovor posredovan Th1 stanicama (203-205). Hiperprolaktinemija je udružena s aktivnošću SLE-a, RA i autoimunog tiroiditisa (206). Nadalje, uočeno je da terapija bromokriptinom (antagonistom prolaktina) može imati povoljne učinke u bolesnika s autoimunim bolestima (207). Dok su androgeni i progesteron prirodni imunosupresori, estrogene pojačavaju humoralnu imunost (201,208). Poznato je da estrogene pojačavaju fagocitnu i antigen prezentirajuću sposobnost makrofaga, pokreću sazrijevanje T pomoćničkih stanica i potiču poliklonsku aktivaciju B stanica (209). Estradiol može povećati stvaranje poliklonskih IgG imunoglobulina uključujući IgG anti-dsDNA u polimorfonuklearima bolesnika sa SLE-om mijenjajući aktivnost B stanica i poticanjem sinteze IL-10 u monocitima (210,211).

Također je utvrđeno da testosteron suprimira stvaranje ukupnih IgG i anti-dsDNA IgG protutijela u polimorfonuklearima bolesnika sa SLE-om. Testosteron i DHEA smanjuju oslobađanje proupalnog citokina IL-6 u monocitima čija razina je povišena u aktivnom SLE-u (212-214).

Nesrazmjernost spolnih hormona u većini autoimunih bolesti očituje se povišenim razinama estrogene i 16-alfa hidroksiliranih metabolita te smanjenim razinama testosterona i DHEA (215-219). To je posljedica poremećene sinteze i metabolizma spolnih hormona u upalnim reumatskim bolestima. Istraživanja su pokazala da je u bolesnika sa SLE-om i RA-om ubrzana konverzija androgenih prekursora u 17-beta estradiol. Za konverziju je odgovoran aromataza enzimski kompleks čija je aktivnost povišena u perifernim tkivima pod utjecajem proupalnih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1) (210,220-222). Dakle, poremećeni metabolizam 17-beta estradiola bi mogao uzrokovati povećanu estrogenu aktivnost u bolesnika sa SLE-om (223). Veće razine estrogene nađene su i u postmenopauzalnih žena, te muškaraca sa SLE-om

što potvrđuje stajalište da estrogene doprinose razvoju ove bolesti (202). Nedvojbeno je pokazano da endogeni estrogene utječu na aktivnost bolesti i prognozu ovih bolesnika. Pogoršanja bolesti često se dešavaju za vrijeme hormonskih promjena kao što su trudnoća, puerperij, stimulacija ovulacije i egzogena primjena estrogene (224-226). Različita fiziološka i patološka stanja poput menstrualnog ciklusa, trudnoće, postpartalnog perioda, menopauze, starenja, kroničnog stresa, promijenjenog cirkadijalnog ritma (kortizol/melatonin) mogu mijenjati serumski milje estrogene i/ili perifernu konverziju. Primjena glukokortikoida, kontraceptiva, nadomjesne hormonske terapije također može promijeniti odnos androgene i estrogene (227,228).

U bolesnika sa SSc-om je također utvrđen izmjenjen hormonski status. Visoke vrijednosti prolaktina te snižene vrijednosti dihidroepiandrosteron sulfata (DHEAS) i testosterona u bolesnika sa SSc-om mogu dovesti do poremećaja hipopituitarnogonadalne osovine i imati važnu ulogu u patogenezi bolesti. Također je utvrđena njihova povezanost s težinom bolesti te brojem zahvaćenih organa. U nekih bolesnika sa SSc-om su nađene povišene razine folikularnog stimulirajućeg hormona uz normalne razine estrogene u folikularnoj fazi. To upućuje na subkliničku insuficijenciju gonada kojom se može objasniti funkcionalna oligomenoreja i prerana menopauzu u dijela bolesnika sa SSc-om (219,229,230). Odnos hormona hipopituitarnogonadalne osovine i imunog sustava s učincima estrogene i testostosterone su prikazani na slici 3 (231).

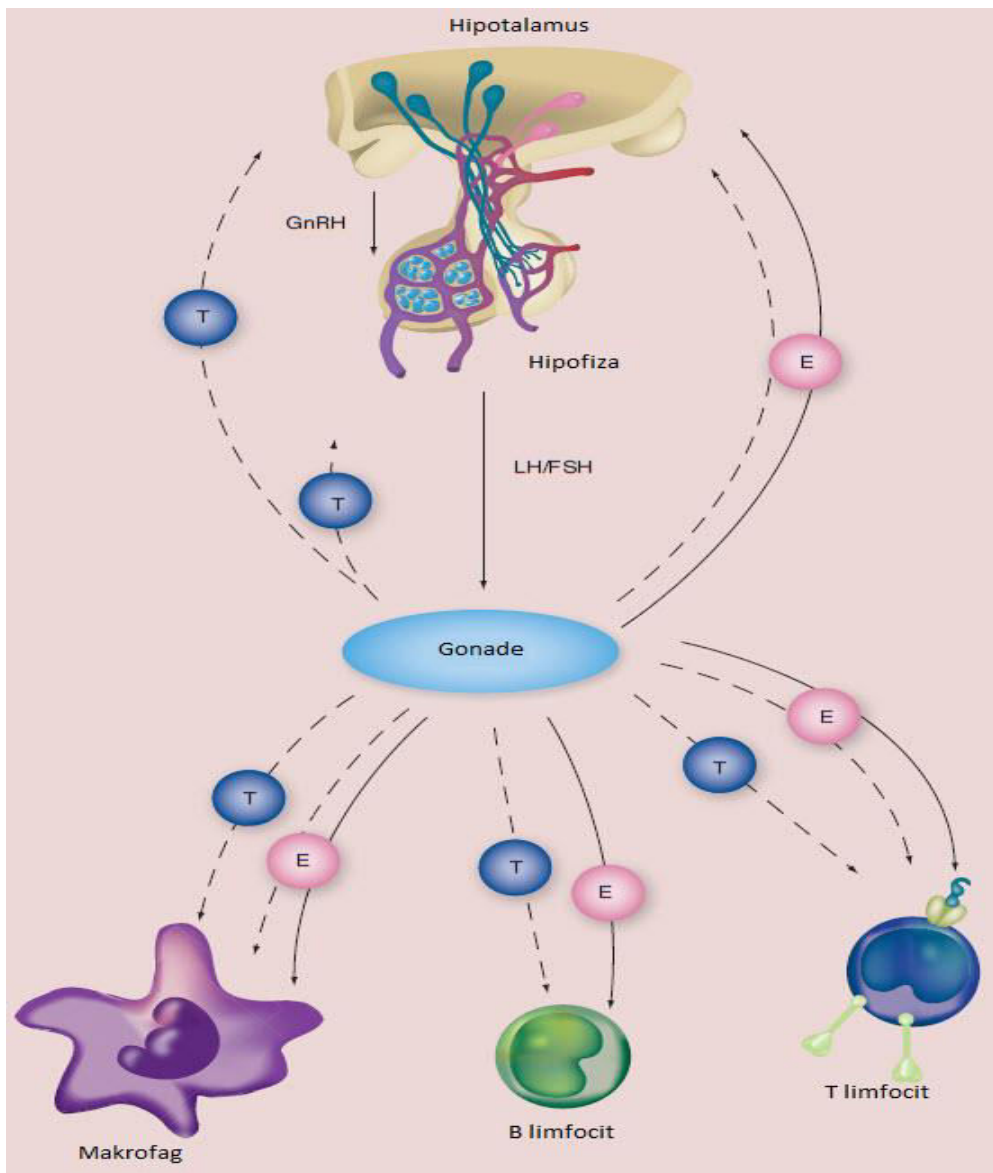
Aida-Yasuoka i suradnici našli su povišene razine estradiola u post-menopauzalnih bolesnika sa SSc-om. S obzirom da estrogene induciraju stvaranje kolagena i fibronektina, može se pretpostavi da abnormalne razine estrogene mogu biti značajan čimbenik razvoja fibroze u SSc-i (218,232). Osim toga, postoje naznake da je u žena sa SSc-om fertilitet smanjen te da je učestalost reproduktivnih problema povećana prije i nakon pojave bolesti (233).

Ova saznanja su dovela do pokušaja primjene androgene, prvenstveno DHEAS, u bolesnika sa SLE-om. Pokazalo se da DHEA ima povoljan učinak na tijek bolesti u SLE-u (234). Novija istraživanja dijelom su promijenila odnos prema hormonskoj terapiji u autoimunim bolestima te se drži da nije apsolutno kontraindicirana. Pojedini autori smatraju da se može primijeniti kod inaktivnog SLE-a uz uvjet da nema pridruženog antifosfolipidnog sindroma ili drugih protrombotskih čimbenika rizika (235,236). Nadalje, zabilježen je povoljan učinak hormonske nadomjesne terapije u prevenciji razvoja izolirane plućne

hipertenzije u bolesnica sa SSc-om u menopauzi (237). U žena s Raynaud-ovim fenomenom utvrđeno je da estrogene imaju vazodilatatorni učinak te da mogu poboljšati simptome (238).

U menopauzi se dešavaju značajne kliničke i hormonske promjene. Najznačajnija hormonska promjena je značajno smanjenje razine estrogena. Promjene na različitim organskim sustavima u menopauzi su prvenstveno rezultat sniženja razine estrogena. S obzirom na nedovoljno razjašnjeni odnos između gonadalnih hormona i imunološkog sustava, moguće je da menopauza utječe ili je pod utjecajem autoimune bolesti. Prijevremena insuficijencija jajnika može biti povezana s autoimunim poremećajima u dijela bolesnica, posebice ako su liječene alkilirajućim agensima kao što je ciklofosamid. Anti-ovarijalna protutijela se mogu naći u bolesnika sa SLE-om ili primarnim Sjogrenovim sindromom. No, unatoč uvriježenim stavovima, nema dovoljno podataka o većoj učestalosti prijevremene insuficijencije ovarija ili ranije pojave menopauze u odnosu na opću populaciju. Uočena je nešto češća pojava SLE-a u bolesnica s ranom menopauzom. U post-menopauzi u bolesnica sa SLE-om je aktivnost bolesti niža dok su kronična oštećenja veća za što su odgovorni dob, trajanje bolesti, dugoročni učinak terapije, ili kombinacija ovih čimbenika (239). Studija Fonta i suradnika je pokazala da bolesnice u kojih se SLE javi u starijoj dobi (iznad 50 godina) imaju blaži klinički tijek, manju učestalost nefritisa, artritisa i kožnih promjena te nešto veću učestalost miozitisa. Također se rjeđe nalazi visoki titar anti-dsDNA i anti-Ro protutijela (240).

Zanimljivo je da početak menopauze može negativno utjecati na SSc-u. Vaskulopatija je značajan čimbenik u nastanku oštećenja u SSc-i, a estrogene imaju protektivni učinak na krvožilni sustav. Smatra se da hipoestrogenemija u post-menopauzi može pogoršati vaskularne promjene u bolesnica sa SSc-om. U prilog tome govori smanjena učestalost plućne hipertenzije u bolesnica sa CREST sindromom koje su bile na hormonskoj nadomjesnoj terapiji (237).



Slika 3. Hipotalamo–pituitarna–gonadalna osovina i učinak gonadalnih steroida na imuni sistem. Dok T uglavnom ima protuupalni učinak, djelovanje E je kompleksno.

Pune linije prezentiraju stimulaciju, a isprekidane inhibiciju. E: Estrogen; FSH: Folikul-stimulirajući hormon; GnRH: Gonadotropin-oslobađajući hormon; LH: Luteinizirajući hormon; T: Testosteron.  
(231)



## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Glavni cilj istraživanja je:

Ispitati povezanost razine spolnih hormona (estradiola, testosterona, DHEAS, androstendiona) s aktivnošću bolesti u bolesnica sa SSc-om u post-menopauzi te istražiti povezanost razine spolnih hormona (estradiola, testosterona, DHEAS, androstendiona) bolesnica sa SLE-om u post-menopauzi s aktivnošću bolesti. U konačnici cilj je usporediti istraživani odnos spolnih hormona i aktivnosti bolesti između SSc-e i SLE-a. Isto tako, cilj je dokazati postoji li razlika u razini spolnih hormona između zdravih ispitanica i ispitanica s SSc-om, odnosno SLE-om.

Sporedni cilj istraživanja je:

Utvrđiti postoji li povezanost razine za bolest specifičnih protutijela: ANA, anti-Scl 70, ACA, anti-dsDNA i anti-Ro s razinama ispitivanih spolnih hormona.

### **HIPOTEZA**

1. Aktivnost bolesti u bolesnica sa SSc-om pozitivno je povezana s razinom estradiola, a negativno povezana s razinom muških spolnih hormona.
2. Aktivnost bolesti u bolesnica sa SLE-om pozitivno je povezana s razinom estrogena, a negativno povezana s razinom muških spolnih hormona.
3. U bolesnica sa SLE-om i SSc-om povišene su vrijednosti estradiola i snižene vrijednosti DHEAS, testosterona i androstendiona u usporedbi s kontrolnom skupinom.
4. Rzina protutijela specifičnih za SLE (ANA, anti-dsDNA, anti-Ro) te za SSc (ANA, anti-Scl 70 i ACA) pozitivno je povezana s razinom estrogena a negativno s razinom DHEAS, testosterona i androstendiona.

### **2.1 USTROJ I ISHOD ISTRAŽIVANJA**

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

## ISHOD ISTRAŽIVANJA

Glavni ishod istraživanja je aktivnost SSc-e izražena kao EUSTAR (European Scleroderma Trial and Research) Systemic Sclerosis Activity Score (0-9,5), te aktivnost SLE-a izražena SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) skorom (0-108) Sporedni ishod je titar specifičnih protutijela u SLE-u i SSc-i.

Ulazni parametri:

- a. razine spolnih hormona (estradiol, testosteron, DHEAS, androstendion)
- b. trajanje menopuze (godine),
- c. dob.

Izlazni parametri:

- a. vrijednost aktivnosti SSc-a,
- b. vrijednost aktivnosti SLE-a,
- c. titar protutijela ANA, anti-Sc170, ACA, anti-dsDNA, anti-Ro.

### 3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

#### 3.1 ISPITANICI

U ovom istraživanju je uključeno 27 bolesnica sa SSc-om i 27 bolesnica sa SLE-om u post-menopauzi najmanje godinu dana i s trajanjem bolesti iznad dvije godine. Skupine ispitanica odgovaraju prema dobi i dužini trajanja bolesti. Svakoj bolesnici je uzeta kompletna povijest bolesti nakon čega je slijedio fizikalni pregled. Trajanje bolesti je definirano od zahvaćanja jednog unutarnjeg organa za SSc-u te definiranja dijagnoze od strane reumatologa za SLE. Menopauza je definirana kao odsustvo prirodne menstruacije >1 godine (241). Uključene bolesnice se liječe i kontroliraju u našoj ustanovi (poliklinika Zavoda za reumatologiju i kliničku imunologiju, Dnevna bolnica ili stacionar Zavoda za reumatologiju i kliničku imunologiju KBC Split). Kontrolna skupina je sačinjavala 27 zdravih žena u menopauzi, odgovarajuće dobi koje ne uzimaju nadomjesne ili druge hormonske pripravke.

Dijagnoza SSc-e je potvrđena od strane interniste-reumatologa prema *American College of Rheumatology* (ACR) kriterijima za klasifikaciju sistemske skleroze (tablica 1) (242).

Tablica 1. Kriteriji za klasifikaciju SSc-e preuzeti od Američkog reumatološkog društva (242).

---

#### A. VELIKI KRITERIJI

Nalaz proksimalne sklerodermije: simetrično zadebljanje i induracija kože prstiju i trupa proksimalno od metakarpofalangealnih ili metatarzofalangealnih zglobova. Promjene mogu zahvatiti cijele udove, trup, lice i vrat

---

#### B. MALI KRITERIJI

1. Sklerodaktilija: opisane promjene ograničene samo na prste
2. Trofički ožiljci i nekroza na prstima uz gubitak potkožnog masnog jastučića kao posljedica ishemičkih promjena
3. Bilateralna fibroza pluća u bazalnim dijelovima: bilateralni mrežoliki intersticijski uzorak na standardnoj snimci prsnog koša koji nije posljedica primarne plućne bolesti

---

Dijagnoza SLE-a je potvrđena od strane interniste-reumatologa prema revidiranim ACR kriterijima (tablica 2) za klasifikaciju sistemskog lupusa (243).

Tablica 2. Revidirani kriteriji za klasifikaciju SLE-a iz 1997 godine (243)\*.

