

# Polimorfizmi gena za hemokromatozu, transferin i čimbenik nekroze tumora u multiploj sklerozi

---

Starčević Čizmarević, Nada

Doctoral thesis / Disertacija

2008

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:998635>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nada Starčević Čizmarević**

**POLIMORFIZMI GENA ZA HEMOKROMATOZU, TRANSFERIN I ČIMBENIK NEKROZE  
TUMORA U MULTIPLOJ SKLEROZI**

**Doktorski rad**

**Rijeka, 2008.**

Mentor rada: Prof.dr.sc. Smiljana Ristić

Doktorska disertacija obranjena je dana \_\_\_\_\_ na Medicinskom fakultetu

Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

4. \_\_\_\_\_

5. \_\_\_\_\_

Rad ima 148 listova.

UDK: 616.832-004.2 (043)

*Zahvaljujem svima koji su mi pomogli u nastajanju ovog rada.*

*Osobitu zahvalu izražavam svojoj mentorici prof.dr.sc. Smiljani Ristić koja me svih godina zajedničkog rada usmjeravala na istraživačkom putu i oblikovanju disertacije.*

*Također zahvaljujem prof.dr.sc. Miljenku Kapoviću i prof.dr.sc. Bojani Brajenović-Milić te svim kolegama sa Zavoda za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci, koji su svojom podrškom i savjetima doprinijeli izradi ovog rada i tehničarkama za pomoć u laboratoriju.*

*Zahvala i prof.dr.sc Borutu Peterlinu i njegovim suradnicima što su mi omogućili da dio istraživanja provedem u Laboratoriju za molekularnu genetiku Odjela za Medicinsku genetiku Sveučilišnog kliničkog centra Ljubljana.*

## SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** S obzirom da nedavni dokazi upućuju na moguću ulogu disregulacije željeza u patogenezi multiple skleroze (MS), cilj istraživanja bio je testirati sljedeću hipotezu: polimorfizmi HFE gena (C282Y i H63D), TF gena (C1/C2) i TNF- $\alpha$  gena (-308 i -238), kao i njihova međusobna interakcija, utječu na predispoziciju za razvoj MS i/ili na kliničku ekspresiju bolesti.

**Ispitanici i metode:** U ispitivanje je uključeno 368 osoba oboljelih od MS (266 žena i 102 muškarca), od toga njih 79 (46 žena i 33 muškarca) iz područja većeg rizika (autohtoni stanovnici Gorskog kotara i Kočevja) i 289 (220 žena i 69 muškaraca) iz područja niže prevalencije MS (populacije Hrvatske i Slovenije). Bolesnici su udovoljavali dijagnostičkoj kategoriji sigurne MS prema Poserovim kriterijima, a klinički su obrađeni sukladno EDMUS protokolu. Kontrolnu skupinu činilo je 368 zdravih dobrovoljnih davatelja krvi (86 autohtonih stanovnika Gorskog kotara i Kočevja; 282 ispitanika s područja nižeg rizika) čija se prosječna dob i spol nisu statistički značajno razlikovali od MS bolesnika. Prisutnost polimorfizama u HFE, TF i TNF- $\alpha$  genu utvrđena je lančanom reakcijom polimeraze i restrikcijom s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama.

**Rezultati:** Učestalost nositelja HFE C282Y mutacije veća je (7,1%) u MS bolesnika negoli u kontrolnih ispitanika (3,8%), a statistički značajna razlika utvrđena je usporedbom MS bolesnika s SP+RR tijekom bolesti i kontrole ( $p=0,026$ ; OR=2,09; 95% CI=1,07-4,08), te je prisutna između MS bolesnika i kontrole izvan žarišnog područja ( $p=0,019$ ; OR=2,33; 95% CI=1,13-4,84). Bolest se javlja ranije u bolesnika s C282Y mutacijom ( $p=0,035$ ), dok utjecaj mutacije na daljnu ekspresiju bolesti (trajanje, EDSS i PI) nije primijećen ( $p>0,05$ ). Frekvencija HFE H63D alela veća je u kontroli (15,6%) negoli u MS bolesnika (13,3%), a razlika u učestalosti H63D homozigota između dvije skupine pokazuje graničnu vrijednost statističke značajnosti ( $p=0,050$ ; OR=0,29; 95 %CI=0,08-1,08). H63D mutacija s obzirom na blagi učinak u taloženju željeza ne korelira značajno ( $p>0,05$ ) s težinom kliničke slike MS. Nije utvrđena razlika ( $p>0,05$ ) u frekvenciji TF C1/C2 genotipova i alela između MS bolesnika i kontrole, kao ni razlika u ispitivanim kliničkim parametrima s obzirom na status

nositelja TF C2 alela. Usporedbom različitih kombinacija polimorfizama HFE i TF gena između MS bolesnika i kontrole nije utvrđena značajna razlika ( $p>0,05$ ), niti je utvrđen učinak zajedničkog djelovanja ovih gena na ekspresiju bolesti. Broj ispitanika s TNF- $\alpha$ -308 A alelom veći je u kontroli (26,6%) negoli u MS bolesnika (20,9%) ( $p=0,069$ ), dok je razlika u žarištu statistički značajna ( $p=0,016$ ; OR=0,41; 95 %CI=0,19-0,86). Polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 ne korelira statistički značajno ( $p>0,05$ ) s težinom kliničke slike MS. Distribucije TNF- $\alpha$ -238 genotipova i alela između MS bolesnika i kontrole statistički se značajno razlikuju ( $p<0,001$ ), pri čemu je veća učestalost TNF- $\alpha$ -238 A alela utvrđena u MS bolesnika (10%) negoli u kontroli (3,8%) ( $p=0,0008$ ; OR=2,83; 95% CI=1,50-5,32). Nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p>0,05$ ) u dobi nastupa, trajanju bolesti, EDSS i PI između bolesnika s TNF- $\alpha$ -238 A alelom, odnosno bez tog alela. Kombinacije potencijalno protektivnih alela HFE i TNF- $\alpha$  gena (C282Y-/TNF- $\alpha$ -308AG+AA, C282Y-/TNF- $\alpha$ -238GG) smanjuju rizik za MS, a kombinacije rizičnih alela povećavaju taj rizik (H63D-/TNF- $\alpha$ -238AG+AA) ( $p<0,05$ ). TNF- $\alpha$ -308 i -238 polimorfizmi ne pokazuju značajnu interakciju s mutacijama HFE gena za većinu promatranih kliničkih parametara. Statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) međudjelovanja H63D i TNF- $\alpha$ -238, odnosno -308 polimorfizama, na trajanje bolesti odnosno PI može biti posljedica manjeg broja ispitanika i njihovog progresivnog tijeka bolesti.

**Zaključak:** Dobiveni rezultati istraživanja ukazuju na moguć utjecaj HFE C282Y i TNF- $\alpha$ -238 A alela kao rizičnih čimbenika u predispoziciji za MS, dok je potencijalni protektivni efekt HFE H63D i TNF- $\alpha$ -308 A alela slabije izražen. TF C1/C2 polimorfizam ne utječe na podložnost ni na kliničku ekspresiju bolesti. Utjecaj ovih polimorfizama na kliničke parametre pokazuje da je HFE C282Y mutacija dobar prediktor ranijeg javljanja bolesti. Istraživanje zajedničkog djelovanja HFE, TF i TNF- $\alpha$  gena na predispoziciju i težinu kliničke slike u MS ukazuje na mogućnost da TNF- $\alpha$ -308 i -238 polimorfizmi u ovisnosti o prisutnosti mutacija HFE gena djelomično modificiraju podložnost za bolest.

**Ključne riječi:** čimbenik nekroze tumora; hemokromatoza; multipla skleroza; polimorfizam; transferin; željezo.

## SUMMARY

**Objectives:** Recent evidence has indicated a role for iron dysregulation in disease pathogenesis. Thus, in our investigation, we tested the hypothesis that polymorphisms in HFE (C282Y and H63D), TF (C1 and C2), and TNF- $\alpha$  (-308 and -238), and interactions among these polymorphisms, influence predisposition to and clinical presentation (age of onset, duration, EDSS, and PI) of multiple sclerosis (MS).

**Patients and methods:** The study included 368 MS patients (266 females; 102 males). Seventy-nine patients (46 females; 33 males) were from high-risk regions in Gorski kotar and Kočevje, and 289 (220 females; 69 males) patients were from other parts of Croatia and Slovenia. The patients were recruited using the criteria of Poser, and their clinical status was evaluated using the EDMUS protocol. The control group comprised 368 unrelated healthy blood donors, matched for geographic region, age, and gender. We analyzed the HFE, TF, and TNF- $\alpha$  gene polymorphisms using the PCR-RFLP method.

**Results:** The HFE C282Y carrier mutation frequency was higher (7.1%) in the MS patient group than in the control group (3.8%). A statistically significant difference was observed after excluding the high-risk group from Gorski kotar and Kočevje ( $p=0.019$ ; OR=2.33; 95% CI=1.13–4.84). We detected significant differences in the HFE C282Y carrier mutation frequency between SP+RR MS patients and controls ( $p=0.026$ ; OR=2.09; 95% CI=1.07–4.08). A significantly earlier age of onset was found in carriers of the C282Y mutation ( $p=0.035$ ). The frequency of the HFE H63D mutation was higher (15.6%) in controls than in MS patients (13.3%), and the difference in the frequency of H63D homozygotes between MS patients and controls was of borderline significance ( $p=0.050$ ; OR=0.29; 95% CI=0.08–1.08). The H63D mutation exhibits a mild effect on iron overload and we found no correlation between its presence and disease behavior ( $p>0.05$ ). We were unable to detect significant differences ( $p>0.05$ ) in the frequencies of the TF C1/C2 genotypes and alleles between MS patients and controls, and we found no differences in clinical parameters in carriers of the TF C2 allele. We did not observe that interactions among HFE and TF gene polymorphisms had any effect on either predisposition to MS or on disease progression ( $p>0.05$ ). The

frequency of carriers with the TNF- $\alpha$ -308 A allele was higher (26.6%) in the control group than in the MS patient group (20.9%) ( $p=0.069$ ), and we found a statistically significant difference in the high-risk group from Gorski kotar and Kočevje ( $p=0.016$ ; OR=0.41; 95% CI=0.19–0.86). We found no evidence of a correlation between the TNF-308- $\alpha$  gene polymorphism and MS clinical severity. The distribution of the TNF-238- $\alpha$  genotypes and alleles in MS patients and controls was statistically significantly different ( $p < 0.001$ ). The TNF- $\alpha$ -238 A allele occurred at a higher frequency in MS patients (10.0%) than in controls (3.8%) ( $p=0.0008$ ; OR=2.83; 95% CI=1.50–5.32). However, there was no statistically significant difference regarding disease progression in patients with or without the TNF-238- $\alpha$  A allele ( $p>0.05$ ). Several combinations of HFE and TNF- $\alpha$  alleles that have been suggested to have a protective effect (C282Y-/TNF- $\alpha$ -308AG+AA, C282Y-/TNF- $\alpha$ -238GG) were correlated with a diminished a risk for MS. The combination of the possible risk alleles of the HFE i TNF- $\alpha$  genes (H63D-/TNF- $\alpha$ -238AG+AA) did correlate with a higher risk of MS ( $p<0.05$ ). We did not observe any significant effects of TNF- $\alpha$ -308 or -238 polymorphisms on most of the clinical parameters. However, there was a statistically significant association ( $p<0.05$ ) between interactions between HFE H63D and both TNF- $\alpha$ -308 and TNF- $\alpha$ -238 polymorphisms and disease duration and PI. But this could be the consequence of a lower number of patients with these polymorphisms and progressive form of disease.

**Conclusion:** Our results indicate that HFE C282Y and TNF- $\alpha$ -238 gene polymorphisms may be risk factors with respect to MS susceptibility. The possible protective effects of the HFE H63D and TNF- $\alpha$ -308 gene polymorphisms were less pronounced. The TF C1/C2 gene polymorphism had no effect on MS development. Furthermore, our results suggest that the C282Y mutation is a good predictor for early onset of MS. Overall, our investigation of the gene–gene interactions among HFE, TF, and TNF- $\alpha$  indicates that they may have an effect on MS susceptibility.

**Key words:** hemochromatosis, iron, multiple sclerosis, polymorphism, transferrin, tumor necrosis factor.



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. Multipla skleroza.....	2
1.1.1. Patogeneza i klinička slika multiple skleroze.....	2
1.1.2. Tijek i prognoza multiple skleroze.....	5
1.1.3. Distribucija multiple skleroze.....	6
1.1.4. Okolišni čimbenici u multiploj sklerozi.....	9
1.1.5. Genetika multiple skleroze.....	13
1.1.5.1. Familijarna multipla skleroza.....	13
1.1.5.2. Genetička podložnost za multiplu sklerozu.....	15
1.2. Željezo i multipla skleroza.....	23
1.3. Metabolizam željeza i njegova genska regulacija.....	25
1.3.1. Gen za hemokromatozu.....	28
1.3.2. Gen za transferin.....	31
1.3.3. Gen za čimbenik nekroze tumora- $\alpha$ .....	33
<b>2. CILJ RADA</b> .....	<b>36</b>
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>37</b>
3.1. Ispitanici.....	37
3.2. Metode.....	39
3.2.1. Molekularno-genetička analiza.....	39
3.2.1.1. Izolacija DNA.....	39
3.2.1.2. Analiza mutacija HFE gena.....	39
3.2.1.2.1. Mutacija C282Y.....	39
3.2.1.2.2. Mutacija H63D.....	42
3.2.1.3. Analiza C1/C2 polimorfizma TF gena.....	44
3.2.1.4. Analiza TNF- $\alpha$ polimorfizama.....	46
3.2.1.4.1. Polimorfizam TNF- $\alpha$ -308.....	46
3.2.1.4.2. Polimorfizam TNF- $\alpha$ -238.....	48

3.3. Statističke metode.....	51
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>52</b>
4.1. Utjecaj C282Y i H63D mutacija HFE gena na podložnost za MS.....	52
4.2. Utjecaj C1/C2 polimorfizma TF gena na podložnost za MS.....	57
4.3. Međudjelovanje HFE i TF gena u podložnosti za MS.....	59
4.4. Utjecaj polimorfizama –308 i -238 TNF- $\alpha$ gena na podložnost za MS.....	61
4.5. Međudjelovanje HFE i TNF- $\alpha$ gena u podložnosti za MS.....	65
4.6. Utjecaj C282Y i H63D mutacija HFE gena na kliničku ekspresiju MS.....	68
4.7. Utjecaj C1/C2 polimorfizma TF gena na kliničku ekspresiju MS.....	73
4.8. Učinak međudjelovanja HFE i TF gena na kliničku ekspresiju MS.....	76
4.9. Utjecaj polimorfizma –308 i -238 TNF- $\alpha$ gena na kliničku ekspresiju MS...	84
4.10. Učinak međudjelovanja HFE i TNF- $\alpha$ gena na kliničku ekspresiju MS.....	89
4.10.1. Međudjelovanje HFE C282Y i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizama.....	89
4.10.2. Međudjelovanje HFE C282Y i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizama.....	93
4.10.3. Međudjelovanje HFE H63D i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizama.....	97
4.10.4. Međudjelovanje HFE H63D i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizama.....	101
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>105</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>129</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>131</b>

## 1. UVOD

Multipla skleroza (engl. multiple sclerosis - MS) kronična je autoimuna bolest središnjeg živčanog sustava, karakterizirana difuznim plakovima demijelinizacije i oštećenjem aksona, što rezultira različitim neurološkim simptomima i znakovima koji se javljaju u remisijama i egzacerbacijama. Stoga je klinička slika bolesti varijabilna, tijekom nepredvidiv, a napredovanje bolesti raznoliko što, često, vodi do smanjenja kvalitete života, a može izazvati težu invalidnost (1). Pripadnici bijele rase kavkaskog porijekla rizična su skupina za razvoj bolesti, od koje najčešće obolijevaju mlade odrasle osobe, češće žene negoli muškarci.

Rasprostranjenost MS različita je u svijetu, a prevalencija bolesti kreće se u rasponu od manje od 5 do više od 200 bolesnika na 100 000 stanovnika i varira ovisno o zemljopisnoj širini, klimi te stupnju ekonomskog razvoja određenog područja. Međutim, postoje i područja koja, neovisno o zemljopisnoj širini, obilježava veći rizik za MS, tzv. žarišta bolesti (2). Takve populacije s izrazito visokom prevalencijom za MS predstavljaju izazovne modele za istraživanje ove bolesti.

Iako je uzrok bolesti još uvijek nepoznat, činjenice upućuju da je MS složena bolest multifaktorijalne etiologije, za čiji su razvoj potrebni i genetički i okolišni čimbenici. Ulogu genetičkih čimbenika u etiologiji MS podupiru saznanja o povećanom relativnom riziku braće i sestara oboljelih u usporedbi s općom populacijom, kao i povećana konkordantna stopa u monozigotnih u usporedbi s dizigotnim blizancima (3). Klasične genetičke studije sugeriraju da je MS poligenetska bolest s blagim predisponirajućim utjecajem svakog pojedinačnog lokusa (4). Zbog autoimunog karaktera MS pokušaji identificiranja gena kandidata zasnivali su se na istraživanju polimorfnih gena čiji su produkti uključeni u imunološki odgovor. S druge strane, studije genomskog probira identificirale su čitav niz lokusa podložnosti. Navedene studije ukazuju da glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. human lymphocyte antigen – HLA) doprinosi, iako u blažem obliku, općoj podložnosti za MS, ali da postoje i drugi geni smješteni izvan HLA koji mogu određivati predispoziciju za MS (5).

Istraživanja koja se provode posljednjih godina upućuju i na moguću ulogu metabolizma željeza u MS (6-9). Iako kompleksno istraživanje ove potencijalne uloge do sada nije provedeno, dosadašnji rezultati predstavljaju izazov za istraživanje uloge gena uključenih u metabolizam željeza na podložnost i kliničku ekspresiju MS.

### **1.1. Multipla skleroza**

MS je još uvijek neizlječiva upalna bolest središnjeg živčanog sustava (engl. central nervous system - CNS), obilježena mišićnom slabošću, ukočenošću i gubitkom koordinacije. Težina bolesti može varirati od relativno blagih slučajeva do značajne invalidnosti i smrti. Na mjestu oštećenja mijelinske ovojnice nastaju ožiljci koji se nazivaju skleroza, plak ili lezija, pa otuda i ime bolesti. Prvi simptomi bolesti ponekad se mogu javiti još u doba puberteta, ali dijagnoza bolesti rijetka je prije adolescencije, incidencija raste prema 35-oj godini, te nakon toga lagano opada, a gornja je granica dijagnoze između 55. i 60. godine života (1,10).

#### **1.1.1. Patogeneza i klinička slika multiple skleroze**

Multipla skleroza je demijelinizacijska bolest središnjeg živčanog sustava karakterizirana nestajanjem mijelinskih ovojnica živčanih niti u obliku žarišta, čime je onemogućeno brzo i učinkovito prenošenje živčanih impulsa (10). Dugo se smatrala bolešću samo bijele tvari jer zahvaća prvenstveno mijelinsku ovojnicu aksona, međutim, kasnija istraživanja lociraju oko 25% lezija u sivoj tvari (patološki nalaz u dubokim moždanim jezgrama i moždanoj kori), dok današnja istraživanja pokazuju da i sam akson može biti oštećen (8,11,12).

S obzirom da točna patogeneza MS još uvijek nije potpuno jasna, postoji nekoliko hipoteza koje nastoje razjasniti etiologiju i patogenetski mehanizam demijelinizacije živčanog tkiva, uključujući virusnu infekciju, imunološke poremećaje, traumu, vaskularna oštećenja i niz drugih uzroka (13,14,15). Mnogi istraživači smatraju da je MS upalna demijelinizacijska autoimuna bolest jer pojedini dijelovi mijelinske ovojnice upalno reagiraju i propadaju. Do demijelinizacije i degeneracije aksona dolazi zbog molekularne mimikrije, nemogućnosti

razlikovanja stranih tvari od vlastitih. T-stanice, B-stanice i makrofazi organiziraju autoimuni napad protiv mijelinskih antigena. Prilikom upale leukociti prolaze krvno-moždanu barijeru i izlučuju se inflamatorni citokini. Dolazi i do oštećenja aksona i atrofije mozga. Međutim, još nije dokazano je li upala primarna ili su, pak, prema drugoj teoriji, primarni procesi na razini oligodendrocita i aksona koji vode do demijelinizacije, a upala je sekundarna (14,16).

Plakovi demijelinizacije rasprostranjeni su središnjim živčanim sustavom i mogu biti različite veličine, od 1-2mm do nekoliko centimetara u promjeru, pri čemu velika žarišta uzrokuju brojne funkcionalne poremećaje, ovisno o njihovoj lokalizaciji. U ranom stadiju bolesti mijelinska su vlakna na pojedinim mjestima ružičasta, otečena i mekana. Javljaju se sukcesivno, u valovima i takva se žarišta mogu u potpunosti povući. Međutim, u većini slučajeva mijelinska su vlakna razgrađuju i zamjenjuju glijom, pri čemu žarište otvrdne do ožiljka i nastane skleroza (1,10). Za lezije u MS klasično se govori da su rasute u vremenu i prostoru. Često su zahvaćeni stražnji funikuli i lemniskalni sustav (dubok osjet, vibracija, pokret). Veliki mozak ima žarišta najčešće subkortikalno i periventrikularno. Žarišta nastaju u okolini vena, venula, često u vidnom živcu, području moždanog debla i medule spinalis (17).

S obzirom na mjesto zahvaćanja i jakost upale mijelinske ovojnice aksona klinička slika MS karakterizirana je varijabilnošću, valovitim tijekom poboljšanja i pogoršanja smetnji, simptoma i znakova bolesti tijekom vremena. Nemaju svi bolesnici iste simptome, niti su oni uvijek u korelaciji s mijelinskim plakovima. Simptomi MS mogu biti blagi ili jaki, dugog trajanja ili kratki i mogu se pojaviti u različitim kombinacijama, ovisno o dijelu živčanog sustava koji je napadnut (1). Gotovo da nema ni jednog neurološkog simptoma koji se ne može javiti u nekoj od faza bolesti. Osoba će obično iskusiti nekoliko simptoma, ali ne i sve simptome koji se očituju u vidu optičkih, senzornih i motoričkih smetnji. Potpune ili djelomične remisije simptoma, posebno u ranim fazama bolesti, javljaju se u 70% slučajeva.

Prvi detaljan klinički opis bolesti dao je Charcot 1868. godine navodeći simptome oštećenja cerebelarnog sustava do kojih dolazi u kasnijem stadiju bolesti. Novije metode ispitivanja kao što su pregled moždanog likvora (engl. cerebrospinal fluid – CSF) u kojem se određuje razina limfocita T, plazma stanica, makrofaga, ukupnih bjelančevina te

oligoklonalna IgG, zatim korištenje evociranih moždanih potencijala, kompjutorizirana tomografija (CT) mozga i nuklearna magnetska rezonancija (NMR) omogućile su otkrivanje novih simptoma bolesti koji se ne mogu detektirati običnim kliničkim pregledom (1,17).

Tako je opisan i čitav niz simptoma bolesti koje možemo sistematizirati prema lokalizaciji oštećenja (10):

- sindrom gornjeg neurona: spastične kljenuti, umaranje, motorne slabosti, trbušni refleksi su ugašeni;
- cerebelarni simptomi: adijadohokineza, intencijski tremor, ataksija, nistagmus, poremećaj govora, skandirajući govor;
- simptomi moždanog debla: diplopija, paralitički strabizam, internuklearna oftalmoplegija, nistagmus;
- osjetni sustav: parestezije (osjećaj mravinjanja, žarenja, trnjenja, bockanja), disestezije;
- poremećaji sfinktera: inkontinencija ili retencija mokraće;
- vidni poremećaji: retrobulbarni neuritis (bolesnik vidi kao kroz maglu ili uopće ne vidi, bolovi u dubini oka);
- mentalni poremećaji: euforija koja se izmjenjuje s fazama depresije, demencija;
- glavobolje i epileptični napadaji.

Među početnim simptomima MS često su smanjenje oštine vida, dupli vid, miješanje crvene i zelene boje ili čak sljepoća na jedno oko. Smetnje vida nastaju zbog upale i demijelinizacije duž vidnog živca (tzv. optički neuritis), a problemi se obično poboljšavaju u višim stadijima bolesti (1). Mnogi bolesnici imaju subjektivne smetnje osjeta i ispade osjeta kao neosjetljivost, svrbež kože ili trnci.

Većina MS bolesnika ima iskustvo sa slabošću mišića u ekstremitetima i teškoću s koordinacijom i ravnotežom u tijeku bolesti, te tremor i vrtoglavicu. Umor može biti izazvan fizičkom iscrpljenošću ili može poprimiti formu stalnog i perzistirajućeg umora. Oko polovice ljudi sa MS ima kognitivne teškoće poput: koncentracije, pažnje, pamćenja, teškoće prosudbe, ali takvi simptomi često su blagi i obično se previđaju (17). Depresija koja je

povezana s kognitivnim problemima drugo je zajedničko obilježje oboljelih od MS, dok oko 10% bolesnika pati od težih psiholoških poremećaja.

Navedeni klinički podaci ukazuju da je MS heterogena bolest koja se odlikuje izrazito varijabilnom kliničkom slikom, što ukazuje na činjenicu da nijedan specifičan klinički simptom ili laboratorijski nalaz, već samo njihovo grupiranje kao i tijek bolesti mogu upućivati na konačnu dijagnozu. Masovno korišteni Poserovi dijagnostički kriteriji za MS variraju od klinički sigurne do laboratorijski sigurno potkrijepljene, te od klinički vjerojatne do laboratorijski potkrijepljene vjerojatne MS (18). Godine 2001. McDonald i sur. objavljuju nove kriterije za dijagnozu MS, koji pojednostavljaju dijagnostičku klasifikaciju i opis bolesti, te potvrđuju temeljno načelo MS kao bolesti rasutih oštećenja živčane osi «u vremenu i prostoru» (19). Nakon postavljene dijagnoze, težina kliničke slike izražava se u stupnjevima invalidnosti koji se određuju numerički u proširenoj ljestvici invaliditeta (engl. Expanded Disability Status Scale - EDSS) prema Kurtzkeu (20), pri čemu 1 označava početni a 10 krajnji stadij oštećenja.

### **1.1.2. Tijek i prognoza multiple skleroze**

MS je, poput ostalih autoimunih bolesti (npr. reumatoidni artritis i sistemski eritemski lupus), češći u žena negoli u muškaraca (omjer je: 2:1), s prvom manifestacijom simptoma u ranoj adultnoj dobi (21,22). Bolest se može javiti u mahovima s različitom simptomatologijom (relapsno-remitirajući oblik) ili može imati kroničan progresivni tijek (primarno–progresivan i sekundarno-progresivan oblik) (1). Tako usprkos velikoj različitosti i nepredvidljivosti simptoma, MS ipak pokazuje određene pravilnosti ako se bolest prati kroz duže vremensko razdoblje. Tijek bolesti je u svake osobe različit i najčešće nepredvidljiv, ali s vremenom većinu bolesnika može se svrstati u jednu od tri glavne skupine.

U većine bolesnika (85%) bolest započinje kao relapsno-remitirajući (RR) oblik sa šubovima bolesti, nakon kojih slijedi oporavak. Tijekom faze pogoršanja (tzv. šubovi, mahovi, egzacerbacije, relapsi) dolazi do pojave novih simptoma ili se već postojeći simptomi pogoršaju. Egzacerbacije nastupaju u vremenu od nekoliko dana ili 1 do 2 tjedna,

traju jedan do tri mjeseca i praćene su remisijama, razdobljima povlaćenja bolesti, u kojima se stanje bolesnika vraća na ono koje je postojalo prije pogoršanja bolesti, ili može zaostati određeno manje oštećenje (21). Između šubova nema napredovanja bolesti. Razmak između dva maha bolesti može trajati samo nekoliko mjeseci, no najčešće iznosi 1-2 godine, a ponekad i znatno duže. Egzacerbacije su češće u prvim godinama bolesti, njihovo je trajanje općenito duže od početnog napada, s tendencijom da se s vremenom i produži. Broj egzacerbacija ne utječe na definitivnu invalidnost (10).

U oko polovice ovih bolesnika s vremenom se razvije sekundarno progresivni (SP) oblik MS, kad nakon faza pogoršanja ne slijedi potpun oporavak već su postupno oštećenja sve veća i postoji kontinuirana progresija bolesti s kratkim razdobljima poboljšanja ili stabilizacije (21). Progresija je brža što je bolest počela kasnije i što je kraći vremenski razmak između prva dva maha bolesti.

Rjeđe, bolest ima primarno progresivan (PP) tijek u kojem postoji stalna progresija oštećenja s gubitkom određenih funkcija i sposobnosti. Ponekad bolest može imati benigni tijek s izoliranim atakama bolesti, bez trajnih oštećenja i nakon dugog niza godina (21). Rijetki su slučajevi fudroajantnog nastupa bolesti, kada bolesnici umiru nekoliko tjedana nakon prvih manifestacija simptoma.

Prosječno trajanje bolesti iznosi 20-30 godina. Pomoć pri hodanju u otprilike 50% bolesnika s relapsno-remitirajućim tijekom bolesti potrebna je kroz desetak godina. Ukupno gledajući, polovica oboljelih postaje invalidna u roku od 5-6 godina, a ovisna o drugima nakon 15-20 godina (22). Uzroci smrti vezani su uglavnom uz pojavu interkurentnih infekcija ili su, pak, posljedica respiratorne insuficijencije ili retencije mokraće (10).

### **1.1.3. Distribucija multiple skleroze**

S obzirom da je MS opisana pred više od jednog stoljeća, a patogeneza je još uvijek nepoznata, ne iznenađuje velik interes za istraživanjem bolesti s ciljem identifikacije uzroka i same prirode bolesti. Brojna epidemiološka istraživanja datiraju još od početka prošlog



stoljeća, a od prve systemske populacijske studije MS, koju je 1929. godine provela Sydney Allison, objavljeno je više od 400 radova o prevalenciji MS u svijetu (23).

