

# Koncentracija interleukina6 i TNF alfa u slini bolesnika s inaktivnom multiplom sklerozom i koegzistirajućim Hashimotovim tireoiditisom

---

Šiško Markoš, Ines

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:496007>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Ines Šiško Markoš

**KONCENTRACIJA INTERLEUKINA 6 I TNF  
ALFA U SLINI BOLESNIKA S INAKTIVNOM  
MULTIPLOM SKLEROZOM I  
KOEKZISTIRAJUĆIM HASHIMOTOVIM  
TIREOIDITISOM**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, veljača 2022.



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Ines Šiško Markoš

**KONCENTRACIJA INTERLEUKINA 6 I TNF  
ALFA U SLINI BOLESNIKA S INAKTIVNOM  
MULTIPLOM SKLEROZOM I  
KOEKZISTIRAJUĆIM HASHIMOTOVIM  
TIREOIDITISOM**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. VANJA BAŠIĆ KES

izv. prof. sc. MAJA FRANCESCHI

Zagreb, veljača 2022.



University of Zagreb

School of Dental Medicine

Ines Šiško Markoš

**THE CONCENTRATION OF INTERLEUKIN 6  
AND TNF ALPHA IN SALIVA OF PATIENTS  
WITH INACTIVE MULTIPLE SCLEROSIS  
AND COEXISTING HASHIMOTO'S  
THYROIDITIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Prof. VANJA BAŠIĆ KES

Prof. MAJA FRANCESCHI

Zagreb, February 2022.

Rad je ostvaren u Kliničkom bolničkom centru: „ Sestre Milosrdnice “ u Zagrebu, Klinika za onkologiju i nuklearnu medicinu i Klinika za neurologiju.

Lektor hrvatskog jezika: Željana Klječanin Franić, prof. hrvatskog jezika i književnosti

Lektor engleskog jezika: Janet Ann Tuškan, prof. engleskog jezika

Sastav povjerenstva za ocjenu i obranu doktorskog rada:

1. Arijana Lovrenčić - Huzjan, prof. dr. sc., Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet
2. Zlatko Trkanjec, prof. dr. sc., Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet
3. Mirko Ivkić, prof. dr. sc., Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
4. Robert Trotić, prof. dr. sc., Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet
5. Kristina Peroš, izv. prof. dr. sc., Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet
6. Maja Žagar, doc. dr. sc., Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet (zamjena)

Datum obrane rada: 10. veljače 2022.

Rad sadrži: 74 stranice (upisati broj)

20 tablica (upisati broj)

9 slika (upisati broj)

2 CD

Rad je vlastito autorsko djelo, koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu su izvorni doprinos autora poslijediplomskog doktorskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihovog podrijetla.

## **STRANICA SA ZAHVALAMA**

Zahvaljujem djelatnicima Klinike za neurologiju i Klinike za onkologiju i nuklearnu medicinu KBC Sestre Milosrdnice u Zagrebu koji su pomogli u probiru i uzorkovanju bolesnika, posebno sestri Dragici Marijan i dr. sc. Valentini Vidranski, mag. med. biokemije.

Posebno hvala mojim mentoricama, prof. dr. sc. Vanji Bašić Kes i izv. prof. dr. sc. Maji Franceschi na korisnim sugestijama i potpori pri ostvarenju ove disertacije.

A sve bi bilo nevažno bez ljubavi mojih najmilijih: Pave, Jakova, Frane i Paole, mame i tate, braće i bake.

## Sažetak

### KONCENTRACIJA INTERLEUKINA 6 I TNF ALFA U SLINI BOLESNIKA S INAKTIVNOM MULTIPLOM SKLEROZOM I KOEGZISTIRAJUĆIM HASHIMOTOVIM TIREOIDITISOM

Cilj istraživanja je usporediti koncentracije interleukina-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini bolesnika s inaktivnom multiplom sklerozom i Hashimotovim tireoiditisom i onih bolesnika s inaktivnom MS i zdravom štitnjačom. Uzeti su uzorci sline i krvi 130 bolesnika u inaktivnoj fazi MS na Klinici za neurologiju, a laboratorijske analize uzoraka su izvršene u laboratoriju Klinike za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Sestre Milosrdnice. Bolesnici su podijeljeni u dvije skupine: oni koji imaju zdravu štitnjaču i bolesnici s HT-om. Ne postoji statistički značajna razlika između razine IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini u zadanim grupama. Međutim, postoji statistički značajna korelacija između razine IL-6 iz sline i IL-6 iz krvi ( $r = 0,363$ ;  $p < 0,01$ ), statistički značajna korelacija između razine IL-6 iz sline i TNF- $\alpha$  iz krvi ( $r = 0,187$ ;  $p < 0,01$ ) i postoji statistički značajna korelacija između razine IL-6 iz krvi i TNF- $\alpha$  iz krvi ( $r = 0,432$ ;  $p < 0,01$ ). Također, postoji statistički značajna razlika u razini TSH u skupini eutireoidnih bolesnika s povišenom razinom protutijela na štitnjaču (TPO i TgA) u odnosu na bolesnike s razinom protutijela u referentnom intervalu ( $t = 3,324$ ;  $df = 128$ ,  $p < 0,01$ ). Indeks tjelesne mase, proširena ljestvica statusa onesposobljenosti i pušenje ne koreliraju s razinom IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini.

Iako nismo dokazali razliku u razini interleukina 6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini u dvije skupine, dokazali smo značajnost sline kao dijagnostičkog uzorka jer u više parametara korelira s razinom u krvi. Također smo pokazali važnost određivanja TPO i TgA protutijela štitnjače jer je razina TSH u eutireoidnih bolesnika statistički značajno viša kod bolesnika s povišenim protutijelima.

**Ključne riječi:** multipla skleroza, Hashimotov tireoiditis, interleukin-6, TNF- $\alpha$ , slina

## Summary

### **TITLE: THE CONCENTRATION OF INTERLEUKIN 6 AND TNF ALPHA IN SALIVA OF PATIENTS WITH INACTIVE MULTIPLE SCLEROSIS AND COEXISTING HASHIMOTO'S THYROIDITIS**

**Aim:** The aim of the study was to compare the concentration of interleukin - 6 and TNF -  $\alpha$  in the blood and saliva of patients with inactive multiple sclerosis and Hashimoto's thyroiditis and those patients with inactive MS and healthy thyroid.

**Materials and methods:** This study was approved by the Ethics Committee of Sestre Milosrdnice University Hospital Centre and by Ethics Committee of the School of Dental Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia. All participants signed informed consent according to Helsinki II. All patients fill out the questionnaire with general data, age of diagnosis, duration of remission, therapy, supplements, diet, malignancy, smoking and alcohol abuse. Patients with other autoimmune diseases and dental works are excluded. Also, inadequate specimens were excluded. Saliva and blood samples were taken from 130 patients in the inactive phase of multiple sclerosis at the Department of Neurology, and laboratory measurements were performed in the laboratory of the Department for Oncology and Nuclear Medicine of the University Hospital Center Sestre Milosrdnice. Patients are divided into two groups: those who have a healthy thyroid and patients with Hashimoto's thyroiditis. In all patients, routine blood tests, TSH, fT4, fT3, TPO, TGA, CRP were made. Saliva and serum were collected for IL-6 and TNF- $\alpha$ . Whole saliva samples were collected with SalivaBio's 2 mL cryovials and the Saliva Collection Aid (exclusively from Salimetrics, State College, PA), a collection device specifically designed to improve volume collection and increase participant compliance and validated for use with salivary. Unstimulated, whole saliva, is gold standard in saliva collection, was collected by passive drool technique in order to maintain consistency in the type of sample collected. Immediately after collection, samples are frozen at  $-20^{\circ}$  C. On the day of assay, the samples were thawed, vortexed and centrifuged for 15 minutes at 396 xg on a Rotina 35R centrifuge (Hettich, Kirchleugern, Germany). IL-6 and TNF- $\alpha$  in serum were measured on an Immulite 1000 automatic immunochemistry analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlanger, Germany), with chemiluminescent immunoassay method as well as TNF- $\alpha$  in saliva. IL-6 in saliva was measured by commercial kit (Salimetrics, PA, SAD) with ELISA (Enzyme - Linked ImmunoSorbent Assay). TNF- $\alpha$  and IL-6 levels were expressed in



pg/mL. Peripheral blood samples were collected by venipuncture in two Vacuette® red cap serum tubes with clot activator (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), for CRP, TSH, FT4, FT3, A-TPO, A-TG, IL-6, TNF- $\alpha$ , and one tube with K<sub>2</sub>EDTA, lavender cap for complete blood count (CBC). Blood for serum testing was centrifuged for 10 minutes at 3500 g in a minute. CRP, TSH, FT4, A-TPO, A-TG were analysed immediately, and for IL-6 and TNF- $\alpha$ , two aliquots (2x550 $\mu$ m) of serum samples were immediately frozen at -20°C until analysis. CRP was determined by immunoturbidimetry on an clinical chemical analyzer Architect c8000 (Abbott, Illinois, SAD), using calibrators and controls. The recommended reference value for CRP is < 5 mg/L. TSH, FT4 and FT3 were determined at immunoassay analyzer Abbott i2000 (Abbott, Illinois, SAD), chemiluminescence method, and A-TPO i A-TG with analyzer Cobas e601 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), electrochemiluminescence method. CBC was performed at DxH 520 (Beckman-Coulter, Brea, SAD) analyzer. The recommended reference values for TSH is 0.35 - 4.94 mIU/L, FT4: 9.01 - 19.05 pmol/L, A-TPO: < 34 kIU/L and A-TG: < 115 kIU/L. IL-6 and TNF- $\alpha$  in serum and salivary TNF- $\alpha$ , after were defrosted by leaving at room temperature until liquid state, were analyzed on Immulite1000 (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Germany) by the chemiluminescent enzyme immunometric method using original Siemens reagents and adjustors according to manufacturer's instructions. Teeth were washed one hour before collecting specimen and fasting for 12 hours, without any oral disease, injuries and inflammation of oral cavity. Statistical analysis was performed using the IBM SPSS Statistics, version 22.

**Results:** There is no statistically significant difference between the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in blood and saliva in the given groups. However, there is a statistically significant correlation between salivary IL-6 level and blood IL-6 ( $r = 0,363$ ;  $p < 0,01$ ), a statistically significant correlation between salivary IL-6 levels and blood TNF- $\alpha$  ( $r = 0,187$ ;  $p < 0,01$ ) and there is statistically significant correlation between blood IL-6 levels and blood TNF- $\alpha$  ( $r = 0,432$ ;  $p < 0,01$ ). Also, there is a statistically significant difference in TSH levels in the group of euthyroid patients with elevated antibody levels compared to patients with antibody levels in the reference interval ( $t = 3.324$ ;  $df = 128$ ,  $p < 0,01$ ). BMI, EDSS, and smoking do not correlate with blood and saliva levels of IL-6 and TNF- $\alpha$ .

**Conclusion:** Although we did not prove a difference in the level of interleukin-6 and TNF- $\alpha$  in blood and saliva in the two groups, we proved the significance of saliva as a diagnostic sample because in several parameters it correlates with the level in the blood. We also demonstrated the importance of determining TPO and TgA thyroid antibodies because TSH levels in euthyroid

patients were statistically significantly higher in patients with elevated antibodies.

**Keywords:** Multiple Sclerosis, Hashimoto's thyroiditis, interleukin-6, TNF- $\alpha$ , Saliva

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Interleukini.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Interleukin 6 .....	1
1.1.2. TNF- $\alpha$ .....	5
<b>1.2. Slina kao laboratorijski uzorak .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3. Multipla skleroza .....</b>	<b>10</b>
1.3.1. Epidemiologija i genetika .....	10
1.3.2. Rizični čimbenici za nastanak multiple skleroze (okolišni čimbenici) .....	11
1.3.3. Patogeneza i patofiziologija multiple skleroze.....	12
1.3.4. Tijek bolesti.....	16
1.3.5. Dijagnostika multiple skleroze .....	17
1.3.6. Terapija multiple skleroze .....	18
<b>1.4. Hashimotov tireoiditis .....</b>	<b>19</b>
1.4.1. Epidemiologija.....	20
1.4.2. Čimbenici nastanka i patogeneza HT.....	20
1.4.3. Dijagnostika Hashimotovog tireoiditisa .....	21
1.4.4. Terapija Hashimotovog tireoiditisa .....	22
<b>1.5. Poliautoimunost .....</b>	<b>22</b>
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>26</b>
<b>4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>29</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>44</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>48</b>
<b>7. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>49</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>74</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

IL - interleukin

gp130 - glikoprotein 130 kDa

IL-6R - interleukin-6 receptor

BSF-2 - humani B-stanični diferencijacijski faktor 2

ELISA - (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) - enzimski imunosorbentni test

HT - Hashimotov tireoiditis

IL-6 - Interleukin-6

IL-1 - Interleukin-1

IL-11 - Interleukin-11

IL-15 - Interleukin-15

TNF- $\alpha$  - (*tumor necrosis factor alpha*), faktor tumorske nekroze alfa

PDGF - (*Platelet derived growth factor*) – trombocitni faktor rasta

STAT3 - (*signal transducer and activator of transcripton 3*) - transduktor signala i aktivator transkripcije 3

RA - reumatoidni artritis

GD - (*Graves's disease*) – Gravesova bolest

SLE - sistemski eritemski lupus

MMP - (*matrix metalloproteinase*) – matrična metaloproteinaza

OLP - oralni *lichen planus*

MS - multipla skleroza

BMI - (*body mass index*), indeks tjelesne mase

EAE - eksperimentalni autoimuni encefalitis

CRP - C-reaktivni protein

EBV - virus Epstein Barr

CMV - citomegalovirus

PSA - antigen specifičan za prostatu

RRMS - relapsno remitentna multipla skleroza

SPMS - sekundarno progresivna multipla skleroza

PPMS - primarno progresivna multipla skleroza

CLIA - (*chemiluminescent immunoassay*) - kemiluminiscentni imunoesej

CIS - (*clinically isolated syndrome*) – klinički izolirani sindrom

RIS - (*radiologically isolated syndrome*) - radiološki izolirani sindrom

MR - magnetska rezonanca

HLA - (*human leukocyte antigen*) – ljudski leukocitni antigen

DMT - *disease modifying therapy*

EDSS - (*Expanded Disability Status Scale*) – proširena ljestvica statusa onesposobljenosti

## 1. UVOD

### 1.1 Interleukini

Citokini su velika skupina malih proteina veličine 5-20 kDa, važna u signalizaciji stanica. Po strukturi su peptidi i ne mogu prijeći lipidni dvosloj stanica da bi ušli u citoplazmu. Uključeni su u autokrino, parakrino i endokrino signaliziranje kao imunomodulirajući agensi. U citokine spadaju kemokini, interferoni, interleukini, limfokini i tumorski faktor nekroze. Citokine proizvodi široki spektar stanica uključujući makrofage, B-limfocite, T-limfocite, mastocite, endotelne stanice, fibroblaste i razne stromalne stanice. Citokini djeluju preko receptora na stanicama i komunikacija su između staničnog i humoralnog imunološkog sustava (1). Citokini se svrstavaju u skupine ovisno o strukturi i specifičnosti receptora (2).

#### 1.1.1 Interleukin 6

Interleukin-6 (IL-6) proupalni je citokin i protuupalni miokin koji sudjeluje u patogenezi kroničnih upalnih i različitih autoimunskih bolesti (3). Skupini IL-6 pripadaju citokini koji se koriste glikoprotein 130 kDa (gp130) kao signalnom receptorskom podjedinicom. Zasad ove kriterije ispunjava osam citokina (4). Skupina IL-6 citokina ima mnogo funkcija, kao što su stimulacija B-staničnog odgovora, aktivacija proteina akutne faze u jetri, balansiranje između efektorskih i regulatornih T-stanica, u metaboličkoj i neurološkoj regulaciji (5). Vezanjem na receptor (IL-6R) započinje klasični i transsignalni put. Karakteristika je većine autoimunskih bolesti hiperprodukcija IL-6. Povećana razina IL-6 karakteristična je za različite tumore i može biti prognostički pokazatelj. U imunskom sustavu u regulaciji proliferacije i diferencijaciji B-stanica u protutijela, glavnu ulogu imaju T-stanice. Pojedine uloge T-stanica mogu se zamijeniti ili posredovati pomoću solubilnih faktora kao što su limfokini ili monokini koje luče T-stanice. Humani B-stanični diferencijacijski faktor-2 (BSF-2) potiče završno sazrijevanje B-stanica u stanice koje luče imunoglobuline. BSF-2 je citokin koji ima 184 aminokiseline (26kDa), a poslije je preimenovan u interleukin-6 (6). IL-6 proizvode mnoge imunološke i neimunološke efektorske stanice uključujući T i B stanice, fibroblaste, monocite, keratinocite, mezangijske stanice, stanice glije, endotelne stanice i razne tumorske stanice (7, 8). Različiti agensi, kao što su interleukin-1 (IL-1), faktor tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), trombocitni faktor rasta (PDGF), bakterijske i virusne infekcije, mogu izazvati produkciju IL-6. Receptori za IL-6 imaju najveću ekspresiju na T i B stanicama, monocitima, makrofagima, neutrofilima, kao i na stanicama pankreasa, i na hepatocitima (8).

Receptor za IL-6 postoji u transmembranskom i solubilnom obliku. Solubilni je oblik neki oblik proteolizom razdijeljenog transmembranskog oblika receptora za IL-6 ili spojenih produkata IL-6 mRNA (7). Citoplazmatska domena receptora za IL-6 jako je kratka i ne sadržava niti jednu cjelovitu sekvencu ili kinaznu domenu.

Vežanjem IL-6 na jedan od dvaju oblika receptora za IL-6 nastaje kompleks koji sadrži signalnu podjedinicu glikoprotein 130 (gp130), koja pokreće signalni put. Osim podjedinice gp130, signalni put pokreću i razni drugi citokini kao što je onkostatina M, IL-11, cilijarni neurotrofni faktor i kardiotrofin-1 (7).

Dođe li do vežanja IL-6 na kompleks transmembranskog IL-6 receptora/gp130, aktivira se klasični signalni put, a dođe li do vežanja IL-6 sa solubilnim receptorom i gp130, transsignalni put (8). Klasični je signalni put ograničen na stanice koje imaju ekspresiju i IL-6 receptora i gp130, dok je transsignalni put otvoren za sve stanice koje imaju gp130.

Različiti su biološki učinci IL-6 na imunost.

T-pomoćničke stanice presudne su u gotovo svim autoimunskim bolestima. Stres i okolišni čimbenici induciraju aktivaciju i diferencijaciju T-stanica u različite skupine stanica s različitim efektorskim ulogama. Stanice Th-1 i Th-2 uglavnom su odgovorne za uklanjanje intracelularnih i ekstracelularnih patogena. Stanice Th-2 posreduju reakcije na alergene. Najmoćnije stanice koje predočuju antigen, dendritičke stanice, luče IL-6 i inhibiraju diferencijaciju T-stanica u Th2 te taj način imaju negativnu ulogu u razvoju Th2 (9).

Th-17 stanice jesu skupina T-stanica različita od stanica Th1 i Th2 (10), i povezane su s kliničkim manifestacijama u brojnim autoimunskim bolestima (11, 12).

Iako se IL-6 u početku označavao kao humani B-stanični faktor diferencijacije, utjecaj u hematopoetskom sustavu nije samo na B-stanice. Blokadom gena za IL-6 zaustavlja se preživljenje i obnova hematopoetskih matičnih stanica i progenitornih stanica (12). Manjak IL-6 prekida ravnotežu između proliferacije i diferencijacije progenitornih stanica granulocitno-monocitne, megakariocitne i eritrocitne loze u zrele krvne stanice te dovodi do prekida ravnoteže između proliferacije i diferencijacije progenitornih stanica (13). Zanimljivo je da IL-6 može potaknuti i inhibirati nastanak limfoma, ovisno o fazi hematopoeze (14). Povišena razina IL-6 i potencijal neuroloških stanica da proizvode IL-6 u različitim neurološkim poremećajima, otvaraju pitanje uloge IL-6 u neurološkim bolestima: ponašaju li se kao proupalni citokini, neurotrofni faktor ili oboje (15). IL-6 ima važnu ulogu u održavanju homeostaze živčanog sustava, dok njegova odsutnost smanjuje aktivaciju glije u traumatskim ozljedama mozga te uzrokuje poremećaje spavanja (16, 17, 18). U mozgu su fiziološki prisutne male količine IL-6, ali su razine povišene kod bolesti kao što je Parkinsonova i Alzheimerova

bolest (19, 20). Povezanost IL-6 s kardiovaskularnim bolestima prvi je put zabilježena u tri bolesnika s miksomom koji su lučili IL-6. Kirurški su uklonjeni, a razina IL-6 se normalizirala (21). Budući da upala doprinosi razvoju ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti, dugotrajna povišena koncentracija IL-6 povećava rizik od koronarne bolesti (22, 23). U akutnoj fazi bolesti regulacija IL-6 djeluje protektivno na srce, dok dugotrajna povišena razina IL-6 izaziva hipertrofiju srčanog mišića i ugrožava srčanu kontraktilnost (24).

Povišena razina IL-6, kao i drugih citokina, prisutna je u različitim plućnim bolestima. Nije poznato je li IL-6 nusprodukt određenog upalnog procesa (25). Lokalna proizvodnja IL-6 potiče diferencijaciju stanica Th-17 u plućima i uzrokuje oštećenje pluća u bolesnika koji su razvili sindrom idiopatske pneumonije poslije transplatacije matičnih stanica (26).

IL-6 regulira jetrenu funkciju. Iako drugi monokini kao IL-1 i TNF- $\alpha$  utječu na pojedine receptore u jetri, IL-6 jači je induktor akutne faze sinteze proteina u jetri u usporedbi s ostalima (7).

Imunohistokemijski uzorci crijeva s aktivnim ulceroznim kolitisom imaju značajno veću razinu IL-6 i fosforiliranih STAT3 pozitivnih epitelnih stanica od bolesnika s inaktivnim ulceroznim kolitisom tj. kontrolnom skupinom (27). Aktivacijom kompleksa IL-6/IL-6R ubrzan je imunosni odgovor u Crohnovoj bolesti (28).

Intraepitelni limfociti koji proizvode IL-6 odmah po oštećenju crijeva, imaju protektivnu ulogu u cijeljenju rana inducirajući epitelnu proliferaciju. Inhibicija IL-6 priječi reparaciju oštećenja (29).

Brojna istraživanja pokazuju da IL-6 ima proupalnu ulogu u murinim modelima lupusnog nefritisa (30).

IL-6 se nalazi u stanicama nazofaringealnog karcinoma. Povezan je i s karcinomima nastalim iz tumora povezanih s kolitisom (31). Progenitorne stanice bolesnika s karcinomom prostate imaju visoke razine IL-6R (32).

Rast tumora ovisi o adekvatnom tumorskom mikrookruženju, a njegovo širenje ovisi o sinergiji tumorskih stanica i okoliša (33).

Tumorogeneza posreduje IL-6, što je izraženo i kod adenokarcinoma dojke.

Formiranje novih krvnih žila kritični je korak u diseminaciji solidnih tumora, a sam je proces reguliran mnoštvom faktora rasta i citokina.

Razina IL-6 korelira s razinom antigena specifičnog za prostatu (PSA) i može biti prediktor rezistencije na docetaxel u hormonski neovisnom karcinomu prostate (34). Također, razna istraživanja pokazuju da IL-6 utječe na nastanak rezistencije na kemoterapiju kod karcinoma pluća i karcinoma jajnika, koji razvijaju rezistenciju na tamoksifen.



Kloniranjem IL-6 otvorile su se razne mogućnosti za kliničku primjenu. U Castlemanovoj bolesti, koju obilježava hiperplazija limfnih čvorova s infiltracijom plazma stanica, groznica, anemija, hipergamaglobulinemija i povišena razina proteina akutne faze, u kulturi stanica supernatanta ekstirpiranog čvora, visoke su koncentracije IL-6, ali ne i drugih citokina (35). Povišena razina IL-6 u različitim autoimunskim bolestima pokazuje da IL-6 ima odlučujuću ulogu u inicijaciji i progresiji bolesti, a blokada IL-6 kao terapijska mogućnost. Ljudsko anti-IL-6R monoklonsko protutijelo (mAb), tocilizumab, korišten je u liječenju sedam bolesnika s multicentričnom Castelmanovom bolesti. Liječenjem su se osjetno smanjili simptomi bolesti, smanjila se razina C-reaktivnog proteina (CRP) i anemija (36).

Reumatoidni artritis (RA) je kronična upalna bolest koja se očituje simetričnom distribucijom poliartritisa u malim zglobovima šaka, a može uzrokovati oštećenje hrskavice i kosti i deformacije zglobova. Patogeneza RA-a kompleksna je i uključuje sinovijalnu proliferaciju i aktivaciju imunskih efektorskih stanica kao što su makrofagi, stanice T i B koje uzrokuju povišenu proizvodnju proupalnih citokina, kemokina, MMP i drugih proteinaza (37).