1. Jagodični osip	Fiksni eritem u razini ili iznad razine kože preko jagodične izbočine
2. Diskoidni osip	Eritem iznad razine kože s adherentnim keratotičkim ljuskanjem i začepljenjem folikula; atrofične keratotičke promjene u starijim lezijama
3. Fotosenzitivnost	Kožni osip nakon izlaganja suncu (u anamnezi ili prilikom pregleda liječnika)
4. Oralne ulceracije	Bezbolne ulceracije u ustima ili nazofaringsu utvrđene prilikom pregleda liječnika
5. Neerozivni artritis	Artritis 2 ili više perifernih zglobova s bolnošću, otokom i izljevom
6. Serozitis	Pleuritis-pleuritička bol u anamnezi ili klinički dokaz pleuralnog izljeva ili Perikarditis- dokumentiran EKG-om ili klinički dokaz perikardijalnog izljeva
7. Bubrežni poremećaji	Perzistentna proteinurija > 0.5 grama/dan ili > od 3+na test traci ili Stanični cilindri
8. Neurološki poremećaji	Konvulzije (tipa grand mal) u odsutstvu lijekova ili drugog poznatog uzroka ili Psihoza u odsutstvu lijekova ili drugog poznatog uzroka
9. Hematološki poremećaji	Hemolitička anemija s retikulocitozom ili Leukopenija < 4,000/mm <sup>3</sup> ili Limfopenija < 1,500/ mm <sup>3</sup> ili Trombocitopenija < 100,000/ mm <sup>3</sup> u odsutstvu lijekova
10. Imunološki poremećaji	Pozitivna anti-DNA antitijela ili Pozitivna anti-Sm antitijela ili Pozitivna antifosfolipidna protutijela: –povišena razina IgG ili IgM antikardiolipinskih protutijela, ili –pozitivan LAC (lupus antikoagulant) ili –lažno pozitivan VDRL test
11. Pozitivna antinuklearna protutijela	pozitivan test na antinuklearna protutijela bez prisutnosti lijekova koji bi ga mogli inducirati

\*prisutna 4 od 11 kriterija u bilo koje vrijeme bolesti:specifičnost dijagnoze 98%, osjetljivost 97%

Aktivnost SSc-e je određena prema EUSTAR *Systemic Sclerosis Activity Score* (0-9,5) (tablica 3). Skor 3 i veći označava aktivnu bolest (244).

Tablica 3. EUSTAR-ovi kriteriji aktivnosti SSc-e (244).

<i>Parametar</i>	<i>Score</i>	<i>Procjena</i>
Modificirani RSS >14	1	Mjerenje zadebljanja kože na ljestvici od 0 (normalna debljina) do 3 (izrazito zadebljano) u 17 anatomskih područja (mRSS se kreće u rasponu od 0-51)
Skleredem	0.5	Povećanje mase mekih česti (osobito na prstima šaka) zbog dermalnih nabora kože
Koža	2	Na pitanje da li su se kožne promjene promijenile tijekom zadnjeg mjeseca, bolesnik odgovara potvrdno
Nekroza prstiju	0.5	Aktivni ulkusi prstiju u rasponu od manjih infarkta vrškova prstiju do gangrene prstiju
Vaskularne promjene	0.5	Na pitanje da li Vam se promijenila cirkulacija krvi tijekom zadnjeg mjeseca bolesnik odgovara potvrdno
Artritis	0.5	Simetrične otekline i bolnost perifernih zglobova
DLCO	0.5	DLCO<80% očekivane vrijednosti mjereno metodom jednog udaha
Srce/Pluća	2	Na pitanje da li su se kardiopulmonalne manifestacija promijenile tijekom zadnjeg mjeseca bolesnik odgovara potvrdno
SE >30	1.5	Westergreen metoda
Hipokomplementemija	1	Snižene vrijednosti C3 ili C4 neovisno o metodi mjerenja (nefelometrija, radioimunodifuzija,...)

Aktivnost SLE-a je određena prema SLEDAI indeksu (0-108) (tablica 4). Vrijednost skora 0 označava remisiju bolesti, 2 i manje inaktivnu bolest, 8 i više označava aktivnu bolest (245). Procjenu aktivnosti bolesti usporedno su obavljala dva reumatologa.

Sve sudionice istraživanja su potpisala informirani pristanak. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC Split.

Tablica 4. SLEDAI Indeks (245).

BODOVI	Poremećaj	Definicija
8	Konvulzije	Isključuje metabolički poremećaj, infekcije, lijekove. Nedavna pojava.
8	Psihoza	Promijenjena sposobnost obavljanja normalnih aktivnosti zbog teškog poremećaja percepcije stvarnosti. Uključuje halucinacije, inkoherenciju, gubitak asocijacija, osiromašen misaoni sadržaj, nelogična razmišljanja, bizarno, neorganizirano, ili katatoničko ponašanje. Isključuje uremiju i lijekove
8	Organski moždani sindrom	Izmijenjena mentalna funkcija s oštećenjem orijentacije, memorije ili drugih intelektualnih funkcija. Uključuje poremećaj svijesti sa smanjenom mogućnošću usredotočavanja i nemogućnosti održavanja pažnje, plus najmanje dva od sljedećih: poremećaj percepcije, nesuvisli govor, nesanica ili pospanost tijekom dana, odnosno povećane ili smanjene psihomotorna aktivnost. Isključuje metaboličke, infektivne uzroke i lijekove.
8	Poremećaj vida	Retinalne promjene. Uključuje citoidna tijela, krvarenja mrežnice, teži eksudati ili krvarenja u koroideju ili optički neuritis. Isključuje hipertenziju, infekcije, ili lijekove.
8	Poremećaj kranijalnih živaca	Nova pojava senzorne ili motorne neuropatije kranijalnih živaca
8	Glavobolja	Teška perzistentna glavobolja:može biti migrena koja ne reagira na narkotičke analgetike
8	CVI	Nova pojava cerebrovaskularnog infarkta. Isključuje aterosklerozu.
8	Vaskulitis	Ulceracije, gangrena, bolni čvorovi na prstima, periungvalne infarkcije, splinter hemoragije, ili vaskulitis dokazan biopsijom ili angiografijom.
4	Artritis	Više od 2 bolna zgloba s znakovima upale.
4	Miozitis	Slabost proksimalnih mišića s povećanim vrijednostima kreatin kinaze/aldolaze ili promjene na EMNG-u ili pozitivan nalaz biopsije.
4	Urinarni cilindri	Hemoglobinski ili eritrocitni cilindri.
4	Hematurija	>5 eritrocita. Isključuje kamence, infekciju ili druge uzroke.
4	Proteinurija	>0.5 g/24 h. Nova pojava ili povećanje postojeće proteinurije >0.5 g/24.
4	Piurija	>5 leukocita. Isključuje infekciju.
2	Novi osip	Pojava novog ili povrat uplnog osipa
2	Alopecija	Pojava nove ili povrat žarišnog ili difuznog gubitka kose
2	Mukozne ulceracije	Pojava novih ili povrat oralnih ili nazalnih ulceracija
2	Pleuritis	Pleuritički bolovi u prsištu s pleuralnim trenjem ili izljevom ili zadebljanje pleure.
2	Perikarditis	Perikardijalni bolovi s najmanje 1 zbivanjem:trenje, izljev,ili EKG promjene.
2	Nizak komplement	Smanjenje CH50, C3, ili C4 ispod donjen referentne granice.
2	Pozitivna DNA At	>25% iznad referentne razine.
1	Vrućica	>38°C. Isključuje infekciju.
1	Trombocitopenia	<100,000 T/mm <sup>3</sup> .
1	Leukopenija	<3,000 L/mm <sup>3</sup> . Isključuje lijekove.

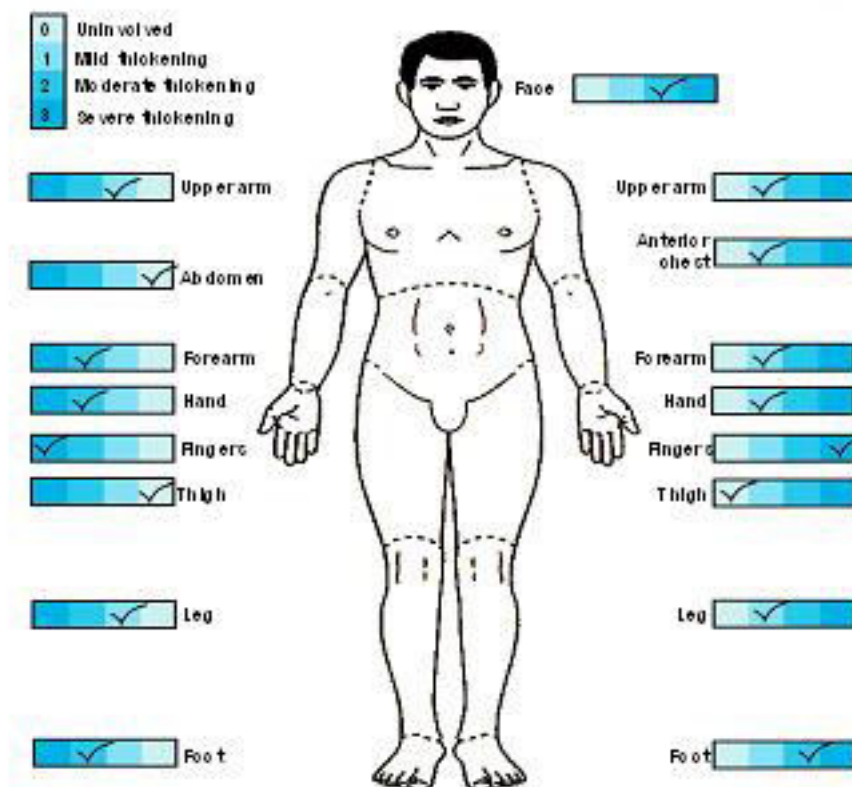
Kriteriji uključenja u studiju su bili:

- jasna dijagnoza SSc-e i SLE-a prema ACR kriterijima,
- trajanje bolesti iznad dvije godine,
- menopauza najmanje godinu dana.

Kriteriji isključenja su bili:

- terapija glukokortikoidima > 10 mg posljednja tri mjeseca,
- hormonsko nadomjesno liječenje ili uzimanje drugih hormonskih pripravaka,
- uzimanje lijekova za koje je poznato da utječu na razinu spolnih hormona.

U serumu se paralelno određivala koncentracija spolnih hormona (estradiol, testosteron, DHEA, androstendion) i specifičnih protutijela (ANA, ACA, anti-Sc170, anti-dsDNA, anti-Ro).



Slika 4. Testna lista za određivanje modificiranog Rodnan *skin* skora (mRSS) (246).

## **3.2. POSTUPCI**

### **3.2.1. Mjerenje spolnih hormona u serumu**

Uzorci seruma (16 ml) za određivanje spolnih hormona (estradiola, testosterona, DHEA, androstendiona) dobili su se venepunkcijom u jutarnjim satima uz prikupljanje krvi u 2 epruvete, potom se izdvojio serum koji je do izrade pohranjen u hladnjaku na -20C. Određivani su u Radioizotopnom laboratoriju na Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu. Koncentracije hormona u serumu bolesnika određivane su radioimunoesej (RIA) metodom, reagensima firme DIASource (DIASource Immunoassay, Belgium) na gama brojaču Cap-Ria 16 Capineta INC. Referentne vrijednosti ispitivanih hormona u menopauzi su slijedeće: estradiol <0,20 nmol/L, testosteron 0,4-2,74 nmol/L, DHEAS 0,7-4,9 μmol/L, androstenedion 1,1-12,9 nmol/L.

### **3.2.2. Mjerenje autoprotutijela u serumu**

Iz drugog uzorka seruma su se na Odjelu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku određivala specifična protutijela: a) anti-Sc170, b) ACA c) anti-dsDNA protutijela i d) anti-Ro protutijela metodom višestrukog određivanja autoprotutijela FIDIS Connective 10, BioMedical Diagnostic SA, France na prilagođenom protočnom citometru Luminex 100 (Austin, USA), e) ANA protutijelo se određivalo indirektnom imunoflorescencijom (IIF) na Hep-2 stanicama (dijagnostički test Bio Systems na fluorescentnom mikroskopu REICHERT, "BINOLUX") e) C3 i C4 komponente komplementa su određivane laserskom nefelometrijom (Behring Pro Spec nephelometer). Rezultati ANA protutijela su izražavana u mjernoj jedinici U/ml, anti-dsDNA u IU/ml, a anti-Ro, anti-Sc170 i ACA protutijela u AU/ml. Titar  $\geq 40$  U/ml se smatrao pozitivnim za sva protutijela osim ANA protutijela kod kojih se prisutstvo u ispitivanom uzorku smatralo pozitivnim (referentna vrijednost je negativna). Referentne vrijednosti su za C3 0,9-1,8 g/l i C4 0,1-0,4 g/l.

Svim bolesnicima određivali su se osnovni laboratorisjki parametri: SE, KKS, ureja, kreatinin, AST, ALT, GGT, AF, CK, LDH, bilirubin, urin, kreatinin klirens, proteini u 24-satnom urinu.



### 3.2.4. Statistička obrada podataka

Za testiranje normaliteta raspodjele kontinuiranih varijabli korišten je Kolmogorov Smirnovljev test za svaku skupinu zasebno. Budući da su sve ispitivane varijable kontinuirane čija je raspodjela bila normalna kao mjere centralne tendencije korištene su aritmetička sredina i standardna devijacija.

Kategorijske varijable su izražene u broju ili postotku.

Za usporedbu razine hormona triju ispitivanih skupina korištena je jednostavna analiza varijance (*One-way ANOVA*).

Utvrđivanje razlike među skupinama ispitivano je *Tukey post hoc* testom i *Student T*-testom.

Povezanost razine spolnih hormona (testosterona, DHEA, androstendiona i estradiola) s aktivnošću bolesti u bolesnicima sa SSc-om i SLE-om ispitivane su uz pomoć Pearsonovog koeficijenta korelacije.

Povezanost razine za bolest specifičnih protutijela (ANA, anti- Scl-70, ACA, anti-dsDNA, anti-Ro) s razinama ispitivanih spolnih hormona i mRSS ispitivana su pomoću Pearson-ovog koeficijenta korelacije.

Analiza je provedena korištenjem Windows SPSS 15.0 programa.

Razina značajnosti za sve postupke je  $P < 0.05$ .

## 4. ETIČKA NAČELA

Svi postupci kojima su ispitanici u ovom istraživanju bili podvrgnuti koriste se u rutinskom dijagnostičkom postupku, praćenju i liječenju bolesnika sa sistemskom sklerozom i sistemskim eritemskim lupusom.

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

Dobivena je privola Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split. U istraživanje su bili uključeni samo oni ispitanici koji su prethodno potpisali informirani pristanak. Materijali će se koristiti isključivo za dobivanje znanstvenih rezultata i oblikovanje znanstvenog mišljenja, a neće se koristiti u svrhu stjecanja materijalne dobiti.

## 5. REZULTATI

Epidemiološka i klinička obilježja ispitanica prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Klinička obilježja bolesnica sa SLE-om, SSc-om i kontrolne skupine.