Procjenjuje se da danas od MS boluje između 1,1-2,5 milijuna ljudi s 350000 registriranih osoba u Europi i 250000 oboljelih u SAD-u. Širom svijeta MS se javlja većom frekvencijom u višim zemljopisnim širinama, a nejednaka geografska rasprostranjenost epidemiološka je značajka same bolesti (21). Područja s relativno visokom učestalošću bolesti od 50 - 120 oboljelih na 100000 stanovnika jesu zapadna Europa, Kanada, Rusija, Izrael, sjever SAD-a, Novi Zeland i jugoistočna Australija (23,24). U ovim regijama uočen je sjever/jug gradijent s većom prevalencijom bolesti u umjerenim temperaturnim područjima između 40 i 60 stupnja sjeverne i južne zemljopisne širine. Spomenuti gradijent dobro se uočava u Australiji i na Novom Zelandu s najvećom prevalencijom u umjerenom južnom dijelu zemlje (25). U zapadnoj Europi gradijent nije toliko očit zbog veće prevalencije u nordijskim zemljama i na Britanskom otočju negoli u južnijim zemljama Mediterana. Ipak, napredak u dijagnostici bolesti i epidemiološkoj metodologiji svrstava zemlje srednje i južne Europe u područje visokog rizika za MS s prevalencijom većom od 30/100000. U SAD-u MS je češći u državama iznad 37 paralele, gdje prevalencija bolesti iznosi 110-140/100000, nego ispod 37 stupnja geografske širine, gdje ona iznosi 57-78/100000 bolesnika. Zone niskog rizika za MS s prevalencijom od 5/100000 stanovnika jesu Azija, Afrika, Japan i sjeverni dio Južne Amerike (23).

Međutim, unutar pojedinih zemalja postoje značajne razlike u distribuciji i učestalosti MS. Tako je, primjerice, u Norveškoj MS pet puta češća u unutrašnjem poljoprivrednom dijelu zemlje negoli nedaleko u obalnom, ribolovnom području. Do sada su u Europi opisane četiri zone visokog rizika (26) sa značajno višom prevalencijom MS: Orkney otoci u sjevernoj Škotskoj (250/10000), Shetland otoci u sjeveroistočnoj Škotskoj (100/10000), Sardinija (102/10000), te područje Gorskog kotara i Kočevja, s prevalencijom od 151.9/10000 (27,28).

Epidemiološka istraživanja pokazuju da je Hrvatska područje umjerenog do visokog rizika za MS s nejednačnom distribucijom bolesti, pri čemu se Gorski kotar izdvaja kao

vremensko i prostorno žarište, vjerojatno i poradi nešto drugačijeg etničkog porijekla stanovništva (dijelom germanskog) (29).

Rijetka pojava MS među Samićanima, Turkmencima, Uzbekstancima, Kazahstancima, Kirgizima, nativnim Sibircima, američkim Indijancima, Kinezima, Japancima, afričkim crncima i novozelandskim Maorima, kao i visok rizik obolijevanja među stanovnicima Sardinije, Parsima i Palestincima nedvojbeno upućuje da su različita rasna i etnička podložnost za MS značajne odrednice nejednake geografske distribucije bolesti (2,24). Tako je i najveća prevalencija MS od 100/100000 utvrđena u populacijama podrijetlom iz sjeverne Europe, kao što je slučaj u Skandinaviji, na Britanskom otočju, sjevernoj regiji SAD i jugu Kanade (30). Bolest se pak javlja sa znatno nižom učestalošću u područjima pretežno naseljenim stanovništvom ostalih rasa (Orijent, Indija, Arapske zemlje, Južna Amerika i Afrika). Tako je u Sjevernoj Americi bolest učestala u dijelovima naseljenim stanovništvom skandinavskog podrijetla, a rijetka među pripadnicima crne rase, ili pak u američkih Indijanaca. U Africi MS je rijetka u pripadnika crne rase, a relativno česta u stanovnika europskog podrijetla (2,24). Slično tome u Australiji i na Novom Zelandu bolest se vrlo rijetko javlja u Aboridžina i Maora, nasuprot visokoj učestalosti među osobama bijele rase. Prevalencija MS niska je (5/100000) u Arapa, a bolest gotovo da i nije dijagnosticirana u mađarskih Roma, Laponaca i Eskima (31).

Iz navedenih podataka razvidno je da se bolest javlja s većom učestalošću u onim područjima gdje je visoka frekvencija gena iz sjevernoeuropskih ili pak skandinavskih populacija, što upućuje na genetičku predispoziciju u razvoju bolesti. Zanimljiva je Poserova teorija (32) o raširenosti bolesti, koja pretpostavlja da su Vikinzi imali odlučujuću ulogu u diseminaciji genetičke podložnosti za MS širom svijeta, budući da su krajem VIII. i početkom IX. stoljeća izvršili prodor u većinu europskih zemalja, naselili se na udaljena područja, trgovali duž riječnih putova te prodrli u Perziju, Indiju i, vjerojatno, Kinu.

U razjašnjavanju etiologije bolesti značajnu ulogu imaju istraživanja migracija iz područja visokog u zonu niskog rizika za MS i obrnuto, koja uglavnom, premda ne uvijek, podupiru važnost okolišnih čimbenika u razvoju bolesti.

Zemlje poput Izraela i Južne Afrike imaju veću incidenciju bolesti no što bi se očekivalo s obzirom na zemljopisnu širinu, vjerojatno stoga što imaju visok nivo imigranata prve generacije Europljana. U Ujedinjenom Kraljevstvu i Sjevernoj Americi rizik za MS u migranata s Dalekog istoka ostaje nizak, dok u migranata iz Afrike i Indije rizik za MS raste u drugoj generaciji, što se djelomično može pripisati i heterogenosti među raznim populacijama (33,34).

Nekoliko studija prevalencije među migrantima pokazuje da ljudi koji migriraju prije puberteta (prije 15 godina) stječu rizik područja u koje migriraju. S druge strane, oni koji migriraju nakon puberteta zadržavaju učestalost bolesti područja s kojeg su migrirali, međutim, taj će se rizik vjerojatno izjednačiti s rizikom zemlje u koju su migrirali već u sljedećoj generaciji (34,35). Novija studija provedena u britanskih i irskih imigranata u Australiji sugerira duži vremenski period rizika za razvoj MS negoli prvih 15 godina života (36). Bez obzira koje su rizične godine za razvoj MS, ukoliko one uistinu postoje, očito je da je bolest aktivna prije no što osobe oboljele od MS stvarno razviju simptome bolesti.

Istraživanja migracija i učestalosti osoba japanskog i kavkaskog podrijetla na Havajima zorno ukazuju na značenje okolišnih čimbenika u MS, koji izgleda mijenjaju prevalenciju oboljelih nakon migracija. Osobe japanskog podrijetla na Havajima imaju prevalenciju 6,5/100000, što je 3 puta više nego li u Japanu (2,1/100000). S druge strane, osobe kavkaskog podrijetla rođene i odrasle na Havajima imaju tri puta manju prevalenciju za MS (10,5/100000) od onih rođenih u Kaliforniji (34).

#### **1.1.4. Okolišni čimbenici u multiploj sklerozi**

Epidemiološki radovi te istraživanja geografske distribucije MS ukazali su na važnost okolišnih čimbenika u MS. Iako istraživanja iz područja populacijske genetike daju neke odgovore, za cjelovitu sliku važno je shvatiti i okolišne čimbenike uključene u razvoj MS. Potencijalni okolišni rizični čimbenici koji se najviše istražuju obuhvaćaju infekcije, vakcinacije, stres, profesionalnu izloženost, klimu i načine prehrane.

Odgovor na pitanje zbog čega je MS rjeđa u tropskim područjima, a česta u umjerenom pojasu, važan je u razumijevanju etiologije i patogeneze bolesti. Pojedina istraživanja sugeriraju da je bolest češća u umjerenim regijama zbog sezonskih fluktuacija u dnevnoj svjetlosti koja utječe na kemiju organizma. Tako je pokazano da su početak bolesti kao i relapsa češći u proljeće negoli zimi (37). Razine vitamina D3 i melatonina pokazuju sezonske varijacije, a čini se da su ujedno i imunološki odnosno neurološki aktivni (34,38). UV-zračenje može imati imunosupresivni efekt i povećava produkciju vitamina D u koži. Vitamin D pozitivno djeluje u slučaju autoimunog encefalomijelitisa i utječe na funkciju T-stanica. Novija istraživanja tako ukazuju na protektivnu ulogu izloženosti sunčevoj svjetlosti u razvoju MS. Premda postoje razlike u dizajnu studija kao i u njihovim rezultatima, moguće je interakcijom genetskih čimbenika koji reguliraju učinak vitamina D i okolišne izloženosti sunčevoj svjetlosti objasniti pojedine razlike u geografskoj varijabilnosti MS. Varijacije u prevalenciji bolesti koje se očituju već na malim geografskim udaljenostima mogu biti posljedica geografskih i mikroklimatskih varijacija, ali i etničkih specifičnosti (kao što je, primjerice, u slučaju Gorskog kotara).

Iako MS nije zarazna bolest, više od stotinjak godina infekcija virusom ili bakterijom smatrana je jednim od glavnih "okidača" bolesti. Tako je i najčešće istraživani uzročni čimbenik u MS svakako infekcija, posebice virusna infekcija preboljena u djetinjstvu, s obzirom da su migracijske studije ukazale na značenje izloženosti nekom agensu tijekom djetinjstva. Prema jednoj teoriji vjerojatno je glavni krivac "sporo djelujući" virus (engl. long-acting virus), tj. onaj koji u organizmu ostane sakriven godinama prije nego što uzrokuje bolest (34). Međutim, do danas nije reproducibilno utvrđena prisutnost virusa, specifičnog viralnog antigena ili virusnog genoma u mozgu, ni u drugom tkivu MS bolesnika (39). Mnoge serološke studije tražile su neizravan dokaz virusnog uzročnika i nastojale pokazati povećanu prisutnost antitijela na nekoliko virusa u serumu i CSF bolesnika, bilježeći povećani titar u odnosu na zdravu kontrolu (40). Međutim, razlike su bile manje očite u usporedbi s braćom, osobama istog HLA tipa ili s osobama koje pate od neuroloških ili drugih upalnih bolesti, te je njihova interpretacija nejasna.

Ospice, zaušnjaci, rubeola i vodene kozice dječje su zarazne bolesti čiji su uzročnici ispitivani kao potencijalni rizični čimbenici u razvoju MS (13,34,35). Tridesetak studija istraživalo je vezu između ospica i MS s različitim rezultatima, a slično je i s rubeolom. Pozitivna korelacija bila je prisutna u slabije dizajniranim istraživanjima, a virus ospica u zabludi je držao istraživače MS gotovo dva desetljeća. Istraživanja zaušnjaka i vodenih kozica nisu pokazala nikavu povezanost između učestalosti tih infekcija i MS.

Epstein-Barr virus (EBV) infektivni je agens od posebnog interesa (13,34). Gotovo 100% MS bolesnika pozitivno je na EBV u usporedbi s 90% zdravih ispitanika. Nekoliko epidemiološko-seroloških istraživanja EBV infekcije i MS utvrdile su povišene vrijednosti antitijela na EBV odnosno serumskog titra u MS bolesnika. Dosadašnji dokazi nedostatni su da pokažu kako EBV infekcija povećava posljedični rizik za MS, iako to ostaje biološki moguće.

Među mogućim infektivnim uzročnicima koji su nedavno apostrofirani još su i humani herpes virus tip 6, retrovirusi i *Chlamidia pneumoniae* (35). Klamidija je također tipičan primjer infekcije povezane s MS i pobudila je veći interes, ali dokazi o povezanosti ipak su prilično slabi. Kad se govori o infektivnim uzročnicima, stavlja ih se u kontekst dobi u kojoj je infekcija preboljena, ali konzistentnih rezultata nema. Nekoliko je istraživanja kroz detaljne intervjuje MS bolesnika utvrdilo da su oni češće preboljeli neke od dječjih bolesti (uključujući ospice, zaušnjake, varičelu i rubeolu) nešto kasnije, u dobi nakon 6 godina.

Iako opservacijske studije do sada nisu identificirale pojedini infektivni agens kao uzročni faktor u MS, niti je MS zarazna bolest, moguće je da bilo koji ili pak nekoliko njih proizvode isti rezultat pod određenim okolnostima (npr. u genetički podložnog domaćina, u kritično doba izloženosti).

Osim same infekcije, istraživala se i eventualna povezanost vakcinacije s MS. Čitav niz prikaza slučajeva u Francuskoj ukazao je na moguću demijelinizaciju koja se razvija nakon vakcinacije protiv hepatitisa B. Ipak studije provedene nakon toga nisu uočile nikakvu korelaciju između vakcinacije (ospice, zaušnjaci, rubeola) i MS (35).

Provedena su mnoga istraživanja u pokušaju da se rasvijetli teorija prema kojoj

ozljeda ili stres dovode do početnih simptoma MS ili čak započinju njezinu egzacerbaciju (35). Međutim, rezultati nisu potvrdili ni ovu hipotezu, iako će većina bolesnika potvrditi nastup ili pogoršanje simptoma nakon veće traume ili stresa. Problem pri ovim istraživanjima predstavlja i sama definicija stresa kao i vremenski period protekao od izlaganja stresnoj situaciji. Što se fizičkog stresa tiče, istraživanja su isključila povezanost s MS, osim malog efekta kranijalne traume na početak bolesti (41). Naime, izgleda da trauma glave povećava propusnost krvno-moždane barijere pri čemu određene stanice lakše prelaze iz krvne struje u središnji živčani sustav, što može utjecati na razvoj MS.

Dokazi za ulogu emocionalnog stresa u etiologiji MS slabi su, ali ostavljaju otvorenu mogućnost tih stresora kao uzročnih čimbenika (35). U svakom slučaju, sama spoznaja da osoba boluje od neke kronične bolesti, pa tako i MS, podiže razinu stresa. Veza između stresa i relapsa ili tijeka bolesti smatra se mogućom, a fizički i emocionalni stresori i dalje se ispituju kao potencijalni rizični faktori u MS.

Nekoliko istraživanja bavilo se korelacijom MS i profesionalne izloženosti, s naglaskom na izloženost organskim otapalima (35,42,43). Međutim, različite studije imaju brojne manjkavosti: upitan period između izloženosti i početka bolesti, nedefinirano trajanje izloženosti da bi se osoba okarakterizirala kao "izložena", uključenost nepotvrđenih MS slučajeva u istraživanje, prilagodba za čimbenike kao što su spol i socioekonomski status, mali broj bolesnika. Bez obzira na brojne manjkavosti, povezanost između organskih otapala i MS ne može se isključiti, a prema Poserovoj hipotezi (44) toksični agensi mogu uzrokovati povremeni gubitak integriteta krvno-moždane barijere, što se smatra prvim događajem u patogenezi formiranja plakova.

Ispitivala se i učestalost MS u industrijskim područjima (42). Tako je u Češkoj utvrđena prevalencija MS od 100/100000 u industrijskom području s razvijenom prvenstveno teškom metalnom i kemijskom industrijom. Slični rezultati ispitivanja dobiveni su u većini zemalja sa snažnim industrijskim regijama, što se opet treba promatrati u kontekstu socio-ekonomskog statusa i razvijenije zdravstvene skrbi.

Iako je ukazano na povezanost fizički napornih profesija poput poljoprivrednih i fizičkih radnika s MS, niti ova ispitivanja korelacije između pojedinih profesija i MS nisu dale konzistentne rezultate (26).

Unatoč mnoštvu provedenih deskriptivnih i analitičkih epidemioloških studija, istraživanje uloge okolišnih čimbenika u etiologiji MS teško je iz više razloga. Svaki okolišni čimbenik može biti samo jedan od mnogih koji mogu potaknuti bolest u genetički podložne osobe, a taj čimbenik ujedno ne mora biti ni neophodan niti mora biti dostatan da izazove bolest. Interakcija uzročnih komponenata može varirati od studije do studije dajući nekozistentne rezultate. Izloženost navodnom agensu vjerojatno je visoka i među zdravim i među osobama oboljelim od MS. MS je ipak rijetka bolest, vjerojatno s dugim periodom latencije između izloženosti i pojave simptoma bolesti, što dodatno otežava utvrđivanje je li izloženost prethodila bolesti. U svakom slučaju, danas se smatra da su za nastanak MS odgovorni okolišni čimbenici koji djeluju kao "okidači" bolesti u genetički podložnih osoba.

#### **1.1.5. Genetika multiple skleroze**

MS je složena bolest multifaktorijalne etiologije, za čiji su razvoj potrebni genetički i okolišni čimbenici. Ideja da genetički čimbenici imaju ulogu u MS javila se još u 1890-tim godinama otkrićem obiteljskih slučajeva. Prva pak genetička povezanost zabilježena je 1972. godine za HLA klasu I antigena. Međutim, od tada je prošlo više od 30 godina, a još uvijek nije razjašnjena etiologija bolesti niti je precizirana relativna uloga gena i okoliša. Kakogod, sistemska genetičko-epidemiološka i molekularno-genetička istraživanja osiguravaju važan uvid u razumijevanje bolesti (5).

##### **1.1.5.1. Obiteljska multipla skleroza**

Već je spomenuto da ulogu genetičkih čimbenika u etiologiji MS podupiru saznanja o povećanom relativnom riziku braće i sestara oboljelih u usporedbi s općom populacijom, kao i povećanoj konkordantnoj stopi u monozigotnih u usporedbi s dizigotnim blizancima (3).

Najveći broj ispitivanja u MS srodnika (blizanaca, braće i sestara, obitelji s više oboljelih) proveden je u Kanadi i Velikoj Britaniji . Nasljedna sklonost za MS povećava se za pojedinca ako u obitelji ima bolesnog člana. Od 15-20% bolesnika u svojoj bližoj ili daljnjoj rodbini ima oboljelog od MS i u većini slučajeva radi se o dvoje do troje oboljelih unutar jedne obitelji (45). Studije koje su ispitivale učestalost među srođnicima aficiranih osoba utvrdile su da najčešće obolijevaju braća i sestre bolesnika (rizik 4%), što može biti posljedica konasljeđivanja faktora podložnosti, ali i dijeljenja zajedničkih okolišnih čimbenika tijekom djetinjstva. Rizik za djecu bolesnika iznosi 2%, dok srođnici drugog stupnja imaju rizik javljanja bolesti 1% (31,45).

Prema Galtonu razlikovanje relativnog doprinosa genetičkih i okolišnih čimbenika u multifaktorijalnim bolestima omogućuju studije blizanaca, a usporedba konkordantnih stopa između monozigotnih i dizigotnih parova omogućava procjenu specifično genetičkih čimbenika u etiologiji bolesti. Ako je jedan od blizanaca obolio od MS, mogućnost da oboli i drugi u prosjeku je 25-30% kod jednojajčanih i 3% u dvojajčanih blizanaca (46). Navedena visoka stopa podudarnosti bolesti u monozigotnih blizanaca u usporedbi s dizigotnim blizancima potvrđena je u više populacijskih studija (5), dok su novija istraživanja u više od polovice blizanačkih parova otkrila demijelinizacijske asimptomatske lezije u blizanca koji nije obolio od MS.

Ispitivanja konjugalnih parova (oba supružnika boluju od MS), iako rijetka, ukazuju da se obiteljski slučajevi MS javljaju zbog dijeljenja zajedničkih čimbenika rizika. Iako su pojedinačni slučajevi konjugalnih parova poznati već desetljećima, provedena su svega dva systemska istraživanja učestalosti MS u njihovih potomaka (47,48). U oba istraživanja rizik za potomke značajno je viši (30,5%) negoli u onih potomaka (2,5%) kojima je samo jedan od roditelja obolio, što jasno ukazuje da nesrodne oboljele osobe moraju imati zajednički barem dio gena podložnosti za bolest .

Konsangvinitet je rijedak među pripadnicima bijele rase i, koliko je poznato, samo je jedno populacijsko istraživanje rizika u potomaka provedeno u slučaju MS (49). Rezultati,



iako dobiveni na malom uzorku, pokazuju da je rizik gotovo četiri puta veći za braću i sestre MS bolesnika čiji su roditelji prvi rođaci (5).

Nadalje, rezultati adoptivnih studija nedvojbeno pokazuju da usvojena djeca, iako od ranog djetinjstva odgojeni kod MS bolesnika, nemaju povećan rizik za MS u odnosu na rizik opće populacije (34). Podaci tako opet ukazuju da je obiteljska MS povezana s dijeljenjem zajedničkih gena prije negoli s dijeljenjem zajedničkog okoliša.

#### **1.1.5.2. Genetička podložnost za multiplu sklerozu**

Nastojanja da se utvrde geni združeni s patogeneom MS ili pak oni koji utječu na klinički tijek bolesti zasnivaju se uglavnom na funkcionalnim istraživanjima gena kandidata, genomskom probiru vezanosti (engl. linkage genome screen) te s njime povezanim studijama mapiranja gena kandidata, a u novije vrijeme provode se i genomska istraživanja genske ekspresije uz pomoć mikročipova (45,50).

Funkcionalna istraživanja gena kandidata temelje se na njihovoj potencijalnoj biološkoj važnosti u razvoju bolesti. Zbog autoimunog karaktera MS pokušaji identificiranja gena kandidata zasnivali su se na istraživanju polimorfnih gena čiji su produkti uključeni u imunološki odgovor. Istraživanja mogućih gena kandidata, kao što su HLA sustav, T-stanični receptorni geni (engl. T-cell receptor gene - TCR), čimbenik nekroze tumora (engl. tumor necrosis factor - TNF), geni za citokine, kemokine, mijelinski antigeni i imunoglobulinski geni, uglavnom nisu pokazala očekivani genetički utjecaj ovih gena na podložnost za MS (51). Naime, s iznimkom HLA regije, brojni rezultati dobiveni za različite gene najčešće nisu ponovljeni u kasnijim nezavisnim istraživanjima. Tako je npr. mijelin bazični protein (MBP) lociran na kromosomu 18q22-q23, koji je važan element u sustavu sintetiziranja mijelina te ima ulogu u održavanju stabilnosti mijelina i inicijaciji remijelinizacije, pokazao pozitivnu korelaciju s MS u studijama provedenim u genetički izoliranoj finskoj populaciji, međutim, rezultati nisu potvrđeni u drugim populacijama (52,53). Geni kandidati ispitivani u eksperimentalnom encefalomijelitisu (engl. experimental encephalomyelitis - EAE) na mišjem modelu MS također su dali nekonzistentne rezultate.

HLA regija najpolimorfnije je genski sustav u čovjeka lokaliziran na 6q21.1-21.3, a povezuje se s čitavim nizom, najčešće autoimunih bolesti. Ipak, u ovoj regiji nalaze se i drugi geni koji nisu izravno povezani s imunološkim odgovorom. Danas se HLA regija, koja se proteže na 4,5 Mb i sadrži dvjestotinjak gena najčešće uključenih u regulaciju razvoja i sazrijevanja T-stanica kao i različite imunološke procese, nedvojbeno povezuje s MS (54). Međutim, identifikacija uzročnih alela i dokazivanje prezentacije antigena direktno povezanih s MS odvija se sporo.

Iako je najprije prijavljena združenost HLA klase I antigena A3 i B7 s MS, daljnja istraživanja utvrdila su jaču povezanost HLA klase II antigena DR15 i DQ6 s polimorfizmima Dw2 i DR2. U svakom slučaju, HLA uzorci u MS bolesnika razlikuju se od onih u zdravih osoba. Istraživanja provedena u sjevernoj Europi i Americi detektirala su tri HLA varijante koje se češće javljaju u MS bolesnika negoli u općoj populaciji. Tako čvrstu asocijaciju s 2 - 4 puta većim relativnim rizikom bolesti pokazuje HLA DRB1\*1501, DQA1\*0102 i DQB1\*0602 haplotip. Međutim, jaku neravnotežu vezanosti gena (engl. linkage disequilibrium – LD) u ovoj regiji otežava utvrđivanje specifične podložnosti s obzirom da se u sjevernoeuropskim populacijama HLA DRB1\*1501, DQA1\*0102 i DQB1\*0602 gotovo uvijek javljaju zajedno (52).

I studije genomskog probira vezanosti izdvojile su HLA regiju kao jedinu jasno povezanu s MS (45). Izgleda da povezanost s HLA-DR2 alelom objašnjava signal u ovom probiru, ali točan mehanizam kojim gen ili geni utječu na rizik za bolest tek treba utvrditi.

Nekoliko populacija koje nisu podrijetlom iz sjeverne Europe imaju različite DRB1 asocijacije s MS. Tako je u bolesnika sa Sardinije utvrđena povezanost s DRB1\*1501 i s DRB1\*0301 (DRB1\*17) i DRB1\*0405 alelima, na Kanarskim otocima i u Turskoj s DR4 alelom. U američkih Afrikanaca koji boluju od MS utvrđen je DQB1\*0602-DQA1\*0102 genotip prisutan na DRB1\*1501 haplotipu kao i DRB1\*1503 i DRB1\*1101 koji nosi DQ6 haplotip. Iako su lokusi DR15 i DQ6 usko vezani, pa se *crossing-over* između njih rijetko događa, nedavna istraživanja u ovoj populaciji ukazuju da su geni podložnosti za MS smješteni bliže DQ negoli DR genima (5,45).

Ispitivanje MS i antigena HLA sustava u Gorskom kotaru ukazalo je da se autohtoni MS bolesnici razlikuju od kontrola za antigen DR2 te da imaju povišen rizik za antigene A1 (RR=2,39). Genska analiza pak izdvojila je prvenstveno DRB1\*15, ali i DRB1\*04, DQB1\*0303 i DQB1\*0602 kao rizične alele (55).

Iako je još uvijek nepoznata osnova združenog HLA nasljeđivanja i MS moguće je da molekule kodirane u HLA regiji, kao što su limfotoksin (LT) i TNF- $\alpha$  imaju kritičnu ulogu u imunopatogenezi MS. Tako se pretpostavlja da T-stanične linije CD4+ sudjeluju u MS patogenezi tako što nakon aktivacije na periferiji ulaze u CNS i u kontaktu s lokalnim antigen-prezentirajućim stanicama prepoznaju autoantigen. Nakon lokalne restimulacije te bi stanice mogle proizvoditi solubilne čimbenike tipične za upalnu reakciju, kao što su interferon- $\gamma$ , LT i TNF- $\alpha$ . Navedeni citokini imaju jak lokalni utjecaj te induciraju dodatne inflamatorne stanice, a LT i TNF- $\alpha$  i direktno doprinose oštećenju mijelina (14,16).

Geni za čimbenik nekroze tumora TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  polimorfni su geni kodirani u regiji 6p21.1-21.3. Budući da su TNF- $\alpha$ 11 i TNF- $\beta$ 4 u neravnoteži vezanosti s DR(2)15, pitanje je imaju li ti lokusi nezavisan učinak u podložnosti za MS. Prva studija 13 polimorfizama TNF- $\alpha$  gena i 5 polimorfizama TNF- $\beta$  gena odstupanja u distribuciji polimorfizama pripisala je efektu povezanosti za DR gene. Niz studija ispitivalo je prvenstveno polimorfizme TNF- $\alpha$  gena, a dobiveni proturječni rezultati različito su interpretirani, što ukazuje da LD u ovoj regiji otežava utvrđivanje zasebnog doprinosa TNF lokusa u podložnosti za MS (52,53).

Prve alelske studije proteina toplinskog šoka (engl. heat-shock protein - HSP) koji su kodirani trima polimorfnim lokusima (HSP70-1, HSP70-2 i HSP70-H) susjednim klasi II HLA regije nisu pokazale povezanost s MS u bolesnika iz Italije i Japana bez obzira na DR2 stratifikaciju (52).

Osim gena smještenih u HLA regiji ispitivani su i geni lokalizirani na drugim kromosomima, ali funkcionalno povezani s HLA regijom i/ili imunološkim odgovorom. T-stanični receptori koji se vežu direktno za HLA antigene u kontekstu prezentacije epitopa i drugih pomoćnih molekula predstavljali su pred desetak godina potencijalne kandidate u razvoju MS (5,52). Međutim, polimorfizmi TCR alfa i beta gena u većini ispitivanja nisu

pokazali združenost s MS. Jedna studija prijavila je povezanost u braće i sestara, dok su druge pronašle pozitivnu korelaciju tek nakon stratificiranja prema HLA tipu i kliničkoj ekspresiji bolesti. Stoga bi doprinos TCR razvoju MS, ukoliko uopće postoji, bio polimorfizam koji djeluje slabo i epistatski s lokusima podložnosti lociranim u HLA regiji.

Aktivacija T-stanica počinje s interakcijom TCR i HLA-epitop kompleksa, kao i kostimulacijom interakcije CD28 i B7 liganda na antigen-prezentirajućim stanicama. U toj fazi aktivacije ekspresija CTLA-4 antigena na površini T stanice pojačana je i molekula može vezati B7 ligand na antigen prezentirajućim stanicama. Međutim, vezanje B7 za CTLA-4 antigen signalizira kraj proliferacije T-stanica. S obzirom da je CTLA-4 dobro poznat terminator staničnog odgovora, novije su studije pomno istražile polimorfizme ovog gena. Nekoliko studija ne podržava hipotezu da polimorfizmi u CTLA-4 genu predstavljaju podložnost za MS (56,57), dok druge ukazuju na slabu povezanost MS s podložnosti i/ili progresijom bolesti (58,59).

Detekcija plazma stanica i B limfocita unutar područja akutne demijelinizacije te visoka učestalost oligoklonskog udruživanja u uzorcima spinalne tekućine MS bolesnika potaknula su istraživanja alelskih asocijacija i povezanosti gena koji kodiraju konstantni i varijabilni dio teškog imunoglobulinskog lanca V i C regije i njihovog Fc receptora. Polimorfna priroda imunoglobulinskog teškog i lakog lanca omogućila je njihovu procjenu kao gena kandidata podložnosti za MS. Prvotne studije opisivale su serološki definirane specifičnosti, a molekularne analize upotpunile su početna istraživanja (52,53). Teški lanac kodiran je klasterom gena lociranom na kromosomu 14q32, 2p12 i 22q11, a laki lanac kodiran je genima na kromosomima 2p12 i 22q11. Dvije populacijske studije pokazale su povezanost  $V_H2-5$  polimorfizma s bolešću, dok kasnije studije nisu potvrdile tu povezanost (52). Moguću genetičku povezanost utvrdio je Wood sa sur. (60) analizirajući 124 obitelji s obiteljskom MS. Sugestiju da je  $V_H2$  lokus povezan s patogenezom MS podržale su i dvije studije genomskog probira, ali status 14q i lokusa za teški lanac imunoglobulina još uvijek je provizoran.

Što se Fc receptora tiče, Myher i sur. (61) nisu pronašli efekt podložnosti za MS, ali

su predložili da je homozigotnost za pojedine FcyR alele (FcyRIIB NA2 i FcyRIIA) povezana s benignim tijekom MS u Norveških bolesnika. Međutim, Breij i sur. (62) nisu pronašli povezanost tri FcyR alela ni s podložnošću za MS ni s kliničkom ekspresijom bolesti na velikom broju ispitanika.

Istraživane su i molekule koje posreduju u upalnim procesima ili participiraju u staničnom signaliziranju i opet su dobiveni kontradiktorni rezultati za gene koji kodiraju CD45 i CD24 molekule (52).