Hashimotov tireoiditis (HT) lokalizirana je autoimunosna bolest koju obilježava pretjeran imunski odgovor na vlastito tkivo, a uzrokuje dugoročnu upalu. Brojni citokini, međuostalom i IL-6 sudjeluju u imunskom odgovoru. Neovisno o funkcionalnom statusu štitnjače, primijećena je veća razina IL-6 i IL-15 u skupini bolesnika s povišenim protutijelima na tireoidnu peroksidazu u odnosu na kontrolnu, zdravu skupinu bolesnika.

Multipla skleroza (MS) upalna je autoimunosna bolest kod koje je mijelin, koji okružuje aksone mozga i kralježnične moždine, oštećen i vodi do inflamacije, demijelinizacije i aksonalne degeneracije u središnjem živčanom sustavu (38). Povišena razina IL-6 je detektirana u središnjem živčanom sustavu bolesnika s MS-om i u miševa s eksperimentalnim autoimunskim encefalitisom (EAE) (39, 40). Blokodom IL-6 inhibiraju se stanice Th17 i Th1 i sprečava nastanak autoimunog encefalitisa (41). Blokada IL-6 inhibira indukciju mijelinskih antigen-specifičnih Th17 stanica i Th1 stanica u eksperimentalnom autoimunom encefalomijelitisu, te su miševi kojima je inhibiran IL-6 u cijelosti rezistentni na simptome multiple skleroze koji su laboratorijski inducirani. Sistemski eritemski lupus (SLE) sistemka je autoimunosna bolest i kronično inflamatorno stanje uzrokovano hipersenzitivnom reakcijom tipa III. Povišena razina IL-6 upućuje na patološku ulogu IL-6 u bolesnicima sa SLE-om (42, 43). Blokada IL-6 and IL-6R protutijelima sprečava nastanak i progresiju bolesti u SLE mišjim modelima (44).

Rađena je meta-analiza kod bolesnika s oralnim *lichenom planusom* (OLP), u kojoj se u šest istraživanja određivao IL-6 u slini, a u sedam istraživanja u serumu. Iako su istraživanja izrazito

heterogena, pokazalo se da je razina IL-6 u slini i u serumu veća kod bolesnika s OLP-om nego u zdravih kontrola. Također je pokazano da je razina IL-6 u slini oko tri puta više nego razina u serumu (45).

Razina IL-6 u serumu i slini povišena je u djece s prekomjernom tjelesnom težinom i pozitivno korelira s indeksom tjelesne mase (BMI) (46).

### 1.1.2. TNF- $\alpha$

Za postojanje biološkog čimbenika koji izloženošću organizma izraženijoj bakterijskoj infekciji djeluje na nekrozu i smanjenje tumora, znalo se već u 19. stoljeću (Coley, 1893). Limfotoksin, solubilni je protein kojeg proizvode T-stanice limfocita, otkriven 1968. godine (Granger and Williams, 1968).

Eksperimentalno se 1975. pokazalo da se protein, koji je nazvan "Tumor Necrosis Factor", otpušta u cirkulaciju životinja, a kao posljedica stimulacije lipopolisaharidom (Carswell et al., 1975). Ovaj protein uzrokuje značajnu regresiju pojedinih tumora. Uloga TNF- $\alpha$  je dvojaka, ovisno u kakvom se okruženju nađe i koji signalni put aktivira; može priječiti razne infekcije s jedne strane, a s druge strane može izazvati teška patološka stanja (47). U organizmu TNF- $\alpha$  ima više uloga, a uključuju imunostimulaciju, otpornost na infektivne agense, otpornost na tumore, utječe na regulaciju spavanja i embrionalni razvoj (48, 49). S druge strane paraziti, bakterije i virusi postaju patogeniji ili fatalniji zbog cirkulacije TNF- $\alpha$  (50). TNF- $\alpha$  može povećati otpornost na infekcije tako da potiče odgovor neutrofila, trombocita, makrofaga i NK-stanica. TNF- $\alpha$  ima ulogu u brojnim autoimunskim bolestima, graft vs host odbacivanju i RA (51, 52). Zajedno s interferonom, TNF- $\alpha$  ima citotoksični učinak na maligne stanice (53). TNF- $\alpha$  uzrokuje smrt stanice nekrozom ili apoptozom. Stanice bubre, organele propadaju i nastaje liza stanica (54). TNF- $\alpha$  djeluje tako da se visokim afinitetom veže na receptore, kojih ima na gotovo svim stanicama. Kompleks ligand receptor se internalizira i završava u sekundarnim lizosomima, gdje se razgrađuje. Ako se TNF- $\alpha$  veže na receptor za TNFR2 od 75 kDa, reakcija nije dovoljna za citotoksičnost, ali ako se veže za TNFR-2 od 55 kD, dovoljan je za izazivanje stanične smrti. Osim u imunološkom sustavu, TNF- $\alpha$  je pleotropni citokin koji regulira fiziološke procese u mozgu (55 - 57). Kod bolesnika s MS-om, TNF- $\alpha$  je pronađen u astrocitima, mikroglijji, endotelnim stanicama, u aktivnim i kroničnim lezijama i u cerebrospinalnom likvoru (58 - 60). Različite su i kompleksne uloge TNF- $\alpha$  u bolesnika s MS-om. Kod bolesnika s MS poremećena je Treg funkcija, neuronalna transmisija, propusnost krvnomoždane barijere i mijelinizacija.

TNF- $\alpha$  vrši staničnu ekspresiju i signaliziranje pomoću devetnaest liganada, dok postoji

dvadeset devet podvrsta TNF receptora (61). Novosintetizirani TNF se u početku pojavljuje kao transmembranski protein koji se pomoću TNF konvertirajućeg enzima pretvara u solubilnu formu. I transmembranska i solubilna forma su biološki aktivne i njihova sinteza i signalizacija ovise o nekoliko faktora kao što je vrsta stanica i duljina izloženosti stimulusu koji potiče proizvodnju TNF- $\alpha$  (62). Postoje dvije velike podvrste receptora TNFRSF1A-TNFR1, poznati kao p55 ili p60 i TNFRSF1B-TNFR2, poznati kao p75 ili p80 (63). Razlikuju se po ekspresiji, afinitetu vezanja liganda, strukturi citoplazmatskih nastavaka i signalnom putu. Samo TNFR1 sadrži citoplazmatsku domenu koja direktno može izazvati apoptozu. TNFR1 ima ekspresiju u gotovo svim tkivima, dok je ekspresija TNFR2 visoko regulirana i određena vrstom stanica kao što su neuroni, mikroglia, oligodendrociti, T-stanice i endotelne stanice (64, 65). TNFR1 prvenstveno potiče upalu i degeneraciju tkiva, TNFR2 posreduju lokalni homeostatski efekt, kao što je preživljenje stanica i regeneracija tkiva (56). Signalni put TNF-TNFR je različit u različitim tipovima stanica i određenim okolnostima (66). Unatoč njihovim različitim funkcijama TNFR1 i TNFR2 aktiviraju transkripcijski nuklearni faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), glavni transkripcijski faktor koji aktivira gene uključene u inflamaciju (67). NF- $\kappa$ B aktivira transkripciju više gena za proinflamatorne citokine kao što su IL-1beta, IL-6 i TNF (68, 69). TNF aktivira i aktiviran je s NF $\kappa$ B, formirajući petlju koja povećava i održava lokalnu upalu (70). TNF povećava proliferaciju, preživljenje, stabilnost, ekspresiju CD25, Foxp3, aktivacijske markere i povećava supresivnu funkciju mišjeg Treg (71 - 73). Vrlo je niska razina TNF- $\alpha$  u zdravom mozgu odrasle osobe (74), a razina može ovisiti o prisustvu/odsustvu citokina koji prelaze krvno moždanu barijeru (75). TNFR se nalazi na neuronima i gliji (76). Ovisno o distribuciji TNF receptora u neuronima i stanicama glije, učinak TNF može biti koristan ili štetan. Kod zdravih, TNF- $\alpha$  ima ulogu održavanja homeostaze plastičnosti sinapsi, sinaptičku transmisiju posredovanu astrocitima i u procesu neurogeneze, koja međuostalom, utječe na učenje i memoriju (77). Stanice glije, astrociti i mikroglia su glavni izvor TNF- $\alpha$  i u fiziološkim i patofiziološkim uvjetima (78, 79). Astrociti i mikroglia su sastavni dio sinapsi, a glavna im je uloga prepoznavanje i otklanjanje glutamata iz sinaptičke pukotine, a na taj način smanjuju vrijeme ekscitacije neurona (80). TNF- $\alpha$  je biološki gliotransmitter uključen u komunikaciju neurona i glije, a na taj način u regulaciju sinapsi, na više razina. TNF- $\alpha$  ima ulogu u održavanju sinaptičke plastičnosti kod duljih promjena stanične aktivnosti (81, 82). Aktivacijom TNFR2 može se prevladati utjecaj ekscitotoksičnosti, a koja je karakteristika nekoliko neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, multipla skleroza, kojih je karakteristika povišena razina TNF-a u zahvaćenim područjima mozga (83 - 88). U oštećenom području povišene koncentracije TNF- $\alpha$  kojeg luče astroglia i mikroglia

pojačavaju neuroinflamatorni odgovor (89). Povišena razina TNF- $\alpha$  utječe na endotelne stanice i na taj način, posredno, na permeabilnost krvno moždane barijere (90 - 92). Aktivacija TNF- $\alpha$  i djelovanje preko TNFR1 dijelom je povezana s apoptozom oligodendrocita (93, 94). U skupini transgeničkih miševa, povišena razina TNF- $\alpha$  utječe na nastanak spontane demijelinizacije (95). Suprotno tome, TNF- $\alpha$  kojeg luči mikroglija potiče homeostatski učinak i neuronalnu remijelinizaciju kod jedne vrste riba, što sugerira dvostruku ulogu TNF- $\alpha$  (96). EAE je najčešće korišten životinjski model koji se koristi u istraživanju MS. Iako, ponekad pojedini pozitivni učinci nekih lijekova korišteni eksperimentalno, nisu imali efekt na bolesnike s MS-om (97). Sistemska administracija TNF- $\alpha$ , povećava ozbiljnost simptoma, prolongira trajanje i potiče relapse (98).

## **1.2. Slina kao laboratorijski uzorak**

Dijagnostička vrijednost sline ovisi o reproducibilnosti u ponovljenim uzorcima i predvidljivoj korelaciji između uzoraka sline i krvi. Prednost uzorkovanja sline je neinvazivnost, pristupačna cijena, nije potrebno laboratorijsko osoblje za uzimanje uzoraka, sigurnost metode i mogućnost opetovanog uzorkovanja (99). Bolesnike se štedi od stresa prilikom venepunkcije, koja i tehnički zahtjeva vještine osoblja. Uzorci se ne zgrušavaju pa nema potrebe za antikoagulansima, manji je rizik prijenosa zaraznih bolesti. Također, uzorci nisu podložni promjenama.

Ciljana skupina bolesnika za uzorkovanje sline su stariji, fizički hendikepirani i teže suradljive skupine kao što su djeca (100). Standardizacija sakupljanja uzoraka, način pohrane i postupci analize su bili osnovni preduvjeti za stavljanje sline kao uzorka u širu primjenu. Također, je iznimno teško odrediti referentne vrijednosti za različite biomarkere u slini, budući su različite studije pokazale značajno različite rezultate za pojedini ispitivani biomarker.

Slina je podložna cirkadijanim promjenama i promjenama uslijed varijacije spolnih hormona. Varijabilnost biomarkera sline ovisi o dobi, o spolu, komorbiditetima, stanju usne šupljine i uzimanju lijekova.

Više je faktora na koji proizvođači upozoravaju, a tiče se načina skupljanja sline. Jedan od njih je "flow rate" ili brzina skupljanja uzorka. Smatra se da razina pojedinih analita varira, ovisno o brzini skupljanja uzoraka. Dodatno se predlaže mjerenje totalnih proteina u slini kao kontrola konzistentnosti uzimanja uzoraka. Da bi izražavanje bilo konzistentno potrebno je bilježiti brzinu skupljanja uzoraka, tj. mjeriti koliko mililitara u minuti je skupljeno da bi se ekskrecijska stopa mogla izraziti u  $\mu\text{g/mL}$ . Također je potrebno standardizirati područje iz kojeg se uzima uzorak. Utvrđena je razlika u razini citokina između cijele sline i sline podrijetla iz samih

parotida. Udio sline iz malih žlijezda na usnama i u ustima pridonosi razini citokina, stoga se savjetuje skupljati cijelu, nestimuliranu slinu, da se izbjegnu varijacije. Obzirom na dnevne varijacije analita, uzimanje uzoraka sline treba i vremenski standardizirati. Vatiće za uzimanje uzoraka ("cotton swabs") se trebaju izbjegavati, obzirom da potiču lučenje sline iz samo pojedinih žlijezda i utječu na brzinu skupljanja. Većina analita su nestabilni i zahtijevaju hlađenje/smrzavanje. Iznimno je važno da rukovanje bude uniformirano.

Prilikom uzorkovanja treba zabilježiti prisutnost ozljeda usne šupljine ili bolesti usne šupljine, prisutnost kontaminacije uzorka sline krvlju (vizualna inspekcija ili određivanje transferina). Potrebno je zabilježiti uzima li bolesnik alkohol, kofein, nikotin ili neke lijekove koje je propisao liječnik, odnosno uzima samovoljno. Također, treba evidentirati fizičku aktivnost bolesnika. Slijedeći jasne upute za uzimanje uzoraka smanjujemo vjerojatnost varijacije rezultata.

Metodom ELISA validirane su metode određivanja koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini. Zaključeno je da se IL-6 može validirati navedenom metodom, ali ne i TNF- $\alpha$  (101).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) biokemijski je esej kojeg su osmislili Engvall i Perlmann 1971. godine (102). Koristi se čvrsti imunoesej da se detektira prisutnost liganda. ELISA se koristi u dijagnostičke svrhe u medicini, biotehnologiji i kao kontrola kvalitete u raznim drugim industrijama. Antigeni uzorka kojeg testiramo su nalijepljeni na površinu, zatim se odgovorajuće protutijelo nanosi na površinu kako bi se mogao vezati antigen. Ovo protutijelo je vezano na enzim i tada se sva nevezana protutijela odstranjuju, a zatim se dodaje enzimski supstrat. Ako se dogodi reakcija vezanja, posljedično se proizvodi detektibilan signal, najčešće kao promjena boje. Izvođenje ELISE uključuje barem jedno protutijelo specifično za određeni antigen. Uzorak s nepoznatom količinom antigena je imobiliziran u solidnoj podlozi ili nespecifično ili specifično. Nakon što je antigen imobiliziran, detektirano protutijelo se dodaje, formirajući kompleks s antigenom. Postoji više vrsta ELISA testova: direktna, sandwich, kompetitivna i reverzna ELISA. Za određivanje IL-6 u slini koristili smo „sandwich“ ELISU. Ona se koristi za detekciju uzorka antigena. Površina se pripremi za točnu količinu antigena za vezanje. Sva nespecifična vezanja na površini su blokirana. Uzorak s antigenom se stavlja na površinu, i hvata pomoću protutijela. Posuda se pere da se odstrani nevezani antigen. Specifično protutijelo se dodaje i veže se na antigen, odakle i naziv sendvič – jer se antigen nalazi između dva protutijela. Primarno protutijelo može biti i u serumu bolesnika, a testira se njegovo vezanje na antigen. Sekundarna protutijela se dodaju i vežu se na Fc regiju protutijela. Inspire se ponovno podloga da se uklone nevezani konjugati antitijela-enzima. Dodaju se različita kemijska

sredstva da bi se dobio signal – bilo boja, fluorescentni ili elektrokemijski signal. Mjeri se količina signala da se dobije kvantiteta antigena (103,104).

Kemiluminiscencija (CLIA) je tehnika imunoeseja gdje je indikator analitičke reakcije luminiscentna molekula. Luminiscencija je emisija vidljive ili skoro vidljive svjetlosti valne duljine ( $\lambda$ ) oko 300 - 800 nm, a koja nastaje prelaskom elektrona iz ekscitiranog u stabilno stanje. Potencijalna energija se oslobađa u obliku svjetla. U spektrofotometriji luminiscencija ima prednost nad absorbancijom jer se mjeri apsolutna vrijednost, dok je kod absorbancije riječ o relativnim vrijednostima. Heterogena metoda je najčešće korišten oblik kemiluminiscentnog eseja. Kemiluminiscentna metoda može biti direktna – koristi luminiformne markere ili indirektna koja koristi enzimske markere. Obje metode mogu biti kompetitivne i nekompetitivne. Mnoge su prednosti ove metode kao što su širok dinamički raspon, visok intenzitet signala, visoka specifičnost, brza detekcija analitičkog signala, visoka stabilnost reagensa i konjugata, potrebne niske doze konjugata, nasumični pristup, kratko vrijeme inkubacije i kompatibilnost s imunološkim protokolima. Postoje i neke mane kao što je limitirana detekcija antigena, visoki troškovi, ograničen panel testova i zatvoreni analitički sustavi. Mnogi kemiluminiscentni sustavi imaju i nisku dozu pozadinske emisije, u odsutstvu analita (105).

Elektrokemiluminiscencija (ECLIA) je kvantitativna metoda za mjerenje antigena ili antitijela bazirana na promjeni elektrokemiluminescentnog signala prije i poslije imunoreakcije. Uzorak postavljen na elektrodu stupa u reakciju gdje visokoenergijskim elektronskim transferom prelazi u ekscitirano stanje i emitira svjetlost. Za ovu metodu nije potreban vanjski izvor svjetlosti, a mjesto i vrijeme svjetlom inducirane reakcije se može kontrolirati. Kontroliranjem vremena, emisija svjetla se može odgoditi dok ne započnu npr. imuno ili enzimski katalizirane reakcije. Kontroliranjem mjesta, može se dovesti emisija u točno željeno područje u odnosu na detektor i na taj način povećati osjetljivost povećavajući odnos signala i šuma. Pozicioniranjem točnog mjesta može se istodobno raditi i nekoliko analita u istom uzorku (106).

### **1.3. Multipla skleroza**

Sve kronične neurološke bolesti imaju složenu etiopatogenezu pa tako i multipla skleroza. Smatra se da je MS upalna bolest s osobinama autoimunosti, a nastaje spletom raznih okolišnih i infektivnih čimbenika, a kod genetski predisponiranih osoba. S obzirom da su čimbenici različiti, ovisno o stupnju njihovog međudjelovanja, nastaju kliničke slike različitog oblika i intenziteta. Češće se javlja u određenim zemljopisnim područjima i u određenim etničkim

skupinama. Češća je u mlađih osoba, dvostruko više u žena nego u muškaraca. Upala i imunost su osnovni mehanizmi u nastanku bolesti, međutim i nadalje nije sasvim razjašnjeno kojim procesom bolest započinje. Oštećeni su mehanizmi urođenog i stečenog imunološkog odgovora.

### **1.3.1. Epidemiologija i genetika**

MS se najčešće pojavljuje sporadično. Apsolutni rizik nastanka za žene u općoj populaciji je 0,5%, a za muškarce 0,3% (107). The Atlas of multiple sclerosis je baza podataka otvorenog pristupa prema čijim je podacima 2,8 milijuna ljudi pogođeno multiplom sklerozom u svijetu, što je 35,9 na 100 000 stanovnika. Od 2013. godine učestalost u svim dijelovima svijeta raste. Stupanj incidencije u sedamdeset i pet zemalja je 2,1 na 100 000 stanovnika godišnje, a srednja dob dijagnosticiranja je trideset i dvije godine. Omjer žene/muškarci je 2:1. Učestalost dijagnosticiranja MS u dobi mlađoj od osamnaest godina 2013. godine je bila manje od 7000 slučajeva godišnje, dok je 2020. godine porasla na više od 30000 slučajeva godišnje (108). Učestalost obiteljskog pojavljivanja bolesti je 19,8%. Dob kod obiteljskog pojavljivanja je niža, a omjer muškarci/žene je veći (109). Rizik prema dobi, ako su oba roditelja bolesna iznosi 30,5%, a ako je jedan roditelj bolestan je 2,7% (110). Učestalost kod jednojajčanih blizanaca je 25 do 30%, a kod dvojajčanih blizanaca 2 do 5% (111). Samo 25% rizika za razvoj multiple skleroze se može pripisati genima, što je pokazano u studiji GWAS – genome - wide association study (112). HLA geni (engl. Human Leukocyte Antigen) odgovorni su za 20%, a ostali, non HLA lokusi za oko 5% (113). Klasa I HLA-alela (A, B i C) prezentira antigene citotoksičnim T-limfocitima (CD8+), a klasa II HLA-alela (DP, DM, DOA, DOB, DQ i DR) pomoćničkim T-limfocitima (CD4+). U patogenezu MS uključene su obje vrste T-limfocita i pretpostavlja se da su neke vrste HLA-alela učinkovitije od drugih u prezentiranju antigena T-limfocitima. Važna je povezanost MS-a i HLA klase II gena na 6. kromosomu, osobito za DR2. Gen povezan s MS-om najvjerojatnije je HLA-DRB1\*1501 alel (114, 115). Ovisno o kombinaciji alela s HLA-DRB1\*1501 alelom, rizik za multiplu sklerozu može se povećati tj. smanjiti (116). HLA-DRB1\*1501 alel sudjeluje u pojačanoj prezentaciji i vezanju autoantigena centralnog živčanog sustava na T-limfocite i povećava autoproliferaciju T-limfocita i utječe na aktivnost memorijskih B-limfocita. Klasa I HLA gena također utječe na rizik za MS. HLA-A\*02, HLA-B\*44 i HLA-Cw\*05 djeluju protektivno dok HLA-A\*0301 povećava rizik za MS (117, 118). Više od dvjesto gena izvan HLA-regije odgovorno je za povećan rizik od MS, a niti jedan nije pokazao konzistentnost u ponovljenim istraživanjima (119). Usprkos nebrojenim istraživanjima, jedinstven gen za MS nije otkriven.

### **1.3.2. Rizični čimbenici za nastanak multiple skleroze (okolišni čimbenici)**

Osim genetske sklonosti, iznimnu važnost imaju okolišni čimbenici. Pojavnost MS-a ovisi i o zemljopisnom području. Ako osoba migrira iz petnaeste godine, dobiva rizik obolijevanja područja iz kojeg dolazi (120). Da se rizik može početi razvijati i in utero, pokazala su novija istraživanja, a kod bolesnika koji su razvili MS u pedijatrijskoj dobi (121 - 123). In utero izloženost dijabetesu i preeklampsiji kod majke te agrikulturna djelatnost oca su rizici za nastanak MS (124). Djeca rođena nakon zime su najviše izložena oboljevanju od MS, dok su djeca rođena iz ljeta, najmanje izložena oboljevanju (125). Niža razina vitamina D tijekom trudnoće i u dojenačkoj dobi je povezana s visokim rizikom od MS u bijelaca (122 - 126). Utjecaj dojenja i carskog reza na razvoj MS nema jednoznačnih podataka (127, 128). Više studija smatra da izloženost većem broju infekcija u djetinjstvu smanjuje vjerojatnost oboljevanja od multiple skleroze u odrasloj dobi (129). Više istraživanja pokazuje da je rizik oboljevanja od MS-a veći kod osoba koje su imale simptomatsku infektivnu mononukleozu uzrokovanu EBV-om (Epstein-Barr virus), od onih koji nisu bili zaraženi. Također, rizik pojave MS-a kod djece koja su preboljela EBV je petnaest puta veći od opće populacije, a rizik pojave MS-a kod osoba koje su oboljele od EBV-a u odrasloj dobi je trideset puta veći (130).

Istraživanja koja se tiču ostalih virusa, kao što su Human herpes virus 6 (HHV6), Herpes simplex virus (HSV), citomegalovirus (CMV) nisu od epidemiološkog značaja. Rizik razvoja multiple skleroze je dvadeset puta veći u bolesnika s manjkom vitamina D i u bolesnika koji su tijekom godine manje izloženi suncu. Bolesnici s MS-om imaju nižu koncentraciju vitamina D od kontrolne zdrave skupine, povišene koncentracije vitamina D povezane su s nižim rizikom za razvoj multiple skleroze (131). Također, utjecaj raznih suplemenata, nezasićenih masnih kiselina, smanjen unos soli, upotreba visokih doza vitamina i pojedinih biljnih pripravaka nemaju znanstvenu opravdanost. Nije dokazana ni povezanost cijepljenja i MS-a, kao ni kirurških i stomatoloških tretmana. U nekim istraživanjima pušenje povećava rizik za nastanak MS-a, a istodobno je i faktor rizika brže progresije bolesti (132). Smatra se da je crijevna mikrobiota različita u zdravoj populaciji i u bolesnika s multiplom sklerozom (133). Povećana tjelesna masa u adolescenciji i mlađoj odrasloj dobi povećava rizik za nastanak MS-a (134).

### **1.3.3. Patogeneza i patofiziologija multiple skleroze**

U multiploj sklerozu oštećeni su mehanizmi i stečene i urođene imunosti. Autoreaktivni CD4+ T limfociti imaju središnju ulogu u pokretanju imunopatogenetskog mehanizma nastanka MS.