	SLE bolesnice (n=27)	SSc bolesnice (n=27)	Kontrola (n=27)
Dob (godine±SD)	62,4±7,8	63,4±9,9	63,6±8,1
Trajanje menopauze (godine ±SD)	13,5±8,6	15,5±8,8	14,2±8,3
Trajanje bolesti (godine ±SD)	14,8±9,0	12,8 ±9,1	np
Terapija glukokortikoidima (mg/dan ±SD)	5,7±3,2	3,3±2,6	np
Anti –dsDNA –IU/ml n (%)	12(22,2)	no	no
Anti-Ro –AU/ml n (%)	16 (37,0)	no	no
ANA U/ml n (%)	23 (85,2)	22 (81,5)	no
ACA-AU/ml n (%)	no	6 (22,2)	no
Anti-Sc170 –AU/ml n (%)	no	10 (37,0)	no
SLEDAI (raspon)	10,5 (4-26)	np	np
EUSTAR SSc aktivnost bolesti (raspon)	np	5,0±2,0(1-9,5)	np
mRSS (raspon)	np	19 (2-42)	np
dSSc/lSSc n	np	21/6	np

np: nije primjenjivo; no: nije određivano; SD: standardna devijacija; Anti-dsDNA: autoprotutijela protiv dvostruke uzvojnice DNA; Anti-Ro: antiSSA protutijela; ANA: antinuklearna protutijela; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; PPI: inhibitori protonske pumpe; ASA: acetilsalicilna kiselina; ACEI: inhibitori angiotenzin konvertaze; CCB: blokatori kalcijevih kanala; ATIIB: blokatori angiotenzin II. ACA-anti-centromera protutijela, anti-Sc170: protutijela na topoizomerazu I, EUSTAR SSc: European Scleroderma Trial and Research systemic sclerosis, mRSS: modificirani Rodnan skin score, dSSc: difuzna sistemska skleroza, lSSc lokalizirana sistemska skleroza; U/ml: jedinica po mililitru; IU: internacionalna jedinica; AU: jedinica apsorpcije

## 5.1. Rezultati za SLE

Vrijednosti razina hormona u serumu u bolesnica sa SLE-om i kontrolne skupine prikazani su u tablici 6. U bolesnica sa SLE-om su nađene značajno niže razine testosterona ( $0,60 \pm 0,52$  nmol/L v.  $1,64 \pm 1,02$  nmol/L,  $p < 0,001$ ) i DHEAS ( $0,78 \pm 0,92 \mu\text{mol/L}$  v.  $2,00 \pm 1,08 \mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,001$ ) u odnosu na zdrave ispitanice. Nije zabilježena značajna razlika u razinama androstendiona ( $4,54 \pm 2,59$  nmol/L v.  $5,79 \pm 2,82$  nmol/L,  $p = 0,244$ ) i estradiola ( $0,20 \pm 0,09$  v.  $0,16 \pm 0,06$ ,  $p = 0,250$ ) između bolesnica sa SLE-om i kontrole (tablica 6).

Tablica 6. Odnos hormona u bolesnica sa SLE-om i kontrolne skupine.

	SLE bolesnice (n=27)	Kontrole (n=27)	p
Testosteron (ref: 0,4-2,74 nmol/L)	$0,60 \pm 0,52$	$1,64 \pm 1,02$	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
DHEAS (ref: 0,7-4,9 $\mu\text{mol/L}$ )	$0,78 \pm 0,92$	$2,00 \pm 1,08$	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
Androstendion (ref: 1.1-12.9 nmol/L)	$4,54 \pm 2,59$	$5,79 \pm 2,82$	$p = 0,244$
Estradiol (<0.20 nmol/L )	$0,20 \pm 0,09$	$0,16 \pm 0,06$	$p = 0,250$

Tukey-ev post hoc test: razina značajnosti  $p < 0.05$

SLE: sistemski eritemski lupus; DHEAS: dihidroepiandrosteron sulfat

Nije bilo značajne razlike u razinama testosterona, DHEAS, androstendiona i estradiola u bolesnica koje su liječene glukokortikoidima u dozi većoj od 5 mg/d i onih s dozom jednakom ili manjom od 5 mg/d (tablica 7).

Tablica 7. Odnos hormona u SLE bolesnica s GK u dozi većoj i manjoj (ili jednakoj) 5 mg/d.

	SLE bolesnice s GK>5mg/d (n=13)	SLE bolesnice s GK≤5 mg/d (n=14)	p
Testosteron (ref:0.4-2.74 nmol/L)	0,42±0,28	0,75±0,63	p=0,086
DHEAS (ref: 0.7-4.9 μmol/L)	0,42±0,30	1,03±1,14	p=0,073
Androstendion (ref:1.1-12.9 nmol/L)	4,48±2,99	4,23±2,23	p=0,527
Estradiol (ref:<0.20 nmol/L)	0,20±0,11	0,16±0,05	p=0,298

t-test:razina značajnosti p<0.05

SLE:sistemski eritemski lupus, GK:glukokortikoidi, DHEAS:dihidroepiandrosteron sulfat

Vrijednosti testosterona ( $r=-0,560$ ,  $p=0,002$ ), DHEAS ( $r=-0,563$ ,  $p=0,002$ ) i androstendiona ( $r=-0,396$ ,  $p=0,041$ ) su negativno korelirale s ANA protutijelima u bolesnica sa SLE-om. Očekivana pozitivna korelacija estradiola i ANA protutijela ( $p=0,613$ ) nije potvrđena za razliku od pozitivne korelacije estradiola s anti-dsDNA protutijelima ( $r=0,398$ ,  $p=0,040$ ). Razine testosterona, DHEAS i androstendiona nisu korelirale s anti-dsDNA protutijelima. Zanimljiva je negativna korelacija razine testosterona ( $r=-0,453$ ,  $p=0,018$ ) i DHEAS ( $r=-0,480$ ,  $p=0,011$ ) s anti-Ro protutijelima, dok nije potvrđena povezanost s androstendionom i estradiolom (tablica 8).

Tablica 8. Odnos spolnih hormona i protutijela u bolesnica sa SLE-om

	ANA	anti-ds DNA	anti-Ro
Testosteron (nmol/L)	<b>r=-0,560;p=0,002</b>	p=0,578	<b>r=-0,453;p=0,018</b>
DHEAS (μmol/L)	<b>r=-0,563;p=0,002</b>	p=0,934	<b>r=-0,480;p=0,011</b>
Androstendion (nmol/L)	<b>r=-0,396;p=0,041</b>	p=0,801	p=0,069
Estradiol (nmol/L)	p=0,613	<b>r=0,398;p=0,040</b>	p=0,401

Pearson-ov koeficijent korelacije: razina značajnosti  $p < 0.05$

ANA:antinuklearne protutijela; anti-dsDNA:protutijela na dvostruku uzvojnicu deoksiribonukleinske kisline, anti-Ro:SSA protutijela, DHEAS:dihidroepiandrosteron sulfat

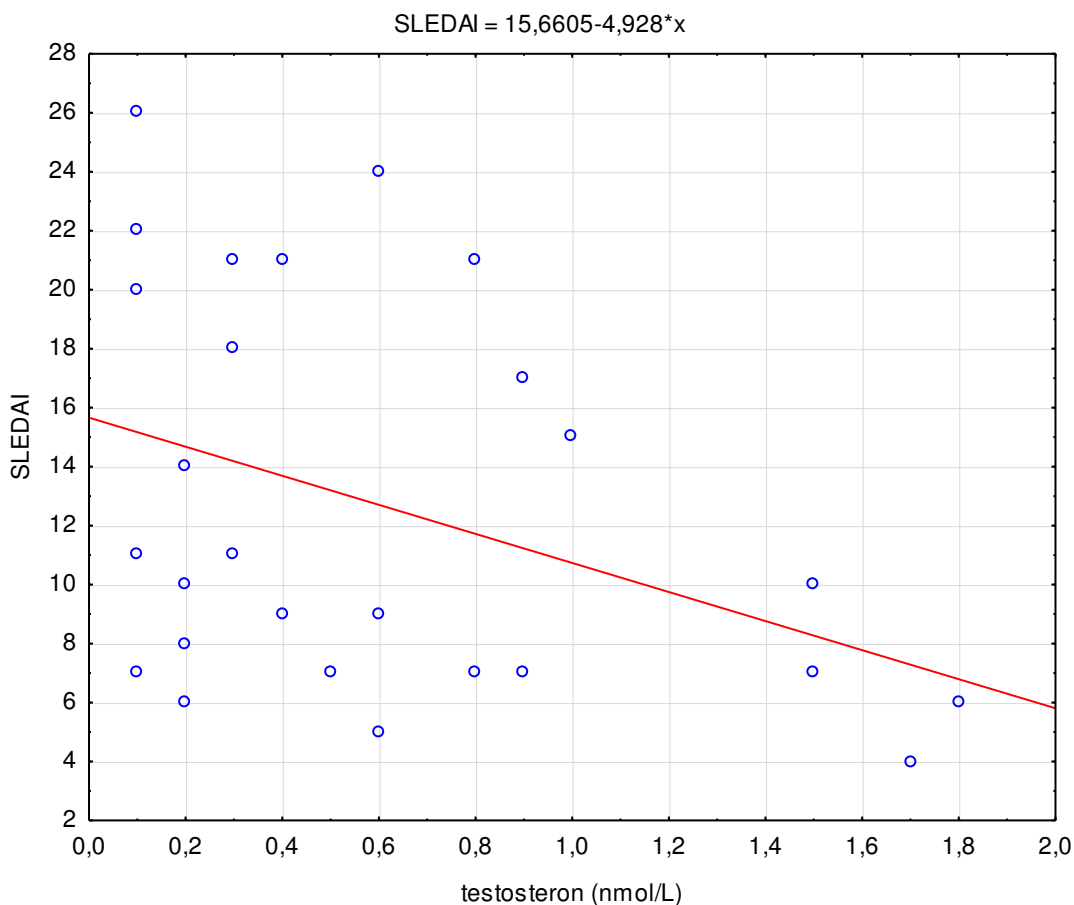
Vrijednosti testosterona su negativno korelirale s aktivnošću bolesti izraženom SLEDAI indeksom ( $r = -0,381$ ,  $p = 0,049$ ) (slika 5). Ostali hormoni nisu pokazali povezanost sa SLEDAI indeksom (tablica 9).

Tablica 9. Odnos hormona i SLEDAI-a.

Hormoni	SLEDAI
Testosteron (nmol/L)	<b>p=0,049</b>
DHEAS (μmol/L)	p=0,458
Androstendion (nmol/L)	p=0,448
Estradiol (nmol/L)	p=0,620

Pearson-ov koeficijent korelacije: razina značajnosti  $p < 0.05$

SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; DHEAS:dihidroepiandrosteron sulfat



Slika 5. Odnos testosterona i SLEDAI-a.

SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; DHEAS:dihidroepiandrosteron sulfat

## 5.2. Rezultati za SSc-u

U bolesnica sa SSc-om su nađene značajno niže razine testosterona ( $0,80 \pm 0,62$  nmol/L v.  $1,64 \pm 1,02$  nmol/l,  $p < 0,001$ ), DHEAS ( $1,16 \pm 1,00$   $\mu$ mol/L v.  $2,00 \pm 1,08$   $\mu$ mol/L,  $p = 0,008$ ) (slika 10) i androstendiona ( $3,26 \pm 3,08$  nmol/L v.  $5,79 \pm 2,82$  nmol/L,  $p = 0,004$ ) u odnosu na zdrave ispitanice. Nije zabilježena značajna razlika u razinama estadiola ( $p = 0,250$ ) u ispitivanim skupinama iako su bolesnice sa SSc-om imale višu razinu hormona (tablica 10).

Tablica 10. Razina spolnih hormona u bolesnica sa SSc-om i kontrole.

	SSc bolesnice (n=27)	Kontrole (n=27)	p
Testosteron (nmol/L)	0,80± 0.62	1,64±1,02	<b>p&lt;0,001</b>
DHEAS (μmol/L)	1,16±1,00	2,00±1,08	<b>p=0,008</b>
Androstendion (nmol/L)	3,26±3,08	5,79±2,82	<b>p=0,004</b>
Estradiol (nmol/L)	0,18±0,84	0,16±0,06	p=0,250

Tukey-ev post hoc test: razina značajnosti p<0.05

SSc:sistemska skleroza; DHEAS:dihidroepiandrosteron sulfat

Nije bilo značajne razlike u razinama testosterona, DHEAS, androstendiona i estradiola u bolesnica koje su liječene kortikosteroidima i bolesnica koje nisu liječene kortikosteridima (tablica 11).

Tablica 11. Razina spolnih hormona u bolesnica sa SSc-om s i bez terapije glukokortikoidima.

	SSc bolesnice s GK (n=12)	SSc bolesnice bez GK (n=15)	p
Testosteron (nmol/L)	0,89±0,55	0,52± 0,29	0,983
DHEAS (μmol/L)	1,31±1,01	0,97± 0,90	0,962
Androstenedion (nmol/L )	2,92 ± 3,08	3,03± 2,93	0,924
Estradiol (nmol/L)	0,19±0,07	0,20±0,10	0,759

Student-ov t-test: razina značajnosti p<0.05

SSc-sistemska skleroza; DHEAS: dihidroepiandrosteron sulfat; GK:glukokortikoidi



U SSc-i ispitivani hormoni nisu korelirali s ANA protutijelima. Razine androstendiona su negativno korelirale s razinom ACA ( $r=-0,434$ ,  $p=0,024$ ) protutijela, dok je nađena pozitivna korelacija sa Scl-70 protutijelima ( $r=0,385$ ,  $p=0,047$ ). Razine testosterona su pozitivno korelirale sa Scl-70 protutijelima ( $r=0,489$ ,  $p=0,010$ ). Nije nađena povezanost testosterona s ACA protutijelima ( $p=0,260$ ). Nije potvrđena povezanost estradiola s nijednim protutijelom u SSc (ANA:  $p=0,083$ ; ACA:  $p=0,946$ ; anti-Scl70:  $p=0,288$ ). Također nije potvrđena povezanost DHEAS s razinama ACA ( $p=0,256$ ) i anti-Scl70 protutijela ( $p=0,154$ ) (tablica 12).

Tablica 12. Odnos hormona i protutijela u bolesnica sa SSc-om.

	ANA	anti-Scl70	ACA
Testosteron (nmol/L)	$p=0,062$	<b><math>r=0,489</math> <math>p=0,010</math></b>	$p=0,260$
DHEAS ( $\mu\text{mol/L}$ )	$p=0,309$	$p=0,154$	$p=0,255$
Androstenedion (nmol/L)	$p=0,682$	<b><math>r=0,385</math> <math>p=0,047</math></b>	<b><math>r=-0,434</math> <math>p=0,024</math></b>
Estradiol (nmol/L)	$p=0,083$	$p=0,288$	$p=0,946$

Pearson-ov koeficijent korelacije: razina značajnosti  $p<0.05$

SSc:sistemska skleroza; ANA:antinuklearna protutijela; anti-Scl70:protutijela na topoizomerazu I; ACA:anticentromerna protutijela; DHEAS:dihidroepiandrosteron sulfat

Nije dokazana povezanost razina ispitivanih hormona s EUSTAR SSc aktivnošću bolesti (tablica 13), a također nije potvrđena povezanost s mRSS (tablica 14). Anti-Scl70 protutijela su pozitivno korelirala sa mRSS, dok nisu pokazala povezanost s EUSTAR SSc aktivnošću bolesti (slika 6).

Tablica 13. Odnos hormona i EUSTAR SSc aktivnosti bolesti.

<b>Hormoni</b>	<b>EUSTAR SSc aktivnost bolesti</b>
testosteron	p=0,281
DHEAS	p=0,106
androstendion	p=0,496
estradiol	p=0,950

Pearson-ov koeficijent korelacije: razina značajnosti  $p < 0.05$

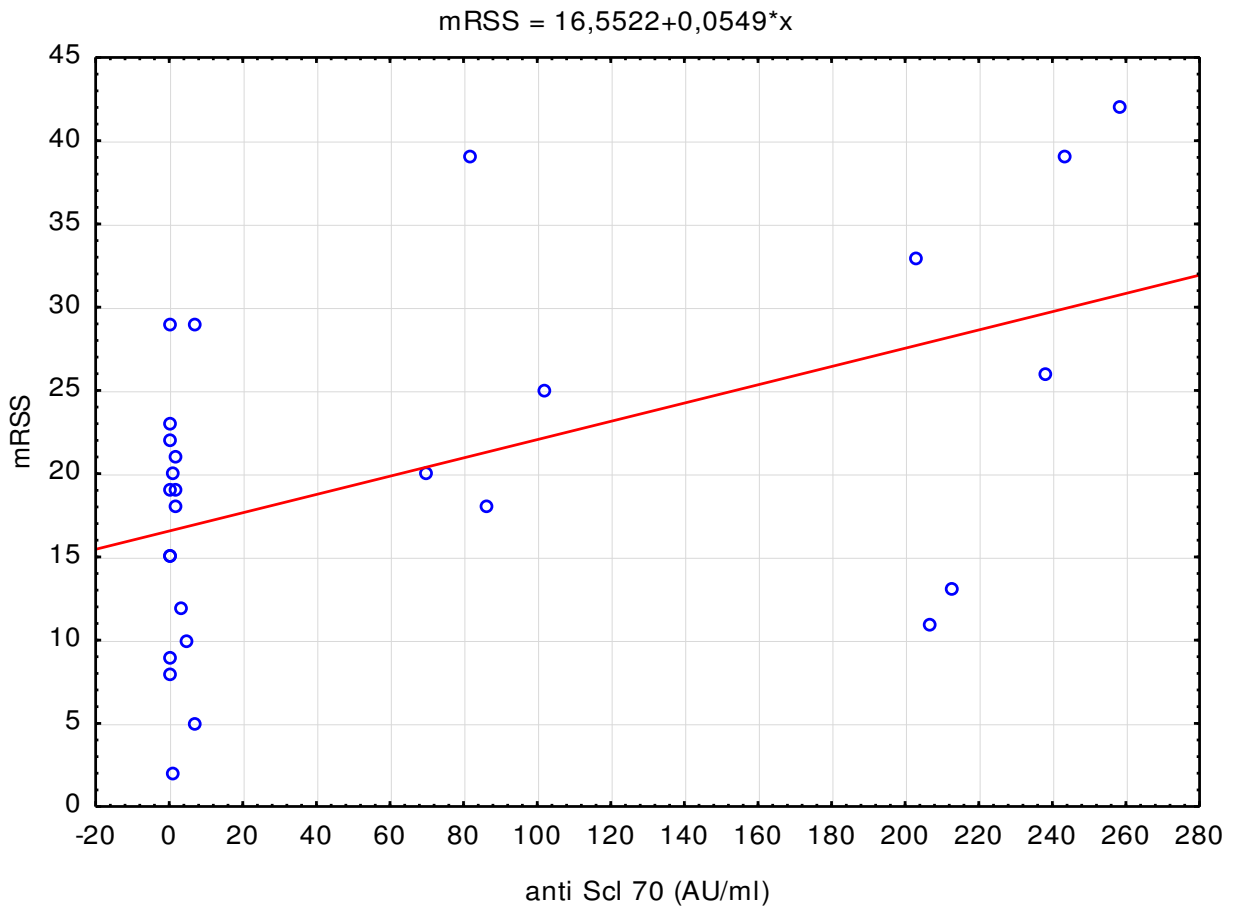
EUSTAR SSc: European Scleroderma Trial and Research systemic sclerosis, DHEAS: dihidroepiandrosteron sulfat

Tablica 14. Odnos hormona i mRSS.