U posljednjih desetak godina intenzivno se istraživalo polimorfizme citokina i kemokina te njihov doprinos razvoju MS. Osim već spomenutog TNF- $\alpha$ , istraživanja iz ovog područja uključila su polimorfizme nekoliko interleukina (IL) i njihove receptore: IL1, IL1a, IL1B, interleukin-1 receptor antagonist (IL1 RA), IL2, IL4, IL6, IL7R, IL10, limfocitni aktivacijski gen 3 (LAG3), IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-22, IL-26 (52,53). Dobiveni rezultati najčešće ukazuju na slabu korelaciju s tijekom bolesti, kao što je slučaj s IL1 RA ili IL 1B, ali rezultati nisu uvijek potvrđeni u različitim populacijama kao npr. za IL 4 i dr. Pojedine asocijacije gena s bolešću odbačene su kao npr. IFN- $\beta$ , dok su pojedini aleli kao CA<sub>12</sub> IFNG gena pokazali protektivan učinak. Ipak posljednje ispitivanje 334923 polimorfizma jednog nukleotida (engl. single-nucleotide polymorphisms, SNPs) u 931 obitelji pokazalo je da osim SNPs u HLA-DRA lokusu postoje još dva gena čiji su polimorfizmi prediktori MS (63). To su geni za podjedinice receptora za interleukin 2 (IL2RA) i interleukin 7 (IL7RA). Za mutacije u tim genima već je otprije poznato da su povezane s *diabetes mellitusom* tip 1 i drugim autoimunim poremećajima, što opet ukazuje na autoimunu komponentu MS (64).

Kemokini i adhezijske molekule poput interstanične adhezijske molekule (ICAM) utječu na upalu tako što povećavaju migraciju i nakupljanje aktiviranih imunih stanica na mjestu upale. Niz izoliranih studija ukazalo je na moguću povezanost gena za te molekule s razvojem MS (52,53). Mycko i sur. (65) prijavili su da alel ICAM1 u egzonu 6 utječe na podložnost za MS. Dvije studije ukazale su da polimorfizam monocitnog kemotaktičnog proteina 3 (MCP-3) ima zaštitnu ulogu, dok je pak isti alel u ruskoj populaciji povezan s ranijim nastupom bolesti (52). Nefunkcijski polimorfizam matriks metaloproteaze 9 (MMP9) u

jednom istraživanju korelira, dok u drugom ne, s podložnošću za MS. U jednom istraživanju utvrđena je povezanost između G/A polimorfizma RANTES kemokina i MS (66). Barcellos i sur. (67) opisali su kasniji početak bolesti u bolesnika s delecijom  $\Delta 32$  u genu za kemokinski receptor CCR5, dok većina kasnijih istraživanja, kao ni studija provedena u našoj populaciji (68), nisu potvrdile povezanost ovog  $\Delta 32$  CCR5 alela s bolešću.

Da bi se ispitalo moguće značenje proteolitičkih mehanizama na razvoj upalnih lezija u MS, ispitan je polimorfizam u promotorskoj regiji gena za inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) kao rizični čimbenik u MS. Aktivatori plazminogena (PA) glavni su pokretači kaskadne aktivnosti nekoliko metaloproteaza. Aktivnost samoga PA može biti zakočena posredstvom PAI-1. U žarištima MS prisutni su i PA i PAI-1. Luomala i sur. (69) pokazali su povezanost navedenog polimorfizma PAI-1 gena s podložnošću na bolest u žena. Alel povezan s bolešću korelira s nižom PAI-1 produkcijom, što smanjuje inhibiciju proteinaze i stoga pojačava migraciju stanica kroz izvanstanični matriks. U hrvatskih i slovenskih MS bolesnika uz PAI-1 istražen je i utjecaj insercijsko/delecijskog polimorfizma tkivnog plazminogen aktivatora (TPA) na podložnost i klinički ekspresiju MS (70). TPA je serin proteaza koja katalizira aktivaciju plazmina, koji ima ulogu u fibrinolitičkom sustavu. Iako pojedinačno gledajući navedeni polimorfizmi ne utječu na predispoziciju za bolest, TPA DD/PAI-1 4G4G kombinacija genotipa pokazala je graničnu značajnost u reduciranom riziku za MS, sugerirajući gen-gen interakciju.

Tražeci razlog za povećanu učestalost MS u žena, Niino i sur. (71) prijavili su povezanost PvuII alela gena za estrogenski receptor (ESR) i podložnosti za MS, dok je XbaI polimorfizam češći u bolesnika s ranijim nastupom bolesti. *Microarray* probirom identificiran je osteopontin (OPN) kao mogući upalni medijator u lezijama multiple skleroze, te je potom ispitan kao mogući gen podložnosti. Iako su neki polimorfizmi ovog OPN gena češći u MS bolesnika u japanskoj populaciji, daljnja istraživanja nisu to potvrdila (52).

Premda neke činjenice upućuju da polimorfizmi gena uključenih u oksidativni stres nisu direktno uključeni u podložnost za MS, Mann i sur. (72) pokazali su povezanost glutathion S-transferaze (GST) s bolešću. Iako GSTT1 i GSTM1 geni nemaju ključnu ulogu u

patogenezi bolesti, nedavno istraživanje ukazuje na povezanost s MS kroz moguću ulogu u detoksikacijskom putu (73).

Ponovnom analizom 34 gena kandidata 2004. godine Barcellos i sur. (74) ukazali su na povezanost promotora dušikove-oksidaže-sintetaze u regiji 17q11 s MS u populacijama europskog podrijetla i u afričkih Amerikanaca. Asocijacija je potvrđena i analizom vezanosti (engl. linkage analysis) (CCTTT)n polimorfizma u obiteljskim slučajevima.

Obiteljske analize vezanosti i studije genomskog probira pokazale su između ostalih regija i povezanost 17q23 regije s MS (53). Jedan gen koji se nalazi na tom lokusu je i gen za angiotenzin-konvertirajući enzim (ACE). ACE je peptidaza koju proizvode aktivirani makrofazi. Osim dobro poznate uloge u regulaciji krvnog tlaka i elektrolita, sudjeluje i u T-staničnoj stimulaciji pojedinih antigenih peptida i utječe na propusnost krvno-moždane barijere. Prema jedinom dosada objavljenom istraživanju insercijsko-delecijskog polimorfizma ovog gena u bolesnika iz Hrvatske i Slovenije utvrđena je razlika u distribuciji ACE I/D alela i genotipova u muških pacijenata, na način da bi se ACE DD genotip mogao smatrati rizičnim čimbenikom u MS muških bolesnika (75).

Mijelinska ovojnica sadrži produkte nekoliko gena koji kodiraju glikoproteine. Wood i sur. (76) su 1996.godine osigurali indirektan dokaz za hipotezu prema kojoj mutacije u strukturnim genima za mijelin pridonose podložnosti za MS. Nekoliko studija istraživalo je tako utjecaj MBP gena, ali, kao što je već spomenuto, različiti rezultati istraživanja sugeriraju da polimorfizmi ovog gena ne doprinose podložnosti za MS u većine bolesnika (53). Gen za mijelin oligodendrocitni glikoprotein leži telomerno od HLA regije, ali niti varijante ovog mijelinskog gena ne pridonose podložnosti za MS. Niti studije koje ispituju gene za proteolipidni protein i mijelin asociirani glikoprotein nisu se pokazale informativnima.

Više od 35 faktora rasta ili gena koji kodiraju strukturne komponente živčanog sustava procijenjeni su kao mogući geni kandidati i većina ih nije pokazala povezanost s bolešću (52). Ipak, valja izdvojiti apolipoprotein E (ApoE) koji je u više navrata istaknut kao gen kandidat koji utječe na tijek multiple skleroze. ApoE je ligand u lipidnom transportu koji proizvode glija stanice, a uključen je i u normalni metabolizam neurona i u odgovor na

ozljeđu. Nekoliko neuroloških poremećaja povezuje se s polimorfizmima ApoE gena smještenog u 19p13 regiji koja se, osim HLA regije, također pokazala kritičnom za razvoj MS. Evangelou i sur. (77) prvi su prijavili povezanost ApoE-ε4 s težom kliničkom slikom i bržom progresijom bolesti, dok su Kantarci i sur. opisali protektivni učinak ApoE- ε2 alela u žena. Uslijedilo je nekoliko potvrdnih izvještaja, ali bilo je i oprečnih rezultata, moguće zbog različitih kriterija korištenih u nizu ispitivanja. Burwick i sur. (78) proveli su meta-analizu postojećih literaturnih podataka koja je pokazala jedino utjecaj ApoE-ε4 alela na težinu kliničke slike u muškaraca homozigota.

U manjoj mjeri ispitivan je i ApoC lokus, gen za receptor gama-aminobutirične kiseline (GABA<sub>A3</sub>) i gen za dopamin D2 receptor, gen za prolaktin i njegov receptor, ali rezultati nisu sugerirali asocijaciju s bolešću (53).

Receptor za vitamin D ispitivan je poradi niske prevalencije MS u područjima s povećanom insolacijom ili zbog imunosupresivnog djelovanja vitamina D. Različiti polimorfizmi u različitim populacijama još se uvijek ispituju a dosadašnji rezultati ne mogu isključivo potvrditi, niti mogu opovrgnuti tezu o značenju vitamina D u patogenezi MS (34).

Spoznaja da se klinički fenotip MS i prisutnost oligoklonskih područja u spinalnoj tekućini mogu pojaviti i u svezi s patološkim mutacijama u mitohondrijskoj DNA potaklo je detaljnu procjenu mitohondrijskih gena kao kandidata za podložnost u MS, ali niti jedna mutacija niti polimorfizam nisu pokazali povezanost s MS u sistemskom probiru neselektiranih bolesnika (52).

S druge strane, inicijalne studije genomskog probira koje traže genetičku povezanost svojstva i polimorfni markera u cijelom genomu identificirale su više od 70 lokusa podložnosti. Međutim, samo su neke regije, uključujući 6p21, 3q21-22, 18p11, 17q22-24, 17p11 i 19q13 (52,80), potvrđene u dva ili više istraživanja. Unatoč većem broju studija vezanosti provedenih na razini cijelog genoma, očekivani genetički doprinos u razjašnjavanju MS nije postignut. Studije genomskog probira pokazuju nedovoljnu statističku snagu, čemu pridonosi i ipak podcijenjena genetička složenost bolesti.



Navedene studije ukazuju da HLA doprinosi, iako u blažem obliku, općoj podložnosti za MS, ali da postoji veliki broj drugih HLA i "ne-HLA" gena koji određuju predispoziciju za MS. Međutim, s iznimkom HLA gena, većina rezultata pokazala se teško ponovljivim u ostalim populacijama. Različiti rezultati u navedenim studijama, koji se odnose na utjecaj različitih gena i lokusa, mogu se objasniti genetičkom i etiološkom heterogenosti u MS, a buduće populacijske i obiteljske studije trebaju tek doprinijeti razjašnjavanju genetičke osnove MS.

Kompleksni genetički poremećaji vjerojatno podliježu različitim okolišnim čimbenicima i mnogi procesi doprinose njihovoj patogenezi. U MS mnogi ispitivani čimbenici, posebice oni koji sudjeluju u imunom odgovoru, kao što su citokini, kemokini ili receptori na površini stanice, pokazuju plejotropna svojstva i imaju brojne funkcije (14). Stoga ne čudi da dosadašnja istraživanja usmjerena uglavnom na jednu molekulu ili gen nisu ispunila očekivanja, te nije izdvojen neki biomarker koji snažno korelira s kliničkom aktivnošću i patogenezi bolesti. Stoga neki noviji radovi prate istovremeno nekoliko funkcionalno povezanih gena, i tek kombinacija pojedinih polimorfizama pokazuje određenu korelaciju s bolešću.

## **1.2. Željezo i multipla skleroza**

Posljednjih godina otvara se novo područje u istraživanju neurodegenerativnih poremećaja i sve veći broj činjenica ukazuje na moguć utjecaj željeza u etiologiji tih bolesti, pa tako i u MS (6-9,80,81). Željezo je zastupljeno u mozgu i neophodno je za njegov opsežan oksidativni metabolizam.

Željezo je jedan od ključnih elemenata u staničnom razvoju i rastu, preduvjet je za mnoge biokemijske reakcije, potrebno je za DNA sintezu, transport kisika i elektrona, kao i za stanično disanje. Iako je željezo nužan element u ljudskom organizmu, ima ga razmjerno malo, a njegov je suvišak štetan. Slobodno željezo ima sposobnost da generira oksidativne radikale koji oštećuju osnovne biološke elemente stanice kao što su lipidi, proteini i DNA. Željezo je moćan prooksidans i uzrokuje oksidativni stres stanice koji se očituje u

peroksidaciji lipidnih membrana (82). Tako nastaju oštećenja mikrosoma, lizosoma i mitohondrija, zatim slijedi štetno djelovanje mikrosomskih enzima, oštećenje dišnih lanaca mitohondrija i izlaženje hidrolitičkih enzima iz lizosoma. Svako takvo oštećenje ili njihova kombinacija mogu prouzročiti smrt stanice. Molekule koje su oštećene slobodnim radikalima uključene su i u inicijaciju autoimunog odgovora. (83)

Željezo je kao kofaktor mnogih proteina važno i za normalno funkcioniranje neurona. Ono ima ključnu ulogu u mijelinogenezi, staničnoj imunosti i otpornosti na infekciju. Oštećenje mijelina, autoimuni odgovor i virusna infekcija neki su od predloženih mehanizama za razvoj MS na koje disregulacija željeza ima utjecaj. Esencijalno je za formiranje mijelina jer je kofaktor potreban za biosintezu kolesterola i lipida, a uključeno je i u formiranje neuronskih plakova (84). Tako je visoka koncentracija željeza ustanovljena već u zdravih osoba u oligodendrocitima odgovornim za sintezu lipida te u samom mijelinu. Otkriće receptora za feritin na membrani oligodendrocita koji omogućavaju unos željeza u ove stanice dodatno podržava ulogu željeza u procesu mijelinogeneze. Connor i sur. (85) su nepravilnosti u mentalnim i motoričkim funkcijama te u produkciji mijelina povezali s nedostatkom željeza u CNS.

S druge strane, željezo je na složen način uključeno u upalne procese, a akumulacija željeza može povećati toksičnost okolišnih i endogenih toksina i predisponirati osobu za virusnu infekciju. Virus preboljen u djetinjstvu često se navodi kao mogući čimbenik u razvoju MS. Patogeni za svoj rast i opstanak trebaju dostupno željezo. Stoga, tijekom infekcije dolazi do redukcije željeza u plazmi, što uključuje vezanje željeza na transferin i supresiju izlaska željeza iz makrofaga (86,87).

Nekoliko dosadašnjih studija ukazalo je da prekomjerno nakupljanje željeza povećava oksidativni stres, što bi moglo dovesti do obolijevanja od neurodegenerativnih bolesti kao što su MS, Parkinsonova, Alzheimerova i Huntingtonova bolest (88-91). Također, željezo može direktno doprinositi patogenezi MS promovirajući produkciju slobodnih radikala, oksidativni stres, lipidnu peroksidaciju i neurotoksičnost u sivoj tvari.

Nedavno je pokazano da je patološko nakupljanje željeza, vidljivo kao T2 hipointenzitet u sivoj tvari mozga MS bolesnika, povezano s fizičkom nesposobnošću, trajanjem i tijekom bolesti te atrofijom mozga (81,92). Naime, težina kliničke slike i tip bolesti ne odgovaraju u cijelosti plakovima demijelinizacije u bijeloj tvari mozga otkrivenim tehnikama konvencionalne MR. Međutim, MS nije samo bolest bijele tvari već se oštećenja nalaze i u sivoj tvari mozga, što danas može vizualizirati ne-konvencionalna MR tehnika. Publicirane slike nekonvencionalne MR ukazuju da su TZV. "crne rupe" u T-2 mjerenoj slici vjerojatno posljedica taloženja željeza dublje u sivoj tvari mozga, a dosad je već nekoliko studija ukazalo da te zone koreliraju s tjelesnim invaliditetom, tijekom bolesti i atrofijom mozga (81,92,93). Stoga je moguće da siva tvar predstavlja primarnu i inicijalnu metu bolesti, što vodi do degeneracije aksona i posljedične demijelinizacije. Još uvijek nije utvrđeno pridonosi li abnormalno taloženje željeza u mozgu patofiziologiji MS ili je pak epifenomen neurodegeneracije.

Također i povišene vrijednosti feritina u serumu MS bolesnika govore o mogućnosti da ovaj biokemijski parametar ukazuje na abnormalnosti metabolizma željeza u MS (94).

Iako istraživanja koja se provode posljednjih godina upućuju na moguću ulogu metabolizma željeza u MS, kompleksno molekularno-genetičko istraživanje te uloge do sada nije provedeno.

### **1.3. Metabolizam željeza i njegova genska regulacija**

S obzirom da je željezo sastavni dio većine intracelularnih enzima, zastupljeno je u svim stanicama organizma. Oko 2/3 željeza nalazi se u hemoglobinu, a gotovo 1/3 u rezervama, u mononuklearno-makrofagnom sustavu prvenstveno jetre, koštane srži i slezene. Otprilike 4% željeza sudjeluje u izgradnji mioglobina u mišićima, a daljnjih 1% je u enzimima kao što su katalaze, peroksidaze, u citokromima, ksantin-oksidazi i dr (95).

Globalno je homeostaza željeza regulirana na nivou apsorpcije iz gastrointestinalnog (GI) trakta, što uključuje interakciju mnogih proteina kao što su Hfe, transferin (Tf), transferinski receptor (TfR), regulirajući proteini željeza (Irp) i dr. Normalno se sadržaj

željeza u organizmu (3,5 - 4 g) održava tako da je apsorpcija željeza u sluznici crijeva jednaka gubitku, oko 1 - 1,5 mg/dan. Apsorpcija neprimjerena potrebama organizma uzrokuje povišenje željeza u plazmi, povećano zasićenje transferina te povišenje feritina (96). Unatoč preopterećenju organizma željezom, ono se i dalje apsorbira i deponira.

Razumijevanje genetskih grešaka koje vode do prekomjernog nakupljanja željeza bilo je otežano zbog činjenice da točan mehanizam apsorpcije i regulacije te apsorpcije nije poznat. Dodatnu prepreku predstavlja činjenica da se apsorpcija organskog (na hem vezanog) željeza, barem u svom početnom dijelu, razlikuje od apsorpcije anorganskog željeza (97). Željezo koje unosimo hranom uglavnom je u Fe<sup>3+</sup> obliku. Apsorbira se međutim u Fe<sup>2+</sup> obliku nakon djelovanja Dcytb reduktaze iz zrelih enterocita (98). Primarno je mjesto apsorpcije dvanaesnik, a manjim dijelom željezo se apsorbira u tankom crijevu.

Regulacija unosa željeza u organizam odvija se na dvije strane tog epitela: apikalnoj i bazolateralnoj strani stanične membrane. Predložena su tri puta apsorpcije kroz apikalnu membranu: pomoću divalentnog metalnog transportera 1 (Dmt1), pomoću mucina, proteina teškog 56 kD, koji je mobilferin, integrin i željezo reduktaza, te apsorpcija željeza u obliku hema.

Transport željeza preko bazolateralne membrane vilusa enterocita uključuje najmanje dva proteina: feroportin 1 (Fp1, zvan još i Ireg1 i Mtp1) i ferooksidazu zvanu hephaestin (Hp) (99). Naime, Fp1 prenosi reducirano željezo (Fe<sup>2+</sup>) preko bazolateralne membrane. Prije no što se to željezo veže za transferin, oksidira se djelovanjem Hp.

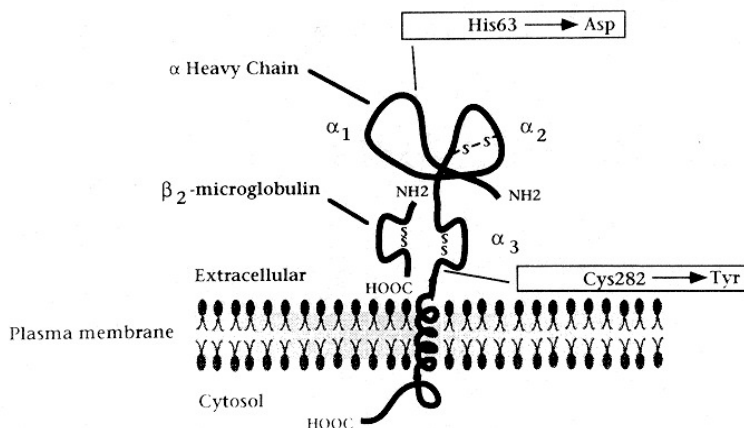
Za razliku od organskog željeza koje ulazi u intestinalne stanice neposredno, anorgansko se željezo prenosi pomoću transportnog sustava neovisnog o transferinu. Na površini intestinalnih stanica veže se s polipeptidnim dimerom, čiji su sastavni dijelovi težine 90 odnosno 150 kDa (27). Mobilferin, protein povezan sa željezom, vezuje se na citosolni C-terminalni kraj  $\alpha$ -lanca integrina. Nastaje kompleks željeza, mobilferina, integrina, flavin monooksigenaze i  $\beta$ 2-mikroglobulina (paraferitin). Nije pojašnjeno kako željezo u takvom kompleksu stiže do transferina (97).

Željezo se u krvi prenosi vezano na transferin, transportnu bjelančevinu koja se sintetizira u jetri. Tako vezano željezo prenosi se do tkiva gdje je potrebno. Tamo pomoću receptorski posredovane endocitoze ulazi u stanice preko transferinskih receptora. Između koncentracije željeza u krvi i koncentracije slobodnog transferina postoji negativna povratna sprega. U normalnom fiziološkom stanju u krvi je 30% transferina zasićeno željezom. Kad je zasićenost transferina željezom veća, željeza je u krvi previše (100).

Željezo koje se u stanicama ne koristi veže se na staničnu bjelančevinu apoferritin i pohranjuje se kao topivi ferritin. Višak je slobodnog željeza toksičan, i zato takav način pohranjivanja predstavlja zaštitu za stanicu. Iako ferritin lako veže velike količine željeza (4500 mola željeza na 1 mol bjelančevine), u normalnim je uvjetima rijetko zasićen. Ako do prekomjerne zasićenosti ipak dođe, ferritin se uz pomoć staničnih lizosoma razgradi u netopivi hemosiderin. Koncentracija željeza uravnotežava sintezu ferritina u stanicama – pri višim koncentracijama željeza u stanicama također je i koncentracija ferritina povišena (100).

U regulaciju željeza između ostalih proteina neposredno je uključen i Hfe protein. Sastoji se od 343 aminokiseline i strukturno je srodan molekulama HLA tipa I (slika 1). Sastavljen je od 3 izvanstanične domene -  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  lanaca koji služe za vezivanje peptida, Ig podobne domene ( $\alpha 3$ ), transmembranske regije i kratkog citoplazmatskog kraja (C terminalna regija). Po analogiji s ostalim molekulama HLA sadrži unutar  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  lanaca disulfidne mostove koji stabiliziraju njegovu tercijalnu strukturu. Disulfidni most koji se nalazi unutar  $\alpha 3$  lanca omogućuje povezivanje Hfe proteina s  $\beta 2$ -mikroglobulinom ( $\beta 2M$ ) u transferinskom receptoru. (99,101).

Fizička povezanost Hfe proteina i transferinskog receptora u kriptalnim enterocitima daje Hfe proteinu strategijsko mjesto utjecaja na TfR-posredovani transport željeza pomoću tih stanica (103). Veliki afinitet između TfR i Hfe, kao i sam Hfe-TfR kompleks, kritični su za ulogu Hfe u apsorciji željeza. (99).



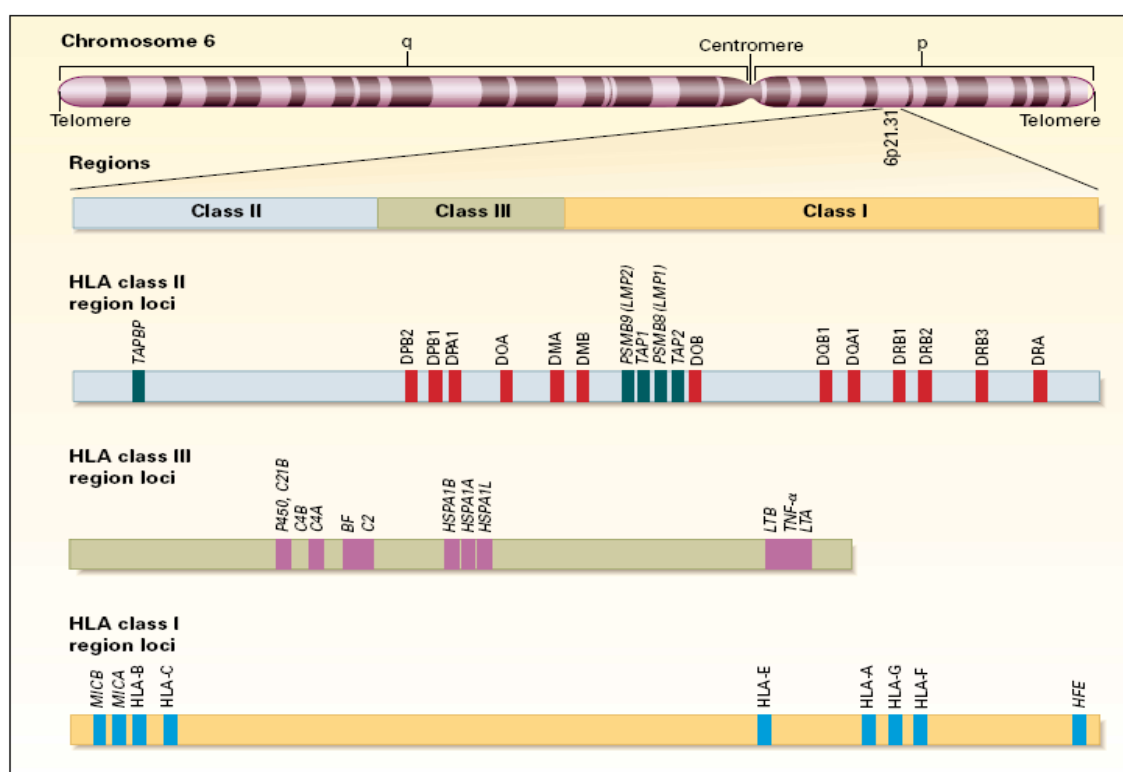
Slika 2. Mutirani HFE protein – položaj promijenjenih aminokiselina kod C282Y i H63D mutacija. Preuzeto iz Feder i sur. (102)

Prekomjerno taloženje željeza u organima javlja se u okviru nekoliko bolesti, te izgleda da do poremećaja u metabolizmu željeza i do njegova prekomjernog nakupljanja u organizmu dolazi zbog mutacija u nekom od stotinjak gena uključenih u ovaj mehanizam. Detaljno su opisane neke od tih mutacija, kao npr.: mutacija G320V gena za juvenilnu hemokromatozu (HJV) na lokusu 1q (104); A77D mutacija u genu koji kodira ferroportin (SLCA11A3), lokus 2q32; (105); mutacije 84-88 insC, Y250X i M172K u TFR2 genu koji kodira transferin receptor 2, lokus 7q22, (106); polimorfizmi -308 i -238 u TNF- $\alpha$  koji igraju ulogu u ekspresiji HH (107); mutacija G185R u genu koji kodira transportni protein za željezo DMT1 (Nramp2), zatim nedostatak Trfr alela za TFR i delecija HEPH gena za hephaestin ispitivane na animalnim modelima (108,109), te niz drugih.

### 1.3.1. Gen za hemokromatozu (HFE)

Mutacije u HFE genu povezane su s gubitkom homeostaze željeza, promjenama u inflamatornom odgovoru i u krajnjem slučaju s klinički prepoznatljivom hemokromatozom. Hemokromatoza je poremećaj metabolizma željeza, u kojem povećana apsorpcija željeza dovodi do njegova prekomjernog odlaganja u stanicama, što vodi oštećenju tkiva i poremećaju funkcije prvenstveno jetre, ali i drugih organa (110).

Gen za hemokromatozu (hereditarna hemokromatoza (engl. hereditary hemochromatosis - HH) - tip 1) nalazi se u blizini HLA-A lokusa na kratkom kraku kromosoma 6, što se poklapa s jednim od lokusa podložnosti za MS otkrivenim u studijama genetskog probira. Uska veza HH s HLA sustavom poznata je već tridesetak godina, a točnu lokaciju gena utvrdili su Feder i sur. 1996. godine (102). HFE gen lociran je na kromosomu 6p21.3 unutar regije HLA klase I i to 4,6 megabaza telomerno od HLA-A, a veličine je 10 kilobaza (slika 2).



Slika 2. Lokacija i organizacija HLA regije na kromosomu 6. Preuzeto iz Mackay i sur. (111)

Do danas je poznat velik broj alelskih varijanti HFE gena, a od toga su s prekomjernim nakupljanjem Fe najčešće povezane dvije mutacije (slika 1) (102):

- C282Y mutacija u egzonu 4, gdje dolazi do zamjene aminokiseline cistein s tirozinom na mjestu 282 HFE proteina, odnosno tranzicije G→A 845 nukleotida HFE gena i
- H63D mutacija u egzonu 2, gdje dolazi do zamjene aminokiseline histidin s asparaginom na mjestu 63 HFE proteina, odnosno transverzije 187C→G nukleotida HFE gena.

Budući da su C282Y i H63D mutantni aleli na istom lokusu, intragenska rekombinacija rijetko se javlja, i dosad je u literaturi opisan samo jedan slučaj s obje mutacije na istom kromosomu (112).

Mutacije u HFE genu javljaju se u kavkaskoj populaciji češće od ijedne druge mutacije, pri čemu prosječna frekvencija C282Y mutacije u Europi iznosi 6%, a distribucija mutacije pokazuje opadanje učestalosti od sjeverozapada (5 – 10%) prema jugoistoku (1 - 5%), dok H63D mutacija ima podjednaku zastupljenost u svim europskim populacijama i njena je učestalost veća od 10% (113). Međutim, penetrabilnost gena nije potpuna, tako da pojedine osobe s mutacijama ovog gena ne manifestiraju kliničke simptome HH (114,115).

Protein Hfe sudjeluje u mehanizmu pomoću kojeg enterociti održavaju razinu zaliha željeza u organizmu tako što modulira uzimanje iz plazme željeza vezanog na transferin. U tri neovisna istraživanja dokazano je da mutacije HFE gena smanjuju afinitet Hfe proteina za vezivanje liganada – transferina s vezanim željezom (116,117). Oštećen Hfe protein daje krive signale uslijed čega enterociti apsorbiraju veće količine željeza no što ih organizam u određenom trenutku treba.