Da bi se aktivirao nespecifični (prirođeni) imunitet, nije potreban prethodni kontakt s antigenom. Sastavnice prirođenog imunološkog odgovora su fagocitne stanice (neutrofili i monociti iz krvi, a makrofagi i dendritičke stanice iz tkiva). One fagocitiraju strane antigene. Stanice koje prezentiraju antigen predočavaju antigen T-limfocitima, a T-limfociti čine dio stečenog (specifičnog) imuniteta. Vežanjem antigena na stanične receptore pokreće se stečeni imunitet. Kao odgovor na različite antigene izlučuju se različiti citokini koji djeluju na CD4+ limfocite, a koji se ovisno o vrsti citokina, diferenciraju u Th1, Th2 i Th17 limfocite. Th1 i Th17 limfociti luče proupalne, a Th2 protuupalne citokine. Aktivirani CD4+ T limfociti stimuliraju imunosne stanice poput B-limfocita, CD8+ T limfocita, mastocita, granulocita i monocita. Osnovni i prvi poremećaj u nastanku multiple skleroze je poremećaj imunosne tolerancije. Tijekom uspostavljanja središnje tolerancije u timusu, većina se autoreaktivnih T-limfocita uklanja (135, 136). Ako se taj mehanizam tolerancije ošteti, smanjenom funkcijom regulatornih T (Treg) stanica i/ili povećanom otpornošću efektorskih T i B limfocita na supresivne mehanizme, autoreaktivni T i B limfociti reaktiviraju se na periferiji i postaju agresivne efektorske stanice koje pokreću patološke događaje koji uključuju upalu, demijelinizaciju, neurodegeneraciju i gliozu koja se pojavljuje žarišno ili difuzno u bijeloj i sivoj tvari mozga i kralježničke moždine. Vjeruje se da imunosne stanice ulaze u središnji živčani sustav kroz krvno moždanu barijeru, a aktiviraju limfocite i uzrokuju progresiju bolesti. Kroz krvnomoždanu barijeru dolazi do transendotelne migracije leukocita u nekoliko koraka: proces privlačenja, vezanja i migracije aktiviranih limfocita omogućuju izlučeni proupalni citokini (TNF- $\alpha$  i interferon gama). Nakon ulaska u CNS dolazi do reaktivacije imunosnih stanica s periferije. U reaktivaciji T-limfocita u CNS-u sudjeluju stanice koje prezentiraju antigen, mikroglia i astrociti, ekspresijom gena glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC) klase II. Autoreaktivni limfociti unutar CNS-a, oslobođanjem citokina i kemokina, uzrokuju lokalnu upalnu reakciju uz novačenje novih upalnih stanica uključujući T-limfocite, monocite i limfocite B te trajnu aktivaciju makrofaga i mikroglije, što rezultira demijelinizacijom, aksonalnom degeneracijom, gubitkom sinapsi, oligodendropatijom i gliozom. Jedna skupina autora smatra da bolest nastaje migracijom B-stanica u središnji živčani sustav, a mogu izazvati bolest i progredirati je. Mehanizam ulaska je i dalje nepoznat, a moguće da ga posreduje ALCAM/CD166, B-limfocitni adhezijski protein.

Dva su klinička fenotipa MS-a: relapsno-remitirajući i progresivni koji se razlikuju kvantitativnim i kvalitativnim omjerom upalnih i degenerativnih patogenetskih mehanizama. Ne postoje točno određeni biljezi koji su specifični za pojedini oblik MS. Trenutno su važeći revidirani McDonaldovi kriteriji iz 2017. godine. Kliničkom slikom i/ili radiološkim dokazom

diseminacije lezija u vremenu i prostoru unutar središnjeg živčanog sustava i uz prisutnost tipičnog kliničkog sindroma postavlja se dijagnoza multiple skleroze. Najbolja i najosjetljivija dijagnostička metoda je MR kojom se vide tipične lezije mozga i kralježnične moždine. Obzirom na heterogenu prirodu bolesti potrebno je osvijestiti pojedine znakove koji mogu biti vodeći u nekim drugim diferencijalnim dijagnozama. Da bi se postavila dijagnoza relapsno remitirajuće MS više je kliničkih preduvjeta koji bi trebali postojati: postojanje tipične kliničke slike koja upućuje na MS, objektivizacija slikovnim metodama, prvenstveno magnetskom rezonancom, demonstracija diseminacije bolesti u vremenu i prostoru i isključenje drugih bolesti koje uzrokuju slične simptome. U tu svrhu postoje McDonaldovi kriteriji, koji su posljednji put revidirani 2017. godine, a u svrhu dijagnozu moraju biti zadovoljeni kriteriji prostorne i vremenske diseminacije bolesti (137). Ovisno koji dio živčanog sustava je zahvaćen, proistječu i simptomi, a moraju trajati najmanje 24 sata uz uvjet da smo isključili infekciju i temperaturu. Potrebno je da je na MR prisutna barem jedna hiperintenzivna lezija na T2 sekvenci u barem dva od četiri moguća tipična područja: periventrikularnom, kortikalnom, infratentorijskom i spinalnom. Uz postojanje lezija na MR potrebno je i postojanje oligoklonskih vrpca u likvoru (138). Prisutnost dvije ili više oligoklonskih vrpca u likvoru može biti zamjena za kriterij diseminacije u vremenu. Ovakvom promjenom može se brže dijagnosticirati relaps. Da bi mogli koristiti dijagnostičke kriterije potrebno je razjasniti terminologiju.

Ataka, relaps, egzacerbacija i klinički izolirani sindrom (ako je prva epizoda) su sinonimi. Ovisno o stupnju onesposobljenosti, relaps može biti blagi, srednjeteški i teški. Relaps ili ataka može biti simptomatski ili asimptomatski. Simptomatski relaps definiran je kao novi simptom ili pogoršanje postojećeg u trajanju od minimalno 24 sata (do nekoliko dana i tjedana), a da je od prethodne egzacerbacije prošlo najmanje mjesec dana. Nastanak novih lezija na magnetskoj rezonanciji, a bez simptoma, karakteristika je asimptomatskog relapsa. Remisija multiple skleroze je faza oporavka od atake, a definira se kao odsutstvo daljnje progresije simptoma ili potpuno ublažavanje simptoma unutar tri do šest mjeseci. Pseudorelaps znači povratak simptoma koji su bili prisutni u posljednjem napadu, a znak su nepotpunog oporavka prethodne ozljede mozga (139). Najčešće su potaknuti nekakvim vanjskim čimbenikom kao što je infekcija. Progresija označava nepovratno oštećenje neurološke funkcije tijekom vremena. Aktivna bolest se definira pojavom novih simptomatskih ataka ili asimptomatskom MR aktivnom bolesti.

Klasifikacija tijeka bolesti obuhvaća tri faze:

- faza visokog rizika za MS

- relapsno remitirajuća faza MS
- progresivna faza MS

Svaka faza ima podtipove gdje bolest može biti aktivna ili neaktivna (140).

Faza visokog rizika za MS:

Klinički izolirani sindrom (CIS) je monofazna klinička epizoda simptoma koje bolesnik javlja i objektivnih nalaza koji su odraz jednog ili više demijelinizacijskih događanja u mozgu koji se razvijaju akutno ili subakutno s trajanjem najmanje 24 sata s ili bez oporavka, bez prisustva infekcije i povišene tjelesne temperature, slično kao i u relapsu tipične multiple skleroze, ali u bolesnika koji ne zna da ima MS, odnosno klinički ne zadovoljava kriterije za MS. Klinički izolirani sindrom se može podijeliti na solitarnu sklerozu i multiplu sklerozu s jednim napadajem. Solitarna skleroza je pojam koji se koristi za bolesnike kod kojih se u trenutku pojave klinički izoliranog sindroma ne zadovoljavaju radiološki kriteriji za multiplu sklerozu, ali su lezije na MR mozga oblikom, mjestom i orijentacijom tipične za MR. Kad bolesnik s klinički izoliranim sindromom zadovolji i MR kriterije za dijagnozu multiple skleroze, onda se govori o dijagnozi multiple skleroze s jednim napadajem. CIS se može javiti sa simptomima jednog ili više funkcionalnih sustava (monofokalna/multifokalna prezentacija) u trajanju od najmanje 24 sata. Bolesnike se mora pratiti klinički i magnetskom rezonancom zbog opasnosti od diseminacije u vremenu i prostoru. Ako se bolesniku naknadno dijagnosticira MS tako što zadovolji kriterije vremenske i prostorne diseminacije te se isključe ostale bolesti, može se reći da je klinički izolirani sindrom bio bolesnikov prvi atak (141, 142). Simptomi klinički izoliranog sindroma mogu biti monofokalni ili multifokalni, a odraz su lokalizacije koju zahvaća. Tipična prezentacija uključuje unilateralni optički neuritis, fokalni supratentorijski sindrom, sindrom moždanog debla ili malog mozga, parcijalna mijelopatija. Atipična prezentacija uključuje bilateralni optički neuritis, kompletnu oftalmoplegiju, kompletnu mijelopatiju, encefalopatiju, glavobolju, promjene svijesti, meningizam i izolirani umor (143). U početku se klinički izolirani sindrom nije uključivao u kliničke oblike multiple skleroze. Sada se CIS opisuje kao prva klinička prezentacija bolesti, javlja se upalna demijelinizacija, koja može biti MS, ali još nema potpune kriterije vremenske diseminacije (144). Razne studije su pokazale da CIS uparen s lezijama vidljivim na magnetskoj rezonanciji nosi veliki rizik nastanka MS (145 - 148). Kliničke studije liječenja bolesnika s CIS s lijekovima koji modificiraju MS, odgodili su sekundarnu egzacerbaciju i potvrdu dijagnoze multiple skleroze (149 - 151) i na taj način se CIS uvrstilo u oblik MS.

Relapsno-remitirajuća faza bolesti (RRMS):

Ova faza zahvaća više od 85% bolesnika. Pojavljuje se u obliku više multifokalnih ili

monofokalnih neuroloških ispada, a traje najmanje 24 sata, u odsutnosti temperature ili infekcije, a nakon koje slijedi potpuna ili nepotpuna spontana remisija ili remisija uz pomoć upotrebe kortikosteroida. RRMS može biti aktivna – ima simptomatske ili asimptomatske relapse i inaktivna ( bez relapsa). Radiološko praćenje aktivnosti bolesti se odvija magnetom mozga jednom godišnje i ev. MR kralježnične moždine ako ima kliničkih znakova transverzalnog mijelitisa. Stupanj onesposobljenosti se ocjenjuje EDSS ljestvicom. Ocjenjuje se stanje bolesnika na temelju neurološkog statusa sedam funkcionalnih sustava u tijelu (sposobnost hodanja bolesnika, koordinacija, govor i gutanje, dodir i bol, funkcija crijeva i mokraćnog mjehura, vidni, mentalni i eventualni drugi oblici neuroloških promjena). EDSS 0 je uredan neurološki status, dok je EDSS 10 smrt od MS. Smatra se da je bolesnik samostalan u dnevnim aktivnostima, radu i hodu dok je EDSS do 4,5. Poseban oblik RRMS je visokoaktivan MS koji ima agresivan tijek, a zadovoljava barem jedan od slijedećih kriterija: 1. Proširena ljestvica statusa onesposobljenosti (EDSS) na početku bolesti 4 ili 5, 2. Dva ili više relapsa s nepotpunim oporavkom u jednoj godini, 3. Dva ili više snimanja MR kojima se nađu nove ili progrediraju stare lezije usprkos terapiji, 4. Bez odgovora na terapiju na jedan ili više modulirajućih lijekova (152).

Progresivna faza multiple skleroze:

Progresivna faza obuhvaća primarno progresivni oblik multiple skleroze i sekundarni oblik multiple skleroze. Progresija bolesti definira se klinički i radiološki. Oba oblika bolesti mogu biti aktivna ili neaktivna s progresijom ili bez. Početak bolesti je različit, ali klinički tijek progresije je jednak (153).

#### **1.3.4. Tijek bolesti**

Radiološki izolirani sindrom (RIS) situacija je gdje se kao slučajan nalaz otkrije demijelinizacija, ali bez prisustva kliničkih simptoma ili znakova (154 - 156). RIS može povećati vjerojatnost multiple skleroze iako sam nalaz na magnetu nije specifičan, ovisno o morfologiji i lokaciji demijelinizirajuće lezije. Promjene na magnetskoj rezonanci koje su visoko sugestivne za demijelinizaciju nose veliki rizik za nastanak simptoma multiple skleroze (156). Asimptomatske lezije leđne moždine, lezije koje se pojačavaju na gadolinij, ili pozitivan nalaz u cerebrospinalnom likvoru, povećavaju vjerojatnost dijagnoze multiple skleroze (156, 157). Bolesnike s radiološki izoliranim sindromom treba pratiti klinički.

Progresivna faza MS uključuje primarno progresivni oblik MS i sekundarno progresivni oblik MS. Progresija se očituje klinički i radiološki, pogoršanjem neurološkog deficita, odnosno progresijom veličine i broja lezija na MR. Početak bolesti je klinički različit dok faza progresije

nema razlike (158, 159).

Sekundarno progresivna multipla skleroza (SPMS) se u većini slučajeva dijagnosticira retrogradno i to tako da se javlja postupno pogoršanje relapsno remitirajućeg oblika bolesti. Ne postoje egzaktni klinički, slikovni, imunološki i patološki kriteriji koji određuju u kojem trenutku relapsno-remitirajući oblik prelazi u sekundarnu progresivnu multiplu sklerozu; prijelaz je uglavnom postupan. U koliko je SPMS u aktivnoj fazi potrebno je ili mijenjati terapiju koja ne djeluje ili uključiti imunosupresivnu/imunomodulatornu terapiju (160).

Primarno progresivna multipla skleroza (PPMS) označava klinički oblik bolesti koji se od početka manifestira progresijom i akumulacijom neuroloških oštećenja. Za razliku od sekundarne progresivne MS, ne prethodi joj relapsno-remitirajuća bolest. Smatra se da 10-15 % bolesnika ima progresivni tip bolesti (161). Neki dokazi sugeriraju da je PPMS-a različita, neinflamatorna ili barem manje inflamatorni oblik MS-a (153). Brojni klinički, slikovni i genetski podaci nalažu da je PPMS dio spektra fenotipova progresivne MS i sve razlike su više relativne nego apsolutne (162, 163). Pogoršanje se u jednakoj mjeri javlja i kod SPMS i kod PPMS (164, 165). McDonaldovi kriteriji za dijagnozu PPMS iz 2017.godine uključuju asimptomatske i kortikalne lezije, a za dokaz je potrebno imati postupno neurološko oštećenje u razdoblju od godine dana, neovisno o kliničkim relapsima. Razvoj neurološkog oštećenja može se dokazati ili prospektivno ili retrospektivno, a potrebno je da ispunjava dva od tri kriterija: barem jedna hiperintenzivna lezija u mozgu, dvije ili više hiperintenzivnih lezija u kralježničnoj moždini i prisutnost oligoklonskih vrpca u likvoru. Fenotipovi multiple skleroze mogu biti relapsni ili progresivni ovisno o statusu i anamnezi, ali ove kategorije ne pokazuju vremenske informacije za tijek bolesti. Aktivnost bolesti procijenjena kliničkim relapsima, oslikavanje magnetom ili progresija invaliditeta može pomoći u procjeni relapsa odnosno progresije. Potvrda aktivnosti bolesti utječe na prognozu i terapijske opcije (153).

Smjernice za dijagnostiku RRMS i PPMS uključuju McDonaldove kriterije.

### **1.3.5. Dijagnostika multiple skleroze**

MS je kronična inflamatorna i demijelinizacijska bolest autoimunskog podrijetla. Čimbenici koji utječu na nastanak bolesti su egzogeni, okolišni i genetski faktori. Karakteriziraju je multifokalna i vremenska oštećenja CNS-a koja vode do aksonalnog oštećenja. Obzirom na klinički tijek može se razlikovati nekoliko oblika MS-a: RRMS relapsno-remitirajući oblik, sekundarna progresivna multipla skleroza (SPMS), primarna progresivna multipla skleroza (PPMS) i progresivna relapsna MS. Ovisno o ozbiljnosti simptoma MS se može opisati kao benigna MS ili maligna MS. Dijagnoza se temelji na McDonaldovim kriterijima koji vežu

kliničke manifestacije s karakterističnim lezijama na magnetskoj rezonanciji, pregledu cerebrospinalnog likvora i vizualnim evociranim potencijalima (166).

Uloga magnetske rezonance u dijagnostici MS je dvosmjerna: potvrditi dijagnozu MS ili opovrgnuti ako se nađe supstrat za neku drugu bolest. MAGNIMS i Consortium of Multiple Sclerosis Centers su objavili standardizirane protokole za magnetsku rezonancu za dijagnozu i za praćenje (167, 168). Magnetska rezonanca mozga i kralježnice je najbolja dijagnostička metoda koja nam pomaže u dijagnozi multiple skleroze i nezamjenjiva je kod izoliranog kliničkog sindroma. Zaključeno je da se MR mozga treba napraviti svim bolesnicima sa sumnjom na multiplu sklerozu, dok je MR kralježnične moždine poželjna, ali ne obavezna. Potrebno ju je napraviti kod sumnje na zahvaćenost kralježnične moždine, kod primarno progresivnog tijeka, kod skupina bolesnika koji su iz nekog razloga manje podložni dobivanju MS (stariji, nebijelci) ili kad trebamo povećati dijagnostičku točnost (potvrditi diseminaciju u prostoru)(167, 168). MR kralježnične moždine je korisnija u dijagnostici MS kod djece nego kod odraslih (169). Po McDonaldovim kriterijima trebaju biti zadovoljeni kriteriji prostorne i vremenske diseminacije. Diseminacija u prostoru se dokazuje postojanjem više od jednog oštećenja u CNS-u, a vremenska diseminacija pokazuje nastajanje novih lezija u nekom periodu. Osim MR, indikativna je pojavnost oligoklonskih vrpca u likvoru. Po zadnjim McDonaldovim kriterijima, prisutnost dvije ili više oligoklonskih vrpca u likvoru mogu biti zamjena za diseminaciju bolesti u vremenu.

### **1.3.6. Terapija multiple skleroze**

Terapija MS se svrstava u tri kategorije: liječenje egzacerbacije, usporavanje progresije bolesti s modificirajućom terapijom i simptomatska terapija. Liječenje je postalo iznimno kompleksno s razvojem imunomodulirajuće terapije koja smanjuje broj i jačinu relapsa te broj lezija koje se vide na magnetskoj rezonanci. Terapija se započinje da se uspori ili prekine nastanak upalnih lezija i na taj način se smanji opseg invalidnosti (170).

Terapija relapsa ili egzacerbacije MS liječenje je spontane epizode nove ili postojeće bolesti. Moraju se razlikovati od nepovezanih neuroloških simptoma uslijed infekcije, temperature ili stresa, a definiraju se kao pseudorelapsi. Pravi relapsi po definiciji traju najmanje 24 sata (iako je prosjek i tri mjeseca) i povezani su s pojavom novih simptoma, koje bolesnik dosad nije iskusio. U nekim slučajevima neki se simptomi mogu ponovno pojaviti (171). Za razliku od relapsa, pseudorelapsni simptomi mogu fluktuirati ovisno o temperaturi tijela ili kao posljedica emocionalnog i fizičkog stresa. Posebno je zahtjevno razlučiti ima li bolesnik relaps, pseudorelaps ili pseudoegzacerbaciju. Umor, prenaprezanje, izloženost vlazi i vrućini može

uzrokovati fluktuacije ili pogoršanje simptoma, ali bez pravog relapsa (Uhthoff fenomen) (171). Ciljevi liječenja akutnog relapsa su brzi funkcionalni oporavak od neurološkog deficita, ublažavanje jačine ataka i smanjenje ili eliminacija potencijalnih ostatnih defekata. Ustaljeno je liječenje antiinflamatornim agensima kao što su visoke doze intravenskih ili oralnih kortikosteroida (171, 172). Kortikosteroidi ne mijenjaju tijek MS, ali ublažavaju simptome, poboljšavaju motoričku funkciju i skraćuju vrijeme oporavka. Kortikosteroidi se mogu davati ili peroralno ili parenteralno, a utjecaj na imunološki sustav ovisi o jačini doze i duljini uzimanja. Iako je dugotrajno uzimanje kortikosteroida korisno i sigurno, prakticira se kraće uzimanje većih doza. Ukoliko bolesnik ne reagira na kortikosteroidnu terapiju, može se napraviti plazmafereza.

Modulirajuća terapija (Disease-Modifying Therapy) - djelovanje modulirajuće terapije je direktno povezano s patofiziologijom MS. To je bolest središnjeg živčanog sustava kod koje se oštećuje mijelinska ovojnica i aksonalno provođenje. Oštećenje je povezano s upalom uzrokovanom perivenularnom infiltracijom T i B limfocitima, makrofagima, antitijelima i komplementom (173). Osim T-stanične imunosti, B-stanična imunost također ima ulogu u nastanku bolesti pa su se tako razvili lijekovi koji ciljano djeluju na B-stanice.

Oblici DMT terapije su: Self-Injected DMT (bolesnik samostalno aplicira terapiju): Interferon Beta-1a, Interferon Beta-1b, Peginterferon Beta-1a i Glatiramer Acetat. Sva odobrena terapija smanjuje učestalost i ozbiljnost relapsa kao i nakupljanje lezija na magnetskoj rezonanci u RRMS. Malo, ili ništa pomažu u progresivnoj formi MS (174). Različiti lijekovi se, ovisno o dozi, doziraju različitom učestalošću. Interferoni koji sadrže veće doze i koji se češće apliciraju su učinkovitiji, ali bolesnici češće razvijaju protutijela koja umanjuju učinkovitost interferona (175, 176). Betaseron, Extavia, i Rebif su visokopotentni interferoni, a Avonex se smatra niskopotentnim. Odobrena su dva oblika GA za RRMS: Copaxone je sintetska forma mijelin bazičnog proteina kopolimera, a dostupan je u dva oblika: 2mg/ml dnevno ili 40 mg/mL tri puta tjedna. Niti jedan DMT ne eliminira rizik relapsa u potpunosti. Peroralni DMT su dimetil fumarat, fingolimod i Teriflunomide. Intravenski agensi: Alemtuzumab, Natalizumab i Mitoxantrone – monoklonska protutijela alemtuzumab i natalizumab su trenutno najefikasnija terapija u liječenju MS. Međutim, oba lijeka imaju značajne rizike. Alemtuzumab je humano monoklonsko protutijelo koja snižava razinu imunoloških stanica. Alemtuzumab je povezan s mogućim autoimunim bolestima: autoimuna bolest štitnjače, autoimunosnom citopenijom, i povećan rizik od infekcija. Natalizumab, je rekombinantno humano monoklonsko protutijelo koje se koristi u RRMS. Blokira transmigraciju imunoloških stanica kroz krvno-moždanu barijeru blokirajući alfa-4 podjedinicu molekule integrina, koja je povezana s adhezijom i

migracijom stanica iz vaskulature u inflamirano tkivo.

Budući da blokira prelazak imunoloških stanica, postoji rizik od rebound učinka nakon prekida uzimanja lijeka.

#### **1.4. Hashimotov tireoiditis**

Hashimotov tireoiditis je česta autoimunosna bolest koja se naziva i autoimunosni tireoiditis (AITD). Opisao ju je 1912. Hakaru Hashimoto u bolesnika s kroničnom bolesti štitnjače koju je nazvao limfomatozna struma, a koju karakterizira difuzna limfocitna infiltracija (T i B stanicama) i makrofazima, s germinativnim centrima, fibrozom, parenhimskom atrofijom i eozinofilnim promjenama u nekim folikularnim stanicama štitnjače (177). Očituju se povišenom razinom protutijela na tireoidnu peroksidazu i tiroglobulin. Za razliku od Gravesove bolesti gdje prevladava humoralna imunost na receptore za TSH, kod Hashimotovog tireoiditisa prevladava stanična imunost koja djeluje na tireoidnu peroksidazu (178, 179). Postupno se gubi funkcija štitnjače i nastaje hipotireoidizam. Tijek bolesti može biti različit, od brzonastale atrofije s hipotireozom, do dugotrajne eutireoze. Hipotireoza se u nekim slučajevima može spontano oporaviti, a bolesnici mogu ući u eutireoidno stanje što može sugerirati reverzibilnost imunološke reakcije.

##### **1.4.1. Epidemiologija**

Protutijela na tireoidnu peroksidazu su prisutna u 10% žena u općoj populaciji (180).

Danas je to najčešća bolest štitnjače i uzrok hipotireoidizma u područjima svijeta s dostatnim unosom joda. Incidencija je 0,3 - 1,5 slučajeva na 1000 stanovnika godišnje. Prevalencija pozitivnih protutijela u žena je veća od deset posto, a klinički vidljive bolesti najmanje dva posto. Muškarci imaju desetinu ove prevalence. U Sjedinjenim Američkim Državama HT je najčešći uzrok hipotireoidizma poslije dobi od šest godina s incidencijom 1,3% na uzorku od 5000 djece u dobi od jedanaest do osamnaest godina. U odraslih je incidencija oko 3,5 na 1000 žena godišnje i 0,8 na 1000 u muškaraca. Prevalencija autoimunosnih bolesti štitnjače raste s dobi. HT je najčešći uzrok hipotireoze u područjima s dostatnim unosom joda.