<b>Hormoni</b>	<b>mRSS</b>
testosteron	P=0,732
DHEAS	P=0,405
androstendion	P=0,950
estradiol	P=0,521

Pearson-ov koeficijent korelacije: razina značajnosti  $p < 0.05$

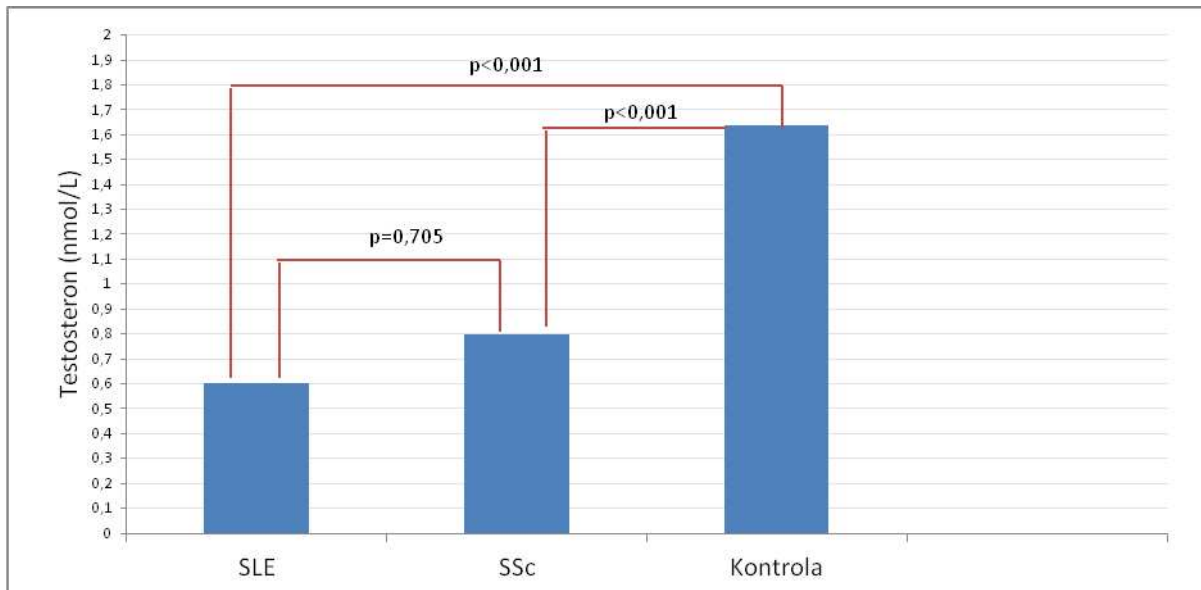
mRSS: modificirani Rodnan skin skor, DHEAS: dihidroepiandrosteron sulfat



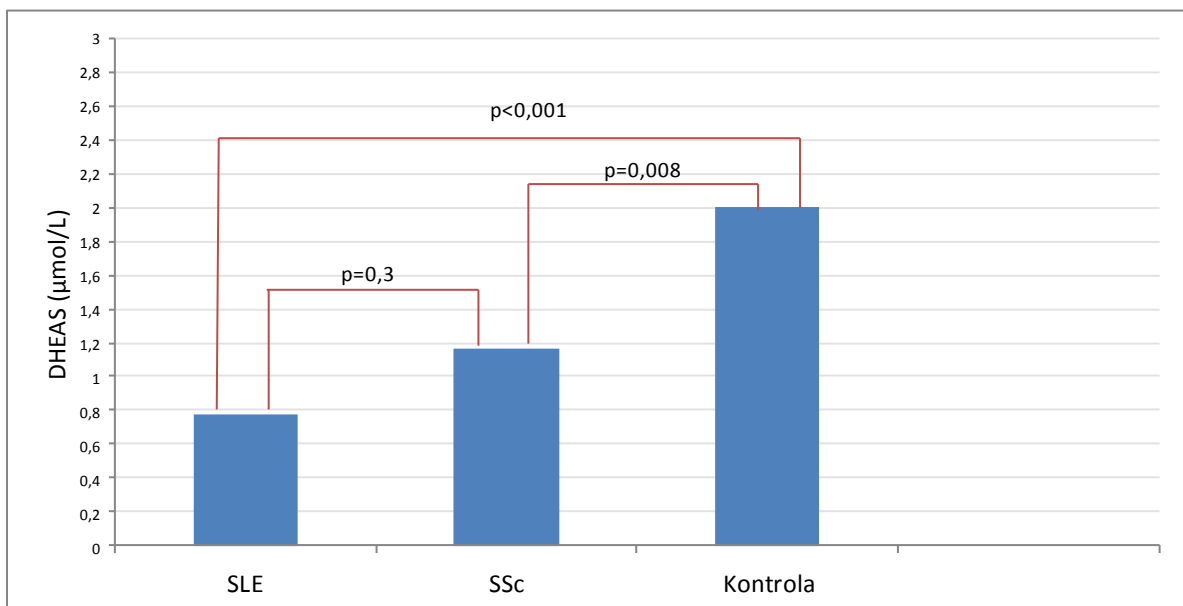
Slika 6. Odnos mRSS i anti-Scl70 protutijela.

### 5.3. Rezultati: Usporedba istraživanih parametra između SLE, SSc i kontrole

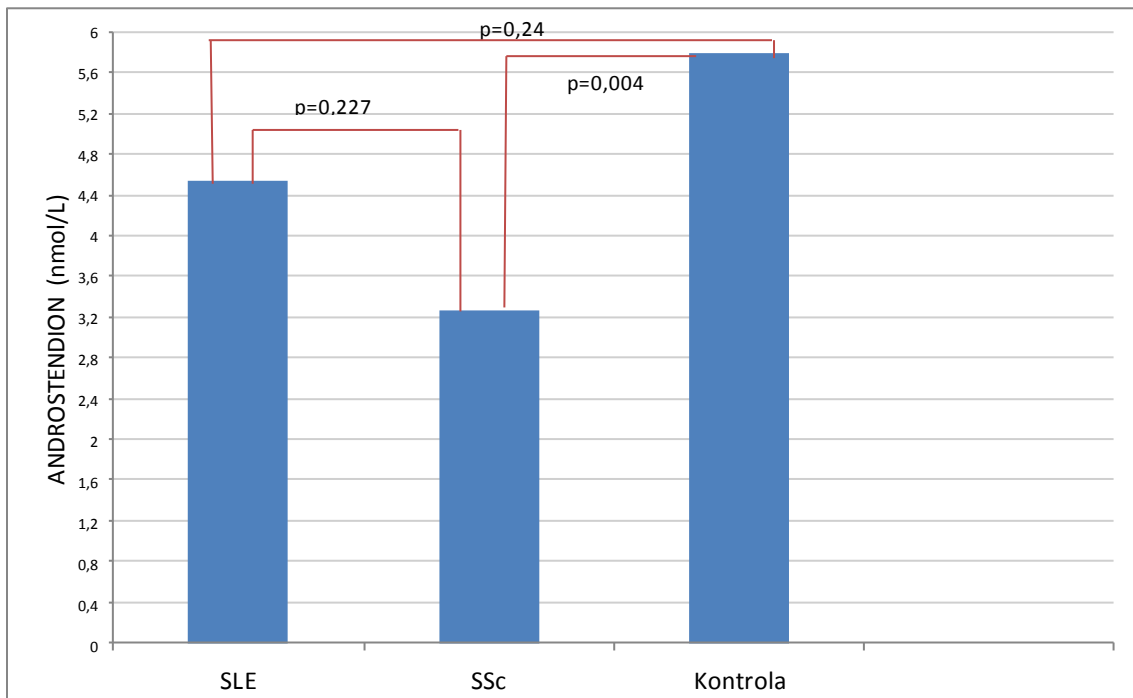
Razine testosterona ( $p=0,705$ ), DHEAS ( $p=0,346$ ), androstendiona ( $p=0,227$ ) i estradiola ( $p\geq 0,250$ ) se nisu značajno razlikovale između bolesnica sa SSc-om i SLE-om (slike 7,8,9,10). U odnosu na kontrolnu skupinu bolesnice sa SLE-om i SSc-om su imale značajno niže razine testosterona i DHEAS-a (slika 7,8) dok su samo bolesnice sa SSc-om imale značajno nižu razinu androstendiona u odnosu na zdrave žene (slika 9).



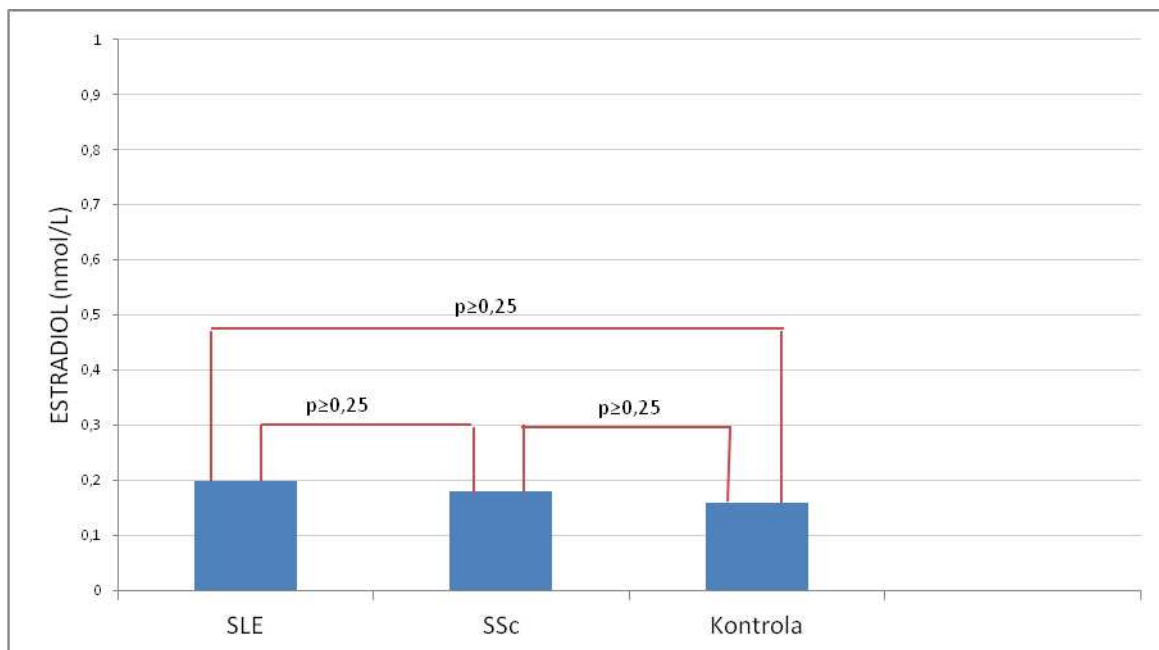
Slika 7. Odnos testosterona u bolesnica sa SLE-om, SSc-om i kontrole.



Slika 8. Odnos DHEAS u bolesnica sa SLE-om, SSc-om i kontrole.



Slika 9. Odnos androstendiona u bolesnica sa SLE-om, SSc-om i kontrole.



Slika 10. Odnos estradiola u bolesnica sa SLE-om, SSc-om i kontrole.

U bolesnica sa SLE-om je potvrđena očekivana negativna korelacija testosterona sa aktivnošću bolesti izražene SLEDAI indeksom (tablica 9) za razliku od SSc u koje nije potvrđena povezanost androgena s EUSTAR SSc aktivnošću bolesti (tablica 13).

Zanimljivo je da je u bolesnica sa SSc-om neočekivano nađena pozitivna korelacija testostreona i androstendiona s anti-Scl 70 protutijelima (tablica 12) za razliku od SLE-a gdje nije potvrđena povezanost s anti-dsDNA protutijelima (tablica 8). No, potvrđena je očekivana negativna povezanost testosterona, DHEAS i androstendiona s ANA protutijelima te testosterona i DHEAS s anti-Ro protutijelima (tablica 8). U bolesnika sa SLE-om je potvrđena očekivana pozitivna korelacija estradiola s anti-dsDNA protutijelima dok u SSc-i nije potvrđena (tablica 8).

Konačno, izuzev sličnosti u razinama spolnih hormona nije uočena značajnija sličnost u ostalim ispitivanim parametrima između ove dvije bolesti.

## 6. RASPRAVA

Ovo istraživanje je pokazalo promjenjen hormonski status u post-menopauzalnih bolesnica sa SLE-om i SSc-om. U ispitivanih bolesnica sa SLE-om nađene su značajno niže razine testosterona i DHEAS u odnosu na zdrave ispitanice dok se razine androstendiona nisu značajno razlikovale. Prethodna istraživanja su također pokazala snižene razine androgena uključujući testosteron, DHEAS, DHEA i androstendion većinom u bolesnica sa SLE-om generativne dobi (216,247). Osim u SLE-u, snižene razine androgena su nađene u RA-u te upalnoj bolesti crijeva, što nedvojbeno upućuje na povezanost androgena i imunog sustava (229,248,249).

Zanimljivo je da u našem istraživanju nismo utvrdili statistički značajnu razliku u razinama estradiola u bolesnica sa SLE-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Većina dosadašnjih istraživanja su pokazala značajno više razine estrogena u bolesnika sa SLE-om uključujući post-menopauzalne žene i muškarace (202). No, Rastin i suradnici nisu našli značajne razlike u razinama estrogena u bolesnica sa SLE-om i kontrolne skupine. Međutim radilo se uglavnom o bolesnicama generativne dobi (250). Izostanak značajnije hiperestrogenemije u naših bolesnica mogli bismo obrazložiti trajanjem post-menopauze. Naime, u zdravih žena nakon menopauze s godinama se razine estrogena snižavaju zbog gubitka ovarijalne funkcije odnosno smanjenja ovarijalne sinteze estrogena (251). Već unutar prvih pet godina post-menopauze razine estrogena su izrazito niske (252). Za očekivati je da je u bolesnica sa SLE-om to smanjenje još izraženije zbog učestalije pojave prijevremene ovarijalne insuficijencije posredovane autoimunim procesom ovarija te primjene alkilirajućih lijekova kao što je ciklofosfamid (239). Povećana periferna konverzija androgena u estrogene u bolesnica sa SLE-om vjerovatno nije dostatna za kompenzaciju takvog smanjenja estrogena.

Već su spomenuta istraživanja koja su pokazala da je u bolesnika sa SLE-om i RA ubrzana periferna konverzija androgenih prekursora u 17-beta estradiol i estron čemu posreduje aromataza enzimski kompleks (217,222,253). U koži i potkožnom tkivu bolesnika sa SLE-om je uočena povišena aktivnost aromataze, za koju se smatra da je povezana s aktivnošću bolesti i razinama estrogena. Ovi podatci dijelom objašnjavaju poremećenu perifernu sintezu estrogena u SLE-u kao i promijenjene razine te odnos spolnih hormona ovoj bolesti (210).