Dokazano je da u nazočnosti C282Y mutacije ne dolazi do stvaranja disulfidnog mosta između Cys282 i Cys252 unutar  $\alpha$ 3 lanca i da je zato onemogućena interakcija  $\beta$ 2-mikroglobulina s HFE proteinom, što onemogućava njegovo ispoljavanje na površini stanice (slika 1) (118). Također je dokazano da takav Hfe protein tvori agregate velike molekularne težine, ne dolazi do njegova dorađivanja u Golgijevom aparatu i podvrgnut je brzom degradaciji.

Kod H63D mutacije promijenjeni protein nalazi se na staničnoj površini (kao i divlji tip). Mutacija ne utječe na njegovo vezanje za  $\beta$ 2-mikroglobulin, iako je moguće da je blokirana interakcija s drugim ligandima (118). Istraživanja na kulturi stanica pokazala su da divlji tip Hfe proteina smanjuje afinitet transferinskog receptora za transferin, dok H63D protein nema taj učinak (116).

Utjecaj HFE mutacije na unos željeza u mozak očituje se kroz prisutnost Hfe proteina zajedno s transferinskim receptorom na koroidnom pleksusu, krvnim žilama i endodimalnim



stanicama koje okružuju ventrikule mozga (119). Stoga je HFE u poziciji da utječe na unos željeza u mozak na isti način kao i u bilo koji drugi organ. U skladu s tim, slike magnetske rezonance pokazale su da mozak akumulira više željeza u prisutnosti HFE mutacija. Nadalje, ove mutacije, pogotovo u kombinaciji s drugim polimorfizmima, pokazale su i određen efekt u Alzheimerovoj bolesti (AD) (120).

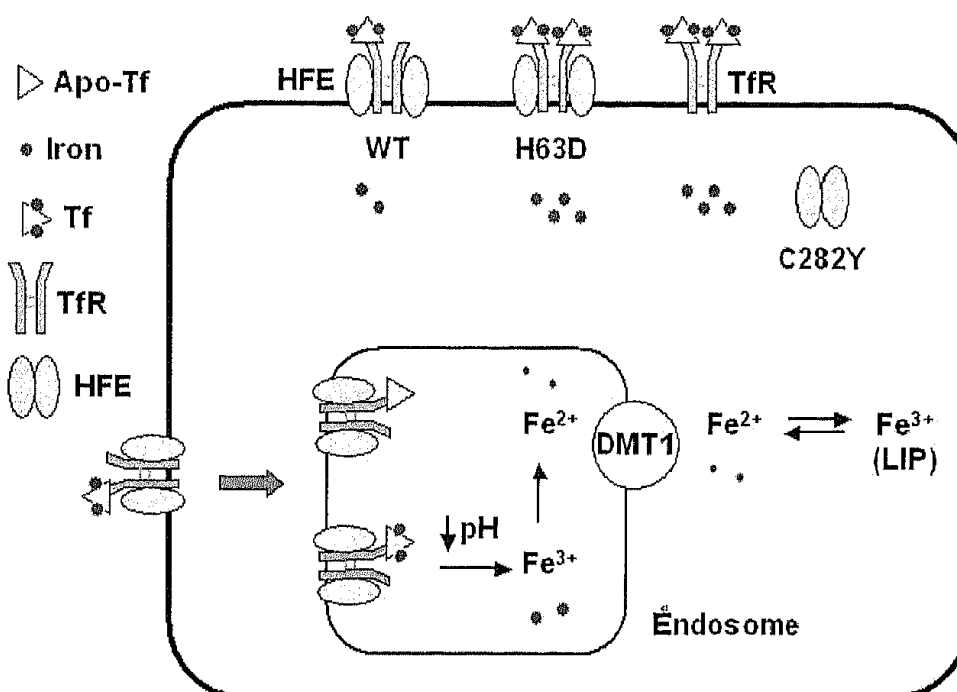
C282Y mutacija češće je povezana s HH, a frekvencija H63D mutacije privlači sve veću pažnju u neurodegenerativnim poremećajima. Prva molekularno-genetička istraživanja gena odgovornog za nakupljanje željeza u osoba oboljelih od MS ispitivala su mutacije u SLCA11A3 i u genu za hemokromatozu (87,121). Rezultati za SLCA11 bili su kontradiktorni, dok su rezultati za HFE gen ukazali da H63D i C282Y ne utječu na predispoziciju MS (88,122), ali je utvrđeno da C282Y/wt genotip može biti dobar prediktor ranog početka bolesti (122).

### **1.3.2. Gen za transferin (TF)**

Još je jedan gen neposredno uključen u metabolizam željeza gen za transferin (engl. transferrin gene – TF). Transferin je glikoprotein kojeg čini jedan lanac od 77 kDa, nalazi se u krvnoj plazmi i željezo veže snažno, ali reverzibilno, te služi za njegovu dostavu. Na transferin vezano željezo dominantni je mehanizam za dostavu željeza u stanice mozga (123). Tf je, dakle, protein koji mobilizira željezo, a u CNS-u najviše ga ima u oligodendrocitima, gdje je uključen i u njihovo sazrijevanje i mijelogenezu (124).

TF gen mapiran je u području koje također odgovara jednom od lokusa podložnosti za MS, 3q21. Do sada je opisano preko 30 genetskih varijanti humanog transferina u serumu (125). Sekvenciranjem egzona 15 TF gena utvrđena je supstitucija C/T prve dušične baze u kodonu 570 koja mijenja prolin u serin (Pro→Ser; P570S) kod transferina, pri čemu se dva alela označavaju s C1 i C2 (126). Izgleda da C2 alel smanjuje afinitet Tf za vezanje željeza, te se povezuje s nekoliko bolesti uključujući Alzheimerovu bolest i reumatoidni artritis (127).

Produkti HFE gena i TF gena ulaze u interakciju u metabolizmu željeza natječući se za vezno mjesto transferinskog receptora. Predloženi mehanizam kompeticije vezanja transferina i Hfe proteina na TfR prikazan je na slici 3 (120). Divlji tip Hfe proteina reagira s TfR kako bi ograničio vezanje Tf na taj isti receptor i time količinu željeza koje ulazi u stanicu. Ovaj kompleks disocira u endosomu iz kojeg se željezo prenosi u citosol putem divalentnog metalnog transportera 1, a proteini koji sudjeluju u njegovu transportu opet se mogu ispoljiti na površini stanice. Kod H63D mutacije protein migrira do membrane, ali je njegova sposobnost da ograniči interakciju Tf i TfR smanjena, te je stoga unos željeza veći. Kod C282Y mutacije protein ne dolazi do membrane, podliježe bržoj degradaciji i na TfR može se vezati više Tf, pa je opet unos željeza veći. Izgleda da C2 alal utječe na jačinu vezanja željeza na Tf kao i na njegovo otpuštanje, te je u kombinaciji s HFE mutacijama povećana količina intracelularnog željeza i produkcija slobodnih radikala. Stoga je moguće da polimorfizmi HFE i TF gena utječu na status željeza u mozgu i s željezom povezanu neurodegeneraciju.



Slika 3. Predložena funkcija HFE i TF proteina. Preuzeto iz Connor i sur. (120)

Istraživanja ovih polimorfizama kod Alzheimerove bolesti pokazala su da kombinacija TF C2 i HFE C282Y polimorfizama može rezultirati viškom slobodnog željeza i stvaranjem slobodnih radikala u neuronima. Moguće je da se u nosilaca ovih mutacija više Tf-TfR kompleksa ulazi u neuron, te da se željezo lakše otpušta u endosomu (zbog TF C2 alela), što vodi do veće produkcije slobodnih radikala i oštećenja membrane neurona. Tako nositelji obaju alela imaju čak pet puta veći rizik od bolesti (128), dok sam TF C2 alel pokazuje povezanost s kasnim početkom Alzheimerove bolesti (126). Do sada nije provedeno istraživanje polimorfizama TF gena kao mogućeg rizičnog čimbenika u MS.

### **1.3.3. Gen za čimbenik nekroze tumora- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Osim gena direktno uključenih u metabolizam željeza, postoje i geni modifikatori koji mogu utjecati na kliničku ekspresiju u bolesnika s prekomjernim nakupljanjem željeza. Smatra se da je jedan od tih gena TNF- $\alpha$  (129). TNF-a gen veličine je 3 kb, sadrži 4 egzona, a mapiran je unutar klase III HLA regije na kromosomu 6p21.3 (slika 2), što se poklapa s jednim od lokusa podložnosti za MS. Produkt TNF- $\alpha$  gena je citokin s različitim funkcijama čija je primarna uloga u regulaciji stanica imunog sustava. To je je protein od 185 aminokiselina glikoziliran na pozicijama 73 i 172 i koji se sintetizira kao inaktivni protein od 212 aminokiselina. TNF- $\alpha$  konvertirajući enzim (TACE) uzrokuje razdvajanje prekursora TNF- $\alpha$  te se stvara bioaktivni solubilni TNF- $\alpha$ . Izlučeni proteini postoje kao multimeri od dva, tri ili pet nekovalentno povezanih jedinica. TNF- $\alpha$  proizvode uglavnom makrofazi, ali i mnoge druge stanice uključujući NK stanice, T-limfocite, miocite, endotelne stanice, fibroblaste, stanice masnog tkiva kao i astrocite i mikroglija stanice CNS (130).

TNF- $\alpha$  spada u grupu citokina koji stimuliraju akutnu fazu upalne reakcije, te kao proinflamatorni citokin ima ulogu u patogenezi mnogih bolesti, uključujući autoimune bolesti (131). Osim upalnog djelovanja posjeduje i snažno citotoksično djelovanje. TNF- $\alpha$  uključen je u kompleksna biološka događanja u najmanje 29 članova familije različitih receptora čimbenika nekroze tumora (TNFR). U fiziološkim homeostatskim uvjetima biološke funkcije ove familije citokina obuhvaćaju korisne i protektivne uloge u prirođenoj imunosti i

hematopoezi i imaju ključnu ulogu u organogenezi. TNF- $\alpha$  uključen je i u mehanizme signaliziranja u staničnoj proliferaciji, tumorogenezi, diferencijaciji, preživljavanju i apoptozi, a može, ovisno o tipu stanica, stimulirati ili inhibirati i svoju vlastitu sintezu (132,133).

Nekoliko je polimorfizma utvrđeno u promotorskoj regiji TNF- $\alpha$  gena, od kojih neki imaju funkcionalne implikacije: jedan je G/A na poziciji -308 (TNF2 alel), a drugi G/A na poziciji -238 (TNF A alel) (134). Studije pokazuju da je TNF2 alel povezan s povećanom transkripcijom i većom razinom TNF- $\alpha$  u krvi u odnosu na divlji tip (TNF1), dok podaci o -238 TNF A alelu govore o suprotnom učinku, ali nisu konzistentni (135,136). S obzirom da se disregulacija, posebice pojačana produkcija TNF- $\alpha$ , povezuje s čitavim nizom bolesti, i polimorfizmi ovog gena istraživani su u različitim bolestima. Rezultati ispitivanja pokazuju predisponirajuću ili protektivnu ulogu, ili pak nije ustanovljena statistički značajna razlika navedenih polimorfizama u odnosu na zdravu populaciju. Zbog različitih rezultata pojedinih ispitivanja u nastanku i kliničkom tijeku nekoliko bolesti razvila se hipoteza da polimorfizmi jednog nukleotida u regulatornoj regiji TNF- $\alpha$  gena nisu povezani s aktivnosti pojedine bolesti već s podložnosti da se razviju određeni uvjeti za nastanak bolesti (137).

S obzirom da je MS kronični upalni demijelinizirajući poremećaj CNS-a, citokini su logični geni kandidati koji utječu na podložnost ili tijek bolesti. TNF- $\alpha$  kao proinflamatorni citokin vjerojatno ima ulogu u nekoliko imunoposredovanih bolesti uključujući i MS (137). Nadalje, smatra se da TNF- $\alpha$  modificira i propusnost krvno-moždane barijere interakcijom s endotelnim stanicama, dopuštajući aktivnim T-limfocitima da dođu do odjeljaka središnjeg živčanog sustava (138). TNF- $\alpha$  povišen je u lezijama i cerebrospinalnoj tekućini MS bolesnika, a na mišjem modelu uočeno je da njegova ekspresija u CNS korelira s tijekom bolesti. Stoga je već nekoliko grupa ispitalo TNF- $\alpha$  polimorfizme, najčešće TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238, kako na podložnost bolesti tako i na težinu kliničke slike MS, ali su dobiveni rezultati kontradiktorni (139-144).

Dosadašnja istraživanja TNF- $\alpha$  polimorfizama u MS provedena su isključivo zbog autoimune prirode ove bolesti. Međutim, izgleda da ovaj citokin s različitim funkcijama indirektno doprinosi regulaciji metabolizma željeza potičući sintezu feritina i transferinskog

receptora u različitim stanicama, (povećavajući unos željeza u makrofage i monocite), te inhibirajući otpuštanje željeza iz makrofaga i smanjujući unos željeza u plazmu i njegovu ugradnju u eritroidne prekursore. Osim navedenoga, TNF- $\alpha$  također modulira i HFE protein. Povezanost TNF- $\alpha$  i hemokromatoze prvi put je sugerirana nakon što je uočeno da stimulirani monociti bolesnika s hemokromatozom otpuštaju nižu količinu TNF- $\alpha$  negoli monociti kontrolnih ispitanika (135).

Smatra se da TNF- $\alpha$  modificira i propusnost krvno-moždane barijere, između ostalog i za željezo. Nadalje, pojedini efekti citokina na mijelinizaciju mogu biti posredovani kroz modifikaciju zadržavanja željeza u oligodendrocitima. Na životinjskom modelu pokazano je da se produkcija citokina u stanicama mijenja pri izloženosti željezu (145). Tako bi se i ekspresija citokina u stanicama nedaleko neuronskih plakova mogla razlikovati i ovisno o ekspresiji HFE mutacija. Ukoliko promijenjeni oblik HFE proteina ima ekspresiju tijekom stresa nerijetko povezanog s MS, unos željeza nije ograničen, što povećava vjerojatnost oksidativnog stresa stanice i povećava produkciju inflamatornih citokina kao što je TNF- $\alpha$  (146).

S obzirom da su proinflamatorni citokini, patološko taloženje željeza i oksidativni stres uključeni u neurodegenerativne poremećaje, odlučili smo u našem istraživanju ispitati TNF- $\alpha$  gen kao potencijalni gen modifikator u metabolizmu željeza u MS bolesnika. Dosadašnje spoznaje predstavljaju izazov za istraživanje uloge metabolizma željeza i gena uključenih u taj metabolizam na podložnost i kliničku ekspresiju MS.

## 2. CILJ RADA

Multipla skleroza je složena bolest multifaktorijalne etiologije za čiji razvoj su potrebni genetički i okolišni čimbenici. Svaki potencijalni gen podložnosti nalazi se u interakciji s drugim genima i/ili čimbenicima okoliša koji moduliraju njegovu povezanost s bolesti. Nedavni dokazi upućuju na moguću ulogu disregulacije željeza u patogenezi MS, budući da je željezo esencijalno za formiranje mijelina i oksidativnu fosforilaciju. Također je pokazano da je patološko nakupljanje željeza, vidljivo kao T2 hipo-intenzitet u sivoj tvari mozga MS bolesnika, povezano s fizičkom nesposobnošću, trajanjem i tijekom bolesti te atrofijom mozga.

Stoga je osnovni cilj ovog rada ispitivanje utjecaja gena izravno ili neizravno uključenih u metabolizam željeza na predispoziciju i/ili kliničku ekspresiju MS.

Na osnovi dobivenih rezultata testirat ćemo hipotezu da polimorfizmi HFE gena (C282Y i H63D), TNF- $\alpha$  gena (-308 i -238) i TF gena (C1/C2), kao i njihova interakcija, imaju ulogu u predispoziciji za razvoj MS ili pak utječu na kliničke karakteristike bolesti, kao što su dob nastupa, trajanje bolesti, stupanj invaliditeta te progresija MS. S obzirom da se smatra da su različiti oblici bolesti (primarno-progresivni, sekundarno-progresivni i relapsno-remitirajući) uvjetovani različitim genetičkim čimbenicima, te da je klinička ekspresija MS izrazito varijabilna i malo se zna o njenim uzrocima, istražiti ćemo jesu li su navedeni geni i polimorfizmi uključeni u početni nastup bolesti, odnosno jesu li odgovorni za njen daljnji razvoj i progresiju.

Također istraživanjem navedenih polimorfizama u MS bolesnika dobit ćemo prve podatke o pojedinim polimorfizmima u MS bolesnika uopće i proširiti podatke o učestalosti tih polimorfizama i na našu populaciju, što može imati i kliničkih implikacija.

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

U razdoblju od 2002. - 2007. godine u okviru nacionalnog projekta 0062016 "Genetički čimbenici u multiploj sklerozi" i hrvatsko-slovenskog bilateralnog projekta "Genetski čimbenici u multiploj sklerozi" prikupljeno je 368 osoba oboljelih od MS (266 žena i 102 muškaraca). Od toga njih 79 (46 žena i 33 muškarca) bilo je iz područja visokog rizika (autohtoni stanovnici Gorskog kotra i Kočevja) i 289 (220 žena i 69 muškaraca) iz područja niže prevalencije MS (populacije Hrvatske i Slovenije).

Svi bolesnici udovoljavali su dijagnostičkoj kategoriji klinički sigurne i laboratorijski potkrijepljene sigurne MS prema Poserovim kriterijima (25), a klinički su obrađeni sukladno EDMUS (European Database for Multiple Sclerosis) protokolu (26). Stupnjevi invalidnosti u bolesnika izražavaju se u proširenoj ljestvici invaliditeta (engl. Expanded Disability Status Scale - EDSS) prema Kurtzkeu (27): 0-3 stupnja = blaga; 4-6 stupnjeva umjerena; 7-9 stupnjeva – teška; 10. stupanj = smrtni ishod. Trajanje bolesti određuje se kao razdoblje (u godinama) između početnog nastupa bolesti do zadnjeg kliničkog pregleda. Indeks progresije bolesti (PI) izračunava se kao odnos EDSS i trajanja bolesti, a izračunali smo ga ukoliko bolest traje 5 i više godina. Navedene parametre MS bolesnika prikazali smo u tablici 1.

Tablica 1. Klinički profil osoba oboljelih od MS (N=368)

	Ukupno	Žarište	Izvan žarišta
<b>Žene/muškarci</b>	2,6:1	1,4:1	3,1:1
<b>Dob<sup>a</sup></b>	44,6 ± 12,2 (18 – 80)	52,1±12,4 (29 – 76)	42,5±11,3 (18 – 80)
<b>Dob nastupa bolesti<sup>a</sup></b>	29,6 ± 8,8 (10 – 54)	28,3 ± 8,6 (14 – 54)	30,0 ± 8,8 (10 – 53)
<b>Tijek</b>			
<b>PP</b>	28 (7,6%)	11 (13,9%)	17 (5,8%)
<b>SP</b>	133 (36,2%)	36 (45,6%)	97 (33,6%)
<b>RR</b>	207 (56,2%)	32 (40,5%)	175 (60,6%)
<b>Trajanje bolesti<sup>a</sup></b>	12,8 ± 10,5 (1 – 52)	20,5 ± 12,1 (1 – 52)	10,6 ± 8,9 (1 – 50)
<b>EDSS<sup>b</sup></b>	4,1 ± 2,4 (1 – 10)	5,6 ± 2,8 (1 – 10)	3,6 ± 2,1 (1 – 9)
<b>PI<sup>b</sup></b>	0,37± 0,25 (0,06 – 1,25)	0,32 ± 0,22 (0,06 – 1,2)	0,38 ± 0,25 (0,08–1,25)

<sup>a</sup> srednja vrijednost (godine) ± SD

<sup>b</sup> srednja vrijednost ± SD

Kontrolnu skupinu čini 368 zdravih dobrovoljnih davatelja krvi, od toga 86 autohtonih stanovnika Gorskog kotara i Kočevja, te 282 ispitanika iz područja nižeg rizika (Hrvatska, Slovenija).

Prilikom odabira kontrolnih ispitanika uzimali smo u obzir njihov spol, dob i etničku pripadnost. Prosječna dob ispitanika i omjer spolova nije se statistički značajno razlikovala između bolesnika i kontrole. Na osnovi anamnestičkih podataka zaključili smo da ispitanici potječu iz različitih dijelova Hrvatske i Slovenije te predstavljaju reprezentativni uzorak hrvatske i slovenske opće populacije i populacije bolesnika. Prilikom odabira kontrolnih osoba iz Gorskog kotara i Kočevja tražilo se da budu autohtoni stanovnici (oba roditelja podrijetlom iz Gorskog kotara odnosno Kočevja) nesrodni međusobno i s MS bolesnicima. Svi ispitanici kontrolne skupine u obitelji nemaju osobe oboljele od MS niti od drugih neurodegenerativnih bolesti.

Molekularno-genetička analiza krvi napravljena je na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci i Odjelu za medicinsku genetiku Sveučilišnog kliničkog centra u Ljubljani.

Istraživanjem je osigurano poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Medicinski podaci i humani materijal prikupljen je u skladu s etičkim i bioetičkim principima, pri čemu je osigurana privatnost ispitanika uključenih u istraživanje i zaštita tajnosti podataka. Svi su ispitanici bili upoznati sa svrhom i metodologijom samog istraživanja, te su dali pismeni pristanak. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstva Medicinskog fakulteta u Rijeci.



## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Molekularno-genetička analiza**

#### **3.2.1.1. Izolacija DNA**

Ispitanicima je izvađeno po 5 ml periferne krvi, koja je do DNA izolacije zamrznuta u epruvetama s antikoagulansom (EDTA) na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Za molekularno-genetičku analizu izolirali smo genomsku DNA iz periferne krvi ispitanika pomoću kitova za izolaciju (Macherey-Nagel), prema uputama proizvođača. Izoliranu DNA pohranjujemo na  $-20^{\circ}\text{C}$  na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci i na Odjelu medicinske genetike Kliničkog centra u Ljubljani.

#### **3.2.1.2. Analiza mutacija HFE gena**

Prisutnost svake od mutacija u HFE genu utvrđivali smo pomoću metode lančane reakcije polimeraze (engl. polymerase chain reaction - PCR), nakon koje je slijedila restrikcija s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama (engl. restriction fragment length polymorphism - RFLP). Umnožavanje ciljnog fragmenta DNA molekule odvijalo se u volumenu od 15  $\mu\text{l}$  u termociklerima (Eppendorf). Uvjete i početnice za lančanu reakciju polimerazom opisali su Feder i sur. (102). Uzorke smo analizirali u serijama od po 20 – 60 uzoraka uz negativnu kontrolu (bez DNA uzorka) i pozitivnu kontrolu (uzorak DNA s oba mutirana alela).

##### **3.2.1.2.1. Mutacija C282Y**

Slijed početnih oligonukleotida za analizu C282Y lokusa i temperaturu spajanja početnih oligonukleotida, sadržaj reakcijske smjese te program lančane reakcije polimeraze prikazuju sljedeće tablice:

Tablica 2. Sekvenca početnih oligonukleotida i temperatura njihovog spajanja ( $T_s$ ) za analizu C282Y lokusa

Početnice	Sekvenca početnih oligonukleotida	$T_s$
C282Y-F	5' CAA GTG CCT CCT TTG GTG AAG GTG ACA 3'	55,0 °C
C282Y-R	5' CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC 3'	55,0 °C

Tablica 3. Reakcijska smjesa u konačnom volumenu od 15  $\mu$ l

	Količina (za 1 uzorak)	Konačna koncentracija
10x PCR pufer	1,5 $\mu$ l	1x PCR pufer
50 mM MgCl	0,45 $\mu$ l	1 mM
10 mM dNTP	0,3 $\mu$ l	0,05 mM
10x primer C282YF	0,75 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
10x primer C282YR	0,75 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
bidestilirana voda	10,1 $\mu$ l	
<i>Taq</i> polimeraza	0,15 $\mu$ l	1,5 U
DNA	1 $\mu$ l	

Tablica 4. Program PCR – temperaturni ciklusi

Korak PCR postupka	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
1.	94 °C	5 min.	1x
2.	94 °C 55,5 °C 72 °C	1 min. 1 min. 20 sek. 1 min.	35 x
3.	72 °C	10 min.	1x

Amplificirane PCR produkte provjerili smo elektroforezom u trajanju od 30 min pri 80V. Po 5  $\mu$ l PCR produkta i 1  $\mu$ l brom-fenol modrila (engl. bromophenol blue - BPB) nanosili smo na 1% agarozni gel u koji smo prethodno dodali 0,1 mg/ml etidium bromida. PCR produkte vizualizirali smo pod UV lampom. Veličinu PCR produkta utvrdili smo primjenom DNA standarda (100 bp DNA ladder). Očekivana veličina PCR produkta bila je 343 parova baza (bp).

Nakon ove amplifikacije napravili smo restrikciju PCR produkta s *Rsa* I restrikcijskim enzimom. Restrikcijska smjesa prikazana je u tablici 5.

Tablica 5. Restrikcijska smjesa za analizu C282Y mutacije

	Količina (za 1 uzorak)	Konačna koncentracija
PCR produkt	10 µl	
10 x pufer REact 1	2 µl	1 x
enzim <i>Rsa</i> I	0,2 µl	0,1 U
bidestilirana voda	7,8 µl	

Restrikcijsku smjesu inkubirali smo 16 – 20 sati u vodenoj kupelji pri temperaturi 37°C. Restrikcijske fragmente (8 µl restrikcijskog fragmenta + 2,0 µl BPB) odvojili smo elektroforezom (30 - 45 min pri 80 V) na 3% agaroznom gelu u koji smo prethodno dodali 0,1 mg/ml etidium bromida. Restrikcijske fragmente analizirali smo pod UV lampom. Veličinu tih fragmenata utvrdili smo primjenom DNA standarda (100 bp DNA ladder). Ovisno o migraciji restrikcijskih fragmenata na gelu razlikovali smo homozigote divljeg tipa, heterozigote i homozigote za navedenu mutaciju. Očekivana veličina restrikcijskih fragmenata prikazana je u tablici 6.

Tablica 6. Veličina PCR produkta i veličina restrikcijskih fragmenata za pojedini genotip pri analizi C282Y lokusa

Genotip	PCR produkt (bp)	Restrikcijski fragment (bp)			
HFE wt/wt*	343	203	140		
HFE C282Y/wt		203		111	29
HFE C282Y/C282Y		203	140	111	29

\*wt- divlji tip (engl. wild type)

### 3.2.1.2.2. Mutacija H63D

Slijed početnih oligonukleotida za analizu H63D lokusa i temperaturu spajanja početnih oligonukleotida, sadržaj reakcijske smjese te program lančane reakcije polimeraze prikazuju sljedeće tablice:

Tablica 7. Sekvenca početnih oligonukleotida i temperatura njihovog spajanja ( $T_s$ ) za analizu H63D lokusa

Počelnice	Sekvenca početnih oligonukleotida	$T_s$
H63D-F	5' ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC 3'	55,0 °C
H63D-R	5' CTT GCT GTG GTT GTG ATT TTC C 3'	55,0 °C

Tablica 8. Reakcijska smjesa u konačnom volumenu od 15  $\mu$ l

	Količina (za 1uzorak)	Konačna koncentracija
10x PCR pufer	1,5 $\mu$ l	1x PCR pufer
50 mM MgCl	0,45 $\mu$ l	1 mM
10 mM dNTP	0,3 $\mu$ l	0,05 mM
10x primer H63D-F	0,75 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
10x primer H63D-R	0,75 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
bidestilirana voda	10,1 $\mu$ l	
<i>Taq</i> polimeraza	0,15 $\mu$ l	1,5 U
DNA	1 $\mu$ l	

Tablica 9. Program PCR – temperaturni ciklusi

Korak PCR postupka	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
1.	94 °C	5 min.	1x
2.	94 °C 55,5 °C 72 °C	1 min. 1 min. 20 sek. 1 min.	35 x
3.	72 °C	10 min.	1x

Amplificirane PCR produkte provjerili smo elektroforezom u trajanju od 30 min pri 80 V. Po 5  $\mu$ l PCR produkta i 1  $\mu$ l BPB nanosili smo na 1% agarozni gel u koji smo prethodno dodali 0,1 mg/ml etidium bromida. PCR produkte vizualizirali smo pod UV lampom. Veličinu PCR produkta utvrdili smo primjenom DNA standarda (100 bp DNA ladder). Očekivana veličina PCR produkta bila je 294 parova baza.

Nakon ove amplifikacije napravili smo restrikciju PCR produkta s *Mbo* I restrikcijskim enzimom. Restrikcijska smjesa prikazana je u tablici 10.

Tablica 10. Restrikcijska smjesa za analizu H63D mutacije

	<b>Količina</b> (za 1 uzorak)	<b>Konačna koncentracija</b>
PCR produkt	10 $\mu$ l	
10x pufer REact 2	2 $\mu$ l	1x
enzim <i>Mbo</i> I	0,2 $\mu$ l	0,1 U
bidestilirana voda	7,8 $\mu$ l	

Restrikcijsku smjesu inkubirali smo 16 – 20 sati u vodenoj kupelji pri temperaturi 37°C. Restrikcijske fragmente (8  $\mu$ l restrikcijskog fragmenta + 2,0  $\mu$ l BPB) provjeravali smo elektroforezom (30 - 45 min pri 80 V) na 3% agaroznom gelu u koji smo prethodno dodali 0,1 mg/ml etidium bromida. Restrikcijske fragmente analizirali smo pod UV lampom. Veličinu tih fragmenata utvrdili smo primjenom DNA standarda (100 bp DNA ladder). Ovisno o migraciji restrikcijskih fragmenata na gelu razlikovali smo homozigote divljeg tipa, heterozigote i homozigote za navedenu mutaciju. Očekivana veličina restrikcijskih fragmenata prikazana je u tablici 11.

Tablica 11. Veličina PCR produkta i veličina restrikcijskih fragmenata za pojedini genotip pri analizi H63D lokusa

<b>Genotip</b>	<b>PCR produkt (bp)</b>	<b>Restrikcijski fragment (bp)</b>			
HFE wt/wt*	294		138	99	57
HFE H63D/wt		237			57
HFE H63D/H63D		237	138	99	57

\*wt- divlji tip (engl. wild type)

### 3.2.1.3. Analiza C1/C2 polimorfizma TF gena

Prisutnost pojedine varijante C1 ili C2 TF gena utvrđivali smo pomoću PCR-RFLP metode. Uvjete i početnice za lančanu reakciju polimerazom opisali su Namekata i sur. (126). Umnožavanje ciljnog fragmenta DNA molekule odvijalo se u volumenu od 15  $\mu$ l u termociklerima (Eppendorf). Uzorke smo analizirali u serijama od po 20 – 60 uzoraka uz negativnu kontrolu (bez DNA uzorka) i pozitivnu kontrolu (uzorak DNA C1/C2 heterozigota).