##### **1.4.2. Čimbenici nastanka i patogeneza HT**

Nastanak Hashimotovog tireoiditisa je interakcija genetskih faktora, epigenetskih učinaka i različitih stečenih čimbenika (unos joda, infekcija) (181).

Genetska podloga - Studije na blizancima su pokazale epidemiološke dokaze za genetsku



podlogu HT-a. U 55% slučajeva jednojajčani blizanci su imali genetsku podlogu, dok je kod dvojajčanih podudarnost 0%. Podudarnost tireoidnih protutijela je puno veća u monozigotnih blizanaca nego u dizigotnih blizanaca (80% vs 40%). Nekoliko lokusa je povezano s Hashimotovim tireoiditisom, kao npr. HLA-DR, imunoregulatorni geni, (CD40, CTLA-4, PTPN22, FOXP3 i CD25). Povećana produkcija interferona u virusnim infekcijama može povećati produkciju tireoglobulina i voditi do aktivacije T-stanica u genetski predisponiranih osoba (182). C/T polimorfizam u Kozakovoj sekvenci na CD40 genu ima izražen efekt na CD40 prezentirajući antigen, uključujući B-stanice, uzrokujući B-staničnu proliferaciju, povezivanje imunoglobulina, proizvodnju protutijela i proizvodnju memorijskih stanica (183). Citotoksični T-limfociti povezani s 4. antigenom (CTLA4) i proteinom tirozin-22-fosfatazom su glavni negativni regulatori T-stanicama posredovanim imunološkim ulogama. Polimorfizam CTLA4 i PTPN22 gena je povezan s Hashimotovim tireoiditisom (184). Točan nastanak autoimunosti ipak nije poznat. Na murinim modelima Gravesove bolesti, regulatorne T stanice su uzrokovale limfocitnu infiltraciju tireoidnih stanica s prolaznom ili trajnom hipotireozom (185). Jod direktno blokira sintezu hormona, može biti direktno toksičan za tireocite, ali može i direktno inducirati autoimunost tako da povećava imunogenost molekula tireoglobulina i oslobađa slobodne radikale tireoglobulinskih molekula kroz enzimatsku reakciju pomoću tireoidne peroksidaze. Povišena razina slobodnih radikala potiče pojačanu ekspresiju unutarstaničnih adhezijskih molekula-1 (186). Ostali okolišni čimbenici kao što je pušenje, stres, trudnoća, hepatitis C virus i ostale infekcije, ili deficijencija selena povećavaju autoimunost i posljedičnu upalu štitnjače (187, 188). Karakteristične histopatološke osobine u Hashimotovom tireoiditisu uključuju difuznu limfoplazmatsku infiltraciju, formiranje folikula s germinativnim centrima, različite stupnjeve fibroze, parenhimsku fibrozu, i prisutnost velikih folikularnih stanica s granularnom eozinofilnom citoplazmom, a koje se zovu Hurtleove stanice, oksifilne ili Askanazy stanice.

### **1.4.3. Dijagnostika Hashimotovog tireoiditisa**

Klinička dijagnoza Hashimotovog tireoiditisa se bazira na prisustvu difuzne guše, povišenim protutijelima na tireoidnu peroksidazu i tireoglobulin, i limfocitnu infiltraciju štitnjače na citološkom razmazu. Različite su potencijalne kliničke slike u Hashimotovom tireoiditisu: eutireoza s gušom, supklinička hipotireoza s gušom, hipotireoidizam, izmjenični hipo i hipertireoidizam (189). Osim određivanjem protutijela na štitnjaču (TPO i TgA), s vrlo visokom sigurnošću Hashimotov tireoiditis se može dijagnosticirati i ultrazvučnim pregledom. Različiti simptomi se javljaju u HT: promjene raspoloženja, depresija, problemi u koncentraciji, suha

koža, gubitak kose, stalni umor unatoč dovoljnoj količini sna, promjene u težini i promjene probave. Postoji više histoloških varijanti HT: fibrozni i atrofični tip, Riedelov tireoiditis i IgG4 tireoiditis (190 - 196).

Otpriblike 10 - 13% bolesnika s HT-om ima fibroznu varijantu. Normalan parenhim je uništen i zamijenjen je staničnim fibroznim tkivom i kolagenom strumom. Fibroza se ne širi izvan granica kapsule štitnjače. Klinički se očituje kao čvrsta guša s nedavnim povećanjem, hipotireozom i porastom tireoglobulinskih protutijela.

Štitnjača je jako malena (1 do 6 grama) i očituje se parenhimskom atrofijom, fibrozom, limfoplazmocitnom infiltracijom u fibroznoj atrofičnoj varijanti HT-a (197, 198). Ova varijanta je povezana s miksedemom i visokom incidencijom pozitivnih protutijela (199).

U podvrste Hashimotovog tireoiditisa svrstavani su i Riedelov tireoiditis i IgG4 tireoiditis, međutim, naknadno se ustvrdilo da bi Riedelov tireoiditis mogao biti dio sistemske bolesti, odnosno multifokalne fibroskleroze. IgG4 tireoiditis je multiorganska sistemska bolest koja se očituje povećanjem zahvaćenog organa i povišenom serumskom i tkivnom razinom IgG4. Veća je vjerojatnost nastanka hipotireoze, a ultrazvučno se vidi izražena hipoechogenost. Koncentracija tireoidnih protutijela je izrazito visoka.

#### **1.4.4. Terapija Hashimotovog tireoiditisa**

Liječenje Hashimotovog tireoiditisa i hipotireoze bilo kojeg uzroka je nadomještanje hormona štitnjače. Terapija izbora je levotiroksin, najčešće doživotno. Potrebno je dozu prilagoditi individualnim potrebama bolesnika. Cilj je dovesti bolesnika u eutireoidno stanje. Standardna doza je 1.6-1.8 µg/kg dnevno. U biokemijskoj eutireozu fT4 i TSH u referentnom su rasponu s tim da je poželjno da je TSH u donjoj polovini normalnih vrijednosti. Bolesnici mlađi od pedeset godina, bez kardiovaskularnih komorbiditeta mogu započeti s punom dozom. Bolesnicima starijim od pedeset godina i onima mlađima od pedeset godina s kardiovaskularnim rizikom, početnu dozu treba smanjiti za 25 µg, uz kontrolu laboratorijskih parametara za 6-8 tjedana. Treba se pažljivo i polako povećavati doza prema eutireoidnom stanju. Nekad je iznimno teško ili nemoguće, bolesnika s kardijalnom aritmijom, dovesti u eutireoidno stanje bez da se ne izazove poremećaj ritma. U takvoj situaciji može biti dostatno i održavati blago povišen TSH. Starije bolesnike najčešće treba tretirati s 1 µg/kg. Također se s manjim dozama tretira i bolesnike na androgenima. Bolesnike s resekcijom crijeva i sindromom kratkog crijeva te malapsorpcijama bilo kojeg uzroka, treba liječiti s većim dozama.

### 1.5. Poliautoimunost

Postojanje dvije ili više autoimunskih bolesti kod istog bolesnika se naziva poliautoimunost. Najčešća autoimunosna bolest uključena u poliautoimunost je Hashimotov tiroiditis. Postojanje poliautoimunosti je dovelo do pretpostavke da bolesnik ima generaliziranu disregulaciju imunološkog sustava. Na početku 20. stoljeća Paul Ehrlic je dokazao da životinje ne proizvode protutijela na vlastite eritrocite i oformio je naziv „horror autotoxicus” za reakciju imunološkog sustava na vlastite stanice (200). Istodobno se otkrilo prirodno postojanje protutijela na spermatozoje. Otada su otkrivena brojna protutijela koja se fiziološki nalaze u zdravom organizmu. Prirodna protutijela postoje u zdravom organizmu (201), pokazuju reaktivnost na vlastite i strane antigene i IgM su razreda (201, 202). Protutijela povezana s bolestima su IgG razreda koja vežu specifične antigene visokim afinitetom (203). Prirodna protutijela mogu služiti za selekciju starih stanica i stanica koje imaju tumorski potencijal te mogu pojačavati antiinflamatornu kontrolu na B i T-stanicama i stoga se prirodna autoimunost mora razlikovati od autoimunosti povezane s bolestima (204, 205).

Autoimunosna bolest nastaje gubitkom tolerancije na vlastite antigene koja se može dogoditi centralno i periferno. Adaptivni imunološki sustav obično, pomoću T i B stanica održava ravnotežu između reakcije na strane i vlastite antigene. T i B stanice sadrže više podvrsta regulatornih stanica s imunoregulatornim citokinskim profilom s jedne strane i efektorskim stanica koje proizvode protutijela ili luče proinflamatorne citokine s druge strane. Tradicionalna podjela na pomoćničke limfocite (Th1 i Th2) napuštena je u trenutku kad je bilo jasno da se  $CD4^+$  efektorske T-stanice mogu diferencirati u nekoliko podrazreda T-stanica koji stimuliraju različit dio imunskog sustava. Stanice Th1 i Th17 sudjeluju u raznim bolestima, uključujući i HT i Gravesovu bolest (206). Th17 povezan je s kroničnom upalom i autoimunskim bolestima kao što su sistemski eritemski lupus, sistemska skleroza ili Sjogrenov sindrom (207). Većina je autoimunskih bolesti vezana za određene HLA antigene, a bolest nastaje prelaskom prirodne imunosti u specifičnu, pod utjecajem genetske sklonosti i faktora iz okoliša kao što su virusne i bakterijske infekcije, pušenje i mikrohimerizmom majka-fetus (208). Budući da je autoimunosna bolest štitnjače najčešća autoimunosna bolest, najčešće je združena s ostalim bolestima u poliautoimunskim sindromima. U kolumbijskoj studiji na uzorku od 1083 bolesnika autoimunosna bolest štitnjače je bila najčešća autoimunosna bolest, u kombinaciji sa sistemskom sklerozom u 23% slučajeva, s reumatoidnim artritismom u 21% slučajeva, sa sistemskim lupusom u 18% slučajeva, a s multiplom sklerozom u 9%. Kod bolesnika sa Sjogrenovim sindromom, 21% bolesnika je imalo združen autoimunosni tireoiditis (209).

Također su rađene studije kod kojih se ispitivala prisutnost TgAb i TPOAb u raznim autoimunskim bolestima, značajno je veća prisutnost protutijela u svim autoimunskim bolesima, u usporedbi sa zdravom, kontrolnom populacijom. Više od 50% bolesnika s dijabetesom je imalo povišena protutijela na štitnjaču, 55% bolesnika s autoimunskom jetrenom bolesti, 26% bolesnika s mijastenijom gravis i 34% bolesnika s bolestima vezivnog tkiva. Koegzistiranje netireoidnih protutijela ili drugih autoimunskih bolesti kod bolesnika s autoimunskim tireoiditisom je istraživano u nekoliko studija. U jednoj, koja je uključila 3069 bolesnika s AITD, samo su tri bolesti (autoimunski gastritis, vitiligo i reumatoidni artritis) imale zajedničku pojavnost veću od 2% (210). U japanskoj populaciji, u skupini bolesnika s AITD, najčešća netireoidna protutijela su protutijela na glutamatnu dekarboksilazu, prisutna u 6,4% bolesnika s Gravesovom bolesti i u 4,6% bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom, na taj način potvrđujući povezanost između inzulinskih protutijela i autoimunosti štitnjače (211).

U studiji koja je uključila 3000 bolesnika iz Velike Britanije s autoimunskom bolesti štitnjače, 14,3% bolesnika s HT-om i 9,7% bolesnika s GD-om imalo je barem jednu autoimunsku bolest. Uglavnom je to bio dijabetes tipa 1, reumatoidni artritis i perniciozna anemija (212). Povećana učestalost autoimunskih bolesti, uključujući i bolesti štitnjače, povećava se primjenom biološke terapije za liječenje bolesnika s rakom i s drugim bolestima kao što je MS ili kronični hepatitis. U bolesnika s MS-om, 6-31 tjedan nakon uzimanja anti-CD52 monoklonskih protutijela – alemtuzumaba, jedna trećina bolesnika će razviti GD (213). Najvjerojatnije je razlog gubitak imunoregulacije posredovane T-stanicama. U bolesnika s kroničnim hepatitisom, koji se liječi interferonom alfa, 40% bolesnika razvije protutijela na štitnjaču, a 15% ih razvije klinički AITD (214,215). Biološki su lijekovi učinkoviti protiv raka, ali mogu uzrokovati različite autoimune bolesti. Primjeri takvih lijekova su ipilimumab (monoklonsko protutijelo na CTLA-4 receptor), nivolumab i pembrolizumab koji imaju antitumorsku aktivnost (216).

## **2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

Primarni je cilj usporediti razliku koncentracije interleukina-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini bolesnika s inaktivnim MS-om i HT-om i onih bolesnika s inaktivnim MS-om i zdravom štitnjačom.

Sekundarni su ciljevi:

1. usporediti dobivene vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini u skupini bolesnika sa zdravom štitnjačom
2. usporediti dobivene vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini u skupini bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom
3. odrediti utječe li koegzistencija dviju autoimunskih bolesti na koncentraciju IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i serumu u odnosu na bolesnike s jednom autoimunskom bolešću.

Osnovna je hipoteza istraživanja da je koncentracija IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini i krvi bolesnika u inaktivnoj fazi multiple skleroze sa zdravom štitnjačom niža od koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini i krvi bolesnika s inaktivnom multiplom sklerozom i koegzistirajućim Hashimotovim tireoiditisom.

### 3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

Uzeti su uzorci krvi i sline 130 bolesnika koji su u inaktivnoj fazi MS, a došli su na redovite kontrolne preglede na Kliniku za neurologiju KBC-a Sestre Milosrdnice. Aktivnost bolesti je klinički i radiološki procijenjena – svi su bili u remisiji. Ovisno o razini TPO i TgA protutijela bolesnici su podijeljeni u dvije skupine: bolesnici koji su imali povišene vrijednosti jednog ili obaju protutijela su svrstani u skupinu bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom, a oni koji su imali protutijela unutar referentnih vrijednosti u skupinu bolesnika sa zdravom štitnjačom. Ovim se istraživanjem ispitivala razina IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini i krvi bolesnika. Svi bolesnici su potpisali informirani pristanak. Probir bolesnika je napravio neurolog, a postupke istraživanja objasnila je i uzela uzorke ista medicinska sestra. U sklopu standardne obrade učinjena je analiza TSH, fT4, anti-TPO, TgA. Krv se uzorkovala venepunkcijom u Vacuete®: dvije serumske epruvete s aktivatorom zgrušavanja, crveni čep za određivanje CRP, TSH, fT4, anti-TPO, TgA, IL-6, TNF- $\alpha$ , a druga epruveta s K2EDTA, ljubičasti čep (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija), uzorak pune krvi za 5-diff kompletnu krvnu sliku (KKS). Serumske epruvete su se u skladu s pravilima dobre laboratorijske prakse u primjerenom vremenu centrifugirale 10 minuta na 3500 okretaja u minuti. TSH, fT4, antiTPO, TgA i KKS su se određivali odmah, a uzorci za IL-6 i TNF- $\alpha$  su se alikvotirali u dva alikvota po 550  $\mu$ L te zamrznuli na -20°C do analize. CRP se analizira na automatskom analizatoru Abbott c8000 (Abbott, Illinois, SAD), metodom imunoturbidimetrije uz prikladno korištenje kalibratora i kontrolnih uzoraka. Referentna vrijednost za CRP je <5mg/L. TSH i fT4 su određeni na automatskom analizatoru Abbott i2000 (Abbott, Illinois, SAD), metodom kemiluminiscencije, a TPO i TgA na analizatoru Cobas e601 (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska), metodom elektrokemiluminiscencije. KKS se određuje na analizatoru DxH520 (Beckham-Coulter, Brea, SAD). Preporučene referentne vrijednosti za TSH su 0,35 - 4,94  $\mu$ IU/mL, fT4 9,01 - 19,05 pmol/L, TPO <34 kIU/L, TgA <115 kIU/L. IL-6 iz krvi je određivan na Cobas e601 (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska), metodom ECLIA, dok je TNF- $\alpha$  iz krvi određivan CLIA metodom kemiluminiscencije (Siemens Immulite 1000). Vrijednosti IL-6 > 3,4 pg/mL i TNF- $\alpha$  > 8,1pg/mL su označene kao detektibilne. Slina se skupljala metodom slobodnog pada. Ispitanici su ispunili upitnik o nekim navikama, kao što je pušenje, duljina trajanja bolesti, terapiji koju su uzimali, prehrambenim navikama te stomatološkim intervencijama, odnosno patologiji usne šupljine. Na početku uzimanja usta se ispiru vodom, a slina se počinje skupljati deset minuta nakon toga, poštujući sve predanalitičke zahtjeve. Ispitanici su bili dvanaest sati natašte, bez prisustva oralnih bolesti, ozljeda ili upala usne šupljine. Zubi su oprani najmanje šezdeset minuta prije početka skupljanja sline. Svi uzorci su skupljeni u razdoblju od 8-10 sati

ujutro. Skuplja se najmanje 1 mL uzorka, stavlja se u hladnjak i što prije se transportira u laboratorij (unutar 6 sati), gdje se podijeli na dva dijela i čuva u različitim hladnjacima na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Iz uzoraka sline određen je IL-6, upotrebom komercijalnih kitova za obradu iz sline (Salimetrics, PA, SAD), ručnom metodom ELISA, dok je TNF- $\alpha$  odrađen CLIA metodom. Kvaliteta uzoraka validirala se standardnim metodama, a u analitičkim i predanalitičkim značajkama poštovala su se načela dobre laboratorijske prakse. Osjetljivost kita za IL-6 u slini je razina iznad 0,07 pg/mL, dok je osjetljivost za TNF- $\alpha$  u slini 0,106 pg/mL. Razine ispod navedenih vrijednosti označit će se kao nedetektibilne, a iznad njih detektibilne.

U statističkoj analizi korišten je programski paket IBM SPSS Statistics, version 22.

U radu je primijenjena deskriptivna statistika u određivanju mjera centralne tendencije i mjera varijabilnosti. Frekvencija (f) jest broj koliko nečega ima, tj. učestalost neke pojave. Valjani se postotak računa od ukupnog broja valjanih podataka. Mjere tendencije koje su primijenjene u radu jesu aritmetička sredina, medijan i mod. Aritmetička sredina ili sredina (mean) je zbroj skupa brojeva podijeljenih određenim brojem brojeva u skupu. Medijan je vrijednost koja se nalazi točno na polovici raspona – pedeset posto uzorka je ispod, a pedeset posto iznad te vrijednosti. Mod ili dominantna vrijednost je najčešća vrijednost. Mjere varijabilnosti primijenjene u radu su raspon i standardna devijacija. Standardna je devijacija mjera prosječnog odstupanja od prosjeka, i to u apsolutnom iznosu. S obzirom na to da se parametrijski testovi upotrebljavaju za normalnu distribuciju neke pojave u prirodi (koja prati Gaussovu krivulju), većina promatranih parametara u ovom radu nema normalnu distribuciju pa se u skladu s tim koriste neparametrijski testovi.

Korišten je t-test za nezavisne uzorke kojim računamo je li razlika između dvije aritmetičkih sredina značajna. Mann – Whitneyev U test neparametrijski je test koji rangira rezultate međusobno, a potom uspoređuje prosječni rang između dviju skupine. Mann Witneyev U test ili Wilcoxonov T test provjeravaju pripadaju li dva uzorka u populaciju s istim medijanom. P-vrijednost ili razina statističke vjerojatnosti određena je na 5%.

Koeficijent korelacije pokazatelj je stupnja statističke povezanosti. Ako se istražuje veza između dviju varijabli i ako je ona linearna, stupanj povezanosti izražava se koeficijentom linearne korelacije. Pearsonov koeficijent korelacije (r) mjeri jakost i smjer linearne korelacije. Smjer korelacije jednak je predznaku r. Stupanj korelacije nalazi se između 0 i 1, pa tako vrijednost  $r = 0$  ne korelira, a vrijednost  $r = 1$  korelira u potpunosti.

Hi-kvadratni ( $\chi^2$ -test) primjenjuje se u većini slučajeva ako se radi o kvalitativnim podacima

ili ako tim podacima distribucija značajno odstupa od normalne. Hi-kvadratni test računa samo s frekvencijama i nije dopušteno koristiti se mjernim jedinicama. Pomaže nam da utvrdimo odstupaju li neke frekvencije od frekvencije koju bi smo očekivali.

Kolmogorov-Smirnovljevim testom, Shapiro-Wilksovim testom i Lilleforovim testom testira se normalnost distribucije. Kolmogorov-Smirnovljev test neparametrijski je test čiji se rezultat interpretira s obzirom na p-vrijednost:  $p < 0,05$  – znači da podaci značajno odstupaju od normalnosti, a  $p > 0,05$  da su rezultati normalno distribuirani. Shapiro Wilksov test primjenjuje se za manje i srednje uzorke. Lilleforov test mjeri maksimalnu udaljenost između promatrane distribucije i normalne distribucije.



#### 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Osnovni demografski podaci prikazani su u tablicama 1. i 2.

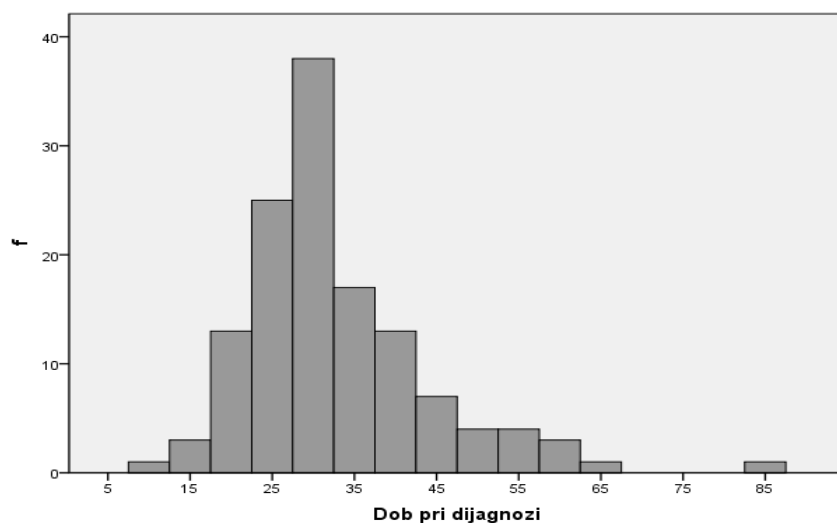
Tablica 1. Parametri obzirom na status štitnjače

	Ukupno	Hashimotov tireoiditis	Zdrava štitnjača
<i>N</i>	130	33 (25,4%)	97 (74,6%)
<i>Muškarci</i>	25 (19,2%)	5 (20%)	20 (80%)
<i>Žene</i>	105 (80,8%)	28 (26,7%)	77 (73,3%)
TSH		2,60	1,29
CRP		1,26	1,70
EDSS		1,15	1,37
IL-6	Slina	4,17	2,93
	Krv	2,44	2,41
TNF- $\alpha$	Slina	26,41	25,18
	Krv	5,69	5,71

Tablica 2. Dob pri dijagnozi

Broj	130
Aritmetička sredina	32,49
Medijan	30,00
Najčešća vrijednost	28
Standardna devijacija	11,05
Najmanja vrijednost	10
Najveća vrijednost	86

Testirana Kolmogorov-Smirnovljevim testom, dob sudionika jest varijabla čija distribucija značajno odstupa od normalne.



Slika 1. Dob pri dijagnozi

Udio bolesnika s multiplom sklerozom i urednom štitnjačom i bolesnika s multiplom sklerozom i Hashimotovim tireoiditisom vidi se u Tablici 3.

Tablica 3. Udio zdrave štitnjače i Hashimotovog tireoiditisa

	F	%
Zdrava štitnjača	97	74,6
Hashimotov tireoiditis	33	25,4
Ukupno	130	100,0

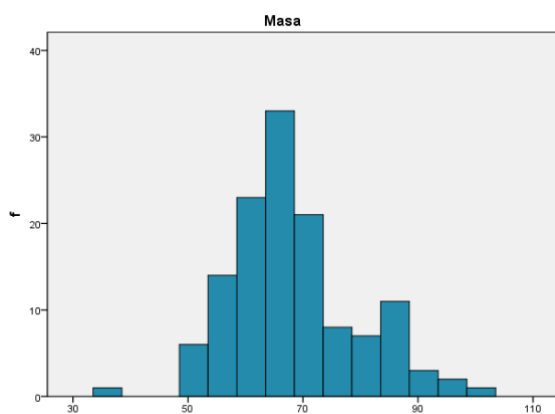
kratice: f - frekvencija

Srednja dob bolesnika u trenutku dijagnoze MS-a u muškaraca je  $33,20 \pm 10,67$  godina, a u žena  $32,32 \pm 11,190$  godina. Udio pušača je 35,4%. Srednja vrijednost BMI u muškaraca je  $23,648 \pm 2,6546$  kg/m<sup>2</sup>, a u žena  $22,869 \pm 2,9341$ kg/m<sup>2</sup> (Tablica 4.).