Naše istraživanje je pokazalo negativnu korelaciju androgena (testosterona, DHEAS i androstendiona) s ANA protutijelima, dok su samo testosteron i DHEAS negativno korelirali s anti-Ro protutijelima. Utvrđeno je da testosteron suprimira stvaranje ukupnih IgG i anti-dsDNA IgG protutijela u polimorfonuklearima bolesnika sa SLE-om (212). U ovom istraživanju nije nađena korelacija s anti-dsDNA protutijelima što je iznenađujuće s obzirom na utvrđeni učinak testosterona na sintezu DNA protutijela. Promjenjivost razina anti-DNA protutijela tijekom vremena i aktivnosti bolesti može djelimično objasniti ove rezultate (139). Važno je napomenuti da u studiji Kande i suradnika nije navedeno da li su bolesnice bile u menopauzi. Budući da je prosječna dob bolesnica bila 42 godine većina je vjerovatno bila u generativnoj dobi (212). Štoviše, potvrđeno je da primjena DHEA ima povoljan učinak na tijek bolesti u SLE-u iako se razine anti-dsDNA protutijela nisu značajnije mijenjale prije i nakon terapije (234). S druge strane, već spomenuta studija Rastina i suradnika je pokazala da su istovremeno povišene razine prolaktina i smanjene razine DHEAS u bolesnika sa SLE-om povezane s povećanjem razine anti-dsDNA protutijela (250). Kako se uglavnom radi o istraživanjima na pre-menopauzalnim ženama pitanje je da li se ovi rezultati mogu primijeniti na post-menopauzalne bolesnice. Nadalje, pitanje je korištenja različitih indeksa za procjenu aktivnosti bolesti što otežava usporedbu dobivenih rezultata. Unatoč izostanku povezanosti androgena s anti-dsDNA protutijelima, povezanost s ANA i anti-Ro protutijelima podupire dosadašnje spoznaje o učinku androgena na sintezu ukupnih imunoglobulina i stvaranje autoprotutijela.

Naše istraživanje je potvrdilo negativnu povezanost testosterona s aktivnošću bolesti izražene SLEDAI indeksom što bi govorilo u prilog imunosupresivnom učinku testosterona. Testosteron i DHEAS smanjuju oslobađanje proupalnog citokina IL-6 u monocitima čija razina je povišena u aktivnom SLE-u (213,214).

Kao što je već spomenuto, razine estradiola u naših bolesnica su bile više u odnosu na kontrolnu skupinu ali bez statističke značajnosti. Ovo istraživanje je pokazalo pozitivnu korelaciju estradiola s razinom anti-dsDNA protutijela što potvrđuje dosadašnje spoznaje o ulozi estrogena u stvaranju autoprotutijela. Poznato je da estrogeni pojačavaju humoralnu imunost te da estradiol može povećati stvaranje poliklonalnih IgG imunoglobulina uključujući IgG anti-dsDNA u polimorfonuklearima bolesnika sa SLE-om (208,210,211). U našem istraživanju nismo potvrdili povezanost estradiola sa SLEDAI indeksom.

U ispitivanih bolesnica sa SSc-om nađene su značajno niže razine testosterona, DHEAS i androstendiona. Prethodne studije su pokazale smanjenu razinu testosterona i



DHEAS u bolesnica sa SSc-om generativne dobi. U post-menopauzalnih bolesnica razine DHEAS se nisu značajno razlikovale od razina u kontrolnoj skupini dok su razine testosterona bile značajno niže (219,230). Za razliku od studije Aida-Yasuoka i suradnika nismo u istraživanju potvrdili značajne razlike u razinama estradiola u post-menopauzalnih bolesnica. Ovaj ishod bi se mogao objasniti, slično kao u bolesnica sa SLE-om, dužinom post-menopauze budući da je naša skupina bolesnica sa SSc-om bila u post-menopauzi duže vrijeme (218). Osim toga nije utvrđena povezanost estradiola s aktivnošću bolesti unatoč poznatom profibrotičkom učinku estrogena, također nije potvrđena povezanost estradiola sa specifičnim protutijelima u SSc-i.

S obzirom da podatci u literaturi upućuju na protektivni protuupalni učinak androgena u autoimunim bolestima može se zaključiti da snižene razine androgena u bolesnika sa SSc-om doprinose razvoju bolesti usljed smanjenja ili izostanka imunosupresivnog učinka ovih hormona (254). S druge strane, niže razine androgena mogu biti posljedica pojačane aktivnosti imunološkog procesa. Poznato je da je u bolesnika sa SSc-om povišena serumska razina IL-6 te njegova ekspresija u dermalnim fibroblastima, mononuklearima i endotelnim stanicama kože (255,256). Također je povišena razina IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , posebice u ranoj fazi bolesti (257,258). Sukladno istraživanjima koja su potvrdila povišene vrijednosti proupalnih citokina u SSc-i može se pretpostaviti da je u ovih bolesnika povišena aktivnost aromataze enzimskog kompleksa te da je ubrzana konverzija androgena razlog hipoandrogenemije slično kao u SLE-u i RA-u (210,220,222). Stanice kože lokalno stvaraju kortikosteron, kortizol, testosteron, DHEAS i estradiol. Tako stvoreni hormoni mogu promijeniti lokalnu imunološku aktivnost te potaknuti razvoj autoimune bolesti. S druge strane, upalni proces u koži i fibroza, u SSc-i bi mogli dovesti do poremećaja lokalne steroidogeneze s posljedičnim poremećajem serumске razine ovih hormona (256,258).

Odnos hormona i specifičnih protutijela u bolesnika sa SSc-om je izrazito složen. Naše istraživanje je pokazalo negativnu korelaciju androstendiona s ACA u post-menopauzalnih bolesnica sa SSc-om. Budući da su ACA uglavnom prisutna u ISSc-i moguće je da veće razine hormona suprimiraju autoimuni proces u koži i na taj način smanjuju pojavnost ACA protutijela (10). Ovi rezultati sukladni su dosadašnjim spoznajma o protektivnom učinku androgena u autoimunim zbivanjima što uključuje i SSc-u (201). S druge strane aktivni upalni proces, čiji odraz je i prisutstvo ACA u serumu bolesnika, može ubrzati konverziju androstendiona u perifernim tkivima te rezultirati sniženjem razine hormona u serumu bolesnica s prisutnim ACA protutijelima (220).

Neočekivano, istraživanje je pokazalo pozitivnu korelaciju androstendiona i testosterona s anti-Sc170 protutijelima. Ova protutijela su češće prisutna u dSSc-i i udružena su s opsežnom fibrozom kože, zahvaćanjem unutarnjih organa te aktivnoću bolesti (9). U kontekstu dosadašnjih saznanja o djelovanju hormona u autoimunim bolestima, za očekivati je bilo negativnu povezanost androgena sa anti-Sc170 protutijelima. Ovakav rezultat bi se mogao objasniti poremećajem lokalne steroidogeneze u sklopu aktivnog upalnog procesa. Kao što je već spomenuto, fibroblasti, endotelne stanice i monociti u koži sintetiziraju androgene (258). Stoga bi se mogla očekivati povećana sinteza androgena u upalnom miljeu kože. S druge strane, može se postaviti pitanje aktivnosti aromataze u uznapredovaloj SSc-i. U kasnijoj fazi bolesti kada dominira fibroza, a stanični elementi normalnog tkiva kože su nadomješteni kolagenom, očekujemo smanjenu aktivnost aromataze te smanjenu konverziju androgena u estrogene. Budući da se anti-Sc170 protutijela ne mijenjaju značajnije tijekom bolesti ta činjenica bi uz smanjenu konverziju androgena mogla objasniti pozitivnu korelaciju testosterona s anti-Sc170 protutijelima (260).

Razine ispitivanih hormona nisu pokazale povezanost s aktivnošću bolesti izražene EUSTAR SSc indeksom. Studija Mirone i sur. je pokazala povezanost androgena i prolaktina s težinom bolesti koja je određivana korištenjem Medsgar-ove skale za težinu bolesti (*severity scale*) koja je slična EUSTAR SSc indeksu aktivnosti bolesti, ali nije identična. Također bih naglasila da u studiji nisu bile izdvojene bolesnice u post-menopauzi te se rezultati ove dvije studije ne mogu u potpunosti uspoređivati (219).

U ovom istraživanju anti-Sc170 protutijela nisu pokazala povezanost s aktivnošću bolesti za razliku od prethodnih istraživanja u kojima je određivana težina bolesti korištenjem Medsgar-ove skale težine bolesti. Potvrđena je pozitivna korelacija anti-Sc170 protutijela s mRRS što je očekivano budući da su ova protutijela udružena s fibrozom kože (9).

SSc-a je etiopatogenetski heterogena bolest, točan mehanizam uključen u patogenezu bolesti je nepoznat te je upitno da li je SSc tipična autoimuna bolest. Pitanje je da li se postulati koji vrijede za ostale autoimune bolesti (prvenstveno SLE) mogu primjeniti i za SSc-u. Izostanak učinka klasične imunosupresivne terapije u SSc-i podržava ovu tezu.

Ako usporedimo SLE i SSc možemo reći da su u obje bolesti utvrđene značajno niže razine androgena u odnosu na kontrolnu skupinu, dok se razine testosterona i DHEAS između bolesnica sa SSc-om i SLE-om nisu razlikovale. Vrijednosti estrogena se također nisu međusobno značajno razlikovale u bolesnica sa SSc-om i SLE-om iako su bile veće u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovi rezultati podržavaju tezu o poremećenom hormonskom statusu u

autoimunim bolestima. Za razliku o SLE-a gdje je potvrđena povezanost androgena s aktivnošću bolesti, u SSc-i ta povezanost nije dokazana. To ostavlja otvoreno pitanje da li je SSc-a tipična autoimuna bolest čemu ide u prilog i pozitivna povezanost testosterona i anti-Sc170 protutijela. Prema nekim izvješćima, hormonsko nadomjesno liječenje u bolesnica sa SSc-om je rezultiralo prevencijom plućne hipertenzije za razliku od SLE-a gdje je nedvojbeno pokazano da može dovesti do pogoršanja bolesti (235,236,237). No, unatoč brojnim studijama, uloga hormona u autoimunim bolestima još uvijek nije potpuno jasna, posebice u SSc-i.

Ograničenja ovog istraživanja je mali broj bolesnica koje su značajnim dijelom bile na terapiji glukokortikoidima. 85% bolesnica sa SLE-om i 44% bolesnica sa SSc-om je uzimalo glukokortikoide (4 bolesnice sa SLE-om i 15 sa SSc-om nisu uzimale glukokortikoide). Iako je poznato da terapija glukokortikoidima suprimira adrenalni korteks i može utjecati na snižene razine androgena, mišljenja smo da minimalna doza koju su naše bolesnice uzimale nije imala značajniji učinak na razine hormona. Naime, maksimalna doza u bolesnica je bila 10 mg/d prednisolona, a  $\leq 7,5$  mg/dan je blizu nadomjesne doze za bolesnike s adrenalnom insuficijencijom (261). Osim toga, kada smo usporedili razine ispitivanih hormona u bolesnica sa SLE-om koje su uzimale  $\leq 5$  mg/dan i onih koje su uzimale  $> 5$  mg/dan nije bilo značajne razlike. Također, u bolesnica sa SSc-om koje su bile na terapiji glukokortikoidima i u onih koje nisu uzimale glukokortikoide nije nađena značajna razlika u razinama ispitivanih hormona. Mali broj bolesnica je posljedica niske incidencije ove dvije bolesti. Osim toga, radi se o presječnom istraživanju što može umanjiti značaj dobivenih rezultata.

## 7. ZAKLJUČAK

Naše istraživanje je pokazalo različite odnose hormona u dvije autoimmune bolesti istraživane u post-menopauzalnih bolesnica, ne samo u odnosu na aktivnost bolesti već i na pojavnost pojedinih autoprotutijela. U bolesnica sa SLE-om su nađene značajno niže razine testosterona i DHEAS u odnosu na zdrave ispitanice dok se razine androstendiona nisu značajno razlikovale. U bolesnica sa SSc-om su utvrđene značajno niže razine testosterona, DHEAS i androstendiona u odnosu na zdrave ispitanice. Vrijednosti testosterona i DHEAS se nisu značajno razlikovale između bolesnica sa SSc-om i SLE-om dok je androstendion bio je značajno niži u bolesnica sa SSc-om. Razine estradiola se nisu značajno razlikovale između ispitivanih skupina bolesnica kao ni u odnosu na kontrolu. U bolesnica sa SLE-om potvrđena je očekivana negativna korelacija svih androgena s ANA protutijelima, dok su samo testosteron i DHEAS negativno korelirali s anti-Ro protutijelima. Zanimljivo je da nije potvrđena povezanost androgena i anti-dsDNA protutijela ali je zato potvrđen pozitivan učinak testosterona na smanjenje aktivnosti bolesti izražene SLEDAI indeksom. Pozitivna korelacija estradiola s razinama anti-dsDNA protutijela u SLE-u prilog je dosadašnjim spoznajama o ulozi estrogena u stvaranju autoprotutijela.

U post-menopauzalnih bolesnica sa SSc-om potvrđena je negativnu korelacija androstendiona i ACA protutijela što se može razmatrati u sklopu supresivnog učinka androgena na autoimuna zbivanja ili obrnuto učinku upalnog zbivanja na konverziju androstendiona u perifernim tkivima. Provokativna je pozitivna korelacija androstendiona i testosterona sa anti-Scl70 protutijelima koja su prisutna u difuznoj SSc-i i rijetko javljaju na samom početku bolesti. Ovaj rezultat se može razmatrati u sklopu smanjenja aktivnosti aromataze u uznapređevaloj SSc-i ili kao poremećaj lokalne steroidogeneze u sklopu aktivnog upalnog procesa budući da se titar anti-Scl70 protutijela ne mijenja značajno tijekom bolesti. Nije potvrđena povezanost razina ispitivanih hormona i anti-Scl70 protutijela s aktivnošću SSc-e. Potvrđena je pozitivna korelcija anti-Scl70 protutijela s mRRS što je očekivano budući da su ova protutijela udružena s fibrozom kože. Neosporno je da su spolni hormoni uključeni u autoimuna zbivanja ali očitito na izrazito složen način što je posebice naglašeno u SLE-u. Odnos hormona u SSc-i s pojedinim protutijelima u usporedbi s SLE-om ponovno ističe pitanje da li je SSc-a uistinu autoimuna bolest i da li su specifična autoprotutijela čimbenici patogeneze ili posljedica bolesti.

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** SLE i SSc su učestalije u žena generativne dobi što upućuje da spolni hormoni imaju značajnu ulogu u patogenezi, pojavnosti i kliničkom tijeku ovih bolesti.

**Cilj:** Ispitati razine spolnih hormona (testosterona, DHEA, androstendiona, estradiola) u post-menopauzalnih bolesnica sa SLE-om i SSc-om u odnosu na zdrave žene u post-menopauzi. Utvrditi povezanost ispitivanih hormona s aktivnošću SSc-e i SLE-a. Istražiti povezanost specifičnih protutijela: ANA, anti-Sc170, ACA, anti-dsDNA i anti-Ro protutijelima s razinama ispitivanih spolnih hormona.

**Metode:** U ovom istraživanju je uključeno 27 bolesnica sa SSc-om, 27 bolesnica sa SLE-om i 27 zdravih žena u post-menopauzi. Razine spolnih hormona su određivane u svih ispitanika RIA (radioimunoesej) metodom. U bolesnica sa SSc-om su određivana ANA, ACA i anti-Sc170 protutijela, a u bolesnica sa SLE-om ANA, anti-dsDNA i anti-Ro protutijela. Aktivnost SSc-e je određivana korištenjem EUSTAR SSc „Activity Score“, a SLE-a pomoću SLEDAI indeksa.