Slijed početnih oligonukleotida za analizu TF polimorfizma i temperaturu spajanja početnih oligonukleotida, sadržaj reakcijske smjese te program lančane reakcije polimeraze prikazuju sljedeće tablice:

Tablica 12. Sekvenca početnih oligonukleotida i temperatura njihovog spajanja ( $T_s$ ) za analizu TF polimorfizma

Početnice	Sekvenca početnih oligonukleotida	$T_s$
TF-F	5'GCT GTG CCT TGA TGG TAC CAG GTA A3'	60,0 °C
TF-R	5'GGA CGC AAG CTT CCT TAT CT3'	60,0 °C

Tablica 13. Reakcijska smjesa u konačnom volumenu od 15  $\mu$ l

	Količina (za 1uzorak)	Konačna koncentracija
10x PCR pufer	1,5 $\mu$ l	1x PCR pufer
50 mM MgCl	0,45 $\mu$ l	1 mM
10 mM dNTP	0,3 $\mu$ l	0,05 mM
10x primer TF-F	0,4 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
10x primer TF-R	0,4 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
bidestilirana voda	10,83 $\mu$ l	
Taq polimeraza	0,12 $\mu$ l	1,2 U
DNA	1 $\mu$ l	

Tablica 14. Program PCR – temperaturni ciklusi

Korak PCR postupka	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
1.	94 °C	2 min.	1x
2.	94 °C 50 °C 72 °C	1 min. 1 min. 50 sek. 1. min 25 sek.	36 x
3.	72 °C	3 min.	1x

Amplificirane PCR produkte provjerili smo elektroforezom u trajanju od 30 min pri 80V. Po 5 µl PCR produkta i 1 µl BPB nanosili smo na 1,5% agarozni gel u koji smo prethodno dodali 0,1 mg/ml etidium bromida. PCR produkte vizualizirali smo pod UV lampom. Veličinu PCR produkta utvrdili smo primjenom DNA standarda (100 bp DNA ladder). Očekivana veličina PCR produkta bila je 110 parova baza.

Nakon ove amplifikacije napravili smo restrikciju PCR produkta s *BstE II* restrikcijskim enzimom. Restrikcijska smjesa prikazana je u tablici 15.

Tablica 15. Restrikcijska smjesa za analizu TF polimorfizma

	Količina (za 1uzorak)	Konačna koncentracija
PCR produkt	5,0 µl	
10 x pufer	2,0 µl	1 x
enzim <i>BstE II</i>	0,2 µl	0,4 U
bidestilirana voda	2,8 µl	

Restrikcijsku smjesu inkubirali smo 2 sata u termocikleru pri temperaturi 60°C. Restrikcijske fragmente (8 µl restrikcijskog fragmenta + 2,0 µl BPB) provjeravali smo elektroforezom (60 min pri 80 V) na 3% agaroznom gelu u koji smo prethodno dodali 0,1 mg/ml etidium bromida. Restrikcijske fragmente analizirali smo pod UV lampom. Veličinu tih fragmenata utvrdili smo primjenom DNA standarda (100 bp DNA ladder). Ovisno o migraciji restrikcijskih fragmenata na gelu razlikovali smo homozigote divljeg tipa, heterozigote i

homozigote za naveden polimorfizam. Očekivana veličina restrikcijskih fragmenata prikazana je u tablici 16.

Tablica 16. Veličina PCR produkta i veličina restrikcijskih fragmenata za pojedini genotip pri analizi TF polimorfizma

Genotip	PCR produkt (bp)	Restrikcijski fragment (bp)		
TF C1/C1	110		89	21
TF C2/C2		110		
TF C1/C2		110	89	21

#### 3.2.1.4. Analiza TNF- $\alpha$ polimorfizama

Prisutnost pojedinog polimorfizma u promotorskoj regiji gena za TNF- $\alpha$  utvrđivali smo pomoću PCR-RFLP metode. Uvjete i početnice za lančane reakcije polimeraze opisali su Wilson i sur (147,148). Umnožavanje ciljnog fragmenta DNA molekule odvijalo se u volumenu od 15  $\mu$ l u termociklerima (Eppendorf). Uzorke smo analizirali u serijama od po 20 – 60 uzoraka uz negativnu kontrolu (bez DNA uzorka) i pozitivnu kontrolu (uzorak DNA s utvrđenim polimorfizmom).

##### 3.2.1.4.1. Polimorfizam TNF- $\alpha$ -308

Sljed početnih oligonukleotida za analizu polimorfizma TNF- $\alpha$ -308 i temperaturu spajanja početnih oligonukleotida, sadržaj reakcijske smjese te program lančane reakcije polimeraze prikazuju sljedeće tablice:

Tablica 17. Sekvenca početnih oligonukleotida i temperatura njihovog spajanja ( $T_s$ ) za analizu TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma

Početnice	Sekvenca početnih oligonukleotida	$T_s$
TNF- $\alpha$ -308-F	5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3'	60,0 °C
TNF- $\alpha$ -308-R	5' TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG 3'	60,0 °C



Tablica 18. Reakcijska smjesa u konačnom volumenu od 15  $\mu$ l

	<b>Količina</b> (za 1 uzorak)	<b>Konačna koncentracija</b>
10x PCR pufer	1,7 $\mu$ l	1x PCR pufer
50 mM MgCl	0,5 $\mu$ l	1 mM
10 mM dNTP	0,34 $\mu$ l	0,05 mM
10x primer TNF- $\alpha$ 308-F	1,7 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
10x primer TNF- $\alpha$ 308-R	1,7 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
DMSO	0,75 $\mu$ l	5%
bidestilirana voda	7,16 $\mu$ l	
<i>Taq</i> polimeraza	0,15 $\mu$ l	1,5 U
DNA	1 $\mu$ l	

Tablica 19. Program PCR – temperaturni ciklusi

<b>Korak PCR postupka</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Vrijeme</b>	<b>Broj ciklusa</b>
1.	94 °C	5 min.	1x
2.	94 °C 60 °C 72 °C	1 min. 1 min. 1 min.	38 x
3.	72 °C	10 min.	1x

Amplificirane PCR produkte provjerili smo elektroforezom u trajanju od 30 min pri 80V. Po 5  $\mu$ l PCR produkta i 1  $\mu$ l BPB nanosili smo na 1,5% agarozni gel u koji smo prethodno dodali 0,1 mg/ml etidium bromida. PCR produkte vizualizirali smo pod UV lampom. Veličinu PCR produkta utvrdili smo primjenom DNA standarda (25 bp DNA ladder). Očekivana veličina PCR produkta bila je 107 parova baza.

Nakon ove amplifikacije napravili smo restrikciju PCR produkta s *Nco* I restrikcijskim enzimom. Restrikcijska smjesa prikazana je u tablici 20.

Tablica 20. Restriksijska smjesa za analizu TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma

	Količina (za 1 uzorak)	Konačna koncentracija
PCR produkt	10 $\mu$ l	
10 x pufer REact 3	2 $\mu$ l	1 x
enzim <i>Nco</i> I	0,2 $\mu$ l	0,2 U
bidestilirana voda	7,8 $\mu$ l	

Restriksijsku smjesu inkubirali smo 16 – 20 sati u vodenoj kupelji pri temperaturi 37°C. Restriksijske fragmente (8  $\mu$ l restriksijskog fragmenta + 2,0  $\mu$ l BPB) provjeravali smo elektroforezom (60 min pri 80 V) na 3% agaroznom gelu u koji smo prethodno dodali 0,1 mg/ml etidium bromida. Restriksijske fragmente analizirali smo pod UV lampom. Veličinu tih fragmenata utvrdili smo primjenom DNA standarda (25 bp DNA ladder). Ovisno o migraciji restriksijskih fragmenata na gelu razlikovali smo homozigote divljeg tipa, heterozigote i homozigote za naveden polimorfizam. Očekivana veličina restriksijskih fragmenata prikazana je u tablici 21.

Tablica 21. Veličina PCR produkta i veličina restriksijskih fragmenata za pojedini genotip pri analizi TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma

Genotip	PCR produkt (bp)	Restriksijski fragment (bp)		
TNF- $\alpha$ -308 G/G	107		87	20
TNF- $\alpha$ -308 A/A		107		
TNF- $\alpha$ -308 G/A		107	87	20

### 3.2.1.4.2. Polimorfizam TNF- $\alpha$ -238

Slijed početnih oligonukleotida za analizu polimorfizma TNF- $\alpha$  238 i temperaturu spajanja početnih oligonukleotida, sadržaj reakcijske smjese te program lančane reakcije polimeraze prikazuju sljedeće tablice:

Tablica 22. Sekvenca početnih oligonukleotida i temperatura njihovog spajanja ( $T_s$ ) za analizu TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma

Početnice	Sekvenca početnih oligonukleotida	$T_s$
TNF- $\alpha$ -238-F	5' ATC TGG AGG AAG CGG TAG TG 3'	60,0 °C
TNF- $\alpha$ -238-R	5' AGA AGA CCC CCC TCG GAA CC 3'	60,0 °C

Tablica 23. Reakcijska smjesa u konačnom volumenu od 15  $\mu$ l

	Količina (za 1 uzorak)	Konačna koncentracija
10x PCR pufer	1,7 $\mu$ l	1x PCR pufer
50 mM MgCl	0,5 $\mu$ l	1 mM
10 mM dNTP	0,34 $\mu$ l	0,05 mM
10x primer TNF- $\alpha$ 238-F	1,7 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
10x primer TNF- $\alpha$ 238-R	1,7 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
DMSO	0,75 $\mu$ l	5%
bidestilirana voda	7,16 $\mu$ l	
Taq polimeraza	0,15 $\mu$ l	1,5 U
DNA	1 $\mu$ l	

Tablica 24. Program PCR – temperaturni ciklusi

Korak PCR postupka	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
1.	94 °C	2 min.	1x
2.	94 °C 60 °C 72 °C	1 min. 1 min. 1 min.	38 x
3.	72 °C	10 min.	1x

Amplificirane PCR produkte provjerili smo elektroforezom u trajanju od 30 min pri 80V. Po 5  $\mu$ l PCR produkta i 1  $\mu$ l BPB nanosili smo na 1,5% agarozni gel u koji smo prethodno dodali 0,1 mg/ml etidium bromida. PCR produkte vizualizirali smo pod UV lampom. Veličinu PCR produkta utvrdili smo primjenom DNA standarda (25 bp DNA ladder). Očekivana veličina PCR produkta bila je 152 parova baza.

Nakon ove amplifikacije napravili smo restrikciju PCR produkta s *Msp I* restrikcijskim enzimom. Restrikcijska smjesa prikazana je u tablici 25.

Tablica 25. Restrikcijska smjesa za analizu TNF- $\alpha$  238 polimorfizma

	<b>Količina</b> (za 1uzorak)	<b>Konačna koncentracija</b>
PCR produkt	10 $\mu$ l	
10 x pufer L	2 $\mu$ l	1 x
enzim <i>Msp I</i>	0,2 $\mu$ l	0,1 U
bidestilirana voda	7,8 $\mu$ l	

Restrikcijsku smjesu inkubirali smo 16 – 20 sati u vodenoj kupelji pri temperaturi 37°C. Restrikcijske fragmente (8  $\mu$ l restrikcijskog fragmenta + 2,0  $\mu$ l BPB) provjeravali smo elektroforezom (60 min pri 80 V) na 3% agaroznom gelu u koji smo prethodno dodali 0,1 mg/ml etidium bromida. Restrikcijske fragmente analizirali smo pod UV lampom. Veličinu tih fragmenata utvrdili smo primjenom DNA standarda (25 bp DNA ladder). Ovisno o migraciji restrikcijskih fragmenata na gelu razlikovali smo homozigote divljeg tipa, heterozigote i homozigote za naveden polimorfizam. Očekivana veličina restrikcijskih fragmenata prikazana je u tablici 26.

Tablica 26. Veličina PCR produkta i veličina restrikcijskih fragmenata za pojedini genotip pri analizi TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma

<b>Genotip</b>	<b>PCR produkt (bp)</b>	<b>Restrikcijski fragment (bp)</b>		
TNF- $\alpha$ -238 G/G	152		132	20
TNF- $\alpha$ -238 A/A		152		
TNF- $\alpha$ -238 G/A		152	132	20

### 3.3. Statističke metode

Statistička obrada podataka provedena je uz pomoć računalnih programa *Statistica for Windows 7.1*, *Epi 6* i *MedCalc*.

Usporedba učestalosti C282Y, H63D, TNF- $\alpha$ -308, TNF- $\alpha$ -238 i TF C1/C2 alela i genotipova u grupi i podgrupama bolesnika s grupom zdravih ispitanika izvršena je  $X^2$  testom i Fisherovim egzaktnim testom. Omjer izgleda (engl. odds ratios - OR) i pripadajući 95% raspon pouzdanosti (engl. confidence interval - CI) izračunati su kako bi se procijenio učinak različitih genotipova u podložnosti za MS.

Za izračunavanje očekivane prevalencije homozigota i heterozigota za ispitivane polimorfizme koristili smo Hardy-Weinbergovu jednadžbu:  $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$ ; gdje p predstavlja frekvenciju alela divljeg tipa, a q frekvenciju mutiranog alela. Eventualna odstupanja utvrđene distribucije genotipova od onih predviđenih Hardy-Weinbergovim ekvilibrijumom ispitali smo također  $X^2$  testom.

U okviru analize kliničkih pokazatelja koristena je deskriptivna statistika (srednje vrijednosti, standardne devijacije). Ispitivana je korelacija između genotipa i fenotipske ekspresije, odnosno kliničke slike te tijeka bolesti za sve polimorfizme. Povezanost pojedinih polimorfizama i genotipova s navedenim kliničkim parametrima testirana je analizom varijancije, pri čemu je korištena metoda parametrijske statistike jednosmjerni ANOVA test, faktorijski ANOVA test i analiza logističke regresije (engl. multiple forward stepwise regression analysis).

Statistička značajnost razlika izražena je na razini 0,05.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Utjecaj C282Y i H63D mutacija HFE gena na podložnost za MS

U analizu mutacija HFE gena uključili smo 368 bolesnika s kliničkom dijagnozom MS i isto toliko zdravih ispitanika kontrolne skupine. Udio ispitanika s i bez ispitivanih HFE mutacija u tri podskupine bolesnika ovisno o tijeku bolesti (P-P, S-P i R-R), zatim u svih bolesnika te u zdravih ispitanika prikazan je u tablici 27. Od ukupnog broja bolesnika, njih 26 (7,1%) bili su heterozigoti za C282Y mutaciju u usporedbi s njih 14 (3,8%) u kontrolnoj skupini, pri čemu statistička značajnost iznosi  $p=0,051$ . Usporedbom ovog genotipa između SP+RR MS bolesnika i kontrole razlika je postala statistički značajna ( $p=0,026$ ). Niti jedna osoba nije bila homozigot za C282Y mutaciju. Nosilaca za H63D mutaciju bilo je 95 (25,8%) u bolesnika i 105 (28,5%) u kontroli ( $p>0,05$ ), dok je H63D homozigota bilo gotovo značajno više ( $p=0,0501$ ) u kontroli 2,7% negoli u bolesnika 0,8%. Nisu utvrđene statistički značajne razlike ( $p>0,05$ ) u distribuciji genotipova između podskupina MS bolesnika.

Analizirane distribucije genotipova bile su podudarne s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi: za C282Y u bolesnika  $p=0,88$ , a u kontrolnoj skupini  $p=1,00$ ; za H63D u bolesnika  $p=0,54$ , a u kontrolnoj skupini  $p=0,96$ .

Kako bismo utvrdili frekvencije C282Y i H63D alela analizirali smo po 736 kromosoma na te dvije mutacije u skupini bolesnika i u skupini zdravih ispitanika. Dobivene frekvencije alela kao i statističke značajnosti prikazali smo također u tablici 27.

Budući da su C282Y i H63D mutantni aleli na istom genskom lokusu, izračunali smo i frekvenciju pojedinog alela isključivši one kromosome koji već nose drugu mutaciju. Tako smo izračunali frekvenciju C282Y alela u odnosu na kromosome koji nemaju H63D i stoga nose rizik za C282Y mutaciju. Frekvenciju H63D alela izračunali smo za kromosome koji nemaju C282Y mutaciju (rezultati nisu prikazani u tablici).

Nakon tako izvršene korekcije za kromosome s rizikom za C282Y mutaciju frekvencija C282Y alela u svih bolesnika iznosi 4,1%, što je više od 2,2 % u kontrolnoj skupini, ali razlike u frekvenciji C282Y alela među skupinama nisu statistički značajne ( $p=0,065$ ).

Nakon izvršene korekcije za kromosome s rizikom za H63D mutaciju frekvencija H63D alela u skupini MS bolesnika iznosi 13,8%, a u skupini zdravih ispitanika 15,9% i te razlike nisu statistički značajne ( $p=0,258$ ).

Tablica 27. Frekvencija alela i genotipova (%) HFE gena u MS bolesnika (N=368) i kontrolnih ispitanika (N=368)

Genotip	MS bolesnici (% , N)				Kontrola % (N=368)	p	OR (95% CI)
	P-P <sup>a</sup> (N=28)	S-P <sup>b</sup> (N=133)	R-R <sup>c</sup> (N=207)	Total (N=368)			
wt/wt	100,0 (28)	91,7 <sup>&amp;</sup> (122)	92,8 <sup>&amp;</sup> (192)	92,9 (342)	96,2 (354)	0,051	0,52 (0,27-1,01)
C282Y /wt	0,0 (0)	8,3 <sup>&amp;</sup> (11)	7,2 <sup>&amp;</sup> (15)	7,1 (26)	3,8 (14)	0,051	1,92 (0,99-3,74)
wt/wt	75,0 (21)	70,7 (94)	76,3 (158)	74,2 (273)	71,5 (263)	0,402	1,15 (0,83-1,59)
H63D/wt	25,0 (7)	27,8 (37)	23,2 (48)	25,0 (92)	25,8 (95)	0,791	0,95 (0,69-1,34)
H63D/H63D	0,0 (0)	1,5 (2)	0,5 (1)	0,8 (3)	2,7 (10)	0,0501	0,29 (0,08-1,08)
<b>Alel</b>							
C282Y	0,0	4,1 <sup>§</sup>	3,6 <sup>§</sup>	3,5	1,9	0,054*	
H63D	12,5	15,4	12,1	13,3	15,6	0,207 <sup>#</sup>	

wt – engl. wild tipe – divlji tip

<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

<sup>&</sup>  $p=0,026$  – između (S-P + R-R) i kontrole

<sup>§</sup>  $p=0,029$  – između (S-P + R-R) i kontrole

\* nakon korekcije  $p=0,065$

<sup>#</sup> nakon korekcije  $p=0,258$

S obzirom na procjene o visokoj prevalenciji MS u području Gorskog kotara i Kočevja te o kliničkim osobitostima i obiteljskoj pojavnosti bolesti u toj regiji prikazali smo distribuciju pojedinih HFE genotipova u navedenom žarišnom području u odnosu na ostala područja Hrvatske i Slovenije u grupi bolesnika i u zdravih ispitanika (tablica 28, tablica 29).

Usporedbe učestalosti pojedinih genotipova između zdravih kontrolnih ispitanika u žarištu i izvan njega nisu pokazale statističku značajnost ( $p>0,05$ ). Statističke značajnosti u distribuciji genotipova nisu utvrđene ni između MS bolesnika i kontrolnih ispitanika na području Gorskog kotara i Kočevja. Međutim, statistički značajna razlika utvrđena je u

distribuciji nositelja C282Y mutacije kao i genotipa divljeg tipa između MS bolesnika i kontrolnih ispitanika iz cijele Hrvatske i Slovenije ( $p=0,019$ ) (tablica 29). Također je utvrđena statistički značajna razlika ( $p=0,023$ ) u distribuciji C282Y/wt genotipa i wt/wt genotipa s obzirom na C282Y mutaciju između bolesnika iz žarišta u odnosu na bolesnike iz područja nižeg rizika.

Distribucija navedenih genotipova (C282Y/wt i wt/wt) statistički se značajno razlikuje ( $p=0,013$ ) između neobiteljskih MS slučajeva i kontrole. Obiteljski slučajevi MS u žarištu zastupljeni su sa 32,9%, a izvan žarišta s 17,9%. Nadalje, H63D heterozigoti i ispitanici bez te mutacije različito su zastupljeni između obiteljskih i neobiteljskih MS slučajeva ( $p=0,044$  i  $p=0,029$ ), te između obiteljskih MS slučajeva i kontrole ( $p=0,077$  i  $p=0,027$ ) (tablica 29).

Tablica 28. Distribucija HFE genotipova (%) u MS bolesnika (N=368) i kontrolnih ispitanika (N=368) u žarištu i izvan žarišta

Genotip	Žarište			Izvan žarišta			p*
	MS bolesnici % (N=79)	Kontrola % (N=86)	p <sub>1</sub>	MS bolesnici % (N=289)	kontrola % (N=282)	p <sub>2</sub>	
wt/wt	98,7 (78)	96,5 (83)	0,342	91,3 (264)	96,1 (271)	0,019	0,023
C282Y/wt	1,3 (1)	3,5 (3)	0,342	8,7 (25)	3,9 (11)	0,019	0,023
wt/wt	69,6 (55)	70,9 (61)	0,854	75,4 (218)	71,6 (202)	0,303	0,318
H63D/wt	29,1 (23)	25,6 (22)	0,613	23,9 (69)	25,9 (73)	0,578	0,332
H63D/H63D	1,3 (1)	3,5 (3)	0,342	0,7 (2)	2,5 (7)	0,102	0,620

wt – engl. wild tipe – divlji tip

p\* - statistička značajnost između MS bolesnika u žarištu i izvan žarišta



Tablica 29. Distribucija HFE genotipova (%) u obiteljskih (N=79) i neobiteljskih slučajeva MS bolesnika (N=287) i u kontrolnih ispitanika (N=368)

Genotip	Obiteljski MS % (N=79)	Neobiteljski MS % (N=287)	Kontrola % (N=368)	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p*
wt/wt	97,5 (77)	91,6 (263)	96,2 (354)	0,440	0,013	0,052
C282Y/wt	2,5 (2)	8,4 (24)	3,8 (14)	0,440	0,013	0,052
wt/wt	83,5 (66)	71,4 (205)	71,5 (263)	0,027	0,991	0,029
H63D/wt	16,5 (13)	27,5 (79)	25,8 (95)	0,077	0,624	0,044
H63D/H63D	0 (0)	1,1 (3)	2,7 (10)	0,139	0,162	0,481

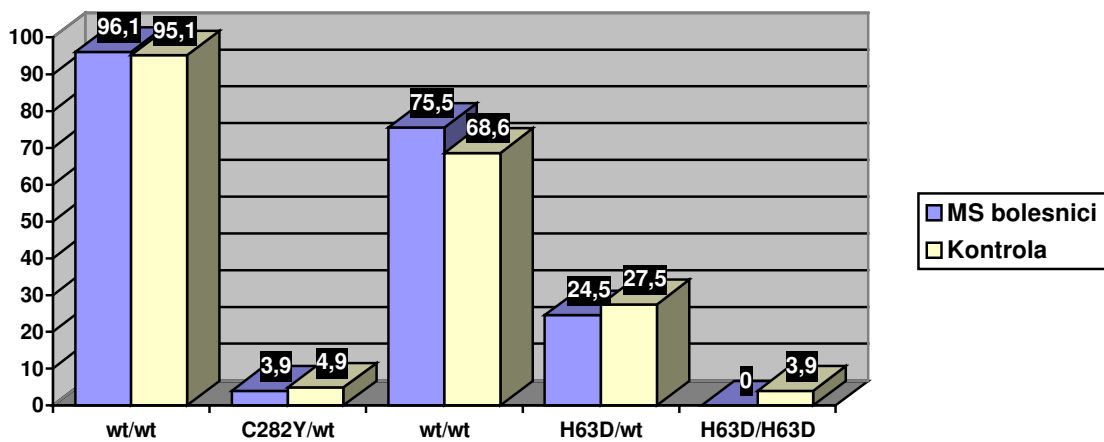
wt – engl. wild tipe – divlji tip

p<sub>1</sub> - statistička značajnost između obiteljskog MS i kontrole

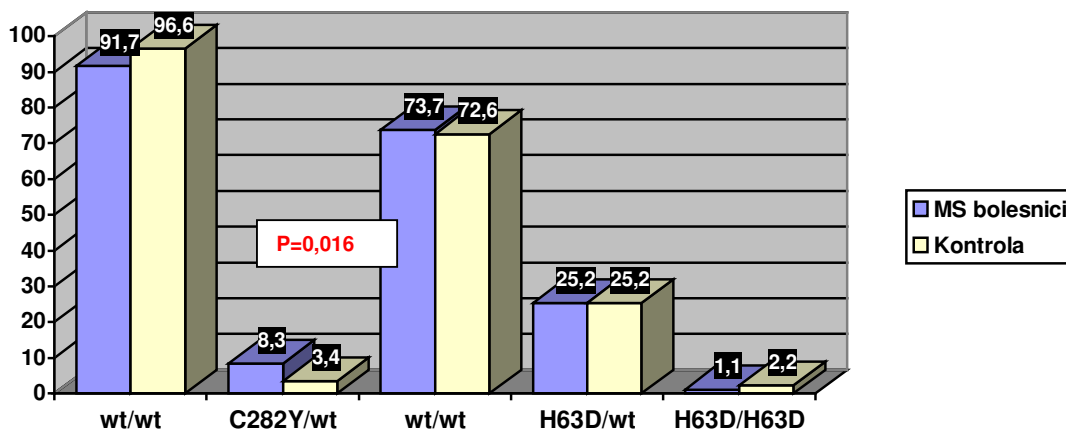
p<sub>2</sub> - statistička značajnost između neobiteljskog MS i kontrole

p\* - statistička značajnost između obiteljskog MS i neobiteljskog MS

Učestalost HFE genotipova usporedili smo između MS bolesnika i kontrolne skupine ovisno o spolu ispitanika. Tako slika 4 prikazuje usporedbu pojedinih HFE genotipova u MS bolesnika i kontrolnih ispitanika muškog spola, a slika 5 u MS bolesnika i kontrolnih ispitanika ženskog spola. Distribucija HFE genotipova ne pokazuje statistički značajne razlike niti unutar MS bolesnika niti u kontrolnih ispitanika s obzirom na spol ( $p > 0,05$ ). Međutim, statistički značajno više ima heterozigota za C282Y mutaciju u žena s MS (8,3%) negoli u zdravih žena (3,4%) ( $p = 0,016$ ).



Slika 4. Učestalost HFE genotipova (%) u MS bolesnika (N=102) i kontrolnih ispitanika (N=102) muškog spola



Slika 5. Učestalost HFE genotipova (%) u MS bolesnika (N=266) i kontrolnih ispitanika (N=266) ženskog spola

#### 4.2. Utjecaj C1/C2 polimorfizmaTF gena na predizpoziciju za MS

Analiza TF C1/C2 polimorfizma pokazala je da su pojedini genotipovi i aleli podjednako zastupljeni među bolesnicima i kontrolnom skupinom ( $p>0,05$ ). Iznimku predstavlja rjeđi TF C2/C2 genotip čija učestalost u bolesnika s PP tijekom bolesti iznosi 10,7% (N=3), a u bolesnika s SP ili RR tijekom bolesti 2,1% (N=7), što je statistički značajna razlika ( $p=0,033$ ) (tablica 30).

Analizirane distribucije TF C1/C2 genotipova bile su podudarne s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi (i u bolesnika i u kontroli  $p=1,00$ ).

Tablica 30. Frekvencija alela i genotipova (%) TF gena u MS bolesnika (N=368) i kontrolnih ispitanika (N=368)

Genotip	MS bolesnici % (N)				Kontrola % (N=368)	p	OR (95% CI)
	P-P <sup>a</sup> (N=28)	S-P <sup>b</sup> (N=133)	R-R <sup>c</sup> (N=207)	Total (N=368)			
C1/C1	71,4 (20)	68,4 (91)	71,0 (147)	70,1 (258)	69,8 (257)	0,952	1,01 (0,74-1,39)
C1/C2	17,9 (5)	28,6 (38)	27,5 (57)	27,2 (100)	27,5 (101)	0,934	0,99 (0,71-1,36)
C2/C2	<b>10,7*</b> <b>(3)</b>	<b>3,0*</b> <b>(4)</b>	<b>1,5*</b> <b>(3)</b>	2,7 (10)	2,7 (10)	1,000	1,0 (0,41-2,43)
<b>Alel</b>							
C1	80,4	84,2	84,8	83,7	83,6	0,943	
C2	19,6	15,8	15,2	16,3	16,4	0,943	

<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

\* $p=0,033$  – između P-P i (S-P + R-R)

Usporedbe učestalosti TF genotipova u žarištu i izvan njega nisu pokazale statističku značajnost ( $p>0,05$ ) ni između MS bolesnika ni između kontrolnih ispitanika, ni između bolesnika i kontrole (tablica 31).

Nadalje, TF genotipovi podjednako su bili zastupljeni i u obiteljskih i u neobiteljskih MS bolesnika te u kontroli, a razlike u distribuciji genotipova nije bilo ni ovisno o spolu ( $p>0,05$ ) (tablica 32, tablica 33).