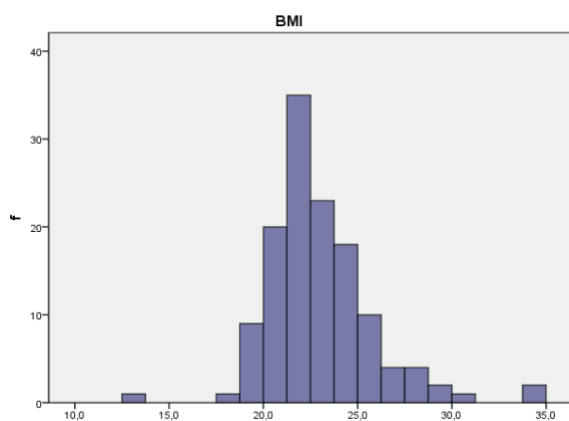
Tablica 4. Visina, tjelesna masa i BMI

	Visina	Masa	BMI
Broj	130	130	130
Aritmetička sredina	1,7176	68,14	23,019
Medijan	1,7150	65,50	22,495
Najčešća vrijednost	1,68 <sup>a</sup>	65	21,5 <sup>a</sup>
Standardna devijacija	0,081	11,118	2,889
Najmanja vrijednost	1,50	36	13,1
Najveća vrijednost	1,89	100	34,6

kratice: BMI – indeks tjelesne mase



Slika 2. Distribucija tjelesne mase



Slika 3. Distribucija indeksa tjelesne mase

Tablica 5. Dob bolesnika pri dijagnozi multiple skleroze

	Spol	Broj	X	SD
Dob pri dijagnozi	M	25	33,20	10,677
	Ž	105	32,32	11,190
BMI	M	25	23,648	2,6546
	Ž	105	22,869	2,9341

Kratice: x – aritmetička sredina, SD- standardna devijacija, M – muškarci, Ž – žene, BMI – indeks tjelesne mase

Primjenom t-testa za nezavisne uzorke, nije dobivena statistički značajna razlika u dobi dijagnosticiranja MS s obzirom na spol, kao ni statistički značajna razlika u BMI-ju između muškaraca i žena.

Tablica 6. Status štitnjače ovisno o spolu

		Status štitnjače		Ukupno	
		Zdrava štitnjača	Hashimotov tireoiditis		
Spol	M	Broj	20	5	25
		% Spol	80,0%	20,0%	100,0%
	Ž	Broj	77	28	105
		% Spol	73,3%	26,7%	100,0%
Ukupno	Broj	97	33	130	
	% Spol	74,6%	25,4%	100,0%	

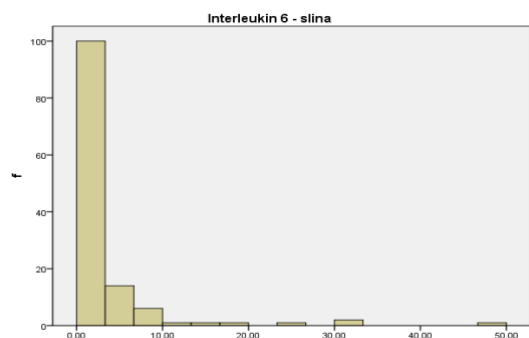
kratice: M – muškarci; Ž - žene

Hi-kvadratnim testom nije utvrđena statistički značajna razlika u pojavnosti Hashimotova tireoiditisa u muškaraca i žena koji imaju multiplu sklerozu.

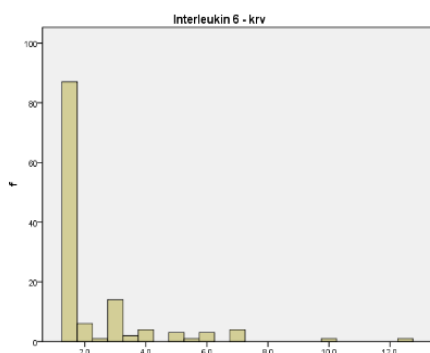
Tablica 7. Razina IL-6 u slini i krvi

	IL-6 – slina	IL-6 – krv
Broj	128	128
Aritmetička sredina	3,2406	2,413
Medijan	0,35	1,5
Najčešća vrijednost	0,35	1,5
Standardna devijacija	6,65127	1,8997
Najmanja vrijednost	0,35	1,5
Najveća vrijednost	46,8	12,3

Učinjen je Kolmogorov-Smirnovljev test normalnosti distribucije uz Lillieforsovu korekciju za uzorke veće od 30 te Shapiro-Wilkijev test normalnosti distribucije za uzorke manje od 30, a distribucija IL-6 u krvi i slini statistički značajno odstupa od normale. Većina vrijednosti se grupira u manjem rasponu. (Slika 5.)



Slika 4. Distribucija IL-6 u slini



Slika 5. Distribucija IL-6 u krvi

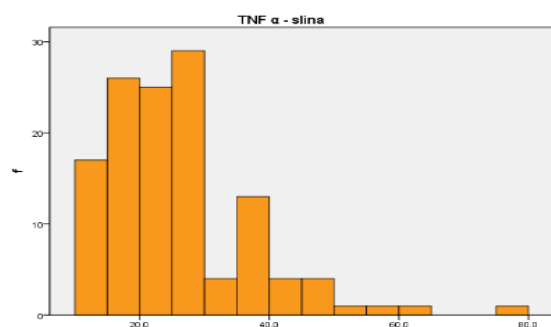
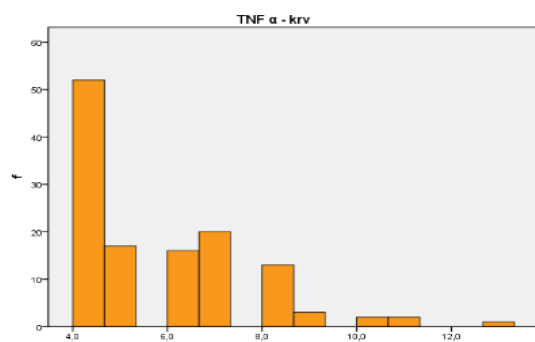
Tablica 8. Razina TNF- $\alpha$  u krvi i slini

	TNF $\alpha$ – slina	TNF $\alpha$ - krv
Broj	128	128
Aritmetička sredina	25,484	5,701
Medijan	23,25	5,00
Najčešća vrijednost	25,3 <sup>a</sup>	4,0
Standardna devijacija	10,7321	1,8782
Najmanja vrijednost	11,9	4,0
Najveća vrijednost	75,9	13,0

a. Postoje više vrijednosti koje se najčešće ponavljaju.

Prikazana je najmanja vrijednost.

Kolmogorov-Smirnovljev test normalnosti distribucije uz Lillieforsovu korekciju za uzorke veće od 30 ili Shapiro- Wilkijev test normalnosti distribucije za uzorke manje od 30 statistički značajno odstupaju od normale za vrijednosti TNF- $\alpha$  u krvi i slini. Većina vrijednosti TNF- $\alpha$  u krvi i slini se grupira u manjem rasponu. (Slika 6. i 7.)

Slika 6. Distribucija TNF- $\alpha$  u sliniSlika 7. Distribucija TNF- $\alpha$  u krvi

Tablica 9. Korelacija između mjera IL-6 i TNF- $\alpha$ 

	Mean	SD	broj
IL 6 – slina	2,7436	5,1196	124
IL 6 – krv	2,369	1,7932	124
TNF $\alpha$ – slina	25,666	10,7439	124
TNF $\alpha$ – krv	5,643	1,8777	124

Kratice: SD – standardna devijacija, mean – aritmetička sredina

Budući da svih 130 ispitanika nije imalo relevantne podatke o svim vrijednostima, za korelacije se koristila opcija gdje su za sve četiri varijable izračunate vrijednosti na onim ispitanicima koji su imali valjan podatak za sve četiri varijable.

Tablica 10. Korelacija između IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini

	IL 6 – slina	IL 6 – krv	TNF $\alpha$ – slina	TNF $\alpha$ – krv
Interleukin 6 – Pearson r slina	-	0,363**	0,132	0,187*
Sig.		0,000	0,145	0,038
Interleukin 6 – Pearson r krv	0,363**	-	0,171	0,432**
Sig.	0,000		0,058	0,000
TNF $\alpha$ – Pearson r slina	0,132	0,171	-	0,161
Sig.	0,145	0,058		0,074
TNF $\alpha$ – Pearson r krv	0,187*	0,432**	0,161	-
Sig.	0,038	0,000	0,074	

\*\* Korelacija je značajna na razini 0,01. Korelacija je značajna na razini 0,05; Pearson r – koeficijent korelacije; Sig.- significance – razina statističke značajnosti

Statistički značajno koreliraju vrijednosti IL- 6 iz sline i IL- 6 iz krvi ( $r = 0,363$ ;  $p < 0,01$ ), IL-6 iz sline i TNF- $\alpha$  iz krvi ( $r = 0,187$ ;  $p < 0,05$ ), kao i između IL-6 iz krvi te TNF- $\alpha$  iz krvi ( $r = 0,432$ ;  $p < 0,01$ ). Ostale varijable statistički značajno ne koreliraju. TNF- $\alpha$  iz sline ne korelira niti s jednom varijablom.

Tablica 11. Razlika IL-6 i TNF- $\alpha$  između skupina obzirom na status štitnjače

Status štitnjače		Broj	Mean	SD	SE
Interleukin 6 - slina	Hashimotov tireoiditis	32	4,1700	8,53300	1,50844
	Zdrava štitnjača	96	2,9308	5,91552	0,60375
Interleukin 6 –krv	Hashimotov tireoiditis	32	2,438	1,8715	0,3308
	Zdrava štitnjača	96	2,405	1,9187	0,1958
TNF $\alpha$ – slina	Hashimotov tireoiditis	32	26,409	12,1020	2,1394
	Zdrava štitnjača	96	25,176	10,2858	1,0498
TNF $\alpha$ – krv	Hashimotov tireoiditis	32	5,688	1,8039	0,3189
	Zdrava štitnjača	96	5,705	1,9116	0,1951

Kratice: Mean – aritmetička sredina SD - standardna devijacija, SE – standardna pogreška

T-testom nije pokazana statistička značajna razlika između dvije skupine bolesnika u nijednoj od mjerenih ciljnih varijabli –  $p$ -vrijednost nigdje nije manja od 0,05.

Tablica 12. Razina IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini obzirom na status štitnjače

	IL 6 – slina	IL 6 – krv	TNF $\alpha$ – slina	TNF $\alpha$ – krv
Mann-Whitney U	1533,0	1472,5	1509,5	1533,5
Wilcoxon W	6189,0	6128,5	6165,5	2061,5
Z	-0,018	-0,416	-0,146	-0,0014
Asymp. Sig.	0,986	0,678	0,884	0,989

Z- razina statističke značajnosti; Asymp. Sig.- razina značajnosti

Mann-Whitneyevim testom i t-testom nema statistički značajne razlike u koncentraciji IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini bolesnika sa zdravom štitnjačom u odnosu na one s Hashimotovim tireoiditisom.

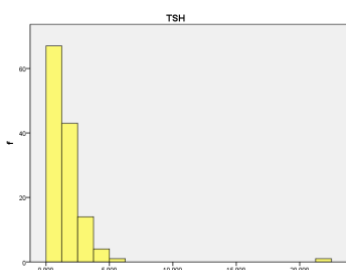
Vrijednosti TSH u našem istraživanju prikazane su u Tablici 13., a raspon vrijednosti prikazan je na Slici 8. Normalitet je testiran Kolmogorov-Smirnovljevim test uz Lillieforsovu korekciju za uzorke veće od 30, a distribucija je odstupala od normale.



Tablica 13. Raspon TSH

Broj	130
Aritmetička sredina	1,61992
Medijan	1,17400
Najčešća vrijednost	0,756 <sup>a</sup>
Standardna devijacija	2,039928
Najmanja vrijednost	0,014
Najveća vrijednost	21,824

a. Postoji više najčešćih vrijednosti,  
Prikazana je najmanja najčešća vrijednost



Slika 8. Distribucija vrijednosti TSH

Statistička značajnost razlike između dviju skupina testirana je t-test-om za nezavisne uzorke, koji je pokazao kako se ove dvije skupine statistički značajno razlikuju obzirom na prosječnu razinu TSH ( $t = 3,324$ ;  $df = 128$ ;  $p < 0,01$ ). Skupina s HT imala je u prosjeku višu razinu TSH ( $M = 2,6$ ) od skupine sa zdravom štitnjačom ( $M = 1,29$ ). S obzirom na činjenicu da se radi o varijabli čija je distribucija statistički značajno odstupala od normalne, što je jedan od preduvjeta za primjenu t-testa, testiranje smo dodatno provjerili koristeći neparametrijski Mann-Whitneyevim testom kao zamjenom. Rezultati Mann-Whitneyeva testa također su potvrdili postojanje statistički značajne razlike ( $p < 0,01$ ) u korist skupine bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom. Vrijednosti TSH kod Hashimotova tireoiditisa su za 1,3 mIU/mL veće od vrijednosti TSH kod zdrave štitnjače iako je prosječna vrijednost TSH svih bolesnika u rasponu normalnih vrijednosti.

Tablica 14. Korelacija razine TSH s razinom IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini

	IL 6 - slina	IL 6 – krv	TNF $\alpha$ - slina	TNF $\alpha$ – krv	TSH
IL 6 – slina					
Pearson r	-	0,363**	0,132	0,187*	0,032
Sig.		0,000	0,145	0,038	0,722
IL 6 – krv					
Pearson r	0,363**	-	0,171	0,432**	-0,004
Sig.	0,000		0,058	0,000	0,964
TNF $\alpha$ – slina					
Pearson r	0,132	0,171	-	0,161	0,067
Sig.	0,145	0,058		0,074	0,462
TNF $\alpha$ – krv					
Pearson r	0,187*	0,432**	0,161	-	-0,031
Sig.	0,038	0,000	0,074		0,728
TSH					
Pearson r	0,032	-0,004	0,067	-0,031	-
Sig.	0,722	0,964	0,462	0,728	

\*\* Korelacija je značajna na razini 0.01. \* Korelacija je značajna na razini 0.05.

U svim navedenim skupina ne postoji korelacija razine TSH s razinom IL-6 i TNF- $\alpha$  ni u krvi ni u slini.

U tablicama 15. i 16. pokazano je da vrijednosti CRP ne koreliraju sa statusom štitnjače, dok Slika 9. pokazuje distribuciju CRP-a

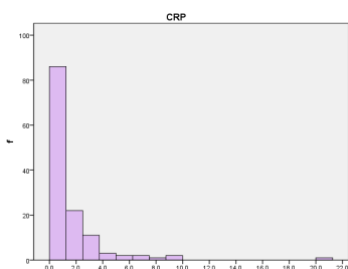
Tablica 15. Razina CRP-a u našem uzorku

Broj	130
Aritmetička sredina	1,595
Medijan	0,800
Najčešća vrijednost	0,4
Standardna devijacija	2,4361
Najmanja vrijednost	0,2
Najveća vrijednost	20,1

Mann-Whitneyev test se slaže s t-testom i pokazuje kako nema statistički značajne razlike u razini CRP-a kod bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom u odnosu na one sa zdravom štitnjačom.

Distribucija normaliteta razine CRP-a testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom i

pokazalo se da vrijednost CRP-a značajno odstupa od normale.



Slika 9. Distribucija razine CRP-a

Tablica 16. Korelacije CRP-a i IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i u slini

	IL 6 – slina	IL 6 – krv	TNF $\alpha$ – slina	TNF $\alpha$ – krv	CRP
IL 6 – slina					
Pearson r		0,368**	0,130	0,186*	0,297**
Sig.	-	0,000	0,152	0,040	0,001
IL 6 – krv					
Pearson r	0,368**		0,153	0,429**	0,385**
Sig.	0,000	-	0,091	0,000	0,000
TNF $\alpha$ – slina					
Pearson r	0,130	0,153		0,156	0,014
Sig.	0,152	0,091	-	0,085	0,877
TNF $\alpha$ – krv					
Pearson r	0,186*	0,429**	0,156		0,223*
Sig.	0,040	0,000	0,085	-	0,013
CRP					
Pearson r	0,297**	0,385**	0,014	0,223*	
Sig.	0,001	0,000	0,877	0,013	-

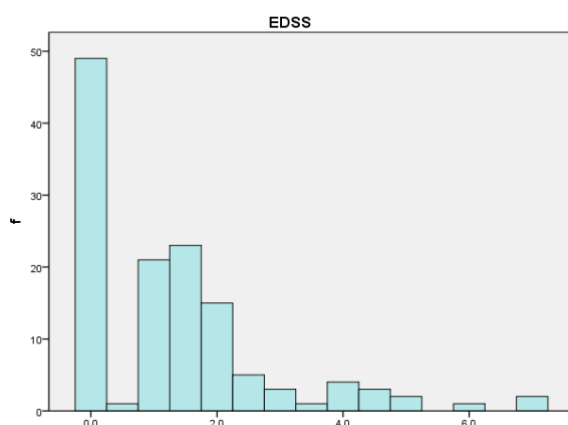
\*\* . Korelacija značajna na razini 0.01. \* . Korelacija značajna na razini 0,05

Dobivena je statistički značajna korelacija između razine CRP-a i razine IL-6 u slini ( $r = 0,297$ ;  $p < 0,01$ ) te značajna korelacija između CRP-a i razine IL-6 u krvi ( $r = 0,385$ ;  $p < 0,01$ ). Korelacija je pozitivna, što znači da su bolesnici koji su imali viši CRP imali i više vrijednosti interleukina-6. Korelacije s TNF- $\alpha$  nisu statistički značajne (Tablica 16.).

Tablica 17. EDSS

Broj	130
Aritmetička sredina	1,312
Medijan	1,000
Najčešća vrijednost	0
Standardna devijacija	1,4958
Najmanja vrijednost	0,0
Najveća vrijednost	7,0

U tablici 17. je prikazana najmanja i najveća vrijednost EDSS-a, a najčešća vrijednost je 0.



Slika 10. EDSS u ispitivanoj skupini

Na slici 10. je prikazan raspon vrijednosti EDSS-a u ispitivanoj skupini.

Tablica 18. Status štitnjače

Status štitnjače	N	Mean	SD
Hashimoto tireoiditis	33	1,152	1,5637
Zdrava štitnjača	97	1,366	1,4764

Kratica: EDSS – Expanded disability status scale

Srednja vrijednost EDSS kod bolesnika s multiplom sklerozom i zdravom štitnjačom je 1,366, dok je srednja vrijednost EDSS-a kod bolesnika s multiplom sklerozom i Hashimotovim tireoiditisom 1,152. Rezultati su prikazani u Tablici 18. a dobivene vrijednosti pokazuju da nema statistički značajne razlike u navedenim skupinama.

Tablica 19. Statistička povezanost EDSS i razine IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini

		IL 6 – slina	IL 6 – krv	TNF $\alpha$ – slina	TNF $\alpha$ – krv	EDSS
IL 6 – slina	Pearson r	-	0,363**	0,132	0,187*	0,046
	Sig.	-	0,000	0,145	0,038	0,613
IL 6 – krv	Pearson r	0,363**	-	0,171	0,432**	-0,078
	Sig.	0,000	-	0,058	0,000	0,389
TNF $\alpha$ – slina	Pearson r	0,132	0,171	-	0,161	-0,163
	Sig.	0,145	0,058	-	0,074	0,071
TNF $\alpha$ – krv	Pearson r	0,187*	0,432**	0,161	-	0,157
	Sig.	0,038	0,000	0,074	-	0,082
EDSS	Pearson r	0,046	-0,078	-0,163	0,157	-
	Sig.	0,613	0,389	0,071	0,082	-

Kratica: EDSS Expanded disability status scale\*\*. Korelacija značajna na razini 0.01. \*. Korelacija značajna na razini 0.05.

U Tablici 19. testirana je povezanost EDSS-a i razine IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini i krvi. Statistička značajnost razlike između dviju skupina testirana je t-testom za nezavisne uzorke, koji je

pokazao da se ove skupine ne razlikuju statistički značajno u prosječnom EDSS-u ( $t = -0,710$ ;  $p = 0,354$ ). S obzirom na činjenicu da se i ovdje radi o varijabli čija je distribucija statistički značajno odstupala od normalne, testiranje smo dodatno provjerili neparametrijskim Mann-Whitneyevim testom kao zamjenom. Rezultati Mann-Whitneyeva testa su također potvrdili nepostojanje statistički značajne razlike među testiranim skupinama.

Pušenje je dihotomna varijabla s dvije vrijednosti (da/ne). Tablica 20. pokazuje da nema korelacije između pušenja i izmjerenih vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  ni u krvi ni u slini.

Tablica 20. Korelacija pušenja i razine IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini

		IL 6 – slina	IL 6 - krv	TNF $\alpha$ – slina	TNF $\alpha$ – krv	Pušenje
IL 6 – slina	Pearson r	-	0,363**	0,132	0,187*	-0,043
	Sig.		0,000	0,145	0,038	0,633
IL 6 – krv	Pearson r	0,363**	-	0,171	0,432**	-0,026
	Sig.	0,000		0,058	0,000	0,770
TNF $\alpha$ – slina	Pearson r	0,132	0,171	-	0,161	-0,082
	Sig.	0,145	0,058		0,074	0,364
TNF $\alpha$ – krv	Pearson r	0,187*	0,432**	0,161	-	-0,134
	Sig.	0,038	0,000	0,074		0,138
Pušenje	Pearson r	-0,043	-0,026	-0,082	-0,134	-
	Sig.	0,633	0,770	0,364	0,138	

\*\* . Korelacija je značajna na razini 0.01; sig.- značajnost

## 5. RASPRAVA

Razina IL-6 i TNF- $\alpha$  povišena je u krvi bolesnika u raznim bolestima kao što su aktivna MS i stanja autoimunosti poput Hashimotova tireoiditisa. Bolesnici u inaktivnoj fazi multiple skleroze najčešće imaju vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u referentnom intervalu što se pokazalo i u ovom radu: najčešća vrijednost IL-6 u slini je 0,35, najčešća vrijednost IL-6 u krvi je 1,5, što je za oba parametra uredna vrijednost. Najčešća vrijednost TNF- $\alpha$  u krvi je 4,0, a TNF- $\alpha$  u slini je 25,3. Određivanje vrijednosti TSH u rutinskoj je proceduri u neurološkoj obradi, međutim određivanje protutijela na štitnjaču radi se izričito kada TSH izlazi iz referentnog intervala. U ovom doktoratu željelo se utvrditi postoji li razlika u razini IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini u bolesnika s inaktivnom multiplom sklerozom i zdravom štitnjačom u usporedbi s bolesnicima u inaktivnoj fazi multiple skleroze i Hashimotovim tireoiditisom. U slučaju da postoji razlika u razini IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini u ciljanim skupinama, a isključena je svaka mogućnost utjecaja aktivnosti multiple skleroze, u obradi bolesnika s MS-om potrebno je tragati za drugim autoimunim bolestima, u ovom slučaju HT-om. U ovoj studiji je uključeno 130 bolesnika s inaktivnom multiplom sklerozom, 80,2% žena i 19,8% muškaraca, što je nešto veći omjer u korist žena u odnosu na pojedina istraživanja (2:1) (216).

Srednja dob pri dijagnozi u našoj studiji je za muškarce 33 godine, a za žene 32 godine, što prati podatke iz literature (216). Učinjeni su testovi normaliteta s obzirom na činjenicu da se ovdje radi o varijabli čija je distribucija statistički značajno odstupala od normale.

Udio bolesnika sa zdravom štitnjačom je 74,6%, a bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom je 25,4%, dok je u općoj populaciji udio HT-a kod žena 10%, a kod muškaraca 1%. Statistička značajnost razlike u zastupljenosti Hashimotovog tireoiditisa među muškim i ženskim ispitanicima testirana je  $\chi^2$  testom, koji je pokazao kako nema statistički značajne razlike ( $\chi^2 = 0,474$ ;  $df = 1$ ;  $p > 0,05$ ) u pojavnosti HT-a među spolovima u zadanoj skupini. Dakle, kod postojanja dviju autoimunskih bolesti u ovom radu nema razlike u spolovima.

Udio pušača u uzorku je 35,4%, a pušački status nema učinka na razinu IL-6 i TNF- $\alpha$  ni u krvi ni u slini. U nekim istraživanjima pušenje povećava rizik za nastanak MS-a, a istodobno je i faktor rizika za bržu progresiju bolesti (217). Također, povećava rizik od nastanka pojedinih karcinoma usne šupljine, koji tek kad nastanu, mijenjaju razinu IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini (218). Pušenje ne mijenja razinu IL-6 i TNF- $\alpha$  ni u krvi ni u slini u bolesnika s MS-om, a bez oralne patologije ili drugih bolesti, koje su isključene anamnestički.