**Rezultati:** U bolesnica sa SLE-om su nađene značajno niže razine testosterona ( $0,60 \pm 0,52$  nmol/L v.  $1,64 \pm 1,02$  nmol/l,  $p < 0,001$ ) i DHEAS ( $0,78 \pm 0,92 \mu\text{mol/L}$  v.  $2,00 \pm 1,08 \mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,001$ ) u odnosu na zdrave ispitanice. Nije zabilježena značajna razlika u razinama androstendiona ( $4,54 \pm 2,59$  nmol/L v.  $5,79 \pm 2,82$  nmol/L,  $p = 0,244$ ) i estradiola ( $0,20 \pm 0,09$  v.  $0,16 \pm 0,06$  nmol/L,  $p = 0,250$ ) ispitivanih skupina. Vrijednosti testosterona su negativno korelirale s aktivnošću bolesti izraženom sa SLEDAI indeksom ( $r = -0,381$ ,  $p = 0,049$ ). Testosteron ( $r = -0,560$ ,  $p = 0,002$ ), DHEAS ( $r = -0,563$ ,  $p = 0,002$ ) i androstendion ( $r = -0,396$ ;  $p = 0,041$ ) su negativno korelirale s ANA protutijelima. Estradiol je pozitivno korelirao s anti-dsDNA protutijelima ( $r = 0,398$ ,  $p = 0,40$ ). Razine testosterona ( $r = -0,453$ ,  $p = 0,018$ ) i DHEAS ( $r = -0,480$ ,  $p = 0,011$ ) su negativno korelirale s anti-Ro protutijelima. U bolesnica sa SSc-om su nađene značajno niže razine testosterona ( $0,80 \pm 0,62$  nmol/L v.  $1,64 \pm 1,02$  nmol/l,  $p < 0,001$ ) DHEAS ( $1,16 \pm 1,00 \mu\text{mol/L}$  v.  $2,00 \pm 1,08 \mu\text{mol/L}$ ,  $p = 0,008$ ) i androstendiona ( $3,26 \pm 3,08$  nmol/L v.  $5,79 \pm 2,82$  nmol/L,  $p = 0,004$ ) u odnosu na zdrave ispitanice. Nije zabilježena značajna razlika u razinama estradiola ( $0,18 \pm 0,84$  v.  $0,16 \pm 0,06$  nmol/L,  $p = 0,250$ ) ispitivanih skupina. Razine androstendiona su negativno korelirale s razinom ACA ( $r = -0,434$ ,  $p = 0,024$ ) protutijela, dok je nađena pozitivna korelacija s anti-Sc170 protutijelima ( $r = 0,385$ ,  $p = 0,047$ ).

Razine testosterona su pozitivno korelirale s anti-Scl70 protutijelima ( $r=0,489$ ,  $p=0,010$ ). Ispitivani hormoni nisu pokazali povezanost s aktivnošću bolesti.

**Zaključak:** Razine testosteroe i DHEAS su smanjenje u post-menopauzalnih žena sa SLE-om i SSc-om u usporedbi sa zdravim post-menopauzalnim ženama. Pozitivna korelacija androgena sa anti-Scl70 protutijelima i negativna korelacija s ACA protutijelima otvara pitanje uloge ovih hormona u SSc-i. Negativna korelacija androgena s anti- Ro i ANA protutijelima te aktivnošću bolesti potvrđuje dosadašnje spoznaje o protektivnom učinku ovih hormona u autimunim procesima. Pozitivna korelacija estrogena s anti-dsDNA protutijelima podržava spoznaje o poticanju humoralne imunosti.

**Ključne riječi:** sistemski eritemski lupus, sistemska skleroza, androgeni, estrogeni, aktivnost bolesti, autoprotutijela

## 9. SUMMARY

**Background:** Systemic lupus erythematosus (SLE) and systemic sclerosis (SSc) are more common in women suggesting that female sex hormones play an important role in the pathogenesis and clinical aspects of these diseases.

**Objective:** The aim of this study was to investigate the serum levels of estradiol, testosterone, dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) and androstenedione in post-menopausal SLE and SSc patients in comparison with healthy women. The aim was also to examine the possible correlation sex hormones with diseases activity in SLE and SSc and correlation sex hormones with specific autoantibodies:antinuclear antibodies (ANA), anticentromeric antibodies (ACA) and DNA topoisomerase I antibodies (anti-Sc170), anti- double strand deoxyribonucleic acid antibodies (anti- dsDNA) and anti-Ro antibodies in SLE and SSc patients.

**Methods:** Twenty-seven post-menopausal SSc patients, twenty-seven post-menopausal SLE patients and twenty-seven healthy women were enrolled in the study. Serum levels of testosterone, DHEAS, androstenedione and estradiol were measured in all groups. Serum levels of ANA, ACA and anti-Sc170 were measured only in SSc patients, while in SLE patients were measured ANA, anti-dsDNA and anti-Ro antibodies. SSc activity was determined using EUSTAR (European Scleroderma Trial and Research) Systemic Sclerosis Activity Score, whereas in SLE patients was determined using Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI).

**Results:** Serum levels of testosterone ( $0.64\pm 0.56$  nmol/L v.  $1.64\pm 1.02$  nmol/l,  $p<0.001$ ) and DHEAS ( $0.78\pm 0.92\mu\text{mol/L}$  v.  $2.00\pm 1.08$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p<0.001$ ) were significantly lower in SLE patients compared to controls. There wasn't a significant difference in serum levels of androstenedione ( $4.54\pm 2.59$  nmol/L v.  $5.79\pm 2.82$  nmol/L,  $p=0.244$ ) and estradiol ( $0.20\pm 0.09$  v.  $0.16\pm 0.06$  nmol/L,  $p=0.250$ ) between groups. Serum levels of testosterone negatively correlated with SLEDAI ( $r=-0.3809$ ,  $p=0.049$ ). Testosterone ( $r=-0.560$ ,  $p=0.002$ ), DHEAS ( $r=-0.563$ ,  $p=0.002$ ) and androstenedione ( $r=-0.396$ ,  $p=0.041$ ) negatively correlated with ANA antibodies. Estradiol positively correlated with anti-dsDNA antibodies ( $r=0.398$ ,  $p=0.40$ ). Testosterone ( $r=-0.453$ ,  $p=0.018$ ) and DHEAS ( $r=-0.480$ ,  $p=0.011$ ) negatively correlated with anti- Ro antibodies. Serum levels of testosterone ( $0.80\pm 0.62$  nmol/L v.  $1.64\pm 1.02$  nmol/l,  $p<0.001$ ), DHEAS ( $1.16\pm 1.00$   $\mu\text{mol/L}$  v.  $2.00\pm 1.08$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p=0.008$ ) and androstenedione

( $3.26\pm 3.08$  nmol/L v.  $5.79\pm 2.82$  nmol/L,  $p=0.004$ ) were significantly lower in SSc patients compared to controls. There wasn't a significant difference in serum levels of estradiol between groups ( $0.18\pm 0.84$  v.  $0.16\pm 0.06$  nmol/L,  $p=0.250$ ). Serum levels of androstenedione negatively correlated with ACA antibodies ( $r=-0.434$ ,  $p=0.024$ ) while a positive correlation was found with anti-Sc170 antibodies ( $r=0.385$ ,  $p=0.047$ ). Testosterone levels positively correlated with anti-Sc170 antibodies ( $r=0.489$ ,  $p=0.010$ ).

**Conclusion:** Circulating testosterone and DHEAS levels are decreased in post-menopausal SLE and SSc patients compared with healthy post-menopausal women. A positive correlation of androgens with anti-Sc170 antibodies and a negative correlation with ACA antibodies raise the question of the role of these hormones in the disease. A negative correlation of androgens with ANA and anti-Ro antibodies as well as SLEDAI confirms current knowledge about protective effect of these hormones in autoimmune diseases. Positive correlation of estrogens with anti- dsDNA antibodies supports the findings of stimulating humoral immunity.

**Key words:** systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, androgens, estrogens, disease activity, autoantibodies



## 10. POPIS LITERATURE

1. Walker JG, Fritzler MJ. Systemic sclerosis. U: Diagnostic criteria in autoimmune diseases. ur. Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin ME. New York:Humana Press; 2008. str.31-6.
2. Silmon AJ. Scleroderma-Demographics and survival. *J Rheumatol* 1997;24:58-61.
3. Herrick AL, Worthington J. Genetic epidemiology systemic sclerosis. *Arthritis Res* 2002;4:166-8.
4. Arnett FC. HLA and autoimmunity in scleroderma (systemic sclerosis). *Int Rev Immunol* 1995;12(2-4):107-28.
5. Arnett FC, Gourh P, Shete S, i sur. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis* 2010;69(5):822-7.
6. Feghali-Bostwick C, Medsger TA Jr, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;48:1956–63.
7. Wang Y, Fan PS, Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2006;54:2271–9.
8. Mora GF. Systemic sclerosis: environmental factors. *J Rheumatol* 2009 Nov;36(11):2383-96.
9. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA Jr, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1363-73.
10. Mahler M, Maes L, Blockmans D, i sur. Clinical and serological evaluation of a novel CENP-A based ELISA. *Arthritis Res Ther* 2010;12(3): R99.
11. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther* 2003;5(2):80-93.
12. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117:557-67.

13. Broen JCA, Radstake TRDJ, Rossato M. The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2014;(10):671-81.
14. Zimmermann AF, Pizzichini MM. Update on etiopathogenesis of systemic sclerosis. *Rev Bras Reumatol* 2013;53(6):516-24.
15. White B. Immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22(4):695-708.
16. Prescott RJ FA, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992;166:255-63.
17. Sakkas LI, Platsoucas C. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum* 2004;50:1721-33.
18. Needleman-White B, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1992;35:67-72.
19. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin-4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1997;24:328-32.
20. Kurosawa K, Hirose K, Sano H, et al. Increased IL-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2455-3.
21. Zuber JP, Spertini F. Immunological basis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45(suppl 3):iii23-iii25.
22. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated B cells. *Arthritis Rheum* 2004;50:1918-27.
23. Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:1186-91.
24. Penas PF, Jones-Caballero M, Aragues M, Fernandez-Herrera J, Fraga J, Garcia-Diez A. Sclerodermatous graft-vs-host disease: clinical and pathological study of 17 patients. *Arch Dermatol* 2002;138:924-34.
25. Zhang Y, McCormick LL, Desai SR, Wu C, Gilliam AC. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. *J Immunol* 2002;168:3088-98.
26. Randone SB, Guiducci S, Cerinic MM. Systemic sclerosis and infections. *Autoimmun Rev* 2008;8(1):36-40.

27. Fujinami RS, Oldstone MB. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 1985;230:1043-5.
28. Jimenez SA, Diaz A, Khalili K. Retroviruses and the pathogenesis of systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995;12:159-75.
29. Radić M, Kaliterna DM, Bonacin D, i sur. Is *Helicobacter pylori* infection a risk factor for disease severity in systemic sclerosis? *Rheumatol Int* 2012;33(11):2943-8.
30. Kahaleh MB, LeRoy EC. Autoimmunity and vascular involvement in systemic sclerosis (SSc) Autoimmunity 1999;31(3):195–214.
31. Carpentier PH, Maricq HR. Microvasculature in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1990;16(1):75-91.
32. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009;360(19):1989-2003.
33. Distler JH, Jünger A, Pileckyte M, i sur. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007;56(12):4203-15.
34. Claman HN, Giorno RC, Seibold JR. Endothelial and fibroblastic activation in scleroderma: The myth of the »uninvolved« skin. *Arthritis Rheum* 1991;34:1495-501.
35. Youinou P, Revelen R, Bordron A. Is antiendothelial cell antibody the murder weapon in systemic sclerosis? *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:35-6.
36. Fleischmajer R, Perlish JS. Capillary alterations in scleroderma. *Arch Dermatol* 1980;113:161-71.
37. Ludwicka-Bradley A, Silver RM, Bogatkevich GS. Coagulation and autoimmunity in scleroderma interstitial lung disease *Semin Arthritis Rheum* 2011;41(2):212-22.
38. Denton CP, Korn JH. Digital ulceration and critical digital ischaemia in scleroderma. *Scleroderma Care Res* 2003;1:12-6.
39. Campbell PM, LeRoy EC. Pathogenesis of systemic sclerosis: a vascular hypothesis. *Semin Arthritis Rheum* 1975;4:351-68.
40. Rodnan GP, Myerowitz RL, Justh GO. Morphologic changes in the digital arteries of patients with progressive systemic sclerosis (scleroderma) and Raynaud phenomenon. *Medicine* 1980;59:393-408.
41. D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT, Shulman LE. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). *Am J Med* 1969;46:428-40.

42. LeRoy EC: Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest* 1974;54:880-8.
43. Needleman BW, Choi J, Burrows-Mezu A i sur. Secretion and binding of transforming growth factor-beta by scleroderma and normal dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1990;33:650-6.
44. van der Slot AJ, Zuurmond AM, van den Bogaerdt AJ, i sur. Increased formation of pyridinoline cross-links due to higher telopeptide lysyl hydroxylase levels is a general fibrotic phenomenon. *Matrix Biol* 2004;23(4):25-7.
45. Buckingham RB, Prince RK, Rodnan GP, Taylor F. Increased collagen accumulation in dermal fibroblast cultures from patients with progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Lab Clin Med* 1978;92:5-21.
46. Bhattacharyya S, Wei J, Tourtellotte WG, Hinchcliff M, Gottardi CG, Varga J. Fibrosis in systemic sclerosis: common and unique pathobiology. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;5(Suppl 1):S18.
47. Leroy EC: Connective tissue synthesis by scleroderma skin fibroblasts in cell culture. *J Exp Med* 1972;135:1351-62.
48. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, i sur. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(21):12319-24.
49. Gardner H, Shearstone JR, Bandaru R, i sur. Gene profiling of scleroderma skin reveals robust signatures of disease that are imperfectly reflected in the transcript profiles of explanted fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2006;54:1961-73.
50. Sargent JL, Milano A, Bhattacharyya S, i sur. A TGFbeta-responsive gene signature is associated with a subset of diffuse scleroderma with increased disease severity. *J Invest Dermatol* 2010;130:694-705.
51. Vuorio T, Maekela JK, Vuorio E. Activation of type I collagen genes in cultured scleroderma fibroblasts. *J Cell Biochem* 1985;28:105-13.
52. Scharffetter K, Lanat-Buttgereit B, Krieg T. Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in-situ hybridization. *Eur J Clin Invest* 1988; 18:9-17.
53. Kahaleh MB, Yin T. Enhanced expression of high-affinity interleukin-2 receptors in scleroderma: possible role for IL-6. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;62:97-102.
54. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J: Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:42-54.

55. Slack JL, Liska D, Bornstein P. Regulation of expression of the type I collagen genes. *Am J Med Genet* 1993;45:140-51.
56. Jelaska A, Arakawa M, Broketa G, Korn JH. Heterogeneity of collagensynthesis in normal and systemic sclerosis skin fibroblasts. Increased proportion of high collagen-producing cells in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1996;39:1338-46.
57. Hesselstrand R, Scheja A, Akesson A. Mortality and causes of death in a Swedish series of systemic sclerosis patients. *Ann Rheum Dis* 1998;57:682-6.
58. Barnett AJ. The "neck sign" in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1989;32(2):209-11.
59. Malcarne VL, Hansdottir I, McKinney A. Medical signs and symptoms associated with disability, pain, and psychosocial adjustment in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2007;34(2):359-67.
60. Varga J, Rudnicka L, Uitto J. Connective tissue alterations in systemic sclerosis. *Clin Dermatol* 1994;12(3):387-96.
61. Belch JJ. Raynaud's phenomenon: its relevance to scleroderma. *Ann Rheum Dis* 1991;50 (Suppl 4):839-45.
62. Mayes MD. Systemic sclerosis: Clinical features. U: Klippel JH, Stone JH. Crofford LJ, White PH, ur. *Primer on the Rheumatic Diseases*. 13. izd. New York:Springer Science;2008. str. 343-50.
63. Olsen NJ, King LE, Park JH. "Muscle abnormalities in scleroderma". *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22(4):783-96.
64. Valentini G, Black C. Systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002;16(5):807-16.
65. Steen VD. The lung in systemic sclerosis. *J Clin Rheumatol* 2005;11(1):40-6.
66. Steen VD, Graham G, Conte C, Owens G, Medsger TA Jr. Isolated diffusing capacity reduction in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1992;35(7):765-70.
67. Sallam H, McNearney TA, Chen JD. "Systematic review: pathophysiology and management of gastrointestinal dysmotility in systemic sclerosis (scleroderma)". *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23(6):691-712.
68. Rose S, Young MA, Reynolds JC. "Gastrointestinal manifestations of scleroderma". *Gastroenterol Clin North Am* 1998;27(3):563-94.