Tablica 31. Distribucija TF genotipova (%) u MS bolesnika (N=368) i kontrolnih ispitanika (N=368) u žarištu i izvan žarišta

Genotip	Žarište			Izvan žarišta			p*
	MS bolesnici % (N=79)	Kontrola % (N=86)	p <sub>1</sub>	MS bolesnici % (N=289)	kontrola % (N=282)	p <sub>2</sub>	
<b>C1/C1</b>	73,4 (58)	70,9 (86)	0,721	69,2 (200)	69,5 (196)	0,936	0,468
<b>C1/C2</b>	25,3 (20)	27,9 (24)	0,704	27,7 (80)	27,3 (77)	0,917	0,675
<b>C2/C2</b>	1,3 (1)	1,2 (1)	0,953	3,1 (9)	3,2 (9)	0,952	0,370

p\* - statistička značajnost između MS bolesnika u žarištu i izvan žarišta

Tablica 32. Distribucija TF genotipova (%) u obiteljskih (N=79) i neobiteljskih slučajeva MS bolesnika (N=287) i kontrolnih ispitanika (N=368)

Genotip	Obiteljski MS % (N=79)	Neobiteljski MS % (N=287)	Kontrola % (N=368)	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p*
<b>C1/C1</b>	64,6 (51)	71,8 (206)	69,8 (257)	0,354	0,451	0,214
<b>C1/C2</b>	31,6 (25)	25,8 (74)	27,5 (101)	0,452	0,634	0,299
<b>C2/C2</b>	3,8 (3)	2,4 (7)	2,7 (10)	0,607	0,828	0,370

p<sub>1</sub> - statistička značajnost između obiteljskog MS i kontrole

p<sub>2</sub> - statistička značajnost između neobiteljskog MS i kontrole

p\* - statistička značajnost između obiteljskog MS i neobiteljskog MS

Tablica 33. Distribucija TF genotipova (%) u MS bolesnika (N=368) i kontrolnih ispitanika (N=368) prema spolu

Genotip	Muškarci			Žene		
	MS bolesnici % (N=102)	Kontrola % (N=102)	p	MS bolesnici % (N=266)	Kontrola % (N=266)	p
<b>C1/C1</b>	69,6 (71)	66,7 (68)	0,652	70,3 (187)	71,1 (189)	0,848
<b>C1/C2</b>	27,5 (28)	32,3 (33)	0,444	27,1 (72)	25,6 (68)	0,693
<b>C2/C2</b>	2,9 (3)	1,0 (1)	0,310	2,6 (7)	3,3 (9)	0,611

### 4.3. Međudjelovanje HFE i TF gena u podložnosti za MS

Nakon što smo utvrdili pojedinačni utjecaj HFE odnosno TF gena u predispoziciji za MS, ispitali smo njihovu povezanost s MS za svaki TF genotip nakon što smo stratificirali ispitanike s obzirom na prisutnost C282Y (tablica 34) odnosno H63D (tablica 35) mutacije HFE gena.

Statistička analiza nije pokazala značajnu interakciju ( $p > 0,05$ ) niti C282Y niti H63D mutacije s TF C1/C2 polimorfizmom. Razlika u učestalosti kombinacija ovih polimorfizama uočena je jedino u bolesnika s C282Y mutacijom i genotipom C1/C2 u odnosu na cijelu kontrolnu skupinu ( $p = 0,053$ ).

Tablica 34. Učestalost (%) TF C1/C2 polimorfizma prema pojedinim skupinama s obzirom na HFE C282Y mutaciju

Ispitivana skupina	TF C1/C1 % (N)	TF C1/C2 % (N)	TF C2/C2 % (N)
<b>Kontrola (N=368):</b>	69,8 (257)	<b>27,5</b> <b>(101)</b>	2,7 (10)
<b>Sa C282Y (N=14)</b>	71,4 (10)	21,5 (3)	7,1 (1)
<b>Bez C282Y (N=354)</b>	69,8 (247)	27,7 (98)	2,5 (9)
<b>Bolesnici (N=368):</b>	70,1 (258)	27,2 (100)	2,7 (10)
<b>Sa C282Y (N=26)</b>	84,6 (22)	<b>11,5</b> <b>(3)</b>	3,9 (1)
<b>Bez C282Y (N=342)</b>	69,0 (236)	28,4 (97)	2,6 (9)
<b>p<sub>1</sub></b>	0,109	<b>0,053</b>	0,735
<b>p<sub>2</sub></b>	0,810	0,785	0,943
<b>p<sub>3</sub></b>	0,276	0,345	0,583
<b>p<sub>4</sub></b>	0,826	0,842	0,943

p<sub>1</sub> - statistička značajnost između bolesnika sa C282Y alelom i kontrole

p<sub>2</sub> - statistička značajnost između bolesnika bez C282Y alela i kontrole

p<sub>3</sub> - statistička značajnost između bolesnika sa C282Y alelom i kontrole sa C282Y alelom

p<sub>4</sub> - statistička značajnost između bolesnika bez C282Y alela i kontrole bez C282Y alela

Tablica 35. Učestalost (%) TF C1/C2 polimorfizma prema pojedinim skupinama s obzirom na HFE H63D mutaciju

Ispitivana skupina	TF C1/C1 % (N)	TF C1/C2 % (N)	TF C2/C2 % (N)
<b>Kontrola (N=368):</b>	69,8 (257)	27,5 (101)	2,7 (10)
<b>Sa H63D (N=105)</b>	70,5 (74)	26,7 (28)	2,8 (3)
<b>Bez H63D (N=263)</b>	69,6 (183)	27,7 (73)	2,7 (7)
<b>Bolesnici (N=368):</b>	70,1 (258)	27,2 (100)	2,7 (10)
<b>Sa H63D (N=95)</b>	68,4 (65)	28,4 (27)	3,2 (3)
<b>Bez H63D (N=273)</b>	70,7 (193)	26,7 (73)	2,6 (7)
<b>p<sub>1</sub></b>	0,789	0,849	0,519
<b>p<sub>2</sub></b>	0,814	0,842	0,904
<b>p<sub>3</sub></b>	0,993	0,781	0,610
<b>p<sub>4</sub></b>	0,778	0,791	0,943

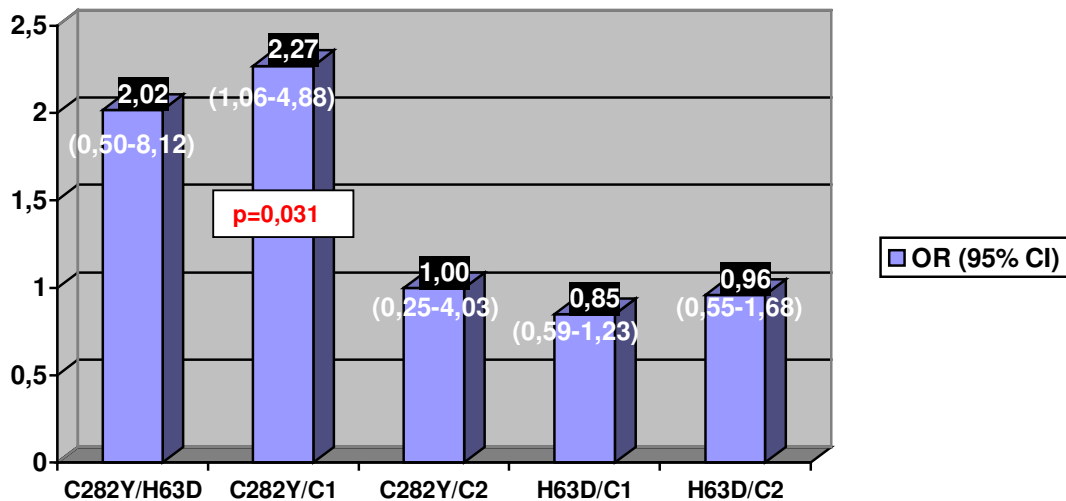
p<sub>1</sub> - statistička značajnost između bolesnika sa H63D alelom i kontrole

p<sub>2</sub> - statistička značajnost između bolesnika bez H63D alela i kontrole

p<sub>3</sub> - statistička značajnost između bolesnika sa H63D alelom i kontrole sa H63D alelom

p<sub>4</sub> - statistička značajnost između bolesnika bez H63D alela i kontrole bez H63D alela

Rizik za MS u bolesnika s različitim kombinacijama polimorfizama HFE i TF gena prikazan je na slici 6. Složeni heterozigoti za C282Y i H63D mutaciju imaju dva puta veći rizik za MS u odnosu na osobe bez tih mutacija, dok je rizik za osobe s C282Y i C1 alelom 2,27 puta veći, što je i statistički značajno ( $p=0,031$ ).



\*Broj bolesnika/kontrole za različite kombinacije alela: 6/3 za C282Y/H63D; 22/10 za C282Y/C1; 4/4 za C282Y/C2; 65/74 za H63D/C1; 26/27 za H63D/C2

Slika 6. Rizik (OR (95% CI)) za MS u osoba koje nose kombinaciju polimorfizma HFE i TF gena\*

#### 4.4. Utjecaj polimorfizama –308 i –238 TNF- $\alpha$ gena na podložnost za MS

Distribucija genotipova i frekvencija alela za polimorfizme TNF- $\alpha$ -308 i -238 u tri podskupine bolesnika ovisno o tijeku bolesti (P-P, S-P i R-R), zatim u svih bolesnika te u zdravih ispitanika prikazana je u tablici 36. Rezultati dobiveni za polimorfizam –308 pokazuju da je broj osoba sa –308 A alelom (genotip 308 AG i 308 AA) manji u bolesnika (N=77) negoli u kontroli (N=98), ali razlika nije statistički značajna ( $p=0,069$ ), što je i u skladu s frekvencijom -308 A alela. Statistički značajna razlika ( $p=0,015$ ) utvrđena je za genotip 308 AG između bolesnika i kontrole te bolesnika s RR tijekom bolesti i kontrole ( $p=0,011$ ).

Za polimorfizam –238 utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u frekvenciji genotipova i alela između sve tri podskupine bolesnika u odnosu na kontrolu, između svih bolesnika i kontrole, te između bolesnika s PP tijekom bolesti i bolesnika s SP i RR tijekom bolesti, pri čemu alel 238 A ima veću učestalost u bolesnika negoli u kontroli.

Analizirane distribucije genotipova bile su podudarne s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi: za TNF- $\alpha$ -308 u bolesnika  $p = 0,19$ , a u kontrolnoj skupini  $p = 0,93$ ; za TNF- $\alpha$ -238  $p = 1,00$  i u bolesnika i u kontroli.

S obzirom na relativno mali broj osoba homozigota za 308 i 238 A alel njih smo u daljnjoj obradi rezultata pribrojili (AG + AA) osobama koje su heterozigoti za taj alel.

Tablica 36. Frekvencija (%) TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 alela i genotipova u MS bolesnika (N=368) i kontrolnih ispitanika (N=368)

Genotip	MS bolesnici (% , N)				Kontrola % (N=368)	p	OR (95% CI)
	P-P <sup>a</sup> (N=28)	S-P <sup>b</sup> (N=133)	R-R <sup>c</sup> (N=207)	Total (N=368)			
308 GG	78,6 (22)	77,4 (103)	80,2 (166)	79,1 (291)	73,4 (270)	0,069	1,37 (0,98-1,93)
308 AG	21,4 (6)	19,5 (26)	15,9 <sup>&amp;</sup> (33)	17,7 (65)	25,0 (92)	0,015	0,64 (0,45-0,92)
308 AA	0,0 (0)	3,0 (4)	3,9 (8)	3,2 (12)	1,6 (6)	0,152	2,04 (0,76-5,48)
238 GG	78,6* (22)	89,5 (119)	91,8 (190)	90,0 (331)	96,2 (354)	0,0008	0,35 (0,19-0,67)
238 AG	21,4* (6)	10,5 (14)	7,7 (16)	9,7 (36)	3,8 (14)	0,001	2,75 (1,45-5,18)
238 AA	0,0 (0)	0,0 (0)	0,5 (1)	0,3 (1)	0,0 (0)	-	-
<b>Alel</b>							
308 G	85,7	87,2	88,2	87,9	85,9	0,246	
308 A	14,3	12,8	11,8	12,1	14,1	0,246	
238 G	85,7 <sup>#</sup>	94,7	95,6	94,8	98,1	0,0007	
238 A	14,3 <sup>#</sup>	5,3	4,4	5,2	1,9	0,0007	

<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda

CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

<sup>&</sup>  $p = 0,011$  - između RR i kontrole

\*  $p = 0,037$  - između P-P i (S-P + R-R)

#  $p = 0,042$  - između P-P i (S-P + R-R)



S obzirom na procjene o visokoj prevalenciji MS u području Gorskog kotara i Kočevja, te o kliničkim osobitostima i obiteljskoj pojavnosti bolesti u toj regiji, prikazali smo distribuciju TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 genotipova u navedenom žarišnom području u odnosu na ostala područja Hrvatske i Slovenije kako u grupi bolesnika, tako i u zdravih ispitanika, te u obiteljskih i neobiteljskih MS slučajeva (tablica 37, tablica 38).

Statistički značajna razlika ( $p=0,016$ ) utvrđena je u distribuciji nositelja 308 A alela kao i genotipa 308 GG između MS bolesnika i kontrolnih ispitanika iz Gorskog kotara i Kočevja, pri čemu je udio osoba koje imaju A alel manji u bolesnika (16,5%) negoli u kontroli (32,6%) (tablica 37).

Udio osoba s 308 A alelom manji je u bolesnika (21,3%) negoli u kontroli (26,6%) i nakon stratifikacije bolesnika na obiteljske i neobiteljske slučajeve, ali razlike nisu statistički značajne ( $p=0,238$  i  $p=0,111$ ) (tablica 38).

Usporedbe učestalosti genotipa 238 AG i AA u svih skupina bolesnika (u žarištu i izvan žarišta, te u obiteljskih i neobiteljskih slučajeva) u odnosu na kontrolu ukazuju na veći broj nositelja 238 A alela među bolesnicima. Razlike su statistički značajne ( $p<0,05$ ) osim u žarištu gdje je  $p=0,093$ .

Tablica 37. Distribucija TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 genotipova (%) u MS bolesnika (N=368) i kontrolnih ispitanika (N=368) u žarištu i izvan žarišta

Genotip	Žarište			Izvan žarišta			p*
	MS bolesnici % (N=79)	Kontrola % (N=86)	p <sub>1</sub>	MS bolesnici % (N=289)	kontrola % (N=282)	p <sub>2</sub>	
308 GG	83,5 (66)	67,4 (58)	0,016	77,9 (225)	75,2 (212)	0,450	0,270
308 AG + AA	16,5 (13)	32,6 (28)	0,016	22,1 (64)	24,8 (70)	0,450	0,270
238 GG	88,6 (70)	95,3 (82)	0,093	90,3 (261)	96,5 (272)	0,003	0,655
238 AG + AA	11,4 (9)	4,7 (4)	0,093	9,7 (28)	3,5 (10)	0,003	0,655

p\* - statistička značajnost između MS bolesnika u žarištu i izvan žarišta

Tablica 38. Distribucija TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 (%) genotipova u obiteljskih i neobiteljskih slučajeva MS bolesnika i kontrolnih ispitanika

Genotip	Obiteljski MS % (N=79)	Neobiteljski MS % (N=287)	Kontrola % (N=368)	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p*
308 GG	79,7 (63)	78,7 (226)	73,4 (270)	0,238	0,111	0,846
308 AG + AA	20,3 (16)	21,3 (61)	26,6 (98)	0,238	0,111	0,846
238 GG	89,9 (71)	89,9 (258)	96,2 (354)	0,018	0,001	0,995
238 AG + AA	11,1 (8)	11,1 (29)	3,8 (14)	0,018	0,001	0,995

p<sub>1</sub> - statistička značajnost između obiteljskog MS i kontrole

p<sub>2</sub> - statistička značajnost između neobiteljskog MS i kontrole

p\* - statistička značajnost između obiteljskog MS i neobiteljskog MS

Nadalje smo ispitali postoji li razlika u učestalosti pojedinih genotipova TNF- $\alpha$ -308 i -238 između MS bolesnika i kontrole s obzirom na spol, kao i između oboljelih muškaraca i žena, te između muških i ženskih kontrolnih ispitanika (tablica 39). U MS bolesnika veća je učestalost genotipa 308 AG i AA u žena (23,3%) negoli u muškaraca (14,7%), ali razlika nije statistički značajna (p=0,069). Navedeni genotip češći je u kontroli negoli u bolesnika oba spola ali razlike također nisu statistički značajne (p>0,05).

Polimorfizam -238 podjednako je zastupljen u muškaraca i žena obje ispitivane skupine (p>0,05). Usporedbom učestalosti genotipa 238 AG i AA između bolesnika i kontrole utvrdili smo statistički značajnu razliku kod žena (p=0,005) i graničnu vrijednost statističke značajnosti kod muških ispitanika (p=0,052).

Tablica 39. Distribucija TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 genotipova (%) u MS bolesnika (N=368) i kontrolnih ispitanika (N=368) prema spolu

Genotip	Muškarci			Žene		
	MS bolesnici % (N=102)	Kontrola % (N=102)	p	MS bolesnici % (N=266)	Kontrola % (N=266)	p
<b>308 GG</b>	85,3 (87)	76,5 (78)	0,109	76,7 (204)	72,2 (192)	0,233
<b>308 AG + AA</b>	14,7 (15)	23,5 (24)	0,109	23,3 (62)	27,8 (74)	0,233
<b>238 GG</b>	<b>89,2 (91)</b>	<b>96,1 (98)</b>	<b>0,052</b>	<b>90,2 (240)</b>	<b>96,2 (256)</b>	<b>0,005</b>
<b>238 AG + AA</b>	<b>10,8 (11)</b>	<b>3,9 (4)</b>	<b>0,052</b>	<b>9,8 (26)</b>	<b>3,8 (10)</b>	<b>0,005</b>

#### 4.5. Međudjelovanje HFE i TNF- $\alpha$ gena u podložnosti za MS

Nakon što smo utvrdili pojedinačni utjecaj HFE odnosno TNF- $\alpha$  gena u predispoziciji za MS, ispitali smo njihovu povezanost s MS za svaki TNF- $\alpha$ -308 i -238 genotip nakon što smo stratificirali ispitanike s obzirom na prisutnost C282Y (tablica 40) odnosno H63D (tablica 41) mutacije HFE gena.

Usporedba bolesnika bez HFE C282Y mutacije i s TNF- $\alpha$ -308 A alelom u odnosu na kontrolnu skupinu s TNF- $\alpha$ -308 A alelom pokazuje graničnu vrijednost statističke značajnosti ( $p=0,053$ ), dok razlika postaje statistički značajna u usporedbi s kontrolnom skupinom koja ima istu kombinaciju alela bez C282Y mutacije i s TNF- $\alpha$ -308 A polimorfizmom ( $p=0,032$ ) (tablica 40). Nadalje, bolesnici bez C282Y mutacije imaju veću učestalost TNF- $\alpha$ -238 A alela (10,5%) u odnosu na cjelokupnu kontrolnu skupinu (3,8%) i na kontrolnu skupinu bez C282Y mutacije (3,4%), što je statistički značajno ( $p<0,05$ ). Broj ispitanika s C282Y mutacijom i TNF- $\alpha$ -238 A alelom mali je u obje skupine.

Tablica 40. Učestalost TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizama (%) prema pojedinim skupinama s obzirom na HFE C282Y mutaciju

Ispitivana skupina	TNF- $\alpha$ 308 GG % (N)	TNF- $\alpha$ 308 AG + AA % (N)	TNF- $\alpha$ 238 GG % (N)	TNF- $\alpha$ 238 AG + AA % (N)
<b>Kontrola (N=368):</b>	<b>73,4</b> <b>(270)</b>	<b>26,6</b> <b>(98)</b>	<b>96,2</b> <b>(354)</b>	<b>3,8</b> <b>(14)</b>
<b>Sa C282Y (N=14)</b>	92,9 (13)	7,1 (1)	85,7 (12)	14,3 (2)
<b>Bez C282Y (N=354)</b>	<b>72,6</b> <b>(257)</b>	<b>27,4</b> <b>(97)</b>	<b>96,6</b> <b>(342)</b>	<b>3,4</b> <b>(12)</b>
<b>Bolesnici (N=368):</b>	79,1 (291)	20,9 (77)	<b>90,0</b> <b>(331)</b>	<b>10,0</b> <b>(37)</b>
<b>Sa C282Y (N=26)</b>	73,1 (19)	26,9 (7)	96,2 (25)	3,8 (1)
<b>Bez C282Y (N=342)</b>	<b>79,5</b> <b>(272)</b>	<b>20,5</b> <b>(70)</b>	<b>89,5</b> <b>(306)</b>	<b>10,5</b> <b>(36)</b>
<b>p<sub>1</sub></b>	0,974	0,974	0,647	0,647
<b>p<sub>2</sub></b>	<b>0,053</b>	<b>0,053</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0005</b>
<b>p<sub>3</sub></b>	0,140	0,140	0,276	0,276
<b>p<sub>4</sub></b>	<b>0,032</b>	<b>0,032</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>

p<sub>1</sub> - statistička značajnost između bolesnika sa C282Y alelom i kontrole

p<sub>2</sub> - statistička značajnost između bolesnika bez C282Y alela i kontrole

p<sub>3</sub> - statistička značajnost između bolesnika sa C282Y alelom i kontrole sa C282Y alelom

p<sub>4</sub> - statistička značajnost između bolesnika bez C282Y alela i kontrole bez C282Y alela

TNF- $\alpha$ -308 A alel rjeđi je u bolesnika s H63D mutacijom nego u kontrolnih ispitanika ( $p=0,028$ ) (tablica 41). TNF- $\alpha$ -238 A alel češće se javlja ( $p<0,05$ ) u bolesnika (10,01%) negoli u kontroli (3,8%) kao i u bolesnika bez H63D mutacije (9,5%) u odnosu na kontrolnu skupinu bez H63D mutacije (2,3%), ali se statistička značajnost gubi u kombinaciji ovog alela s H63D mutacijom ( $p=0,225$ ).

Tablica 41. Učestalost TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizama (%) prema pojedinim skupinama s obzirom na HFE H63D mutaciju

Ispitivana skupina	TNF- $\alpha$ 308 GG % (N)	TNF- $\alpha$ 308 AG + AA % (N)	TNF- $\alpha$ 238 GG % (N)	TNF- $\alpha$ 238 AG + AA % (N)
<b>Kontrola (N=368):</b>	<b>73,4 (270)</b>	<b>26,4 (98)</b>	<b>96,2 (354)</b>	<b>3,8 (14)</b>
Sa H63D (N=105)	80,0 (84)	20,0 (21)	93,3 (98)	6,7 (7)
Bez H63D (N=263)	70,7 (186)	29,3 (77)	<b>97,3 (256)</b>	<b>2,3 (7)</b>
<b>Bolesnici (N=368):</b>	79,1 (291)	20,9 (77)	<b>89,9 (331)</b>	<b>10,1 (37)</b>
Sa H63D (N=95)	<b>84,2 (80)</b>	<b>15,8 (15)</b>	88,4 (84)	11,6 (11)
Bez H63D (N=273)	77,3 (211)	22,7 (62)	<b>90,5 (247)</b>	<b>9,5 (26)</b>
<b>p<sub>1</sub></b>	<b>0,028</b>	<b>0,028</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>
<b>p<sub>2</sub></b>	0,256	0,256	<b>0,003</b>	<b>0,003</b>
<b>p<sub>3</sub></b>	0,082	0,082	0,225	0,225
<b>p<sub>4</sub></b>	0,438	0,438	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>

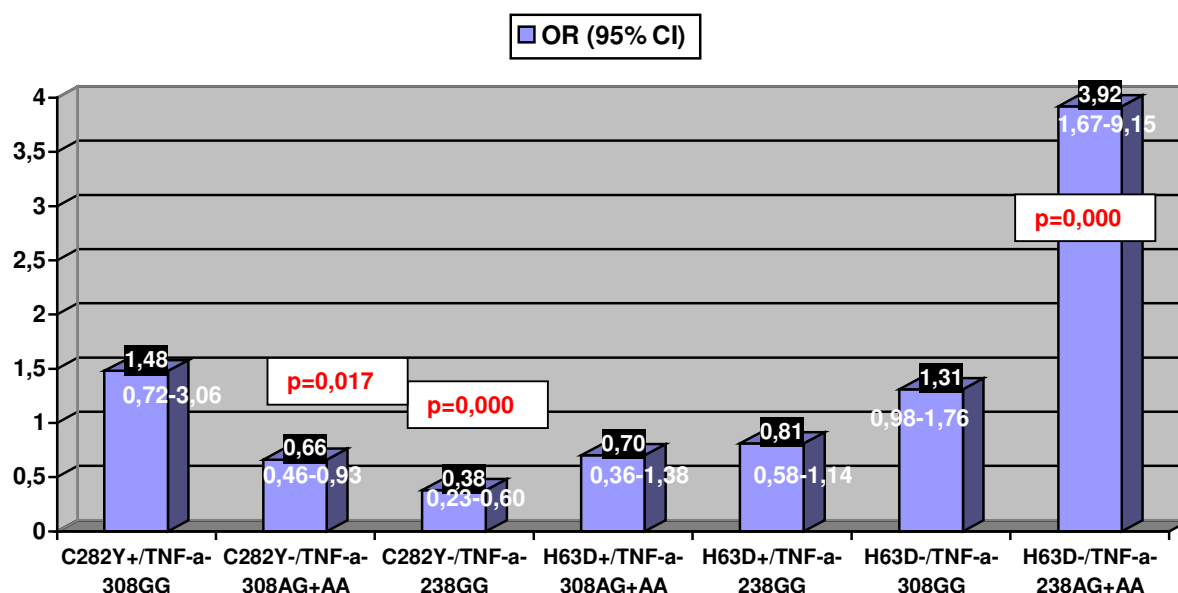
p<sub>1</sub> - statistička značajnost između bolesnika sa H63D alelom i kontrole

p<sub>2</sub> - statistička značajnost između bolesnika bez H63D alela i kontrole

p<sub>3</sub> - statistička značajnost između bolesnika sa H63D alelom i kontrole sa H63D alelom

p<sub>4</sub> - statistička značajnost između bolesnika bez H63D alela i kontrole bez H63D alela

Rizik za MS u bolesnika s različitim kombinacijama polimorfizama HFE i TNF- $\alpha$  gena prikazan je na slici 7. Povećan rizik u podložnosti za MS imaju osobe s HFE C282Y mutacijom u kombinaciji s TNF- $\alpha$ -308 G alelom (OR=1,48) i osobe bez HFE H63D mutacije u kombinaciji s TNF- $\alpha$ -308 G alelom (OR=1,31). Osobe bez HFE H63D mutacije u kombinaciji s TNF- $\alpha$ -238 A alelom imaju čak 3,92 puta veći rizik u podložnosti za MS ( $p=0,000$ ). Statistički značajno manji rizik ( $p<0,05$ ) u podložnosti za MS imaju osobe bez HFE C282Y mutacije u kombinaciji s TNF- $\alpha$ -308 A alelom (OR=0,66) odnosno TNF- $\alpha$ -238 G alelom (OR=0,38).



\* Broj bolesnika/kontrole za različite kombinacije alela: 19/13 za C282Y+/TNF- $\alpha$ -308GG; 70/97 za C282Y-/TNF- $\alpha$ -308AG+AA; 306/342 za C282Y-/TNF- $\alpha$ -238GG; 15/21 za H63D+/TNF- $\alpha$ -308AG+AA; 84/98 za H63D+/TNF- $\alpha$ -238GG; 211/186 za H63D-/TNF- $\alpha$ -308GG; 26/7 za H63D-/TNF- $\alpha$ -238AG+AA

Slika 7. Rizik (OR (95% CI)) za MS u osoba koje nose kombinaciju polimorfizma HFE i TNF- $\alpha$  gena\*

#### 4.6. Utjecaj C282Y i H63D mutacija HFE gena na kliničku ekspresiju MS

Dob nastupa bolesti u osoba s ili bez C282Y, odnosno H63D mutacije HFE gena u četiri podskupine MS bolesnika ovisno o tijeku bolesti (P-P, S-P, R-R i SP+RR) te u svih bolesnika prikazana je u tablici 42. Bolest nastupa 2,6 godina ranije u bolesnika s C282Y mutacijom, ali razlika nije statistički značajna ( $p=0,198$ ). Dob nastupa bolesti podjednaka je bez obzira na H63D mutaciju ( $p=0,882$ ), dok je u H63D homozigota (rezultat nije prikazan u tablici) srednja dob nastupa bolesti nešto veća i iznosi  $31,7\pm 7,6$  godina (također nije statistički značajno:  $p=0,689$ ). Iz tablice je razvidno da bolest nastupa kasnije u bolesnika s primarno progresivnim tijekom bolesti bez obzira na navedene genske varijante.

Tablica 42. Dob nastupa bolesti (godine) prema statusu nositelja C282Y i H63D mutacije

	Dob nastupa MS ( $\bar{X} \pm SD^*$ )		p	Dob nastupa MS ( $\bar{X} \pm SD^*$ )		p
	C282Y pozitivan	C282Y negativan		H63D pozitivan	H63D negativan	
<b>PP<sup>a</sup> MS</b>	-	37,3±9,8	-	34±7,5	38,5±10,4	0,304
<b>SP<sup>b</sup> MS</b>	26,4±12,6	29,8±8,4	0,225	30,2±9,2	29,3±8,7	0,584
<b>RR<sup>c</sup> MS</b>	28,2±11,3	28,7±8,0	0,823	28,8±8,9	28,9±8,0	0,932
<b>SP+RR</b>	27,4±11,7	29,2±8,2	0,325	29,4±8,9	28,9±8,3	0,645
<b>Ukupno MS</b>	27,2±11,5	29,8±8,6	0,198	29,8±8,9	29,6±8,8	0,882

\*  $\bar{X} \pm SD$  – srednja vrijednost i standardna devijacija

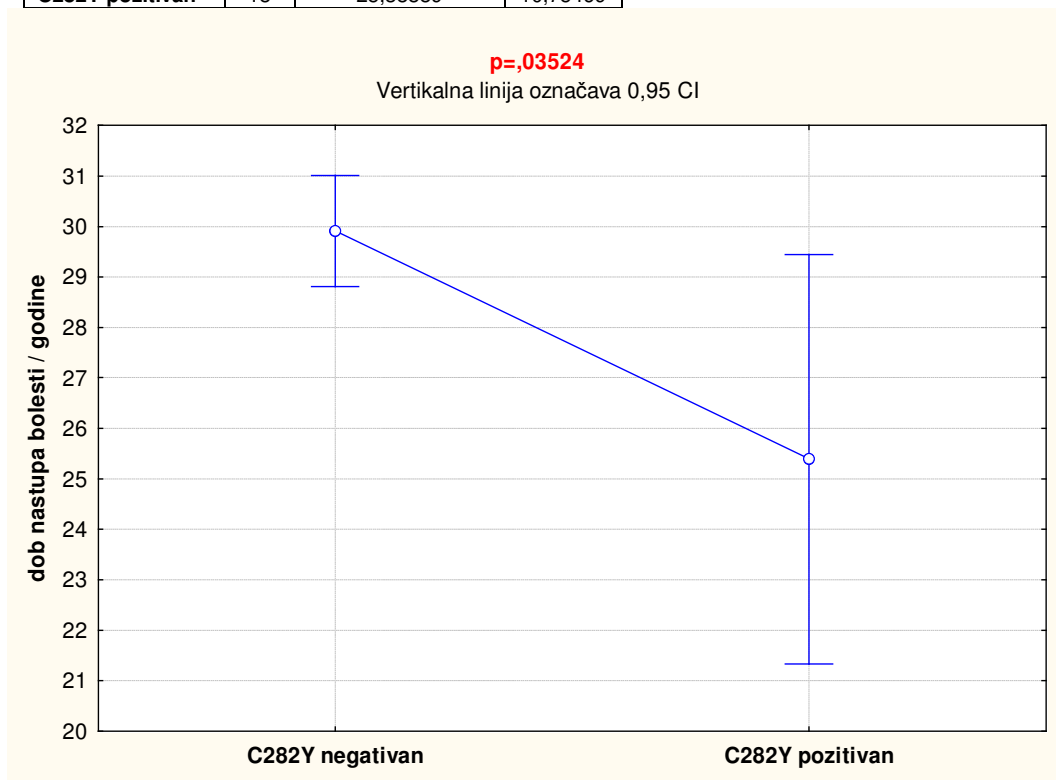
<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

Srednju dob nastupa bolesti u bolesnika sa C282Y mutacijom i bez C282Y mutacije izračunali smo i nakon što smo isključili one bolesnike koji imaju H63D mutaciju. Također smo izračunali srednju dob nastupa bolesti u bolesnika s H63D mutacijom i bez H63D mutacije nakon što smo isključili one bolesnike koji imaju C282Y mutaciju. Nakon ove korekcije pokazalo se da bolest nastupa 4,5 godina ranije u nosilaca C282Y mutacije, što je statistički značajno ( $p=0,035$ ) (slika 8).