Indeks tjelesne mase u žena je  $22,869 \pm 2,9341$ , dok je u muškaraca  $23,648 \pm 2,6546$ . Učinjeni



su testovi normaliteta uz Lillieforsovu korekciju - distribucija BMI-ja u ispitivanoj skupini značajno odstupa od normaliteta. Statistički nema značajne razlike u indeksu tjelesne mase po spolu. U našem su istraživanju bolesnici u oba spola imali normalan BMI. U pojedinim istraživanjima povećana tjelesna masa u adolescenciji i mlađoj odrasloj dobi povećava rizik za nastanak MS-a (219). Naši ispitanici imaju normalan BMI.

U analizu razine IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini se uključilo 124 ispitanika jer su njihove vrijednosti u šest bolesnika, i u osam varijabli bile deset puta veće od prve slijedeće vrijednosti što bi imalo značajan učinak na rezultate.

Dobivena je statistički značajna korelacija između mjera IL-6 iz sline te IL-6 iz krvi ( $r = 0,368$ ;  $p < 0,01$ ) te TNF- $\alpha$  iz krvi ( $r = 0,186$ ;  $p < 0,05$ ), kao i između IL-6 iz krvi te TNF- $\alpha$  iz krvi ( $r = 0,429$ ;  $p < 0,01$ ). Ostale varijable nisu statistički značajno korelirale. Razina IL-6 u krvi i slini u našem istraživanju korelira, a podaci su u literaturi nekonzistentni. Jasna korelacija između serumske i salivarne koncentracija IL-6 opisana je u članku La Fratta i suradnika, dok u više drugih, nema jasne korelacije (220 - 222). S druge pak strane, pojedine studije pokazuju jasnu korelaciju između razine IL-6 u krvi i slini odrađene metodom EIA, međutim niti jedna studija nema korelaciju između serumske i salivarne razine TNF- $\alpha$ , što je pokazalo i ovo istraživanje (223 - 225). Metodologija određivanja IL-6 u slini korištena u ovom radu uvjetovana je naputcima proizvođača, IL-6 u krvi i TNF- $\alpha$  u krvi svakodnevnom laboratorijskom praksom, dok je za određivanje razine TNF- $\alpha$  u slini konsenzusom istraživača dogovorena metoda za potrebe ovog rada.

U pojedinim istraživanjima serumski IL-6 nije se mijenjao ovisno o stanju usne šupljine (uredna, oralni lichen planus i karcinom), dok je razina IL-6 u slini rasla kako je napredovala lokalna patologija usne šupljine (226).

Uzrok koreliranju naših rezultata može se objasniti dobrom pripremom i trijažom bolesnika, odnosno isključenja lokalnog uzroka povišene razine IL-6 u slini (bolesti usne šupljine).

Također korelira razina IL-6 u slini i TNF u krvi, što bi se moglo objasniti odabranom ciljanom skupinom bolesnika – inaktivnost multiple skleroze s urednom usnom šupljinom.

Razina TNF-a u krvi i slini u našem radu ne korelira što se pokazalo i u više radova (101). Postoje indicije da bi bilo potrebno tražiti drugu metodu određivanja TNF-a u slini.

T-testom usporedili smo razinu IL-6 u krvi i slini u bolesnika sa zdravom štitnjačom, odnosno u bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom. Ne postoji statistički značajna razlika između dviju skupina u mjerenim varijablama.

Također su se, istim testom, uspoređivale razine TNF- $\alpha$  u krvi i slini u skupini bolesnika sa zdravom štitnjačom i u bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom. Isto tako, ne postoji statistički

značajna razlika između dviju skupina u mjerenim varijablama. Budući da smo Kolmogorov-Smirnovljevim testom utvrdili da vrijednosti svih naših rezultata odstupaju od normalne distribucije, rezultate dobivene t-testom, provjerili smo neparametrijskim testom – Mann-Whitneyevim testom, koji se u potpunosti slaže s t-testom, čime potvrđuje da ni u jednoj mjerenoj vrijednosti nema statistički značajne razlike u rezultatima u skupini bolesnika sa zdravom štitnjačom, odnosno bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom.

Slijedeće što smo testirali je razina TSH u usporedbi sa statusom štitnjače. Prilikom dolaska na pregled niti jedan bolesnik nije bio na terapiji za bolesti štitnjače niti je znao za bolest štitnjače. Kolmogorov-Smirnovljevim testom pokazali smo da vrijednosti TSH odstupaju od normalne distribucije. Usporedili smo razinu TSH u bolesnika s povišenim protutijelima s bolesnicima koji su imali protutijela u referentnom intervalu. Srednja vrijednost TSH svih bolesnika je 1,61 mU/L, minimalna vrijednost je 0,014 mU/L, a maksimalna 21,82 mU/L.

U skupini bolesnika sa zdravom štitnjačom srednja vrijednost TSH je bila 1,29 mU/L, a u skupini bolesnika s povišenim protutijelima je 2,60 mU/L. Primjenom t-testa zaključili smo da se dvije skupine statistički značajno razlikuju po razini TSH. Skupina bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom u prosjeku ima za 1,3mU/L veću vrijednost TSH u odnosu na bolesnike sa zdravom štitnjačom. S obzirom na to da je vrijednost TSH jednog bolesnika bila značajno veća od ostalih (21,82mU/L), napravili smo izračun i bez njega, ali se i nadalje pokazala statistički bitna razlika u dvjema skupinama. Isto smo potvrdili i Mann - Whitneyevim testom. Iako je prosječna vrijednost i jedne i druge skupine bila u referentnom intervalu, dobivena minimalna vrijednost, odnosno postojanje niske razine TSH, upućuje na potrebu traganja uzroka hipertireoze u bolesnika s takvim nalazom. S druge pak strane, postojanje izrazito povišenog TSH u pojedinih bolesnika, također zahtjeva obradu i adekvatno uvođenje terapije L-tiroksinom.

Napravljene su korelacije TSH s razinom IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini, međutim dobivene vrijednosti niti u jednom segment statistički značajno ne koreliraju (227). U literaturi su nađene poveznice između povišene razine TSH i razine IL-6 u krvi (228). Također, pojedini autori navode da razina TSH negativno korelira s razinom IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi.

Vrijednost CRP-a po Kolmogorov-Smirnovljevom testu ne prati normalnu distribuciju. Srednja vrijednost CRP-a kod bolesnika sa zdravom štitnjačom je 1,595. Testirali smo razinu CRP-a ovisno o statusu štitnjače i dobili kako nema statistički značajne razlike u razini CRP-a kod bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom u odnosu na one sa zdravom štitnjačom, a isto se pokazalo i u literaturi gdje se uspoređivala razina CRP-a u skupini zdravih, eutireoidnih kontrola, bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom i bolesnika sa subakutnim tireoiditisom

(229).

Dobiveno je da CRP statistički značajno korelira s IL-6 iz sline ( $r = 0,297$ ;  $p < 0,01$ ) te s IL-6 iz krvi ( $r = 0,385$ ;  $p < 0,01$ ). Rezultati našeg istraživanja podudaraju se s radovima iz literature (230).

Korelacija je pozitivna, što znači da oni bolesnici koji su imali viši CRP su u prosjeku imali i viši izmjereni IL-6. Obzirom da se CRP kao laboratorijski parametar koristi kao indikator upale, a da razina IL-6 u krvi i slini može biti pokazatelj upale, bilo lokalne ili sistemske, korelacije su očekivane. Korelacije s TNF- $\alpha$  nisu statistički značajne.

Testirana je povezanost EDSS-a i razine IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini i krvi. Statistička značajnost razlike između dviju skupina testirana je t-testom za nezavisne uzorke, koji je pokazao da se ove skupine ne razlikuju statistički značajno u prosječnom EDSS-u ( $t = -0,710$ ;  $p = 0,354$ ). S obzirom na činjenicu da se i ovdje radi o varijabli čija je distribucija statistički značajno odstupala od normalne, testiranje smo dodatno provjerili neparametrijskim Mann-Whitneyevim testom kao zamjenom. Rezultati Mann-Whitneyeva testa su također potvrdili nepostojanje statistički značajne razlike među testiranim skupinama.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju našeg istraživanja, a u skladu sa zadanim ciljevima zaključujemo:

1. Bolesnici u inaktivnoj fazi multiple skleroze imaju vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini u referentnom intervalu.
2. Nema statistički značajne razlike u zastupljenosti Hashimotova tireoiditisa između muških i ženskih ispitanika koji imaju inaktivnu multiplu sklerozu.
3. Ne postoji statistički značajna razlika između razine IL-6 u krvi u bolesnika sa zdravom štitnjačom u usporedbi s bolesnicima s Hashimotovim tireoiditisom.
4. Ne postoji statistički značajna razlika između razine IL-6 u slini u bolesnika sa zdravom štitnjačom u usporedbi s bolesnicima s Hashimotovim tireoiditisom.
5. Ne postoji statistički značajna razlika između razine TNF- $\alpha$  u krvi u skupini bolesnika sa zdravom štitnjačom u usporedbi s bolesnicima s Hashimotovim tireoiditisom.
6. Ne postoji statistički značajna razlika između razine TNF- $\alpha$  u slini u skupini bolesnika sa zdravom štitnjačom u usporedbi s bolesnicima s Hashimotovim tireoiditisom.
7. Postoji statistički značajna korelacija između razine IL-6 iz sline i IL-6 iz krvi.
8. Postoji statistički značajna korelacija između razine IL-6 iz sline s TNF- $\alpha$  iz krvi.
9. Postoji statistički značajna korelacija između razine IL-6 iz krvi s TNF- $\alpha$  iz krvi.
10. BMI, EDSS i pušenje ne koreliraju s razinom IL-6 i TNF- $\alpha$  u krvi i slini.
11. Razina CRP-a statistički značajno korelira s razinom IL-6 u slini i krvi.
12. Postoji statistički značajna razlika u razini TSH u skupini eutireoidnih bolesnika s povišenom razinom protutijela u odnosu na bolesnike s razinom protutijela u referentnom intervalu.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Lackie J. *A Dictionary of Biomedicine*. New York (NY): Oxford University Press; 2010.
2. Spangler JB, Moraga I, Mendoza JL, Garcia KC. Insights into cytokine-receptor interactions from cytokine engineering. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:139-67. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120211. Epub 2014 Dec 10. PMID: 25493332; PMCID: PMC4445396.
3. Gandhi NA, Bennett BL, Graham NM, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2016 Jan; **15**(1): 35–50. doi: 10.1038/nrd4624. Epub 2015 Oct 16. PMID: 26471366.
4. Rose-John S, Scheller J, Schaper F. “Family reunion”—A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015 Oct; **26**(5):471–4. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.07.011. Epub 2015 Jul 6. PMID: 26235233.
5. Tanaka T, Narazaki M, Ogata A, Kishimoto T. A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy. *Semin Immunol*. 2014 Feb; **26**(1):88–96. doi: 10.1016/j.smim.2014.01.009. Epub 2014 Mar 1. PMID: 24594001.
6. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*. 1986 Nov 6-12; **324**(6092):73-6. doi: 10.1038/324073a0. PMID: 3491322
7. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol*. 2005; **23**:1-21. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115806. PMID: 15771564.
8. Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Richardson DR, Morris DL. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *J Clin Pathol*. 2014 Nov; **67**(11):932-7. doi: 10.1136/jclinpath-2014-202493. Epub 2014 Jul 16. PMID: 25031389.
9. Ellingsgaard H, Ehses JA, Hammar EB, Van Lommel L, Quintens R, Martens G, et al. Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 2; **105**(35):13163-8. doi: 10.1073/pnas.0801059105. Epub 2008 Aug 21. PMID: 18719127; PMCID: PMC2529061.
10. Mayer A, Debusson D, Denanglaire S, Eddahri F, Fievez L, Hercor M, et al. Antigen presenting cell-derived IL-6 restricts Th2-cell differentiation. *Eur J Immunol*. 2014 Nov; **44**(11):3252-62. doi: 10.1002/eji.201444646. Epub 2014 Sep 5. PMID: 25092208.
11. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends Immunol*. 2012 Oct; **33**(10):505-12. doi: 10.1016/j.it.2012.05.004. Epub

2012 Jun 7. PMID: 22682163.

12. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol*. 2014 Sep;14(9):585-600. doi: 10.1038/nri3707. PMID: 25145755; PMCID: PMC4281037.

13. Bernad A, Kopf M, Kulbacki R, Weich N, Koehler G, Gutierrez-Ramos JC. Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity*. 1994 Dec;1(9):725-31. doi: 10.1016/s1074-7613(94)80014-6. PMID: 7895162.

14. Gilbert LA, Hemann MT. Context-specific roles for paracrine IL-6 in lymphomagenesis. *Genes Dev*. 2012 Aug 1;26(15):1758-68. doi: 10.1101/gad.197590.112. PMID: 22855834; PMCID: PMC3418592.

15. Wagner JA. Is IL-6 both a cytokine and a neurotrophic factor? *J Exp Med*. 1996 Jun 1;183(6):2417-9. doi: 10.1084/jem.183.6.2417. PMID: 8676061; PMCID: PMC2192601.

16. Klein MA, Möller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich G. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia*. 1997 Mar;19(3):227-33. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199703)19:3<227::aid-glia5>3.0.co;2-w. PMID: 9063729.

17. Morrow JD, Opp MR. Sleep-wake behavior and responses of interleukin-6-deficient mice to sleep deprivation. *Brain Behav Immun*. 2005 Jan;19(1):28-39. doi: 10.1016/j.bbi.2004.02.003. PMID: 15581736.

18. Penkowa M, Moos T, Carrasco J, Hadberg H, Molinero A, Bluethmann H, et al. Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia*. 1999 Feb 15;25(4):343-57. PMID: 10028917.

19. Bauer J, Strauss S, Schreiter-Gasser U, Ganter U, Schlegel P, Witt I, et al. Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett*. 1991 Jul 8;285(1):111-4. doi: 10.1016/0014-5793(91)80737-n. PMID: 1712317.

20. Hüll M, Berger M, Volk B, Bauer J. Occurrence of interleukin-6 in cortical plaques of Alzheimer's disease patients may precede transformation of diffuse into neuritic plaques. *Ann N Y Acad Sci*. 1996 Jan 17;777:205-12. doi: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb34420.x. PMID: 8624085.

21. Jourdan M, Bataille R, Seguin J, Zhang XG, Chaptal PA, Klein B. Constitutive production of interleukin-6 and immunologic features in cardiac myxomas. *Arthritis Rheum*. 1990 Mar;33(3):398-402. doi: 10.1002/art.1780330313. PMID: 1690543.

22. Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, et al. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies

- and a systematic review. *PLoS Med.* 2008 Apr 8;5(4):e78. doi: 10.1371/journal.pmed.0050078. PMID: 18399716; PMCID: PMC2288623.
23. Fan HC, Fernández-Hernando C, Lai JH. Protein kinase C isoforms in atherosclerosis: pro- or anti-inflammatory? *Biochem Pharmacol.* 2014 Mar 15;88(2):139-49. doi: 10.1016/j.bcp.2014.01.006. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24440741.
24. Fontes JA, Rose NR, Čiháková D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine.* 2015 Jul;74(1):62-8. doi: 10.1016/j.cyto.2014.12.024. Epub 2015 Jan 31. PMID: 25649043; PMCID: PMC4677779.
25. Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1281-90. doi: 10.7150/ijbs.4874. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23136556; PMCID: PMC3491451.
26. Varelias A, Gartlan KH, Kreijveld E, Olver SD, Lor M, Kuns RD, et al. Lung parenchyma-derived IL-6 promotes IL-17A-dependent acute lung injury after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2015 Apr 9;125(15):2435-44. doi: 10.1182/blood-2014-07-590232. Epub 2015 Feb 11. PMID: 25673640; PMCID: PMC5457133.
27. Li Y, de Haar C, Chen M, Deuring J, Gerrits MM, Smits R, et al. Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut.* 2010 Feb;59(2):227-35. doi: 10.1136/gut.2009.184176. Epub 2009 Nov 18. PMID: 19926618.
28. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med.* 2000 May;6(5):583-8. doi: 10.1038/75068. Erratum in: *Nat Med.* 2010 Nov;16(11):1341. PMID: 10802717.
29. Kuhn KA, Manieri NA, Liu TC, Stappenbeck TS. IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury. *PLoS One.* 2014 Dec 5;9(12):e114195. doi: 10.1371/journal.pone.0114195. PMID: 25478789; PMCID: PMC4257684.
30. Cash H, Relle M, Menke J, Brochhausen C, Jones SA, Topley N, et al. Interleukin 6 (IL-6) deficiency delays lupus nephritis in MRL-Fas<sup>lpr</sup> mice: the IL-6 pathway as a new therapeutic target in treatment of autoimmune kidney disease in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2010 Jan;37(1):60-70. doi: 10.3899/jrheum.090194. Epub 2009 Dec 1. PMID: 19955044.
31. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated

- cancer. *Cancer Cell*. 2009 Feb 3;15(2):103-13. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.001. Erratum in: *Cancer Cell*. 2009 Mar 3;15(3):241. PMID: 19185845; PMCID: PMC2667107.
32. Kroon P, Berry PA, Stower MJ, Rodrigues G, Mann VM, Simms M, et al. JAK-STAT blockade inhibits tumor initiation and clonogenic recovery of prostate cancer stem-like cells. *Cancer Res*. 2013 Aug 15;73(16):5288-98. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0874. Epub 2013 Jul 3. PMID: 23824741.
33. Malik R, Lelkes PI, Cukierman E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol*. 2015 Apr;33(4):230-6. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.01.004. Epub 2015 Feb 20. PMID: 25708906; PMCID: PMC4380578.
34. Domingo-Domenech J, Oliva C, Rovira A, Codony-Servat J, Bosch M, Filella X, et al. Interleukin 6, a nuclear factor-kappaB target, predicts resistance to docetaxel in hormone-independent prostate cancer and nuclear factor-kappaB inhibition by PS-1145 enhances docetaxel antitumor activity. *Clin Cancer Res*. 2006 Sep 15;12(18):5578-86. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2767. PMID: 17000695.
35. Yoshizaki K, Matsuda T, Nishimoto N, Kuritani T, Taeho L, Aozasa K, et al. Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood*. 1989 Sep;74(4):1360-7. PMID: 2788466.
36. Nishimoto N, Sasai M, Shima Y, Nakagawa M, Matsumoto T, Shirai T, et al. Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):56-61. PMID: 10607684.
37. Ho LJ, Lai JH. Chinese herbs as immunomodulators and potential disease-modifying antirheumatic drugs in autoimmune disorders. *Curr Drug Metab*. 2004 Apr;5(2):181-92. doi: 10.2174/1389200043489081. PMID: 15078195.
38. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):918-34. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.016. PMID: 20303880; PMCID: PMC2873093.
39. Gijbels K, Van Damme J, Proost P, Put W, Carton H, Billiau A. Interleukin 6 production in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 1990 Jan;20(1):233-5. doi: 10.1002/eji.1830200134. PMID: 2307176.
40. Maimone D, Gregory S, Arnason BG, Reder AT. Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1991 Apr;32(1):67-74. doi: 10.1016/0165-5728(91)90073-g. PMID: 2002092.
41. Serada S, Fujimoto M, Mihara M, Koike N, Ohsugi Y, Nomura S, et al. IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental



- autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 1;105(26):9041-6. doi: 10.1073/pnas.0802218105. Epub 2008 Jun 24. PMID: 18577591; PMCID: PMC2449361.
42. Hirohata S, Miyamoto T. Elevated levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid from patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system involvement. *Arthritis Rheum*. 1990 May;33(5):644-9. doi: 10.1002/art.1780330506. PMID: 2346520.
43. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J Immunol*. 1991 Jul 1;147(1):117-23. PMID: 2051017.
44. Yoshizaki K, Nishimoto N, Mihara M, Kishimoto T. Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized anti-IL-6 receptor antibody. *Springer Semin Immunopathol*. 1998;20(1-2):247-59. doi: 10.1007/BF00832010. PMID: 9836380.
45. Mozaffari HR, Sharifi R, Sadeghi M. Interleukin-6 levels in the serum and saliva of patients with oral lichen planus compared with healthy controls: a meta-analysis study. *Cent Eur J Immunol*. 2018;43(1):103-108. doi: 10.5114/ceji.2018.74880. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29731693; PMCID: PMC5927179.
46. Pîrsean C, Neagu C, Stefan-van Staden RI, Dinu-Pirvu CE, Armean P, Udeanu DI. The salivary levels of leptin and interleukin-6 as potential inflammatory markers in children obesity. *PLoS One*. 2019 Jan 3;14(1):e0210288. doi: 10.1371/journal.pone.0210288. PMID: 30605486; PMCID: PMC6317816.
47. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett*. 1991 Jul 22;285(2):199-212. doi: 10.1016/0014-5793(91)80803-b. PMID: 1649771.
48. Krueger JM, Fang J, Taishi P, Chen Z, Kushikata T, Gardi J. Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 Sep 29;856:148-59. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08323.x. PMID: 9917875.
49. Wride MA, Sanders EJ. Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anat Embryol (Berl)*. 1995 Jan;191(1):1-10. doi: 10.1007/BF00215292. PMID: 7717528.
50. Rizzo FR, Musella A, De Vito F, Fresegna D, Bullita S, Vanni V, Guadalupi L, et al. Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1 $\beta$  Modulate Synaptic Plasticity during Neuroinflammation. *Neural Plast*. 2018 May 14;2018:8430123. doi: 10.1155/2018/8430123. PMID: 29861718; PMCID: PMC5976900.
51. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996 Jun 27;334(26):1717-25. doi: 10.1056/NEJM199606273342607. PMID: 8637518.

52. Beutler B, Bazzoni F. TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread? *Blood Cells Mol Dis.* 1998 Jun;24(2):216-30. doi: 10.1006/bcmd.1998.0187. PMID: 9645922.
53. Gruss HJ, Dower SK. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood.* 1995 Jun 15;85(12):3378-404. PMID: 7780126
54. Beyaert R, Fiers W. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS Lett.* 1994 Feb 28;340(1-2):9-16. doi: 10.1016/0014-5793(94)80163-0. PMID: 8119415.
55. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10(1):45-65. doi: 10.1038/sj.cdd.4401189. PMID: 12655295.
56. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience.* 2015 Aug 27;302:2-22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.038. Epub 2015 Jun 24. PMID: 26117714.
57. Zhang L, Yao CH. The Physiological Role of Tumor Necrosis Factor in Human Immunity and Its Potential Implications in Spinal Manipulative Therapy: A Narrative Literature Review. *J Chiropr Med.* 2016 Sep;15(3):190-6. doi: 10.1016/j.jcm.2016.04.016. Epub 2016 May 26. PMID: 27660595; PMCID: PMC5021902.
58. Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest.* 1991 Mar;87(3):949-54. doi: 10.1172/JCI115102. PMID: 1999503; PMCID: PMC329886.
59. Vladić A, Horvat G, Vukadin S, Sucić Z, Simaga S. Cerebrospinal fluid and serum protein levels of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) interleukin-6 (IL-6) and soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R gp80) in multiple sclerosis patients. *Cytokine.* 2002 Oct 21;20(2):86-9. doi: 10.1006/cyto.2002.1984. PMID: 12445803.
60. Domingues RB, Fernandes GBP, Leite FBVM, Tilbery CP, Thomaz RB, Silva GS, et al. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis: far beyond the bands. *Einstein (Sao Paulo).* 2017 Jan-Mar;15(1):100-104. doi: 10.1590/S1679-45082017RW3706. PMID: 28444098; PMCID: PMC5433316.
61. Dostert C, Grusdat M, Letellier E, Brenner D. The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiol Rev.* 2019 Jan 1;99(1):115-160. doi: 10.1152/physrev.00045.2017. PMID: 30354964.
62. Smookler DS, Mohammed FF, Kassiri Z, Duncan GS, Mak TW, Khokha R. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation. *J Immunol.* 2006 Jan 15;176(2):721-5. doi: 10.4049/jimmunol.176.2.721. PMID: 16393953.
63. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function

- relationship(s). *Microsc Res Tech.* 2000 Aug 1;50(3):184-95. doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H. PMID: 10891884.
64. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10(1):45-65. doi: 10.1038/sj.cdd.4401189. PMID: 12655295.
65. Dopp JM, Sarafian TA, Spinella FM, Kahn MA, Shau H, de Vellis J. Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NFkappaB translocation and oxyradical neutralization in glial cells. *Neurochem Res.* 2002 Nov;27(11):1535-42. doi: 10.1023/a:1021608724117. PMID: 12512958.
66. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014 Aug;25(4):453-72. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.016. Epub 2014 Aug 1. PMID: 25169849.
67. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.* 2000 Jan 1;59(1):13-23. doi: 10.1016/s0006-2952(99)00296-8. PMID: 10605930.
68. Kohase M, Henriksen-DeStefano D, May LT, Vilcek J, Sehgal PB. Induction of beta 2-interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell.* 1986 Jun 6;45(5):659-66. doi: 10.1016/0092-8674(86)90780-4. PMID: 2871942.
69. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol.* 2014 Jun;26(3):253-66. doi: 10.1016/j.smim.2014.05.004. Epub 2014 Jun 21. PMID: 24958609; PMCID: PMC4156877.
70. Barnes PJ. Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Jun;29(6):867-70. doi: 10.1016/s1357-2725(96)00159-8. PMID: 9304801.
71. Chen X, Bäuml M, Männel DN, Howard OM, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2007 Jul 1;179(1):154-61. doi: 10.4049/jimmunol.179.1.154. PMID: 17579033.
72. Hamano R, Huang J, Yoshimura T, Oppenheim JJ, Chen X. TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40. *Eur J Immunol.* 2011 Jul;41(7):2010-20. doi: 10.1002/eji.201041205. PMID: 21491419; PMCID: PMC3783213.
73. Chen X, Wu X, Zhou Q, Howard OM, Netea MG, Oppenheim JJ. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol.* 2013 Feb 1;190(3):1076-84. doi: 10.4049/jimmunol.1202659. Epub

- 2012 Dec 31. PMID: 23277487; PMCID: PMC3552130.
74. Boulanger LM. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron*. 2009 Oct 15;64(1):93-109. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.001. PMID: 19840552.
75. Banks WA. The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2009 May;29(2):223-8. doi: 10.1016/j.iac.2009.02.001. PMID: 19389578.
76. Dopp JM, Mackenzie-Graham A, Otero GC, Merrill JE. Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J Neuroimmunol*. 1997 May;75(1-2):104-12. doi: 10.1016/s0165-5728(97)00009-x. PMID: 9143243.
77. Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:861231. doi: 10.1155/2014/861231. Epub 2014 May 21. PMID: 24966471; PMCID: PMC4055424.
78. Pfeffer K, Matsuyama T, Kündig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*. 1993 May 7;73(3):457-67. doi: 10.1016/0092-8674(93)90134-c. PMID: 8387893.
79. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995 Jun;2(6):561-72. doi: 10.1016/1074-7613(95)90001-2. PMID: 7540941.
80. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. 2009 Aug;32(8):421-31. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.001. Epub 2009 Jul 15. PMID: 19615761.
81. Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, et al. Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science*. 2002 Mar 22;295(5563):2282-5. doi: 10.1126/science.1067859. PMID: 11910117.
82. Stellwagen D, Malenka RC. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature*. 2006 Apr 20;440(7087):1054-9. doi: 10.1038/nature04671. Epub 2006 Mar 19. PMID: 16547515.
83. Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, et al. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1991 Aug 19;129(2):318-20. doi: 10.1016/0304-3940(91)90490-k. PMID: 1745413.
84. Alvarez A, Cacabelos R, Sanpedro C, García-Fantini M, Aleixandre M. Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2007 Apr;28(4):533-6. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.012. Epub 2006 Mar 29.