69. Ruangjutipopan S, Kasitanon N, Louthrenoo W, Sukitawut W, Wichainun R. Causes of death and poor survival prognostic factors in Thai patients with systemic sclerosis. *J Med Assoc Thai* 2002;85(11):1204-9.
70. Steen VD, Mayes MD, Merkel PA. "Assessment of kidney involvement". *Clin. Exp Rheumatol* 2003;21(3 Suppl 29):S29-31.
71. Penn H, Howie AJ, Kingdon EJ, i sur. "Scleroderma renal crisis: patient characteristics and long-term outcomes". *QJM* 2007;100 (8):485-94.
72. Deswal A, Follansbee WP. Cardiac involvement in scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22(4):841-60.
73. Medsger TA Jr, Steen VD. Classification, prognosis. U: Clements PJ, Furst DE, ur. *Systemic sclerosis*. Baltimore: Williams and Wilkins;1996. str. 51-4.
74. Czömpöly T, Simon D, Czirják L, Németh P. Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2009;8(8):692-6.
75. Harvey GR, Rands AL, McHugh NJ. Anti-RNA polymerase antibodies in systemic sclerosis (SSc): association with anti-topoisomerase I antibodies and identification of autoreactive subunits of RNA polymerase II. *Clin Exp Immunol* 1996;105(3):468-74.
76. Oddis CV, Okano Y, Rudert WA, Trucco M, Duquesnoy RJ, Medsger TA Jr. Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl. Clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum* 1992;35(10):1211-7.
77. Worda M, Sgonc R, Dietrich H, i sur. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorioallantoic membrane assay. *Arthritis Rheum* 2003;48:2605-14.
78. Harvey GR, McHugh NJ. Serologic abnormalities in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 1999;11(6):495-502.
79. Kowal-Bielecka O, Landewé R, Avouac J, i sur. EUSTAR Co-Authors. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis* 2009;68(5):620-8.
80. Zarafonitis CJ. Antifibrotic therapy with POTABA. *Am J Med Sci* 1964;248:550-61.
81. Furst DE, Clements PJ, Hillis S, i sur. Immunosuppression with chlorambucil, versus placebo, for scleroderma. Results of a three-year, parallel, randomized, double-blind study. *Arthritis Rheum* 1989;32(5):584-9.
82. Beckett VL, Conn DL, Fuster V, i sur. Trial of platelet-inhibiting drug in scleroderma. Double-blind study with dipyridamole and aspirin. *Arthritis Rheum* 1984;27(10):1137-43.

83. Blom-Bülow B, Oberg K, Wollheim FA, i sur. Cyclofenil versus placebo in progressive systemic sclerosis. A one-year double-blind crossover study of 27 patients. *Acta Med Scand* 1981;210(5):419-28.
84. Williams HJ, Furst DE, Dahl SL, i sur. Double-blind, multicenter controlled trial comparing topical dimethyl sulfoxide and normal saline for treatment of hand ulcers in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1985;28(3):308-14.
85. Gruber BL, Kaufman LD. A double-blind randomized controlled trial of ketotifen versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* 1991;34(3):362-6.
86. Casas JA, Saway PA, Villarreal I, i sur. 5-fluorouracil in the treatment of scleroderma: a randomised, double blind, placebo controlled international collaborative study. *Ann Rheum Dis* 1990;49(11):926-8.
87. Zandman-Goddard G, Tweezer-Zaks N, Shoenfeld Y. "New therapeutic strategies for systemic sclerosis-a critical analysis of the literature". *Clin Dev Immunol* 2005;12(3):165-73.
88. Thompson AE, Shea B, Welch V, Fenlon D, Pope JE. Calcium-channel blockers for Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2001;44(8):184-7.
89. Lau CS, Belch JJ, Madhok R, i sur. A randomised, double-blind study of cicaprost, an oral prostacyclin analogue, in the treatment of Raynaud's phenomenon secondary to systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 1993;11(1):35-40.
90. Wigley FM, Wise RA, Seibold JR, i sur. Intravenous iloprost infusion in patients with Raynaud phenomenon secondary to systemic sclerosis. A multicenter, placebo-controlled, double-blind study. *Ann Intern Med* 1994;120(3):199-206.
91. Wigley FM, Seibold JR, Wise RA, McCloskey DA, Dole WP. Intravenous iloprost treatment of Raynaud's phenomenon and ischemic ulcers secondary to systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1992;19(9):1407-14.
92. Korn JH, Mayes M, Matucci Cerinic M, i sur. Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 2004;50(12):3985-93.
93. Badesch DB, Tapson VF, McGoon MD, i sur. Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to the scleroderma spectrum of disease. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2000;132(6):425-34.
94. McLaughlin VV. Survival in patients with pulmonary arterial hypertension treated with first-line bosentan. *Eur J Clin Invest* 2006;36(Suppl 3):10-5.

95. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002;346(12):896-903.
96. Lee AJ, Chiao TB, Tsang MP. Sildenafil for pulmonary hypertension. *Ann Pharmacother* 2005;39(5):869-84.
97. Davas EM, Peppas C, Maragou M, Alvanou E, Hondros D, Dantis PC. Intravenous cyclophosphamide pulse therapy for the treatment of lung disease associated with scleroderma. *Clin Rheumatol* 1999;18(6):455-61.
98. Pakas I, Ioannidis JP, Malagari K, Skopouli FN, Moutsopoulos HM, Vlachoyiannopoulos PG. Cyclophosphamide with low or high dose prednisolone for systemic sclerosis lung disease. *J Rheumatol* 2002;29(2):298-304.
99. Rosas V, Conte JV, Yang SC, et al. Lung transplantation and systemic sclerosis. *Ann Transplant* 2000;5(3):38-43.
100. Steen VD, Medsger TA Jr. Long-term outcomes of scleroderma renal crisis. *Ann Intern Med* 2000;133(8):600-3.
101. Stratton RJ, Wilson H, Black CM. Pilot study of anti-thymocyte globulin plus mycophenolate mofetil in recent-onset diffuse scleroderma. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(1):84-8.
102. van Laar JM, Sullivan K. Stem cell transplantation in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25(6):719-25.
103. Rahman A, Isenberg DA. "Review Article: Systemic Lupus Erythematosus". *N Engl J Med* 2008; 358(9):929-39.
104. Wong N, Ng VY, Ibrahim S, Slessarev M, Chandran V. Lupus - the cold, hard facts. *Lupus* 2014;23(8):837-9.
105. Cabral AR, Alarcón-Segovia D. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 1997;9(5):387-92.
106. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune Dis* 2014;2014:321-59.
107. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349(16):1526-33.
108. Lau CS, Yin G, Mok MY. Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. *Lupus* 2006;15(11):715-9.



109. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992;35:31-8.
110. Tsao BP, Grossman JM, Riemekasten G, et al. Familiality and co-occurrence of clinical features of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46(10):2678-85.
111. Doria A, Gatto M, Zen M, Iaccarino L, Punzi L. Optimizing outcome in SLE: treating-to-target and definition of treatment goals. *Autoimmun Rev* 2014;13(7):770-7.
112. Sestak AL, Fürnrohr BG, Harley JB, Merrill JT, Namjou B. The genetics of systemic lupus erythematosus and implications for targeted therapy. *Ann Rheum Dis* 2011;70(Suppl 1):i37-43.
113. Sanchez E, Nadig A, Richardson BC, et al. Phenotypic associations of genetic susceptibility loci in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2011;70(10):1752-7.
114. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003;56(7):481-90.
115. Graham RR, Ortmann WA, Langefeld CD, et al. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2002;71(3):543-53.
116. Nath SK, Kilpatrick J, Harley JB. Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture. *Curr Opin Immunol* 2004;16(6):794-800.
117. Tsao BP. Update on human systemic lupus erythematosus genetics. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16(5):513-21.
118. Tsokos GC, Magrath IT, Balow JE. Epstein-Barr virus induces normal B cell responses but defective suppressor T cell responses in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1983;131(4):1797-801.
119. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Parks CG, Gilkeson GS. Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998;41(10):1714-24.
120. Costenbader KH, Feskanich D, Stampfer MJ, Karlson EW. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum* 2007;56(4):1251-62.
121. Lehmann P, Hölzle E, Kind P, Goerz G, Plewig G. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol* 1990;22(2 Pt 1):181-7.

122. Ritterhouse LL, Crowe SR, Niewold TB, i sur. Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2011;70(9):1569-74.
123. Bakke AC, Kirkland PA, Kitridou RC, i sur. T lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus. Correlations with corticosteroid therapy and disease activity. *Arthritis Rheum* 1983;26:745-50.
124. Tsokos GC, Nambiar MP, Tenbrock K, Juang YT. Rewiring the T-cell: signaling defects and novel prospects for the treatment of SLE. *Trends Immunol* 2003;24(5):259-63.
125. Linker-Israeli M, Quismorio FP Jr, Horwitz DA. CD8+ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4+ cells to support autoantibody synthesis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1216-25.
126. Liossis SN, Kovacs B, Dennis G, i sur. B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. *J Clin Invest* 1996;98:2549-57.
127. Nagy G, Koncz A, Perl A. T-and B-cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Crit Rev Immunol* 2005;25(2):123-40.
128. Juang YT, Wang Y, Solomou EE, i sur. Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV. *J Clin Invest* 2005;115(4):996-1005.
129. Tsokos GC, Boumpas DT, Smith PL, Djeu JY, Balow JE, Rook AH. Deficient gamma-interferon production in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1986;29(10):1210-5.
130. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, i sur. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(5):2610-5.
131. Mir A, Porteu F, Levy M, i sur. C3b receptor (CR1) on phagocytic cells from SLE patients: analysis of the defect and familial study. *Clin Exp Immunol* 1988;73:461-6.
132. Dijkstra HM, Bijl M, Fijnheer R, i sur. Fc gamma receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum* 2000;43:2793-800.

133. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, i sur. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998;41:1241-50.
134. Suzuki N, Ichino M, Mihara S, i sur. Inhibition of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of lymphocytes in vitro by circulating anti-Fas ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998;41:344-53.
135. Baumann I, Kolowos W, Voll RE, i sur. Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46:191-201.
136. Walport MJ, Davies KA, Botto M. C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology* 1998;199(2):265-85.
137. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004;34(2):501-37.
138. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, i sur. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
139. Ehrenstein MR, Katz DR, Griffiths MH, i sur.. Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. *Kidney Int* 1995;48:705-11.
140. Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid-beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992;1(2):75-81.
141. Bigler C, Schaller M, Perahud I, Osthoff M, Trendelenburg M. Autoantibodies against complement C1q specifically target C1q bound on early apoptotic cells. *J Immunol* 2009;183(5):3512-21.
142. Moroni G, Trendelenburg M, Del Papa N, i sur. Anti-C1q antibodies may help in diagnosing a renal flare in lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 2001;37(3):490-8.
143. Edworthy SM. Clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. U: Harris ED, Budd R, Genovese M, Firestein G, Sargent J, Sledge C ur. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 7. izd. Philadelphia:Elsevier Saunders;2005. str.1201-24.
144. Oinuma K, Harada Y, Nawata Y, i sur. Osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus develops very early after starting high dose corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis* 2001;60(12):1145-8.

145. Firestein GS, Budd RC, Harris ED Jr, McInnes ID, O'Dell JR. Kelley's Textbook of Rheumatology. 9. izd. Philadelphia:Elsevier Saunders;2012.
146. Callen JP. Systemic lupus erythematosus in patients with chronic cutaneous (discoid) lupus erythematosus. Clinical and laboratory findings in seventeen patients. *J Am Acad Dermatol* 1985;12(2 Pt 1):278-88.
147. Faurschou M, Dreyer L, Kamper AL, Starklint H, Jacobsen S. Long-term mortality and renal outcome in a cohort of 100 patients with lupus nephritis. *Arthritis Care Res* 2010;62(6):873-80.
148. Dooley MA. Clinical and laboratory features of lupus nephritis. U: Wallace DJ, Hahn BH ur: Dubois' Lupus Erythematosus. Philadelphia PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. str. 1112-30.
149. Asherson RA, Cervera R. Review: antiphospholipid antibodies and the lung. *J Rheumatol* 1995;22(1):62-6.
150. Gertner E. Diffuse alveolar hemorrhage in the antiphospholipid syndrome: spectrum of disease and treatment. *J Rheumatol* 1999;26(4):805-7.
151. Trager J, Ward MM. Mortality and causes of death in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13(5):345-51.
152. Doria A, Shoenfeld Y, Wu R, i sur. Risk factors for subclinical atherosclerosis in a prospective cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2003;62(11):1071-7
153. Salmon JE, Roman MJ. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: implications for patient management. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13(5):341-4.
154. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, i sur. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1997;145(5):408-15.
155. Mosca M, Tani C, Aringer M, i sur. European League Against Rheumatism recommendations for monitoring patients with systemic lupus erythematosus in clinical practice and in observational studies. *Ann Rheum Dis* 2010;69(7):1269-74.
156. Jennekens FG, Kater L. The central nervous system in systemic lupus erythematosus. Part 1. Clinical syndromes: a literature investigation. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41(6):605-18.

157. Jennekens FG, Kater L. The central nervous system in systemic lupus erythematosus. Part 2. Pathogenetic mechanisms of clinical syndromes: a literature investigation. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41(6):619-30.
158. Bertsias GK, Ioannidis JP, Aringer M, i sur. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus with neuropsychiatric manifestations: report of a task force of the EULAR standing committee for clinical affairs. *Ann Rheum Dis* 2010;69(12):2074-82.
159. Sanna G, Bertolaccini ML, Cuadrado MJ, Khamashta MA, Hughes GR. Central nervous system involvement in the antiphospholipid (Hughes) syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(2):200-13.
160. Messer J, Reitman D, Sacks HS, Smith H Jr, Chalmers TC. Association of adrenocorticosteroid therapy and peptic-ulcer disease. *N Engl J Med* 1983;309(1):21-4.
161. Sultan SM, Ioannou Y, Isenberg DA. A review of gastrointestinal manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38(10):917-3.
162. Hahn BH. Systemic lupus erythematosus. U: Fauci AS ur: *Harrison's Rheumatology*. New York: McGraw-Hill; 2006. str.69-83.
163. Alarcón GS, McGwin G, Bertoli AM, i sur. Effect of hydroxychloroquine on the survival of patients with systemic lupus erythematosus: data from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA L). *Ann Rheum Dis* 2007;66(9):1168-72.
164. Ostensen M, Villiger PM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001;10:135-9.
165. Wallace DJ. The use of chloroquine and hydroxychloroquine for non-infectious conditions other than rheumatoid arthritis or lupus: a critical review. *Lupus* 1996;5(Suppl 1):S59-64.
166. Imboden J, Hellman DB, Stone JK. *Current rheumatology diagnosis and treatment*. 1. izd. McGraw-Hill Professional:2004.
167. Bertsias GK, Gordon C, Ioannidis JP, i sur. EULAR recommendations for the management of SLE. Report of a Task Force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 2008;67:195-205.
168. Abransom SM, Dobro J, Eberle MA, i sur. Acute reversible hypoxemia in systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 199;114:941-7.

169. Haris EN, Wilson WA, Pierangeli SS. Haemathological and coagulation abnormalities of systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome. U:Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS ur: Systemic Lupus Erythematosus. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2007. str. 408-13.
170. Houssiau FA, Ginzler EM. Current treatment of lupus nephritis. *Lupus* 2008;17:426-30.
171. Flanc RS, Roberts MA, Strippoli GF, Chadban SJ, Kerr PG, Atkins RC. Treatment of diffuse proliferative lupus nephritis: a meta-analysis of randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis* 2004;43:197-208.
172. Houssiau FA, Vasconcelos C D'Cruz D, i sur. Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: the Euro-Lupus Trial, a randomized trial of low dose versus high-dose intravenous cyclophosphamide. *Arthritis Rheum* 2002;46:2121-31.
173. Ginzler EM, Dooley MA, Aranow C, i sur. Mycophenolate mofetil or intravenous ciclophosphamid for lupus nephritis. *N Engl J Med* 2005;353:2219-28.
174. Contreras G, Pardo V, Leclercq B, i sur. Sequential therapies for proliferative lupus nephritis. *N Engl J Med* 2004;350:971-80.
175. Bhat P, Radhakrishman J. B lymphocytes and lupus nephritis : new insights into pathogenesis and targeted therapies. *Kidney Int* 2008;73:261-8.
176. Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ, i sur. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to- severly active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010;62:222-33.
177. Davies RJ, Sangle SR, Jordan NP, i sur. Rituximab in the treatment of resistant lupus nephritis: therapy failure in rapidly progressive crescentic lupus nephritis. *Lupus*. 2013;22(6):574-82.
178. Rovin BH, Furie R, Latinis K, i sur. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum* 2012;64(4):1215-26.
178. Furie R, Petri M, Zamani O, i sur.: BLISS-76 Study group. A phase III, randomised, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumat* 2011;63(12):3918-30.
180. Navarra SV, Guzmán RM, Gallacher AE, i sur. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2011;377(9767):721-31.