	N	Srednja vrijednost	SD
C282Y negativan	246	29,90650	8,58400
C282Y pozitivan	18	25,38889	10,75469



Slika 8. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u bolesnika sa i bez C282Y mutacije

Trajanje bolesti s obzirom na C282Y mutaciju ne pokazuje značajnu razliku ( $p > 0,05$ ) (tablica 43) ni u podskupinama ni u svih MS bolesnika, ni nakon što smo isključili bolesnike koji imaju H63D mutaciju (trajanje: C282Y pozitivan -  $13,8 \pm 10,4$ ; C282Y negativan -  $12,1 \pm 10,2$ ;  $p = 0,492$ ). Bolest traje 2,1 godinu duže u bolesnika s H63D mutacijom ( $p > 0,05$ ), a nakon što smo isključili bolesnike koji imaju C282Y mutaciju statistička značajnost dosegla je graničnu vrijednost ( $p = 0,0504$ ) (slika 9). U H63D homozigota bolest traje kraće, ali razlika nije statistički značajna ( $p = 0,241$ ) (rezultat nije prikazan u tablici). Nadalje, iz tablice 44 razvidno je da bolest najdulje traje u bolesnika sa SP tijekom bolesti bez obzira na navedene genske varijante.



Tablica 43. Trajanje bolesti (godine) prema statusu nositelja C282Y i H63D mutacije

	Trajanje MS ( $\bar{X} \pm SD^*$ )		p	Trajanje MS ( $\bar{X} \pm SD^*$ )		p
	C282Y pozitivan	C282Y negativan		H63D pozitivan	H63D negativan	
PP <sup>a</sup> MS	-	11,6±9,9	-	16,1±10,7	9,8±9,3	0,153
SP <sup>b</sup> MS	19,0±9,9	19,2±11,1	0,944	20,1±12,6	18,9±10,3	0,577
RR <sup>c</sup> MS	6,7±5,2	8,8±8,0	0,358	9,2±7,8	8,5±7,9	0,592
SP+RR	12,3±9,8	12,9±10,6	0,800	14,1±11,4	12,4±10,2	0,204
Ukupno MS	12,3±9,8	12,8±10,6	0,836	14,3±11,4	12,2±10,2	0,111

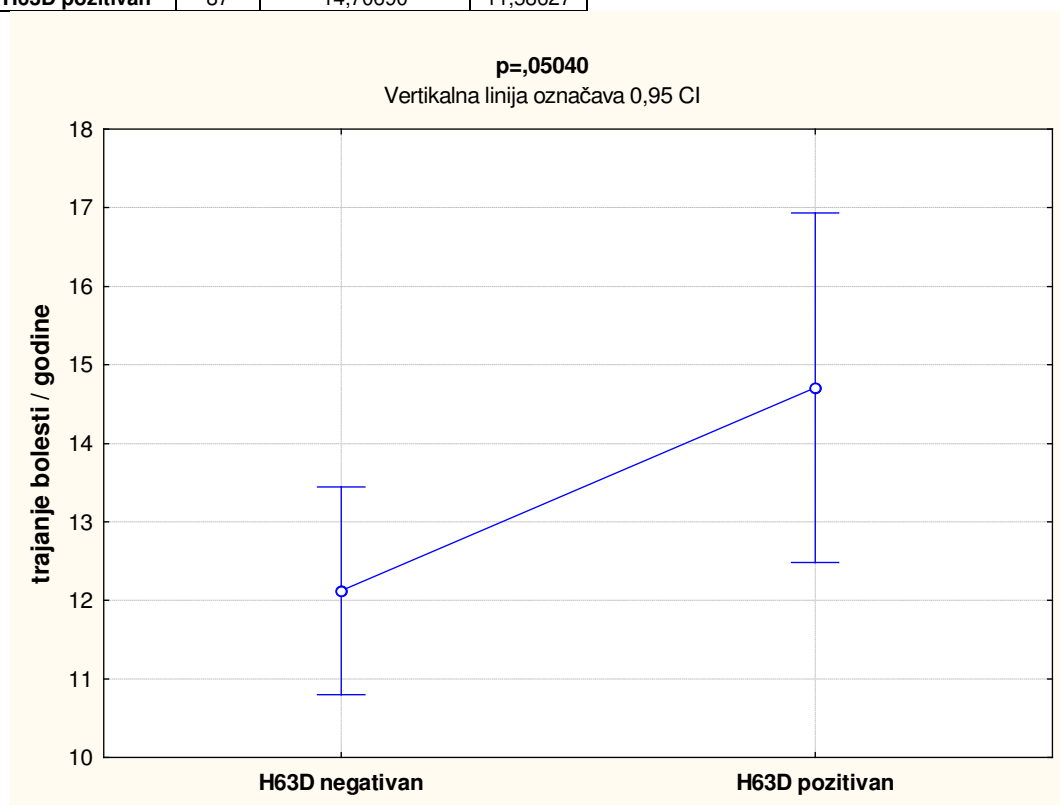
\*  $\bar{X} \pm SD$  – srednja vrijednost i standardna devijacija

<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

	N	Srednja vrijednost	SD
H63D negativan	246	12,12398	10,15371
H63D pozitivan	87	14,70690	11,58627



Slika 9. Prosječno trajanje bolesti (godine) u bolesnika s H63D mutacijom i bez H63D mutacije nakon korekcije za nosioce HFE C282Y mutacije

Distribucija stupnja invalidnosti i progresijskog indeksa u ovisnosti o C282Y ili H63D mutaciji prikazana je u tablicama 44 i 45. Nisu utvrđene razlike u vrijednosti navedenih parametara među bolesnicima koji imaju, odnosno nemaju C282Y i/ili H63D mutacije HFE gena. Statistički značajne razlike s obzirom na ove mutacije nema ( $p > 0,05$ ) ni u ovisnosti o tijeku bolesti, niti je ima nakon što smo isključili bolesnike koji već imaju jednu mutaciju HFE gena (vrijednosti nisu prikazane). U H63D homozigota EDSS iznosi  $3,5 \pm 0,9$  ( $p = 0,723$ ), a PI  $0,53 \pm 0,04$  ( $p = 0,366$ ) (vrijednosti nisu prikazane u tablicama). Iz tablica je razvidno da su EDSS i PI veći u svih bolesnika s progresivnim tijekom bolesti (PP i SP) bez obzira na navedene genske varijante.

Tablica 44. Stupanj invalidnosti (EDSS) prema statusu nositelja C282Y i H63D mutacije

	EDSS ( $X \pm SD^*$ )		p	EDSS ( $X \pm SD^*$ )		p
	C282Y pozitivan	C282Y negativan		H63D pozitivan	H63D negativan	
PP <sup>a</sup> MS	-	6,1±1,9	-	6,6±1,7	6,0±1,9	0,489
SP <sup>b</sup> MS	5,7±1,2	6,0±1,7	0,569	5,9±1,9	6,0±1,6	0,754
RR <sup>c</sup> MS	2,6±2,1	2,4±1,5	0,690	2,5±1,6	2,4±1,6	0,926
Ukupno MS	4,0±2,3	4,1±2,4	0,973	4,2±2,5	4,0±2,4	0,376

\*  $X \pm SD$  – srednja vrijednost i standardna devijacija

<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

Tablica 45. Progresijski indeks (PI) prema statusu nosilaca C282Y i H63D mutacije

	PI ( $X \pm SD^*$ )		p	PI ( $X \pm SD^*$ )		p
	C282Y pozitivan	C282Y negativan		H63D pozitivan	H63D negativan	
PP <sup>a</sup> MS	-	0,49±0,19	-	0,50±0,20	0,49±0,23	0,918
SP <sup>b</sup> MS	0,48±0,40	0,42±0,26	0,473	0,41±0,28	0,42±0,28	0,882
RR <sup>c</sup> MS	0,31±0,17	0,29±0,20	0,825	0,24±0,13	0,30±0,21	0,136
Ukupno MS	0,40±0,33	0,36±0,24	0,481	0,35±0,24	0,37±0,25	0,683

\*  $X \pm SD$  – srednja vrijednost i standardna devijacija

<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

#### 4.7. Utjecaj C1/C2 polimorfizmaTF gena na kliničku ekspresiju MS

Dob nastupa kao ni trajanje bolesti ne pokazuju značajna odstupanja ( $p>0,05$ ) s obzirom na TF C2 alel ni u podskupinama, ni u svih MS bolesnika (tablica 46).

Tablica 46. Dob nastupa i trajanje bolesti (godine) prema statusu nositelja TF C2 alela

	Dob nastupa MS ( $X \pm SD^*$ )		p	Trajanje MS ( $X \pm SD^*$ )		p
	C2 pozitivan	C2 negativan		C2 pozitivan	C2 negativan	
<b>PP<sup>a</sup> MS</b>	36,6±10,7	37,6±9,7	0,820	13,3±9,7	10,9±10,1	0,594
<b>SP<sup>b</sup> MS</b>	30,1±8,9	29,3±8,8	0,651	18,5±11,6	19,5±10,7	0,619
<b>RR<sup>c</sup> MS</b>	29,2±7,7	28,5±8,5	0,624	7,9±7,3	8,9±8,1	0,410
<b>PP+RR</b>	29,5±8,2	28,8±8,6	0,491	12,3±10,7	13,1±10,6	0,567
<b>Ukupno MS</b>	30,0±8,5	29,5±9,0	0,621	12,4±10,6	12,9±10,2	0,681

\*  $X \pm SD$  – srednja vrijednost i standardna devijacija

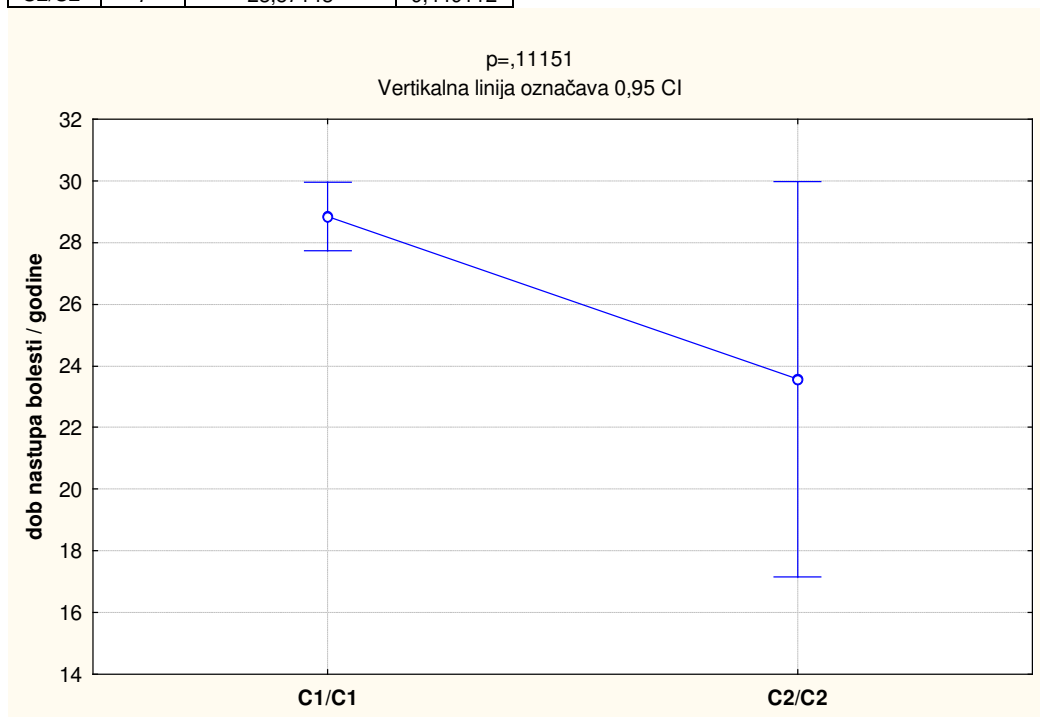
<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

Bolest nastupa 3,6 godina ranije u bolesnika (N=9) koji su homozigoti za C2 alel ( $p=0,236$ ) i čak 5,2 godina ranije u bolesnika s SP ili RR tijekom bolesti. S obzirom na relativno mali broj bolesnika (N=7) s SP ili RR tijekom bolesti i s genotipom C2/C2 razlika nije statistički značajna ( $p=0,112$ ) (slika 10). Uslijed ranijeg početka bolesti u C2 homozigota bolest traje u prosjeku 2 godine duže, što nije statistički značajno ( $p=0,559$ ) (rezultat nije prikazan).

	N	Srednja vrijednost	SD
C1/C1	233	28,84549	8,584378
C2/C2	7	23,57143	9,449112



Slika 10. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u bolesnika homozigota za TF C1 odnosno C2 alel

Stupanj invalidnosti i progresijski indeks neznatno su viši u bolesnika s C2 alelom u odnosu na one s C1 alelom, ali razlike nisu statistički značajne ( $p>0,05$ ) što je prikazano u tablici 47.

Tablica 47. Stupanj invalidnosti (EDSS) i progresijski indeks (PI) prema statusu nositelja TF C2 alela

	EDSS ( $X \pm SD^*$ )		p	PI ( $X \pm SD^*$ )		p
	C2 pozitivan	C2 negativan		C2 pozitivan	C2 negativan	
PP <sup>a</sup> MS	6,6±1,7	6,0±1,9	0,393	0,51±0,18	0,49±0,23	0,878
SP <sup>b</sup> MS	6,0±1,4	6,0±1,8	0,984	0,44±0,28	0,41±0,28	0,520
RR <sup>c</sup> MS	2,4±1,5	2,5±1,6	0,838	0,30±0,22	0,29±0,19	0,796
<b>Ukupno MS</b>	4,1±2,4	4,0±2,4	0,729	0,39±0,26	0,35±0,24	0,337

\*  $X \pm SD$  – srednja vrijednost i standardna devijacija

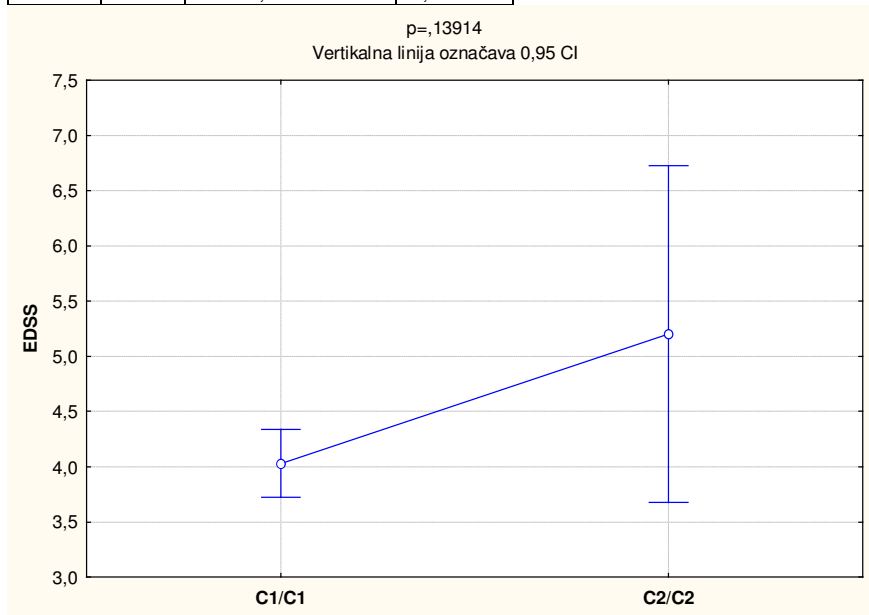
<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

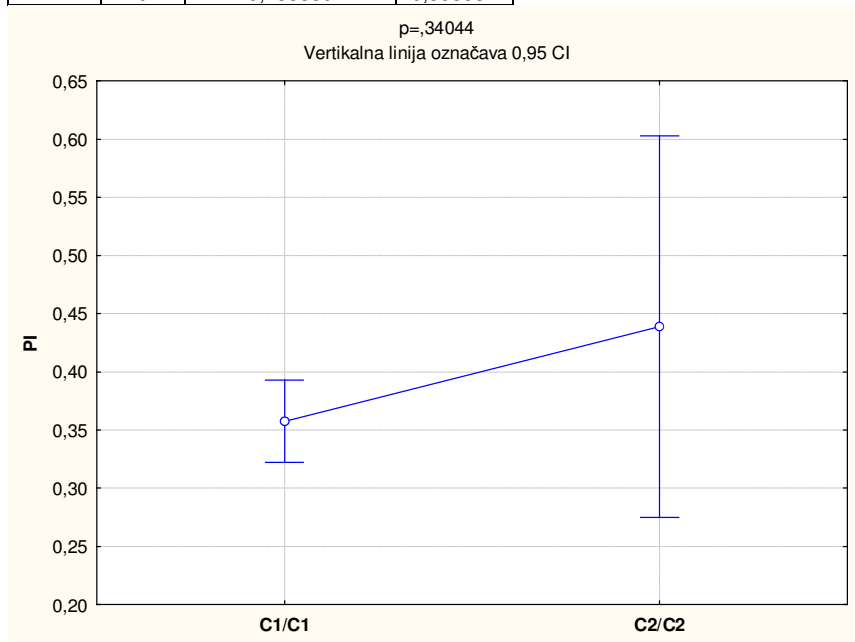
Iako stupanj invalidnosti i progresijski indeks pokazuju trend porasta u homozigota za C2 alel (EDSS=5,2±2,6; PI=0,43±0,35) u odnosu na bolesnike genotipa C1/C1 (EDSS=4,0±2,4; PI=0,35±0,24), razlike nisu statistički značajne ( $p>0,05$ ) (slika 11, slika 12).

	N	Srednja vrijednost	SD
C1/C1	246	4,028455	2,442231
C2/C2	10	5,200000	2,594867



Slika 11. Stupanj invalidnosti (EDSS) u bolesnika homozigota za TF C1 odnosno C2 alel

	N	Srednja vrijednost	SD
C1/C1	197	0,357563	0,244518
C2/C2	9	0,438889	0,353534

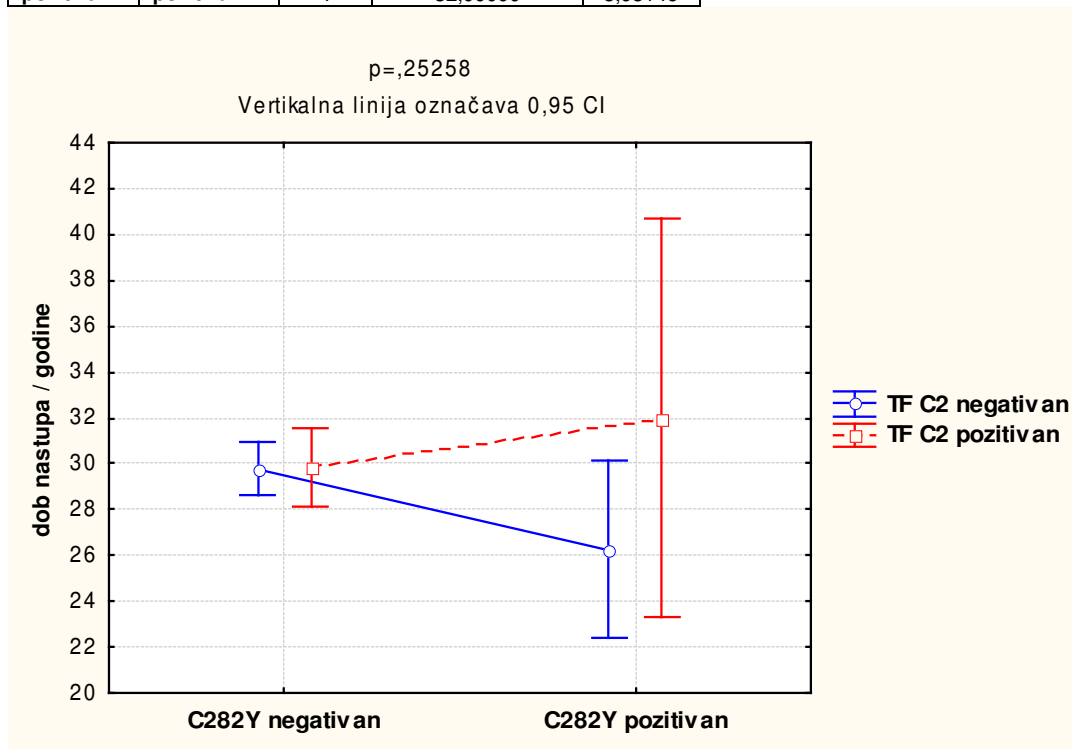


Slika 12. Progresijski indeks (PI) u bolesnika homozigota za TF C1 odnosno C2 alel

#### 4.8. Učinak međudjelovanja HFE C282Y i TF gena na kliničku ekspresiju MS

Međudjelovanje HFE C282Y i TF C1/C2 polimorfizma ne utječe statistički značajno ( $p=0,253$ ) na dob nastupa bolesti (slika 13). U MS bolesnika bez C282Y mutacije TF C2 alel ne mijenja dob nastupa bolesti (29,8 i 29,9 godina), dok u 20 bolesnika s mutacijom C282Y koji su homozigoti za TF C1 alel bolest nastupa ranije (sa 26,3 godina), dok u svega 4 bolesnika koji imaju kombinaciju C282Y mutacije i C2 polimorfizma bolest se javlja sa 32 godine.

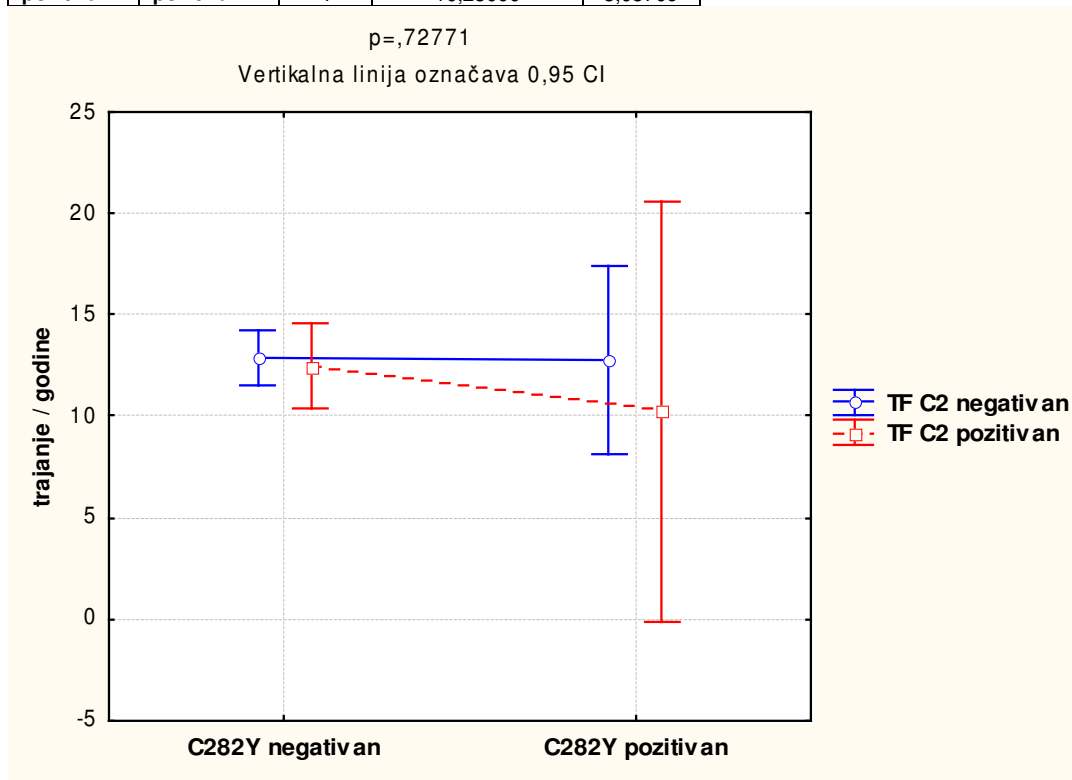
HFE C282Y	TF C2	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	232	29,78448	8,62776
negativan	pozitivan	102	29,88235	8,48446
pozitivan	negativan	20	26,25000	11,93789
pozitivan	pozitivan	4	32,00000	8,98146



Slika 13. Učinak međudjelovanja HFE C282Y mutacije i TF C1/C2 polimorfizma na dob nastupa bolesti (godine)

Međudjelovanje HFE C282Y i TF C1/C2 polimorfizma ne utječe statistički značajno ( $p=0,727$ ) niti na trajanje bolesti (slika 14). U MS bolesnika bez C282Y mutacije TF C2 alel neznatno smanjuje trajanje bolesti (s 12,9 na 12,5 godina). Trajanje bolesti u 20 bolesnika s mutacijom C282Y koji su homozigoti za TF C1 alel iznosi 12,8 godina, a u svega 4 bolesnika koji imaju kombinaciju C282Y mutacije i C2 polimorfizma bolest u prosjeku traje 10,3 godina.

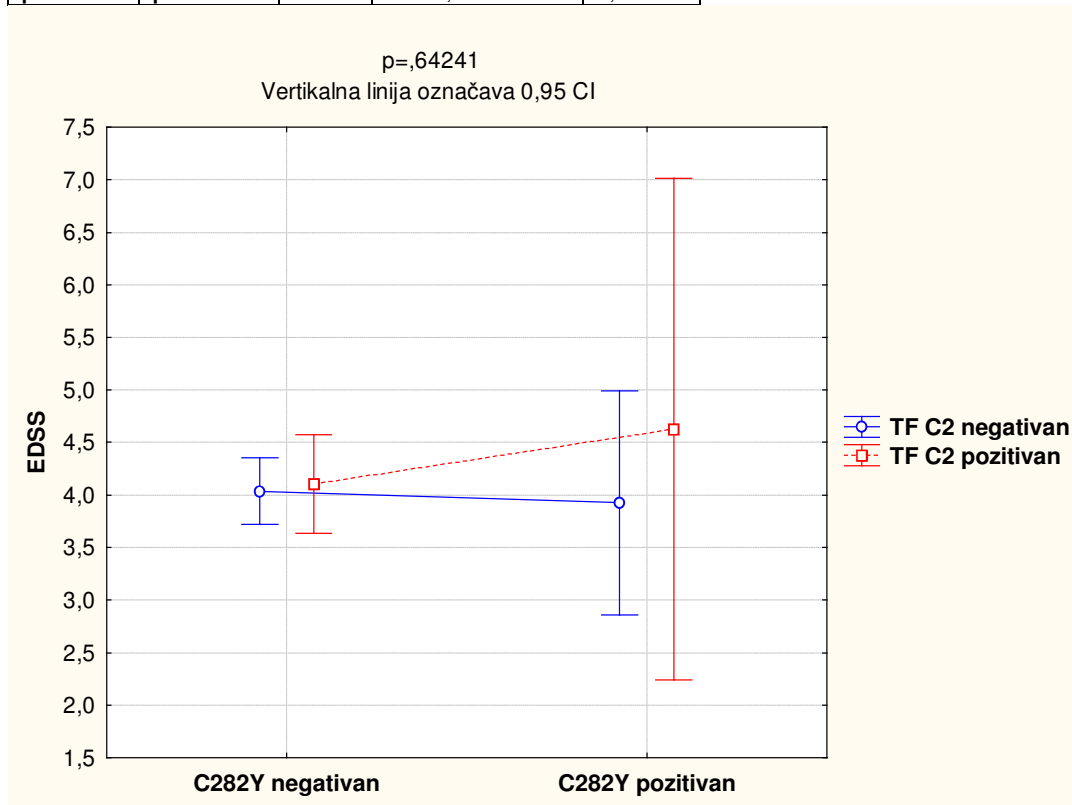
HFE C282Y	TF C2	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	232	12,93103	10,56692
negativan	pozitivan	101	12,49505	10,68913
pozitivan	negativan	20	12,75000	10,26940
pozitivan	pozitivan	4	10,25000	8,05709



Slika 14. Učinak međudjelovanja HFE C282Y mutacije i TF C1/C2 polimorfizma na trajanje bolesti (godine)

Međudjelovanje HFE C282Y i TF C2 alela podiže EDSS u prosjeku za vrijednost 0,6, ali na 4 bolesnika s ovom kombinacijom polimorfizama razlika nije statistički značajna ( $p=0,642$ ) (slika 15).