PMID: 16569464.

85. Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1994 May 19;172(1-2):151-4. doi: 10.1016/0304-3940(94)90684-x. PMID: 8084523.

86. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2000;(60):277-90. doi: 10.1007/978-3-7091-6301-6\_19. PMID: 11205147.

87. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med*. 1989 Aug 1;170(2):607-12. doi: 10.1084/jem.170.2.607. PMID: 2754393; PMCID: PMC2189402.

88. Raine CS, Bonetti B, Cannella B. Multiple sclerosis: expression of molecules of the tumor necrosis factor ligand and receptor families in relationship to the demyelinated plaque. *Rev Neurol (Paris)*. 1998 Sep;154(8-9):577-85. PMID: 9809372.

89. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev*. 1999 Jun;169:175-94. doi: 10.1111/j.1600-065x.1999.tb01315.x. PMID: 10450517.

90. da Fonseca AC, Matias D, Garcia C, Amaral R, Geraldo LH, Freitas C, et al. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci*. 2014 Nov 3;8:362. doi: 10.3389/fncel.2014.00362. PMID: 25404894; PMCID: PMC4217497.

91. Rodrigues SF, Granger DN. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers*. 2015 Apr 3;3(1-2):e978720. doi: 10.4161/21688370.2014.978720. PMID: 25838983; PMCID: PMC4372023.

92. Pan W, Kastin AJ. Upregulation of the transport system for TNFalpha at the blood-brain barrier. *Arch Physiol Biochem*. 2001 Oct;109(4):350-3. doi: 10.1076/apab.109.4.350.4238. PMID: 11935370.

93. Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G, Lassmann H, Kollias G, Probert L. Transgenic models of TNF induced demyelination. *Adv Exp Med Biol*. 1999;468:245-59. doi: 10.1007/978-1-4615-4685-6\_20. PMID: 10635034.

94. Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G, Pasparakis M, Lassmann H, Kollias G, et al. Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendroglipathy. *Am J Pathol*. 1998 Sep;153(3):801-13. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65622-2. PMID: 9736029; PMCID: PMC1853008.

95. Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 21;92(24):11294-8. doi: 10.1073/pnas.92.24.11294. PMID: 7479982; PMCID: PMC40618.
96. Cunha MI, Su M, Cantuti-Castelvetri L, Müller SA, Schifferer M, Djannatian M, et al. Pro-inflammatory activation following demyelination is required for myelin clearance and oligodendrogenesis. *J Exp Med*. 2020 May 4;217(5):e20191390. doi: 10.1084/jem.20191390. PMID: 32078678; PMCID: PMC7201919.
97. Steinman L, Zamvil SS. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2006 Jul;60(1):12-21. doi: 10.1002/ana.20913. PMID: 16802293.
98. Valentin-Torres A, Savarin C, Hinton DR, Phares TW, Bergmann CC, Stohlman SA. Sustained TNF production by central nervous system infiltrating macrophages promotes progressive autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. 2016 Feb 22;13:46. doi: 10.1186/s12974-016-0513-y. PMID: 26906225; PMCID: PMC4763407.
99. Nam Y, Kim YY, Chang JY, Kho HS. Salivary biomarkers of inflammation and oxidative stress in healthy adults. *Arch Oral Biol*. 2019 Jan;97:215-222. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.10.026. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30399508.
100. Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent*. 2009 Aug;22(4):241-8. PMID: 19824562; PMCID: PMC2860957.
101. Hanneman SK, McCue D, Blog GL. Validation of Salivary Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-Alpha of Healthy Adult Volunteers by Enzyme Immunoassay. *Nurs Res*. 2016 Nov/Dec;65(6):475-480. doi: 10.1097/NNR.000000000000186. PMID: 27801718.
102. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol*. 1972 Jul;109(1):129-35. PMID: 4113792.
103. Schmidt SD, Mazzella MJ, Nixon RA, Mathews PM. A $\beta$  measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Methods Mol Biol*. 2012;849:507-27. doi: 10.1007/978-1-61779-551-0\_34. PMID: 22528112.
104. Kragstrup TW, Vorup-Jensen T, Deleuran B, Hvid M. A simple set of validation steps identifies and removes false results in a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay caused by anti-animal IgG antibodies in plasma from arthritis patients. *Springerplus*. 2013 Jun 15;2(1):263. doi: 10.1186/2193-1801-2-263. PMID: 23875127; PMCID: PMC3695686.
105. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what

- does it change in autoantibody detection? *Auto Immun Highlights*. 2017 Dec;8(1):9. doi: 10.1007/s13317-017-0097-2. Epub 2017 Jun 24. PMID: 28647912; PMCID: PMC5483212.
106. Fung AWS, Knauer MJ, Blasutig IM, Colantonio DA, Kulasingam V. Evaluation of electrochemiluminescence immunoassays for immunosuppressive drugs on the Roche cobas e411 analyzer. *F1000Res*. 2017 Oct 13;6:1832. doi: 10.12688/f1000research.12775.2. PMID: 29225777; PMCID: PMC5710386.
107. Nielsen NM, Westergaard T, Rostgaard K, Frisch M, Hjalgrim H, Wohlfahrt J, et al. Familial risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study. *Am J Epidemiol*. 2005 Oct 15;162(8):774-8. doi: 10.1093/aje/kwi280. Epub 2005 Aug 24. PMID: 16120694.
108. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*. 2020 Dec;26(14):1816-1821. doi: 10.1177/1352458520970841. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33174475; PMCID: PMC7720355.
109. Ebers GC, Koopman WJ, Hader W, Sadovnick AD, Kremenchutzky M, Mandalfino P, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study: 8: familial multiple sclerosis. *Brain*. 2000 Mar;123 Pt 3:641-9. doi: 10.1093/brain/123.3.641. PMID: 10686184.
110. Kahana E. Epidemiologic studies of multiple sclerosis: a review. *Biomed Pharmacother*. 2000 Mar;54(2):100-2. doi: 10.1016/S0753-3322(00)88859-9. PMID: 10759294.
111. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol*. 1993 Mar;33(3):281-5. doi: 10.1002/ana.410330309. PMID: 8498811.
112. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*. 2007 Aug 30;357(9):851-62. doi: 10.1056/NEJMoa073493. Epub 2007 Jul 29. PMID: 17660530.
113. Cree BA. Multiple sclerosis genetics. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:193-209. doi: 10.1016/B978-0-444-52001-2.00009-1. PMID: 24507519.
114. Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ, Schaefer C, van Duijn CM, Noble JA, et al. Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet*. 2013 Nov;9(11):e1003926. doi: 10.1371/journal.pgen.1003926. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24278027; PMCID: PMC3836799.
115. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Genome-wide association study of severity in multiple sclerosis. *Genes Immun*. 2011 Dec;12(8):615-25. doi: 10.1038/gene.2011.34. Epub 2011 Jun 9. PMID: 21654844; PMCID: PMC3640650.

116. Dyment DA, Herrera BM, Cader MZ, Willer CJ, Lincoln MR, Sadovnick AD, et al. Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Hum Mol Genet.* 2005 Jul 15;14(14):2019-26. doi: 10.1093/hmg/ddi206. Epub 2005 Jun 1. PMID: 15930013
117. Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, et al. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet.* 1998 Aug;7(8):1229-34. doi: 10.1093/hmg/7.8.1229. PMID: 9668163.
118. Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, Barcellos LF, Walton A, Goris A, et al. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2007 Mar;61(3):228-36. doi: 10.1002/ana.21063. PMID: 17252545; PMCID: PMC2737610.
119. Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet.* 2008 Jul;9(7):516-26. doi: 10.1038/nrg2395. Epub 2008 Jun 10. PMID: 18542080.
120. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol.* 1995 Nov-Dec;47(4-5):425-48. PMID: 8966212.
121. Mirzaei F, Michels KB, Munger K, O'Reilly E, Chitnis T, Forman MR, et al. Gestational vitamin D and the risk of multiple sclerosis in offspring. *Ann Neurol.* 2011 Jul;70(1):30-40. doi: 10.1002/ana.22456. PMID: 21786297; PMCID: PMC3205990.
122. Munger KL, Åivo J, Hongell K, Soilu-Hänninen M, Surcel HM, Ascherio A. Vitamin D Status During Pregnancy and Risk of Multiple Sclerosis in Offspring of Women in the Finnish Maternity Cohort. *JAMA Neurol.* 2016 May 1;73(5):515-9. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.4800. PMID: 26953778; PMCID: PMC4861670.
123. Nielsen NM, Munger KL, Koch-Henriksen N, Hougaard DM, Magyari M, Jørgensen KT, et al. Neonatal vitamin D status and risk of multiple sclerosis: A population-based case-control study. *Neurology.* 2017 Jan 3;88(1):44-51. doi: 10.1212/WNL.0000000000003454. Epub 2016 Nov 30. PMID: 27903815; PMCID: PMC5200855.
124. Graves JS, Chitnis T, Weinstock-Guttman B, Rubin J, Zelikovitch AS, Nourbakhsh B, et al. Network of Pediatric Multiple Sclerosis Centers. Maternal and Perinatal Exposures Are Associated With Risk for Pediatric-Onset Multiple Sclerosis. *Pediatrics.* 2017 Apr;139(4):e20162838. doi: 10.1542/peds.2016-2838. PMID: 28562303; PMCID: PMC5369674.
125. Grytten N, Torkildsen Ø, Aarseth JH, Benjaminsen E, Celius EG, Dahl OP, et al. Month of birth as a latitude-dependent risk factor for multiple sclerosis in Norway. *Mult Scler.* 2013



- Jul;19(8):1028-34. doi: 10.1177/1352458512471094. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23257620.
126. Montgomery SM, Lambe M, Olsson T, Ekbom A. Parental age, family size, and risk of multiple sclerosis. *Epidemiology*. 2004 Nov;15(6):717-23. doi: 10.1097/01.ede.0000142138.46167.69. PMID: 15475721.
127. Nielsen NM, Bager P, Stenager E, Pedersen BV, Koch-Henriksen N, Hjalgrim H, et al. Cesarean section and offspring's risk of multiple sclerosis: a Danish nationwide cohort study. *Mult Scler*. 2013 Oct;19(11):1473-7. doi: 10.1177/1352458513480010. Epub 2013 Mar 6. PMID: 23466398.
128. Langer-Gould A, Smith JB, Hellwig K, Gonzales E, Haraszti S, Koebnick C, et al. Breastfeeding, ovulatory years, and risk of multiple sclerosis. *Neurology*. 2017 Aug 8;89(6):563-569. doi: 10.1212/WNL.0000000000004207. Epub 2017 Jul 12. PMID: 28701499; PMCID: PMC5562955.
129. Leibowitz U, Antonovsky A, Medalie JM, Smith HA, Halpern L, Alter M. Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1966 Feb;29(1):60-8. doi: 10.1136/jnnp.29.1.60. PMID: 5910580; PMCID: PMC495985.
130. Ascherio A, Munger KL. Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2010 Sep;5(3):271-7. doi: 10.1007/s11481-010-9201-3. Epub 2010 Apr 6. PMID: 20369303.
131. Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004 Jan 13;62(1):60-5. doi: 10.1212/01.wnl.0000101723.79681.38. PMID: 14718698.
132. Riise T, Nortvedt MW, Ascherio A. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology*. 2003 Oct 28;61(8):1122-4. doi: 10.1212/01.wnl.0000081305.66687.d2. PMID: 14581676.
133. Chen J, Chia N, Kalari KR, Yao JZ, Novotna M, Paz Soldan MM, et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci Rep*. 2016 Jun 27;6:28484. doi: 10.1038/srep28484. PMID: 27346372; PMCID: PMC4921909.
134. Mokry LE, Ross S, Timpson NJ, Sawcer S, Davey Smith G, Richards JB. Obesity and Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *PLoS Med*. 2016 Jun 28;13(6):e1002053. doi: 10.1371/journal.pmed.1002053. PMID: 27351487; PMCID: PMC4924848.
135. Wucherpfennig KW, Call MJ, Deng L, Mariuzza R. Structural alterations in peptide-MHC recognition by self-reactive T cell receptors. *Curr Opin Immunol*. 2009 Dec;21(6):590-5. doi:

- 10.1016/j.coi.2009.07.008. Epub 2009 Aug 19. PMID: 19699075; PMCID: PMC2787854.
136. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015 Sep 15;15(9):545-58. doi: 10.1038/nri3871. Epub 2015 Aug 7. PMID: 26250739.
137. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018 Feb;17(2):162-173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2. Epub 2017 Dec 21. PMID: 29275977.
138. Huss AM, Halbgebauer S, Öckl P, Trebst C, Spreer A, Borisow N, et al. Importance of cerebrospinal fluid analysis in the era of McDonald 2010 criteria: a German-Austrian retrospective multicenter study in patients with a clinically isolated syndrome. *J Neurol.* 2016 Dec;263(12):2499-2504. doi: 10.1007/s00415-016-8302-1. Epub 2016 Oct 11. PMID: 27730374; PMCID: PMC5110610.
139. Novotna M, Paz Soldán MM, Abou Zeid N, Kale N, Tutuncu M, Crusan DJ, et al. Poor early relapse recovery affects onset of progressive disease course in multiple sclerosis. *Neurology.* 2015 Aug 25;85(8):722-9. doi: 10.1212/WNL.0000000000001856. Epub 2015 Jul 24. Erratum in: *Neurology.* 2015 Oct 13;85(15):1355. PMID: 26208962; PMCID: PMC4553030.
140. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology.* 2014 Jul 15;83(3):278-86. doi: 10.1212/WNL.0000000000000560. Epub 2014 May 28. PMID: 24871874; PMCID: PMC4117366.
141. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, De Stefano N, Evangelou N, Kappos L, et al. MAGNIMS Study Group. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol.* 2016 Mar;15(3):292-303. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00393-2. Epub 2016 Jan 26. PMID: 26822746; PMCID: PMC4760851.
142. Keegan BM, Kaufmann TJ, Weinshenker BG, Kantarci OH, Schmalstieg WF, Paz Soldan MM, et al. Progressive solitary sclerosis: Gradual motor impairment from a single CNS demyelinating lesion. *Neurology.* 2016 Oct 18;87(16):1713-1719. doi: 10.1212/WNL.0000000000003235. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27638926; PMCID: PMC5085075.
143. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet.* 2017 Apr 1;389(10076):1336-1346. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30959-X. Epub 2016 Nov 24. PMID: 27889190.

144. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol.* 2005 May;4(5):281-8. doi: 10.1016/S1474-4422(05)70071-5. PMID: 15847841.
145. Tintoré M, Rovira A, Martínez MJ, Rio J, Díaz-Villoslada P, Brieva L, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2000 Apr;21(4):702-6. PMID: 10782781; PMCID: PMC7976636.
146. O'Riordan JI, Thompson AJ, Kingsley DP, MacManus DG, Kendall BE, Rudge P, et al. The prognostic value of brain MRI in clinically isolated syndromes of the CNS. A 10-year follow-up. *Brain.* 1998 Mar;121 ( Pt 3):495-503. doi: 10.1093/brain/121.3.495. PMID: 9549525.
147. Filippi M, Horsfield MA, Morrissey SP, MacManus DG, Rudge P, McDonald WI, et al. Quantitative brain MRI lesion load predicts the course of clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Neurology.* 1994 Apr;44(4):635-41. doi: 10.1212/wnl.44.4.635. PMID: 8164816.
148. Morrissey SP, Miller DH, Kendall BE, Kingsley DP, Kelly MA, Francis DA, et al. The significance of brain magnetic resonance imaging abnormalities at presentation with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. A 5-year follow-up study. *Brain.* 1993 Feb;116 ( Pt 1):135-46. doi: 10.1093/brain/116.1.135. PMID: 8453454.
149. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownschidle CM, Murray TJ, et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med.* 2000 Sep 28;343(13):898-904. doi: 10.1056/NEJM200009283431301. PMID: 11006365.
150. Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Bajenaru O, Carra A, et al. PreCISe study group. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2009 Oct 31;374(9700):1503-11. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61259-9. Epub 2009 Oct 6. Erratum in: *Lancet.* 2010 Apr 24;375(9724):1436. PMID: 19815268.
151. Kappos L, Polman CH, Freedman MS, Edan G, Hartung HP, Miller DH, et al. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology.* 2006 Oct 10;67(7):1242-9. doi: 10.1212/01.wnl.0000237641.33768.8d. Epub 2006 Aug 16. PMID: 16914693.

152. Díaz C, Zarco LA, Rivera DM. Highly active multiple sclerosis: An update. *Mult Scler Relat Disord*. 2019 May;30:215-224. doi: 10.1016/j.msard.2019.01.039. Epub 2019 Jan 24. PMID: 30822617.
153. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol*. 2012 Nov 5;8(11):647-56. doi: 10.1038/nrneurol.2012.168. Epub 2012 Sep 25. PMID: 23007702.
154. Lebrun C, Bensa C, Debouverie M, Wiertlevski S, Brassat D, de Seze J, et al. Club Francophone de la Sclérose en Plaques. Association between clinical conversion to multiple sclerosis in radiologically isolated syndrome and magnetic resonance imaging, cerebrospinal fluid, and visual evoked potential: follow-up of 70 patients. *Arch Neurol*. 2009 Jul;66(7):841-6. doi: 10.1001/archneurol.2009.119. PMID: 19597085.
155. Siva A, Saip S, Altintas A, Jacob A, Keegan BM, Kantarci OH. Multiple sclerosis risk in radiologically uncovered asymptomatic possible inflammatory-demyelinating disease. *Mult Scler*. 2009 Aug;15(8):918-27. doi: 10.1177/1352458509106214. PMID: 19667020.
156. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, Waubant E, Baranzini SE, Goodin DS, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2009 Mar 3;72(9):800-5. doi: 10.1212/01.wnl.0000335764.14513.1a. Epub 2008 Dec 10. Erratum in: *Neurology*. 2009 Apr 7;72(14):1284. PMID: 19073949.
157. Giorgio A, Stromillo ML, Rossi F, Battaglini M, Hakiki B, Portaccio E, et al. Cortical lesions in radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2011 Nov 22;77(21):1896-9. doi: 10.1212/WNL.0b013e318238ee9b. Epub 2011 Nov 9. PMID: 22076541.
158. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol*. 2012 Nov 5;8(11):647-56. doi: 10.1038/nrneurol.2012.168. Epub 2012 Sep 25. PMID: 23007702.
159. Zeydan B, Kantarci OH. Progressive Forms of Multiple Sclerosis: Distinct Entity or Age-Dependent Phenomena. *Neurol Clin*. 2018 Feb;36(1):163-171. doi: 10.1016/j.ncl.2017.08.006. PMID: 29157397.
160. Cohen JA, Cutter GR, Fischer JS, Goodman AD, Heidenreich FR, Kooijmans MF, et al. IMPACT Investigators. Benefit of interferon beta-1a on MSFC progression in secondary progressive MS. *Neurology*. 2002 Sep 10;59(5):679-87. doi: 10.1212/wnl.59.5.679. PMID: 12221157.
161. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2018 Jan 11;378(2):169-180. doi: 10.1056/NEJMra1401483. PMID: 29320652; PMCID: PMC6942519.
162. Okuda DT, Mowry EM, Cree BA, Crabtree EC, Goodin DS, Waubant E, et al.

Asymptomatic spinal cord lesions predict disease progression in radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2011 Feb 22;76(8):686-92. doi: 10.1212/WNL.0b013e31820d8b1d. Epub 2011 Jan 26. PMID: 21270417; PMCID: PMC3053327.

163. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*. 2007 Apr;17(2):210-8. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x. PMID: 17388952; PMCID: PMC8095582.

164. Ebers GC. Natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2004 Jun;10 Suppl 1:S8-13; discussion S13-5. doi: 10.1191/1352458504ms1025oa. PMID: 15218804.

165. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain*. 2006 Mar;129(Pt 3):606-16. doi: 10.1093/brain/awl007. Epub 2006 Jan 16. PMID: 16415308.

166. Kamińska J, Koper OM, Piechal K, Kemonia H. Multiple sclerosis - etiology and diagnostic potential. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017 Jun 30;71(0):551-563. doi: 10.5604/01.3001.0010.3836. PMID: 28665284.

167. Wattjes MP, Rovira À, Miller D, Yousry TA, Sormani MP, de Stefano MP, et al. Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis--establishing disease prognosis and monitoring patients. *Nat Rev Neurol*. 2015 Oct;11(10):597-606. doi: 10.1038/nrneurol.2015.157. Epub 2015 Sep 15. PMID: 26369511.

168. Traboulsee A, Simon JH, Stone L, Fisher E, Jones DE, Malhotra A, et al. Revised Recommendations of the Consortium of MS Centers Task Force for a Standardized MRI Protocol and Clinical Guidelines for the Diagnosis and Follow-Up of Multiple Sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016 Mar;37(3):394-401. doi: 10.3174/ajnr.A4539. Epub 2015 Nov 12. PMID: 26564433; PMCID: PMC5094650.

169. Hummel HM, Brück W, Dreha-Kulaczewski S, Gärtner J, Wuerfel J. Pediatric onset multiple sclerosis: McDonald criteria 2010 and the contribution of spinal cord MRI. *Mult Scler*. 2013 Sep;19(10):1330-5. doi: 10.1177/1352458513493033. Epub 2013 Jul 4. PMID: 23828866.

170. Hart FM, Bainbridge J. Current and emerging treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care*. 2016 Jun;22(6 Suppl):s159-70. PMID: 27356025.