181. Specchia ML, de Waure C, Gualano MR, i sur. Health technology assessment of belimumab: a new monoclonal antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Biomed Res Int*. 2014;2014:704207
182. Kamal A. The efficacy of novel B cell biologics as the future of SLE treatment: A review. *Autoimmun Rev* 2014;13(11);1094-101.
183. Haubitz M. New and emerging treatment approaches to lupus. *Biologics* 2010;4:263-71.
184. Wallace DJ, Gordon C, Strand V, i sur. Efficacy and safety of epratuzumab in patients with moderate/severe flaring systemic lupus erythematosus: results from two randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre studies (ALLEVIATE) and follow-up. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52(7):1313-22.
185. Wallace DJ, Kalunian K, Petri MA, i sur. Efficacy and safety of epratuzumab in patients with moderate/severe active systemic lupus erythematosus: results from EMBLEM, a phase IIb, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(1):183-90.
186. Merrill JT, Burgos-Vargas R, Westhovens R, i sur. The efficacy and safety of abatacept in patients with non-life-threatening manifestations of systemic lupus erythematosus: results of a twelve-month, multicenter, exploratory, phase IIb, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2010;62(10):3077-87.
187. Rovin BH, Parikh SV. Lupus Nephritis: The Evolving Role of Novel Therapeutics. *Am J Kidney Dis* 2014; 63(4):677-90.
188. Lateef A, Petri M. Biologics in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:504-9.
189. Horowitz DM, Furie RA. Abetimus sodium: a medication for the prevention of lupus nephritis flares. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10(9):1501-7.
190. Stoecker ZM, Sharabi A, Molad Y, i sur. Treatment of lupus patients with a tolerogenic peptide, hCDR1 (Edratide). Immunomodulation of gene expression. *Hum Immunol* 2009;33:77-82.
191. Barilla-Labarca ML, Toder K, Furie R. Targeting the complement system in systemic lupus erythematosus and other diseases. *Clin Immunol*. 2013;148(3):313-21.
192. Llorente L, Rishaud-Patin Y, Garcia-Padilla C, i sur. Clinical and biological effects of anti-IL 10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1790-800.

193. Illei GG, Shirota Y, Yarboro CH, i sur. Tocilizumab in systemic lupus erythematosus : data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum* 2010;62:542-52.
194. Fernandez D, Bonilla E, Mirza N, Niland B, Perl A. Rapamycin reduces disease activity and normalizes T cell activation-induced calcium fluxing in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006;54(9):2983-8.
195. Soforo E, Baumgartner M, Francis L, i sur. Induction of systemic lupus erythemtaosus with tumor necrosis factor blockers. *J Rheumatol* 2010;37(1):204-5.
196. Moroni G, Doria A, Mosca M, i sur. A randomized pilot trial comparing cycloporine versus azathioprine for maintance therapy in diffuse lupus nephritis over four years . *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:925-32.
197. Mok CC, Tong KH, To CH, i sur.. Tacrolimus for induction therapy of diffuse proliferative lupus nephritis: an open labeled pilot study. *Kidney Int* 2005;68:813-7.
198. Farge D, Labopin M, Tyndall A, i sur. Autologous hematopoetic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years of expirience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases. *Haematologica* 2010;95:284-95.
199. Liang J, Zhang H, Hua B, i sur. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1423-9.
200. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2001;2:777-80.
201. Castagnetta L, Granata OM, Traina A, i sur. A role for sex steroids in autoimmune diseases: a working hypothesis and supporting data. *Ann N Y Acad Sci* 2002;966:193-203.
202. Verthely D, Petri M, Ylamus M, Klinman DM. Disossiation of sex hormones levels and cytokine production in SLE patients. *Lupus* 2001;10:352-8.
203. Viselli SM, Stanek EM, Mukherjee P, Hymer WC, Mastro AM. Prolactin-induced mitogenes of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology* 1991;129:983-90.
204. Clevenger CV, Altman SW, Prytowsky MB. Requirement of nuclear prolactin fot interleukin-2-stimulated proliferation of T lymphocytes. *Science* 1991;53:77-9.
205. Padgett DA, Loria RM. In vitro potentiation of lymphocyte activation by dehydroepiandrosterone, androstendiol, and androstentriol. *J Immunol* 1994;153:1544-52.



206. Walker SE, Allen SH, McMurray RW. Prolactin and autoimmune disease. *Trends Endocrinol Metab* 1993;4(5):147-51.
207. McMurray RW, Weidensaul D, Allen SH, Walker SE. Efficacy of bromocriptine in an open label therapeutic trial for systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1995;22:2084-91.
208. Cutolo M, Capellino S, Sulli A, i sur. Estrogens and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:538-47.
209. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, i sur. Hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus* 2004;13(9):635-8.
210. Folomeev M, Dougados M, Beaune J, i sur. Plasma sex hormones and aromatase activity in tissues of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1992;1:191-5.
211. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42(2):328-37.
212. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1703-11.
213. Zietz B, Reber T, Oertel M, Glück T, Schölmerich J, Straub RH. Altered function of the hypothalamic stress axes in patients with moderately active systemic lupus erythematosus. II. Dissociation between androstenedione, cortisol, or dehydroepiandrosterone and interleukin 6 or tumor necrosis factor. *J Rheumatol* 2000;27(4):911-8.
214. Straub RH, Konecna L, Hrach S, i sur. Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(6):2012-7.
215. Lahita RG, Bradlow HL, Fishman J, Kunkel HG. Estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus: patients and family members. *Arthritis Rheum* 1982;25:843-6.
216. Lahita RG, Bradlow HL, Ginzler E, Pang S, New M. Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1987;30:241-8.
217. Tengstrand B, Calstron K, Fellander-Tsai, i sur. Abnormal levels of serum dehydroepiandrosteron, estrone, and estradiol in men with rheumatoid arthritis: high correlation between serum estradiol and current degree of inflammation. *J Rheumatol* 2003; 30:2338-43.

218. Aida-Yasuoka K, Peoples C, Yasuoka H, i sur. Estradiol promotes the development of a fibrotic phenotype and is increased in the serum of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2013;10;15(1):R10.
219. Mirone L, Barini A, Barini A. Androgen and prolactin (Prl) levels in Systemic Sclerosis (SSc ): relationship to disease severity. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1096:257-62.
220. Macdiarmid F, Wang D, Duncan LG. Stimulation of aromatase activity in breast fibroblasts by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Mol Cell Endocrinol* 1994;106:17-21.
221. Purohit A, Ghilchic MW, Duncan L. Aromatase activity and interleukin-6 production by normal and malignant breast tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3052-8.
222. Le Bail J, Liagre B, Vergne P, i sur. Aromatase in synovial cells from postmenopausal women. *Steroids* 2001;66:749-57.
223. Lahita RG, Bradlow HL, Kunkel HG, i sur. Alterations of estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1979;22:1195-8.
224. Mok CC, Wong RWS. Pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Postgrad Med J* 2001;77:157-65.
225. Mok CC, Lau CS, Wong RWS. Use of exogenous estrogens in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2001;30:426-35.
226. Le Thi Huong D, Wechsler B, Piette JC, i sur. Risks of ovulation-induction therapy in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1996;35:1184-6.
227. Cutolo M, Villaggio B, Otsa K, i sur. Altered circadian rhythms in rheumatoid arthritis patients play a role in the disease's symptoms. *Autoimmun Rev* 2005;4:497-502.
228. Straub RH, Buttgereit F, Cutolo M. Benefit of pregnancy in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:801-3.
229. Straub RH, Zeuner M, lock G, Scholmerich J, Lang B. High prolactin and low dehydroepiandrosterone sulfate serum levels in patients with severe systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1997;36(4):426-32.
230. La Montagna G, Baruffo A, Pasquali D, Bellastella A, Tirri G, Sinisi AA. Assessment of pituitary gonadotropin release to gonadotropin releasing hormone/thyroid-stimulating hormone stimulation in women with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:310-14.
231. Turesson C, Pikwer M The role of testosterone and other hormonal factors in rheumatoid arthritis development. *Int J Clin Rheumatol* 2014;9(1):73-87.

232. Soldano S, Montagna P, Villaggio B, i sur. Endothelin and sex hormones modulate the fibronectin synthesis by cultured human skin scleroderma fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 2009; 68(4):599-602.
233. Steen VD, Medsger TA Jr. Fertility and pregnancy outcome in women with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999;42:763-8.
234. Van Vollenhoven RF, Engleman EG, McGuire JL. Dehydroepiandrosteron in systemic lupus erythematosus: Results of a double-blind, placebo-controlled, randomised clinical trial. *Arthritis Rheum* 1995;38:1826-31.
235. Buyon JP, Petri MA, Kim MY, i sur. The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2005;142:953-62.
236. Sanchez-Guerrero J, Gonzales-Perez M, Romero-Diaz J, Cravioto MD. Menopausal hormonal therapy in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007;56:3070-9.
237. Beretta L, Caronni M, Origgi L, Ponti A, Santaniello A, Scorza R. Hormone replacement therapy may prevent the development of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Scand J Rheumatol* 2006;35:468-71.
238. Generini S, Seibold JR, Matucci-Cerinic M. Estrogens and neuropeptides in Raynaud's phenomenon. *Rheum Dis Clin North Am* 2005;31:177-86.
239. Sammaritano LR. Menopause in patients with autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2012;11(6-7):A430-6.
240. Font J, Pallares L, Cervera R, i sur. Systemic lupus onset in the elderly: clinical and immunological characteristics. *Ann Rheum Dis* 1991;50:702-5.
241. World Health Organisation Scientific Group. Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1996;866:1-107.
242. Masi AT. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1980;23(5):581-90.
243. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.
244. Valentini G, Della Rossa A, i sur. European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis II. Identification of disease activity variables and development of preliminary activity indexes. *Ann Rheum Dis* 2001;60(6):592-8.

245. Bombardieri S, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.
246. Clements PJ, Lachenbruch PA, Seibold JR, i sur. Skin thickness score in systemic sclerosis: an assessment of interobserver variability in 3 independent studies. *J Rheumatol* 1993;20(11):1892-6.
247. Jungers P, Nahoul K, Pélissier C, i sur. Plasma androgens in women with disseminated lupus erythematosus. *Presse Med* 1983;12(11):685-8.
248. Chen CC, Parker CR Jr. Adrenal androgens and the immune system. *Semin Reprod Med* 2004;22(4):369-77.
249. Tengstrand B, Carlstrom K, Hafstrom I. Gonadal hormones in men with rheumatoid arthritis – from onset through 2 years. *J Rheumatol* 2009;36(5):887-92.
250. Rastin M, Hatef MR, Tabasi N, Sheikh A, Morad Abbasi J, Mahmoudi M. Sex hormones and peripheral white blood cell subsets in systemic lupus erythematosus patients. *Iran J Immunol* 2007;4(2):110-5.
251. Navarro D, Acosta A, Robles E, Díaz C. Hormone profile of menopausal women in Havana. *MEDICC Rev* 2012;14(2):13-5.
252. Yasui T, Matsui S, Tani A, Kunimi K, Yamamoto S, Irahara M. Androgen in postmenopausal women. *J Med Invest* 2012;59(1-2):12-27.
253. Bijlsma JW, Straub RH, Masi AT, i sur. Neuroendocrine immune mechanisms in rheumatic diseases. *Trends Immunol* 2002;23:59-76.
254. Suzuki T, Suzuki N, Daynes RA, Engeleman EG. Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;61:202-11.
255. Muangchant C, Pope JE The significance of interleukin-6 and C-reactive protein in systemic sclerosis: a systematic literature review. *Clin Exp Rheumatol* 2013;31(2 Suppl 76):122-34.
256. Khan K, Xu S, Nihtyanova S, i sur. Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012;71(7):1235-42.
257. Kantor TV, Friberg D, Medsger TA Jr, Buckingham RB, Whiteside TL. Cytokine production and serum levels in systemic sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;65(3):278-85.

258. Pehlivan Y, Onat AM, Ceylan N, i sur. Serum leptin, resistin and TNF- $\alpha$  levels in patients with systemic sclerosis: the role of adipokines in scleroderma. *Int J Rheum Dis* 2012;15(4):374-9.
259. Slominski A, Zbytek B, Nikolakis G, i sur. Steroidogenesis in the skin: Implications for local immune functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013;137:107-23.
260. Sato S, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K. Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels determined by ELISA in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(10):1135-40.
261. AHFS drug information 2004. McEvoy GK, ur. Corticosteroids general statement. Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists;2004:2886-98.

## **11. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNI PODATCI**

**Ime i prezime:** Dijana Perković

**Adresa:** Šimićeva 68, 21000 Split

**Telefon:** +38521 557 660

**Elektronička pošta:** dijana.perkovic@hotmail.com

**Državljanstvo:** Hrvatsko

**Datum i mjesto rođenja:** 24. 10. 1965., Aržano

### **ŠKOLOVANJE**

1990.

Završen medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu

2001.

Završena specijalizacija iz Interne medicine

2003.

Završen poslijediplomski studij iz Biomedicine

2006.

Asistent MEF Split

2008.

Završena uža specijalizacija iz Reumatologije

2012.

Obranjena tema doktorata

2013.

Priznavanje naziva primarijus

2014.

Priznavanje uže specijalizacije iz kliničke imunologije i alergologije

## **RADNO ISKUTSTVO**

1991.-1992.

Obvezni staž, DZ Split, KBC Split

1992.-1994.

Liječnik opće medicine, DZ Imotski

1994.-1997.

Liječnik opće prakse, Interna klinika, KBC Split

1997.-2001.

Specijalizant Interne medicine, Interna klinika, KBC Split

2001.-2008.

Intermist, Interna klinika, KBC Split

2008-2014.

Internist-reumatolog, Interna klinika, KBC Split

2014-

Internist, reumatolog, klinički imunolog i alergolog, Interna klinika, KBC Split

## **MATERINSKI JEZIK**

- Hrvatski jezik

## **OSTALI JEZICI**

- Engleski jezik

## **RADOVI INEDKSIRANI U CC:**

1. Ljutić D, **Perković D**, Rumboldt Z, Bagatin J, Hozo I, Pivac N. Comparasion, of Ondansetron with Metoclopramide in the Symptomatic Relief of Uraemia-Induced Nausea and Vomiting. *Kidney Blood Press Res* 2002;923.
2. Polić S, **Perković D**, Štula I, Punda A, Lukin A, Rumboldt Z. Early Cardiac Rupture Following Sterptokinase in Patients with Acute Myocardial Infarction: Retrospective Cohort Study. *Croat Med J* 2000;41:303-305.
3. Buća A, **Perković D**, Martinović Kaliterna D, Vlastelica Krstulović M, Titlić M. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: diagnostic and clinical features according to revised ACR criteria. *Coll Antropol* 2009 Aug;14(49):281-8.

4. Znaor L, Medic A, Karaman K, **Perković D**. Serpiginous-like choroiditis as sign of intraocular tuberculosis. *Med Sci Monit* 2011 Jul;17(7):CS88-90.
5. Kaliterna DM, **Perković D**, Radić M. Churg-Straus syndrome associated with montelukast therapy. *J Asthma* 2009;46(6):604-5.
6. Jurišić Z, Martinović Kaliterna D, Marasović Krstulović D. **Perković D**, i sur. Relationship between interleukin-6 and cardiac involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52(7):1298-302.
7. Martinović Kaliterna D, Aljinović J, **Perković D**, Marasović Krstulović D, Marinović I, Vlak T. Does tocilizumab contribute to elevation of rheumatoid factor and induction of paradoxical sialoadenitis in rheumatoid arthritis patients? *Wien Klin Wochenschr.* 2014;126(3-4):126-129.
8. Lalovac M, Martinovic-Kaliterna D, Mejjic Krstulovic S, Markovic V, Salamunic I, **Perkovic D**. Possible implications of TGF-alpha in eosophageal dysmotility in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2014 Aug 1. [Epub ahead of print]
9. Marasovic-Krstulovic D, Jurisic Z, **Perkovic D**, Aljinovic J, Martinovic-Kaliterna D. Fulminant diffuse systemic sclerosis following aortic valve replacement. *Med Hypotheses.* 2014;82(6):792-4.
10. **Perković D**, Martinović Kaliterna D, Jurišić Z, Lalovac M, Radić M. Androgens in post-menopausal patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* 2014 (in press).