171. Frohman EM, Shah A, Eggenberger E, Metz L, Zivadinov R, Stüve O. Corticosteroids for multiple sclerosis: I. Application for treating exacerbations. *Neurotherapeutics*. 2007 Oct;4(4):618-26. doi: 10.1016/j.nurt.2007.07.008. PMID: 17920542; PMCID: PMC7479685

172. Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP Jr, Halper J, Likosky WH, Lublin FD, et al. Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of

- Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology*. 2002 Jan 22;58(2):169-78. doi: 10.1212/wnl.58.2.169. Erratum in: *Neurology* 2002 Aug13;59(3):480. PMID: 11805241.
173. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*. 2006 Mar 2;354(9):942-55. doi: 10.1056/NEJMra052130. PMID: 16510748.
174. Gajofatto A, Benedetti MD. Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop? *World J Clin Cases*. 2015 Jul 16;3(7):545-55. doi: 10.12998/wjcc.v3.i7.545. PMID: 26244148; PMCID: PMC4517331.
175. Govindappa K, Sathish J, Park K, Kirkham J, Pirmohamed M. Development of interferon beta-neutralising antibodies in multiple sclerosis--a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015 Nov;71(11):1287-98. doi: 10.1007/s00228-015-1921-0. Epub 2015 Aug 14. PMID: 26268445.
176. Sharief MK. Dose and Frequency of Administration of Interferon-beta Affect its Efficacy in Multiple Sclerosis. *Clin Drug Investig*. 2003;23(9):551-9. doi: 10.2165/00044011-200323090-00001. PMID: 17535068.
177. Hiromatsu Y, Satoh H, Amino N. Hashimoto's thyroiditis: history and future outlook. *Hormones (Athens)*. 2013 Jan-Mar;12(1):12-8. doi: 10.1007/BF03401282. PMID: 23624127.
178. Gérard AC, Boucquey M, van den Hove MF, Colin IM. Expression of TPO and ThOXs in human thyrocytes is downregulated by IL-1alpha/IFN-gamma, an effect partially mediated by nitric oxide. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Aug;291(2):E242-53. doi: 10.1152/ajpendo.00439.2005. Epub 2006 Feb 14. PMID: 16478776.
179. Rapoport B, McLachlan SM. Thyroid autoimmunity. *J Clin Invest*. 2001 Nov;108(9):1253-9. doi: 10.1172/JCI14321. PMID: 11696565; PMCID: PMC209450.
180. Amino N, Hagen SR, Yamada N, Refetoff S. Measurement of circulating thyroid microsomal antibodies by the tanned red cell haemagglutination technique: its usefulness in the diagnosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1976 Mar;5(2):115-25. doi: 10.1111/j.1365-2265.1976.tb02822.x. PMID: 773572.
181. Hasham A, Tomer Y. Genetic and epigenetic mechanisms in thyroid autoimmunity. *Immunol Res*. 2012 Dec;54(1-3):204-13. doi: 10.1007/s12026-012-8302-x. PMID: 22457094; PMCID: PMC3601048.
182. Stefan M, Jacobson EM, Huber AK, Greenberg DA, Li CW, Skrabanek L, et al. Novel variant of thyroglobulin promoter triggers thyroid autoimmunity through an epigenetic

- interferon alpha-modulated mechanism. *J Biol Chem.* 2011 Sep 9;286(36):31168-79. doi: 10.1074/jbc.M111.247510. Epub 2011 Jul 12. PMID: 21757724; PMCID: PMC3173071.
183. Jacobson EM, Huber AK, Akeno N, Sivak M, Li CW, Concepcion E, Ho K, Tomer Y. A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression. *Genes Immun.* 2007 Apr;8(3):205-14. doi: 10.1038/sj.gene.6364375. Epub 2007 Mar 8. PMID: 17344890.
184. Tomer Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future. *Thyroid.* 2010 Jul;20(7):715-25. doi: 10.1089/thy.2010.1644. PMID: 20604685; PMCID: PMC2949235.
185. Saitoh O, Nagayama Y. Regulation of Graves' hyperthyroidism with naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in a mouse model. *Endocrinology.* 2006 May;147(5):2417-22. doi: 10.1210/en.2005-1024. Epub 2006 Jan 26. PMID: 16439459.
186. Burek CL, Talor MV. Environmental triggers of autoimmune thyroiditis. *J Autoimmun.* 2009 Nov-Dec;33(3-4):183-9. doi: 10.1016/j.jaut.2009.09.001. Epub 2009 Oct 9. PMID: 19818584; PMCID: PMC2790188.
187. Duntas LH. Environmental factors and autoimmune thyroiditis. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 Aug;4(8):454-60. doi: 10.1038/ncpendmet0896. Epub 2008 Jul 8. PMID: 18607401.
188. Saranac L, Zivanovic S, Bjelakovic B, Stamenkovic H, Novak M, Kamenov B. Why is the thyroid so prone to autoimmune disease? *Horm Res Paediatr.* 2011;75(3):157-65. doi: 10.1159/000324442. Epub 2011 Feb 22. PMID: 21346360.
189. Amino N, Tada H, Hidaka Y. Postpartum autoimmune thyroid syndrome: a model of aggravation of autoimmune disease. *Thyroid.* 1999 Jul;9(7):705-13. doi: 10.1089/thy.1999.9.705. PMID: 10447018.
190. Katz SM, Vickery AL Jr. The fibrous variant of Hashimoto's thyroiditis. *Hum Pathol.* 1974 Mar;5(2):161-70. doi: 10.1016/s0046-8177(74)80063-8. PMID: 4405879.
191. Ahmed R, Al-Shaikh S, Akhtar M. Hashimoto thyroiditis: a century later. *Adv Anat Pathol.* 2012 May;19(3):181-6. doi: 10.1097/PAP.0b013e3182534868. PMID: 22498583.
192. Hennessey JV. Clinical review: Riedel's thyroiditis: a clinical review. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;96(10):3031-41. doi: 10.1210/jc.2011-0617. Epub 2011 Aug 10. PMID: 21832114.
193. Hay ID. Thyroiditis: a clinical update. *Mayo Clin Proc.* 1985 Dec;60(12):836-43. doi: 10.1016/s0025-6196(12)64789-2. PMID: 3906289.
194. Stone JH, Khosroshahi A, Deshpande V, Chan JK, Heathcote JG, Aalberse R, et al.

Recommendations for the nomenclature of IgG4-related disease and its individual organ system manifestations. *Arthritis Rheum.* 2012 Oct;64(10):3061-7. doi: 10.1002/art.34593. PMID: 22736240; PMCID: PMC5963880.

195. Kakudo K, Li Y, Taniguchi E, Mori I, Ozaki T, Nishihara E, et al. IgG4-related disease of the thyroid glands. *Endocr J.* 2012;59(4):273-81. doi: 10.1507/endocrj.ej11-0309. Epub 2011 Dec 2. PMID: 22133985.

196. Deshpande V, Huck A, Ooi E, Stone JH, Faquin WC, Nielsen GP. Fibrosing variant of Hashimoto thyroiditis is an IgG4 related disease. *J Clin Pathol.* 2012 Aug;65(8):725-8. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200485. Epub 2012 Jun 1. PMID: 22659333.

197. Deshpande V, Huck A, Ooi E, Stone JH, Faquin WC, Nielsen GP. Fibrosing variant of Hashimoto thyroiditis is an IgG4 related disease. *J Clin Pathol.* 2012 Aug;65(8):725-8. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200485. Epub 2012 Jun 1. PMID: 22659333.

198. Zaletel K, Gaberšček S. Hashimoto's Thyroiditis: From Genes to the Disease. *Curr Genomics.* 2011 Dec;12(8):576-88. doi: 10.2174/138920211798120763. PMID: 22654557; PMCID: PMC3271310.

199. Tamaki H, Amino N, Kimura M, Hidaka Y, Takeoka K, Miyai K. Low prevalence of thyrotropin receptor antibody in primary hypothyroidism in Japan. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 Nov;71(5):1382-6. doi: 10.1210/jcem-71-5-1382. PMID: 1977757.

200. Welch WH. The Huxley Lecture on Recent Studies of Immunity, with Special Reference to their Bearing on Pathology: Delivered at the Opening of the Winter Session of Charing Cross Hospital Medical School on October 1st, 1902. *Br Med J.* 1902 Oct 11;2(2180):1105-14. doi: 10.1136/bmj.2.2180.1105. PMID: 20760475; PMCID: PMC2401880.

201. Nakamura M, Burastero SE, Ueki Y, Larrick JW, Notkins AL, Casali P. Probing the normal and autoimmune B cell repertoire with Epstein-Barr virus. Frequency of B cells producing monoreactive high affinity autoantibodies in patients with Hashimoto's disease and systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1988 Dec 15;141(12):4165-72. PMID: 2848890.

202. Berneman A, Guilbert B, Eschrich S, Avrameas S. IgG auto- and polyreactivities of normal human sera. *Mol Immunol.* 1993 Nov;30(16):1499-510. doi: 10.1016/0161-5890(93)90458-n. PMID: 8232336.

203. Nielsen CH, Bendtzen K. Immunoregulation by naturally occurring and disease-associated autoantibodies : binding to cytokines and their role in regulation of T-cell responses. *Adv Exp Med Biol.* 2012;750:116-32. doi: 10.1007/978-1-4614-3461-0\_9. PMID: 22903670; PMCID: PMC7123141.

204. Lutz HU, Binder CJ, Kaveri S. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and



- disease. *Trends Immunol.* 2009 Jan;30(1):43-51. doi: 10.1016/j.it.2008.10.002. Epub 2008 Dec 4. PMID: 19058756.
205. Hurez V, Dietrich G, Kaveri SV, Kazatchkine MD. Polyreactivity is a property of natural and disease-associated human autoantibodies. *Scand J Immunol.* 1993 Aug;38(2):190-6. doi: 10.1111/j.1365-3083.1993.tb01712.x. PMID: 8346418.
206. Rapoport B, McLachlan SM. Graves' hyperthyroidism is antibody-mediated but is predominantly a Th1-type cytokine disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Nov;99(11):4060-1. doi: 10.1210/jc.2014-3011. Epub 2014 Sep 11. PMID: 25210884; PMCID: PMC4223433.
207. Papp G, Boros P, Nakken B, Szodoray P, Zeher M. Regulatory immune cells and functions in autoimmunity and transplantation immunology. *Autoimmun Rev.* 2017 May;16(5):435-444. doi: 10.1016/j.autrev.2017.03.011. Epub 2017 Mar 7. PMID: 28286106.
208. Stevens AM: Maternal microchimerism in health and disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2016; **31**: 121–30.
209. Rojas-Villarraga A, Amaya-Amaya J, Rodriguez-Rodriguez A, Mantilla RD, Anaya JM. Introducing polyautoimmunity: secondary autoimmune diseases no longer exist. *Autoimmune Dis.* 2012;2012:254319. doi: 10.1155/2012/254319. Epub 2012 Feb 20. PMID: 22454759; PMCID: PMC3290803.
210. Morris GP, Brown NK, Kong YC. Naturally-existing CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells are required for tolerance to experimental autoimmune thyroiditis induced by either exogenous or endogenous autoantigen. *J Autoimmun.* 2009 Aug;33(1):68-76. doi: 10.1016/j.jaut.2009.03.010. Epub 2009 Apr 17. PMID: 19375891; PMCID: PMC2706097.
211. Morris GP, Brown NK, Kong YC. Naturally-existing CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells are required for tolerance to experimental autoimmune thyroiditis induced by either exogenous or endogenous autoantigen. *J Autoimmun.* 2009 Aug;33(1):68-76. doi: 10.1016/j.jaut.2009.03.010. Epub 2009 Apr 17. PMID: 19375891; PMCID: PMC2706097.
212. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 2006 Aug;212:28-50. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x. Erratum in: *Immunol Rev.* 2006 Oct;213:257. PMID: 16903904.
213. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):20-1. doi: 10.1038/83713. PMID: 11137993.
214. Zeher M, Horvath IF, Szanto A, Szodoray P. Autoimmune thyroid diseases in a large group

- of Hungarian patients with primary Sjögren's syndrome. *Thyroid*. 2009 Jan;19(1):39-45. doi: 10.1089/thy.2007.0398. PMID: 19119981.
215. Biró E, Szekanez Z, Czirják L, Dankó K, Kiss E, Szabó NA, et al. Association of systemic and thyroid autoimmune diseases. *Clin Rheumatol*. 2006 Mar;25(2):240-5. doi: 10.1007/s10067-005-1165-y. Epub 2005 Oct 25. PMID: 16247581.
216. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*. 2020 Dec;26(14):1816-1821. doi: 10.1177/1352458520970841. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33174475; PMCID: PMC7720355.
217. Riise T, Nortvedt MW, Ascherio A. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology*. 2003 Oct 28;61(8):1122-4. doi: 10.1212/01.wnl.0000081305.66687.d2. PMID: 14581676.
218. Skrinjar I, Brailo V, Vidovic-Juras D, Vucicevic-Boras V, Milenovic A. Evaluation of pretreatment serum interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha as a potential biomarker for recurrence in patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015 Jul 1;20(4):e402-7. doi: 10.4317/medoral.20373. PMID: 25858079; PMCID: PMC4523251.
219. Mokry LE, Ross S, Timpson NJ, Sawcer S, Davey Smith G, Richards JB. Obesity and Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *PLoS Med*. 2016 Jun 28;13(6):e1002053. doi: 10.1371/journal.pmed.1002053. PMID: 27351487; PMCID: PMC4924848.
220. La Fratta I, Tatangelo R, Campagna G, Rizzuto A, Franceschelli S, Ferrone A, et al. The plasmatic and salivary levels of IL-1 $\beta$ , IL-18 and IL-6 are associated to emotional difference during stress in young male. *Sci Rep*. 2018 Feb 14;8(1):3031. doi: 10.1038/s41598-018-21474-y. PMID: 29445205; PMCID: PMC5813044.
221. Jönsson M, Gerdle B, Ghafouri B, Bäckryd E. The inflammatory profile of cerebrospinal fluid, plasma, and saliva from patients with severe neuropathic pain and healthy controls—a pilot study. *BMC Neurosci*. 2021 Feb 1;22(1):6. doi: 10.1186/s12868-021-00608-5. PMID: 33522900; PMCID: PMC7852144.
222. Beigpoor A, McKinlay BJ, Kurgan N, Plyley MJ, O'Leary D, Falk B, et al. Cytokine Concentrations in Saliva vs. Plasma at Rest and in Response to Intense Exercise in Adolescent Athletes. *Ann Hum Biol*. 2021 Sep 12:1-11. doi: 10.1080/03014460.2021.1980105. Epub ahead of print. PMID: 34514917.
223. Hanneman SK, McCue D, Blog GL. Validation of Salivary Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-Alpha of Healthy Adult Volunteers by Enzyme Immunoassay. *Nurs Res*. 2016

- Nov/Dec;65(6):475-480. doi: 10.1097/NNR.000000000000186. PMID: 27801718.
224. Nam Y, Kim YY, Chang JY, Kho HS. Salivary biomarkers of inflammation and oxidative stress in healthy adults. *Arch Oral Biol.* 2019 Jan;97:215-222. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.10.026. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30399508.
225. Cullen T, Thomas AW, Webb R, Hughes MG. The relationship between interleukin-6 in saliva, venous and capillary plasma, at rest and in response to exercise. *Cytokine.* 2015 Feb;71(2):397-400. doi: 10.1016/j.cyto.2014.10.011. Epub 2014 Nov 15. PMID: 25464926.
226. Brailo V, Vucicevic-Boras V, Lukac J, Biocina-Lukenda D, Zilic-Alajbeg I, Milenovic A, et al. Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012 Jan 1;17(1):e10-5. doi: 10.4317/medoral.17323. PMID: 21743397; PMCID: PMC3448188.
227. Davies PH, Black EG, Sheppard MC, Franklyn JA. Relation between serum interleukin-6 and thyroid hormone concentrations in 270 hospital in-patients with non-thyroidal illness. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996 Feb;44(2):199-205. doi: 10.1046/j.1365-2265.1996.668489.x. PMID: 8849575.
228. Antunes TT, Gagnon A, Langille ML, Sorisky A. Thyroid-stimulating hormone induces interleukin-6 release from human adipocytes through activation of the nuclear factor-kappaB pathway. *Endocrinology.* 2008 Jun;149(6):3062-6. doi: 10.1210/en.2007-1588. Epub 2008 Feb 28. PMID: 18308843.
229. Rao NL, Shetty S, Upadhyaya K, R M P, Lobo EC, Kedilaya HP, et al. Salivary C-Reactive Protein in Hashimoto's Thyroiditis and Subacute Thyroiditis. *Int J Inflam.* 2010 Sep 14;2010:514659. doi: 10.4061/2010/514659. PMID: 21151525; PMCID: PMC2989710.
230. Fernandez-Botran R, Miller JJ, Burns VE, Newton TL. Correlations among inflammatory markers in plasma, saliva and oral mucosal transudate in post-menopausal women with past intimate partner violence. *Brain Behav Immun.* 2011 Feb;25(2):314-21. doi: 10.1016/j.bbi.2010.09.023. Epub 2010 Oct 1. PMID: 20888902; PMCID: PMC3025073.

## 8. ŽIVOTOPIS

Ines Šiško Markoš, doktorica medicine, specijalistica nuklearne medicine, rođena 17.05.1984. godine u Splitu.

Nakon opće gimnazije Vladimir Nazor u Splitu, diplomirala 2009. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu s temom diplomskog rada Valjanost ultrazvučnog nalaza u dijagnostici polipa endometrija.

Pripravnički staž odradila na KBC-u Zagreb. Od 2011. zaposlenik KBC Sestre Milosrdnice, na specijalizaciji iz nuklearne medicine, .

Završila poslijediplomski specijalistički studij Nuklearna medicina na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od 2017. godine stalni zaposlenik Klinike za onkologiju i nuklearnu medicine, Zavoda za nuklearnu medicine gdje se bavi širokim spektrom nuklearnomedicinske dijagnostike s više od 3000 procedura godišnje: dijagnostika lokomotornog sustava, neuroendokrinih tumora, bolesti paratireoidnih žlijezda, poremećaja motiliteta želuca, bolesti respiratornog sustava, a polje užeg interesa je neurologija i psihijatrija. Također, uključena u ultrazvučnu dijagnostiku bolesti štitnjače, melanoma i druge onkološke patologije. Licencirana za ultrazvučnu dijagnostiku bolesti dojke. Svakodnevno sudjeluje u obavljanju citoloških punkcija i biopsija širokom iglom. U više navrata educirana u Hrvatskoj i inozemstvu u školama nuklearne medicine (Beč, Ghent, Groningen, Cluj-Napoca).

Aktivni sudionik više domaćih i stranih stručni skupova.

Član HLK, HLZ, Hrvatskog društva za nuklearnu medicine, Hrvatskog društva za štitnjaču, Europskog društva za nuklearnu medicine i Europskog društva za hibridni imaging.

Udata, majka troje djece.

Publikacije:

1. Šiško Markoš I, Franceschi M, Vidranski V, Markos P; Jukic T, Fröbe A, Bašić Kes V.

The concentration of interleukin 6 and TNF alpha in saliva and blood of patients with inactive multiple sclerosis and coexisting Hashimoto's thyroiditis – Acta Clinica Croatica, ahead of print – rad iz doktorata, Q3, glavni autor

2. Peitl V, Badžim VA, Šiško Markoš I, Rendulić A, Matešić K, Karlović D. Improvements of Frontotemporal Cerebral Blood Flow and Cognitive Functioning in Patients with First Episode of Schizophrenia Treated With Long-Acting Aripiprazole. J Clin Psychopharmacol. 2021 Aug 26. Doi:10.1097/JCP0000000000001477. Epub ahead of print. PMID: 34459433. – Q2, koautor

3. Blažeković I, Romić M, Bosak Butković M, Šiško Markoš I, Gladić Nenadić V, Vidranski V, Petranović Ovčariček P, Krilić D, Varjačić T, Staničić J, Granić R, Punda M, Mihaljević I, Jukić T, Franceschi M. Thyroglobulin measurement in Needle Aspiration for detection of Recurrences and Neck Metastases in Patients with Differentiated Thyroid carcinoma: Significance of Anti-Tg Antibodies. *Acta Clin Croat.* 2020 Jun;59.s1.01. PMID 34219879: PMCID: PMC8212602

Q3, koautor

4. Orlović I, Bartulović M, Marušić K, Vlahović D, Šiško Markoš I, Karlović D, Peitl V. The enigma of Lewy body dementia: a case report. *Acta Clin Croat.* 2020 Dec;59(4):771-776. DOI: 10.20471/acc.2020.59.04.27. PMID: 34285451; PMCID: PMC8253061 Q3 - koautor

5. Markos P, Sisko Markos I, Ivekovic H, Bilic B, Rustemovic N.

Self-expandable metal stent for dysphagia caused by mediastinal masses in patients with lung cancer, *Arab J Gastroenterol.* 2019. Mar;20(21):28-31. doi:10.1016/j.ajg.2019.01.004. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30733178 Q3, koautor

6. Šiško Markoš, Ines; Trkanjec, Zlatko; Bašić Kes, Vanja; Gladić Nenadić, Vedrana; Jukić, Tomislav

Brain perfusion SPECT with 99mTc-HMPAO in patient with Anti-NMDA receptor encephalitis caused by pheochromocytoma-case report // *10th International Congress of the Croatian Society of Nuclear Medicine / Huić, Dražen (ur.).* Zagreb, 2021. 21, 1 (poster, domaća recenzija, sažetak, ostalo)

7. Sisko Markos, Ines; Trkanjec, Zlatko; Basic Kes, Vanja; Gladic Nenadic, Vedrana; Jukic, Tomislav

Brain perfusion SPECT with 99mTc-HMPAO in diagnosis of rapid mental deterioration – case report of Creutzfeldt – Jakob disease // *10th International Congress of the Croatian Society of Nuclear Medicine / Huić, Dražen (ur.).* Zagreb, 2021. 22, 1 (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni)

8. Šiško Markoš, Ines

Nuklearno-medicinske metode u dijagnostici neurodegenerativnih bolesti// 2. hrvatski kongres o neurodegenerativnim bolestima, Zagreb, 28. i 29. Listopad 2021., predavanje

8. Šiško Markoš, Ines

Nuklearno-medicinske metode u dijagnostici neurodegenerativnih bolesti // *10th International Congress of the Croatian Society of Nuclear Medicine, 11th Meeting of the Croatian Society of Nuclear Medicine Technologists / Huić, Dražen (ur.)*. Vodice, 2021. (pozvano predavanje, podatak o recenziji nije dostupan, ostalo, stručni)

9. Peitl, Vjekoslav; Silić, Ante; Ostojčić, Draženka; Aukst Margetić, Branka; Šiško Markoš, Ines; Bogović Dijaković, Anamarija; Rendulić, Ana; Karlović, Dalibor

FRONTO-TEMPORAL CEREBRAL BLOOD FLOW AND COGNITIVE FUNCTIONING IN PATIENTS WITH FIRST EPISODE PSYCHOSES TREATED WITH ARIPIPRAZOLE: PRELIMINARY FINDINGS // *Schizophrenia Bulletin*, 46 (Suppl 1) (2020), S120-S120 doi:10.1093/schbul/sbaa031.281 Q1 – koautor

10. Šiško Markoš, Ines

Nuklearno-medicinske metode u dg neurodegenerativnih bolesti // *Prvi hrvatski kongres o neurodegenerativnim bolestima / Trkanjec, Zlatko ; Bašić Kes, Vanja (ur.)*. Zagreb, 2019. (pozvano predavanje, podatak o recenziji nije dostupan, ostalo, stručni)

11. Sisko Markos I, Romić M, Petranović Ovcariček P, Gladić Nenadić V, Franceschi M, Kusić Z.

Multiple Non Ossifying Fibromas in 20 year old patient with Speckled Lentiginous Nevus Syndrome; Jaffe-Campanacci syndrome? (poster, scientific, europski kongres nuklearne medicine, Barcelona 2016.)

12. I.Šiško Markoš, M.Franceschi, T.Jukić, V.Gladić Nenadić, P.Petranović Ovcariček, J.Staničić, Z.Kusić Comparison of sonographic features between papillary thyroid cancer  $\geq 1$  cm and micropapillary thyroid cancer (poster, Hrvatsko-slovenski ultrazvučni kongres, Split 2015.)

13. Šiško Markoš I, Franceschi M, Jukić T, Kusić Z. ULTRASONOGRAPHIC FEATURES OF PAPILLARY THYROID MICROCARCINOMA: FIVE-YEAR EXPERIENCE IN THYROID REFFERAL CENTER // (oral presentation, 10th Alpe Adria Symposium, Šibenik, May, 2014.)

14. Franceschi, Maja; Jukić, Tomislav; Granić, Roko; Staničić, Josip; Šiško Markoš, Ines; Dabelić, Nina; Punda, Marija; Lukinac, Ljerka; Kusić, Zvonko. Follow-up of children with differentiated thyroid cancer: an institutional experience // *European Thyroid Journal*. Karger, 2013. 148-148 (poster,international peer-review,abstract,scientific).
15. Jukić, Tomislav; Franceschi, Maja; Lukinac, Ljerka; Granić, Roko; Staničić, Josip; Šiško Markoš, Ines; Punda, Marija; Dabelić, Nina; Mateša, Neven; Sonicki, Zdenko; Kusić, Zvonko. Survival rates and prognostic features of 1167 papillary thyroid carcinoma patients with long-term follow up // *European Thyroid Journal*. Karger, 2013. 123-123 (poster,international peer-review,abstract,scientific).
16. Šiško Markoš, Ines; Franceschi, Maja; Jukić, Tomislav; Staničić, Josip; Petranović Ovačariček, Petra; Granić, Roko; Punda, Marija; Lukinac, Ljerka; Kusić, Zvonko. Preoperative ultrasound, fine needle aspiration cytology and Tg in aspirates in the assesment of lateral lymph nodes in patients with papillary thyroid carcinoma // *European Thyroid Journal*. Karger, 2013. 163-163 (poster,international peer-review,abstract,scientific).
17. Šiško Markoš, Ines; Franceschi, Maja; Rončević, Sanja; Gladić Nenadić, Vedrana; Mateša, Neven; Kusić, Zvonko. Ultrasonographic features of papillary carcinoma: Five-year experience in thyroid refferal center // *European Thyroid Journal*, vol.1, suppl.1. 2012. 109-110 (poster,international peer-review,abstract,scientific).