HFE C282Y	TF C2	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	226	4,037611	2,465703
negativan	pozitivan	104	4,105769	2,355198
pozitivan	negativan	20	3,925000	2,214040
pozitivan	pozitivan	4	4,625000	3,037954

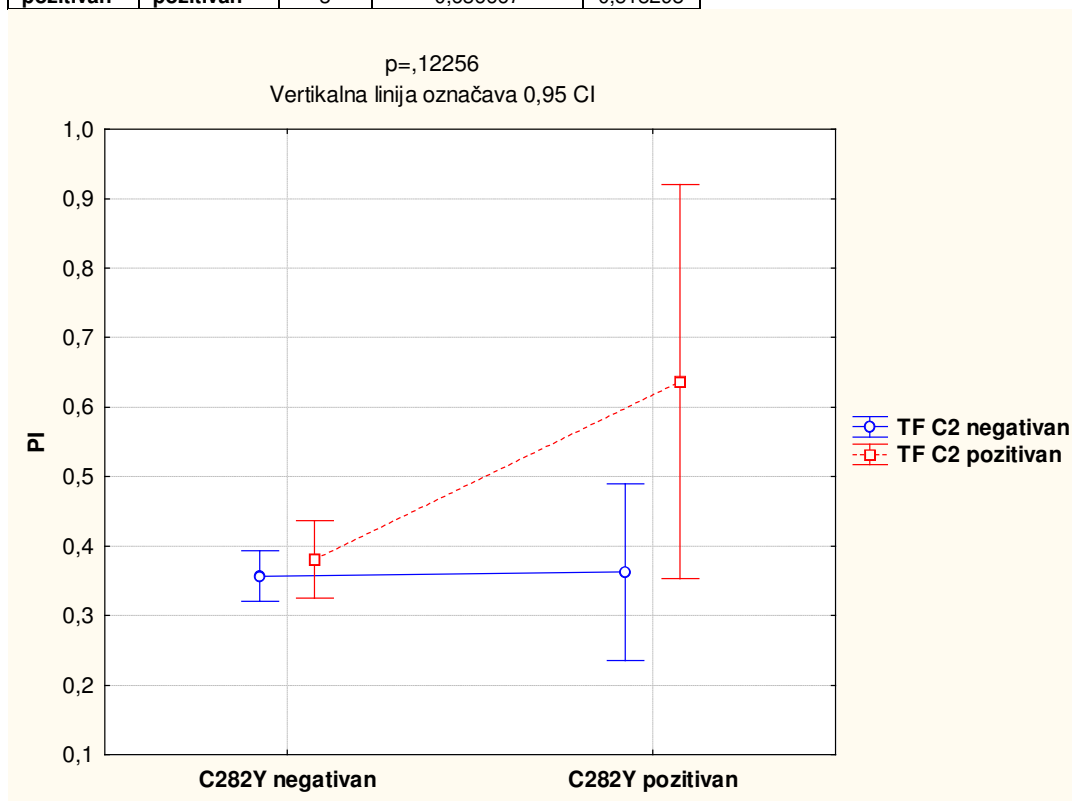


Slika 15. Učinak međudjelovanja HFE C282Y mutacije i TF C1/C2 polimorfizma na stupanj invalidnosti (EDSS)



Progresijski indeks u svega tri bolesnika s kombinacijom HFE C282Y i TF C2 alela iznosi 0,63 i veći je u odnosu na vrijednosti (0,36 – 0,38) preostalih kombinacija ovih polimorfizama, ali razlika nije statistički značajna ( $p=0,123$ ) (slika 16).

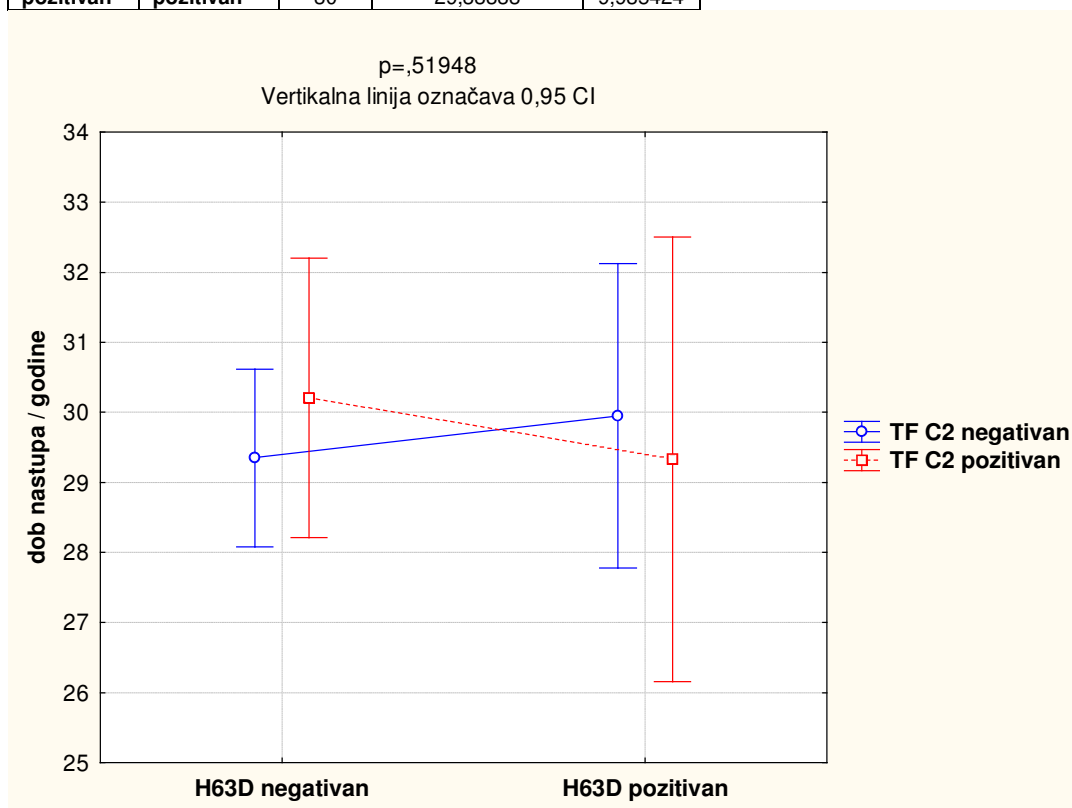
HFE C282Y	TF C2	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	182	0,357143	0,241847
negativan	pozitivan	78	0,381026	0,250307
pozitivan	negativan	15	0,362667	0,284290
pozitivan	pozitivan	3	0,636667	0,518298



Slika 16. Učinak međudjelovanja HFE C282Y mutacije i TF C1/C2 polimorfizma na progresijski indeks (PI)

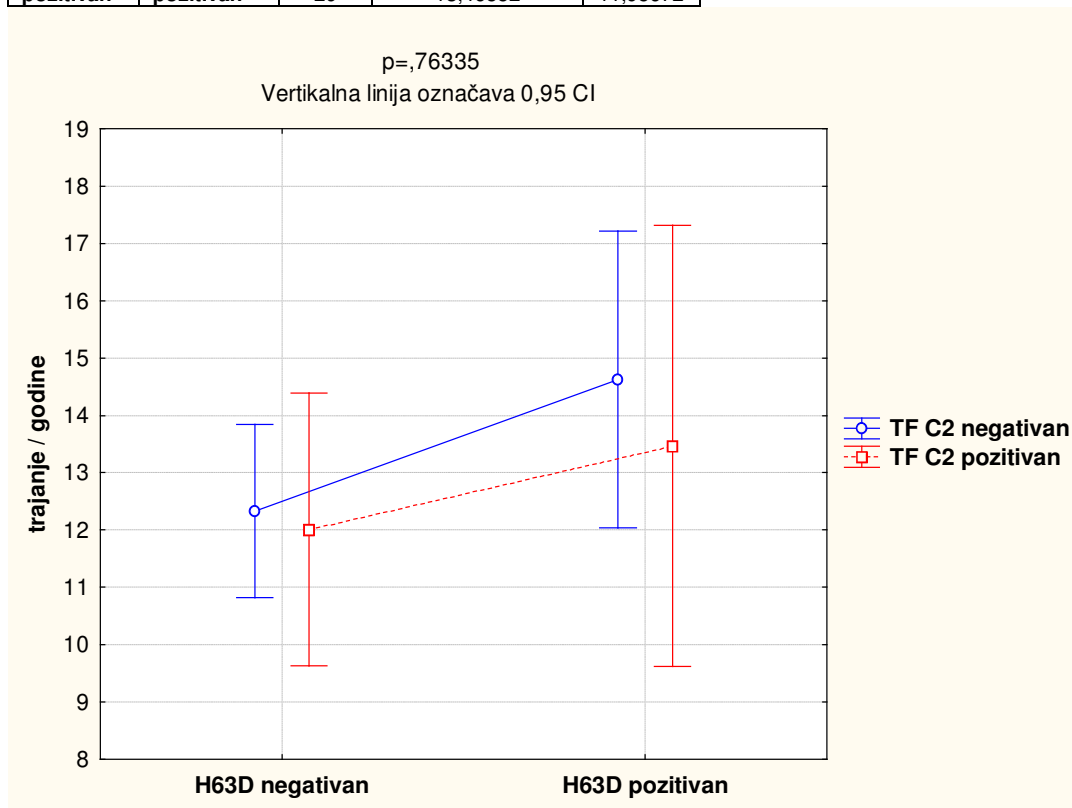
Međudjelovanje HFE H63D mutacije i TF C1/C2 polimorfizma ne mijenja ( $p>0,05$ ) niti jedan od kliničkih parametara koje smo pratili, iako neznatno spušta dob nastupa bolesti u nosioca H63D mutacije (slika17), te lagano podiže trajanje bolesti (slika 18), EDSS (slika 19) i PI (slika 20) u svih bolesnika.

HFE H63D	TF C2	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	188	29,35106	9,154301
negativan	pozitivan	76	30,21053	7,874543
pozitivan	negativan	64	29,95313	8,399603
pozitivan	pozitivan	30	29,33333	9,935424



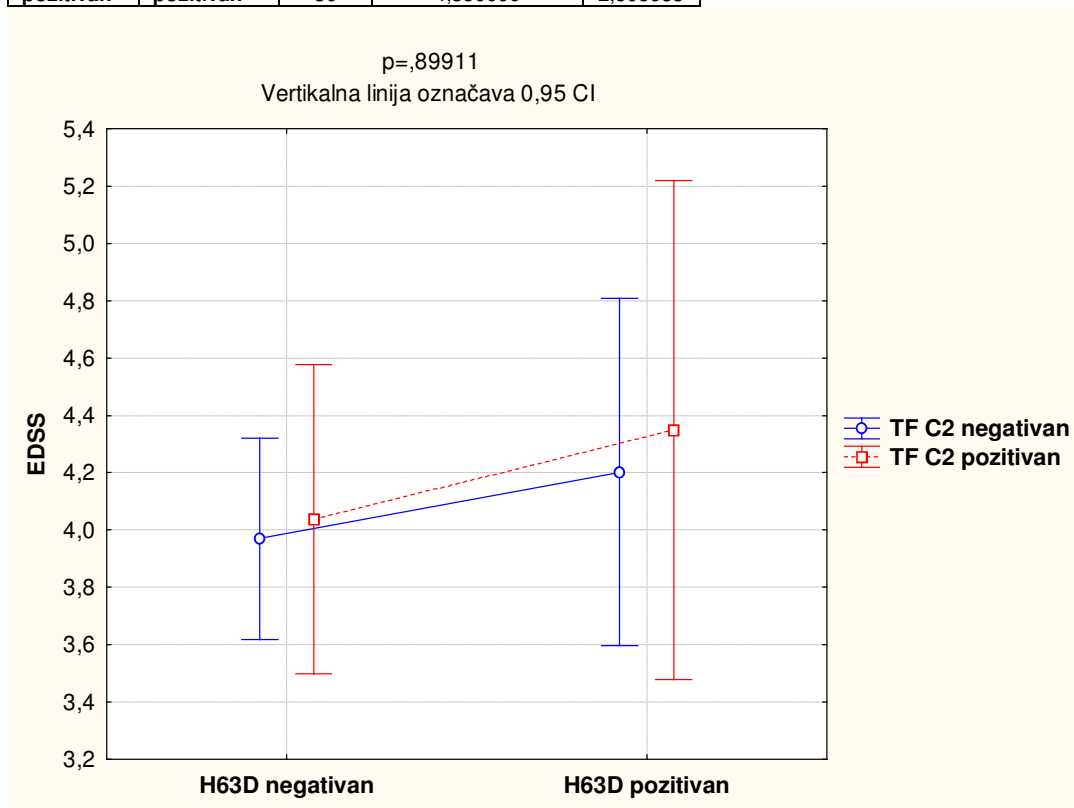
Slika 17. Učinak međudjelovanja HFE H63D mutacije i TF C1/C2 polimorfizma na dob nastupa bolesti (godine)

HFE H63D	TF C2	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	188	12,33511	10,22171
negativan	pozitivan	76	12,00658	10,06131
pozitivan	negativan	64	14,62500	11,27506
pozitivan	pozitivan	29	13,46552	11,95672



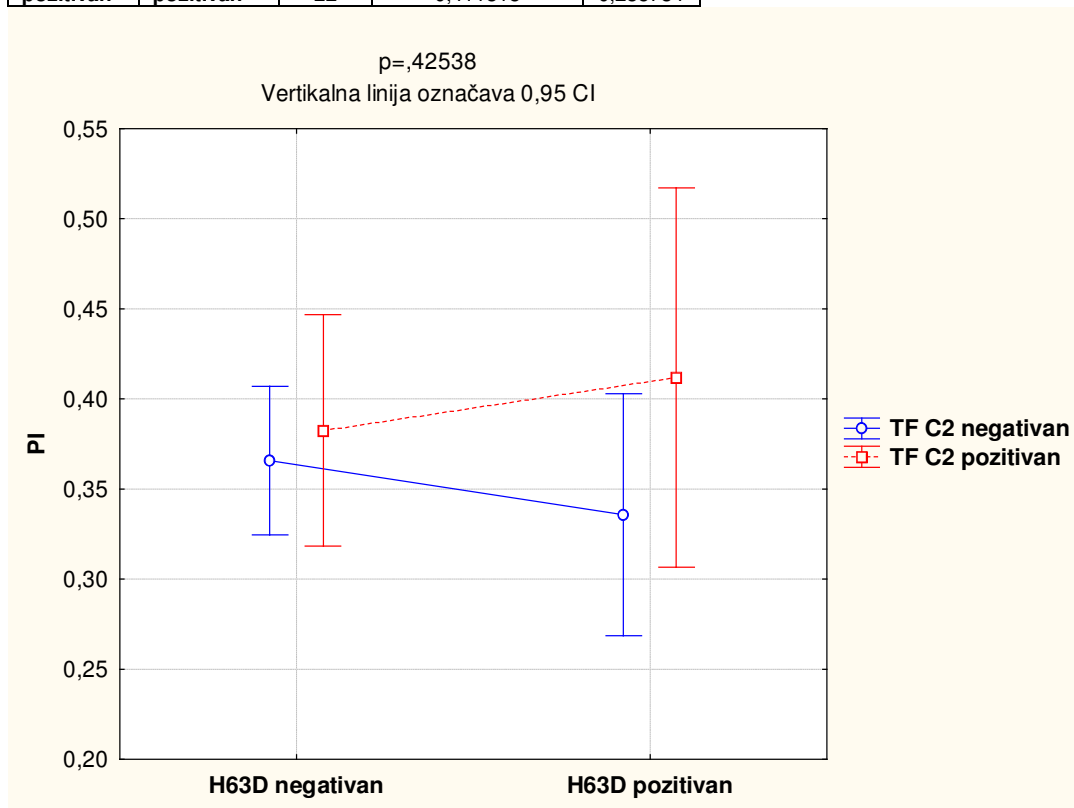
Slika 18. Učinak međudjelovanja HFE H63D mutacije i TF C1/C2 polimorfizma na trajanje bolesti (godine)

HFE H63D	TF C2	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	184	3,970109	2,428863
negativan	pozitivan	78	4,038462	2,324026
pozitivan	negativan	62	4,201613	2,493368
pozitivan	pozitivan	30	4,350000	2,505683



Slika 19. Učinak međudjelovanja HFE H63D mutacije i TF C1/C2 polimorfizma na stupanj invalidnosti (EDSS)

HFE H63D	TF C2	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	143	0,365804	0,251052
negativan	pozitivan	59	0,382542	0,256707
pozitivan	negativan	54	0,335741	0,227095
pozitivan	pozitivan	22	0,411818	0,285734



Slika 20. Učinak međudjelovanja HFE H63D mutacije i TF C1/C2 polimorfizma na progresijski indeks (PI)

#### 4.9. Utjecaj polimorfizama –308 i –238 TNF- $\alpha$ gena na kliničku ekspresiju MS

Dob nastupa bolesti u osoba s ili bez TNF- $\alpha$ -308 A odnosno TNF- $\alpha$ -238 A alela u četiri podskupine MS bolesnika ovisno o tijeku bolesti (P-P, S-P,R-R i SP+RR) te u svih bolesnika prikazana je u tablici 48. Dob nastupa pokazuje trend kasnijeg javljanja bolesti (za 1,6 godina) u svih skupina bolesnika s TNF- $\alpha$ -308 A alelom, ali razlika nije statistički značajna ( $p=0,157$ ) (slika 21). Dob nastupa bolesti nešto je veća (1,3 godine) uzimajući u obzir sve osobe s TNF- $\alpha$ -238 A alelom ( $p=0,418$ ), međutim u 6 bolesnika s ovim alelom koji imaju PP tijekom bolesti ona se javlja 7,9 godina ranije ( $p=0,078$ ) (slika 22).

Tablica 48. Dob nastupa bolesti prema statusu nosilaca TNF- $\alpha$ -308 A i -238 A alela

	Dob nastupa MS ( $\bar{X} \pm SD^*$ )		p	Dob nastupa MS ( $\bar{X} \pm SD^*$ )		p
	308 A pozitivan	308 A negativan		238 A pozitivan	238 A negativan	
<b>PP<sup>a</sup> MS</b>	37,7 $\pm$ 12,8	37,2 $\pm$ 9,1	0,920	31,2 $\pm$ 9,6	39,1 $\pm$ 9,3	0,078
<b>SP<sup>b</sup> MS</b>	31,4 $\pm$ 6,6	29,0 $\pm$ 9,3	0,185	30,2 $\pm$ 8,8	29,5 $\pm$ 8,7	0,786
<b>RR<sup>c</sup> MS</b>	29,5 $\pm$ 7,5	28,5 $\pm$ 8,4	0,520	31,3 $\pm$ 10,1	28,5 $\pm$ 8,1	0,226
<b>PP+RR</b>	30,3 $\pm$ 7,2	28,7 $\pm$ 8,8	0,158	30,7 $\pm$ 9,3	28,9 $\pm$ 8,4	0,206
<b>Ukupno MS</b>	30,9 $\pm$ 7,9	29,3 $\pm$ 9,0	0,157	30,8 $\pm$ 9,2	29,5 $\pm$ 8,8	0,418

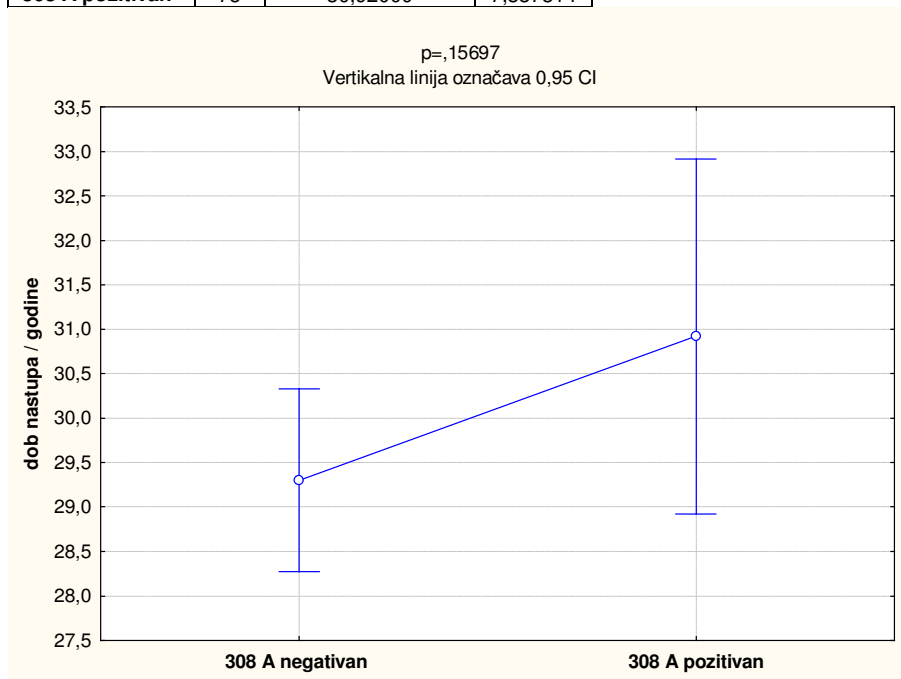
\*  $\bar{X} \pm SD$  – srednja vrijednost i standardna devijacija

<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

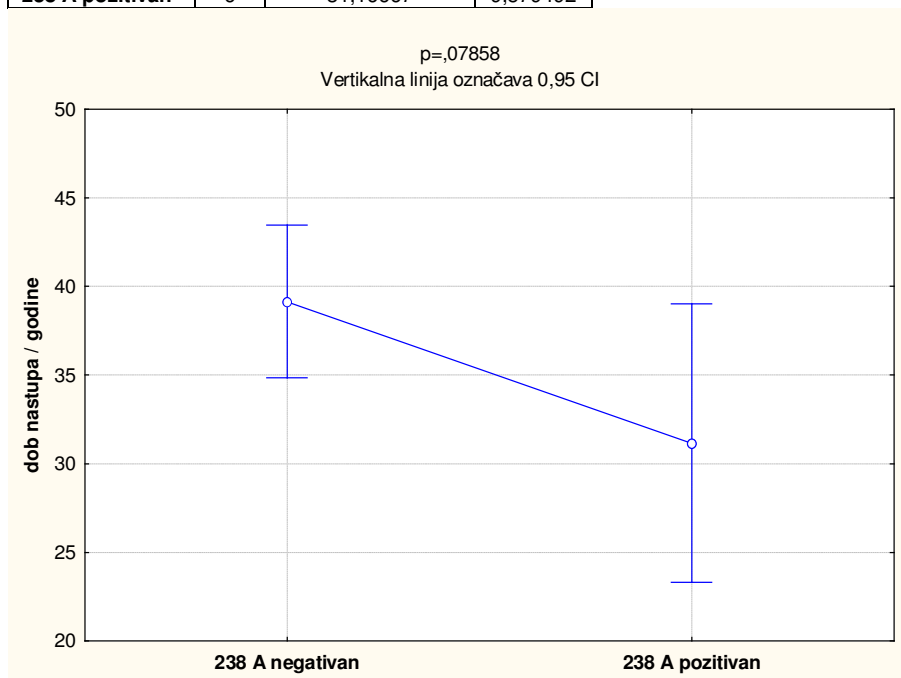
<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

	N	Srednja vrijednost	SD
<b>308 A negativan</b>	283	29,30035	9,015249
<b>308 A pozitivan</b>	75	30,92000	7,887314



Slika 21. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u bolesnika bez i sa TNF- $\alpha$ -308 A alelom

	N	Srednja vrijednost	SD
<b>238 A negativan</b>	20	39,15000	9,269503
<b>238 A pozitivan</b>	6	31,16667	9,579492



Slika 19. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u bolesnika s primarno progresivnim tijekom bolesti bez TNF- $\alpha$ -238 A alela i sa -238 A alelom

Trajanje bolesti s obzirom na TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizam ne pokazuje statistički značajnu razliku ( $p>0,05$ ) niti u podskupinama niti u svih MS bolesnika (tablica 49). Prosječno trajanje bolesti u osoba s TNF- $\alpha$ -308 A alelom 0,8 godina je kraće negoli u bolesnika bez ovog alela ( $p=0,535$ ), što je i u skladu s kasnijim nastupom bolesti. U bolesnika s TNF- $\alpha$ -238 A alelom bolest u prosjeku traje 1,8 godina duže ( $p=0,342$ ).

Tablica 49. Trajanje bolesti (godine) prema statusu nosilaca TNF- $\alpha$ -308 A i -238 A alela

	Trajanje MS ( $X \pm SD^*$ )		p	Trajanje MS ( $X \pm SD^*$ )		p
	308 A pozitivan	308 A negativan		238 A pozitivan	238 A negativan	
<b>PP<sup>a</sup> MS</b>	6,5 $\pm$ 7,8	13,1 $\pm$ 11,0	0,158	7,8 $\pm$ 8,6	12,6 $\pm$ 10,2	0,304
<b>SP<sup>b</sup> MS</b>	17,6 $\pm$ 8,2	19,7 $\pm$ 11,7	0,354	21,4 $\pm$ 10,4	18,9 $\pm$ 11,1	0,428
<b>RR<sup>c</sup> MS</b>	8,7 $\pm$ 7,2	8,6 $\pm$ 8,1	0,936	10,4 $\pm$ 9,9	8,5 $\pm$ 7,7	0,370
<b>PP+RR</b>	12,6 $\pm$ 8,7	12,9 $\pm$ 11,0	0,804	15,7 $\pm$ 11,5	12,6 $\pm$ 10,5	0,127
<b>Ukupno MS</b>	12,1 $\pm$ 8,8	12,9 $\pm$ 10,9	0,535	14,4 $\pm$ 11,3	12,6 $\pm$ 10,5	0,342

\*  $X \pm SD$  – srednja vrijednost i standardna devijacija

<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

Stupanj invalidnosti ne pokazuje značajna odstupanja ( $p=0,969$ ) između bolesnika s TNF- $\alpha$ -308 A alelom i bolesnika bez tog alela (tablica 50). Međutim u bolesnika homozigota za TNF- $\alpha$ -308 A alel EDSS je manji za 1, ali razlika nije statistički značajna ( $p=0,203$ ) (slika 23). Što se TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma tiče stupanj invalidnosti u nositelja 238 A alela za 0,5 je veći negoli u homozigota za 238 G alel, ali razlika također nije statistički značajna ( $p=0,303$ ) (tablica 50).



Tablica 50. Stupanj invalidnosti (EDSS) prema statusu nositelja TNF- $\alpha$ -308 A i -238 A alela

	EDSS ( $\bar{X} \pm SD^*$ )		p	EDSS ( $\bar{X} \pm SD^*$ )		p
	308 A pozitivan	308 A negativan		238 A pozitivan	238 A negativan	
PP <sup>a</sup> MS	5,5 $\pm$ 2,2	6,3 $\pm$ 1,8	0,346	6,23 $\pm$ 2,1	6,1 $\pm$ 1,8	0,876
SP <sup>b</sup> MS	5,8 $\pm$ 1,5	6,1 $\pm$ 1,8	0,346	5,4 $\pm$ 1,6	6,1 $\pm$ 1,7	0,178
RR <sup>c</sup> MS	2,5 $\pm$ 1,5	2,4 $\pm$ 1,6	0,776	2,8 $\pm$ 1,9	2,4 $\pm$ 1,5	0,319
<b>Ukupno MS</b>	4,1 $\pm$ 2,2	4,1 $\pm$ 2,5	0,969	4,5 $\pm$ 2,3	4,0 $\pm$ 2,4	0,303

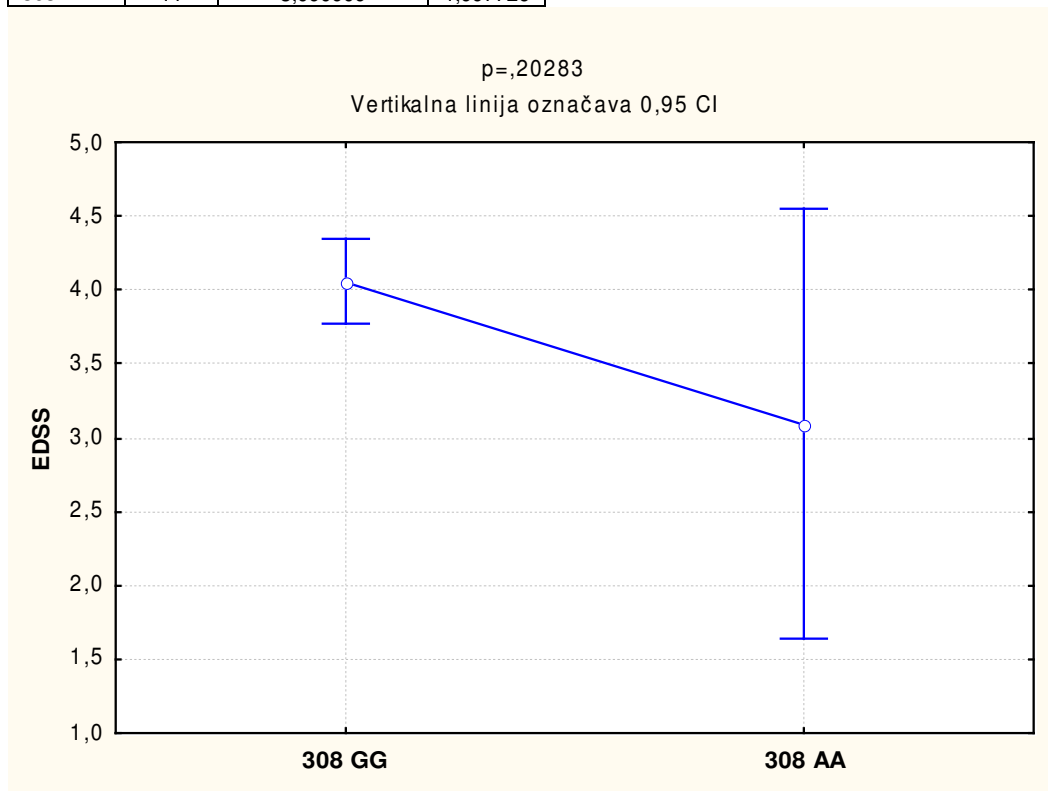
\*  $\bar{X} \pm SD$  – srednja vrijednost i standardna devijacija

<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

	N	Srednja vrijednost	SD
308 GG	280	4,055357	2,473075
308 AA	11	3,090909	1,997726



Slika 23. Stupanj invalidnosti (EDSS) u bolesnika homozigota TNF- $\alpha$ -308 GG odnosno TNF- $\alpha$ -308 AA

Progresijski indeks u bolesnika s TNF- $\alpha$ -308 A alelom podjednak je indeksu bolesnika bez tog alela ( $p=0,984$ ), osim u bolesnika s PP tijekom bolesti, gdje je PI veći za 0,22 u bolesnika s A alelom, ali razlika nije dosegla statističku značajnost ( $p=0,073$ ) (tablica 51). U bolesnika homozigota za TNF- $\alpha$ -308 A alel PI je manji za 0,12, ali razlika također nije statistički značajna ( $p=0,185$ ) (slika 24). Što se pak TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma tiče, progresijski indeks u bolesnika s 238 A alelom za 0,05 je manji negoli u homozigota za 238 G alel, no razlika također nije statistički značajna ( $p=0,313$ ) (tablica 51).

Tablica 51. Progresijski indeks (PI) prema statusu nosilaca TNF- $\alpha$ -308 A i -238 A alela

	PI ( $\bar{X} \pm SD^*$ )		p	PI ( $\bar{X} \pm SD^*$ )		p
	308 A pozitivan	308 A negativan		238 A pozitivan	238 A negativan	
PP <sup>a</sup> MS	0,67 $\pm$ 0,24	0,45 $\pm$ 0,16	0,073	0,46 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,23	0,809
SP <sup>b</sup> MS	0,40 $\pm$ 0,23	0,43 $\pm$ 0,29	0,640	0,33 $\pm$ 0,21	0,43 $\pm$ 0,28	0,197
RR <sup>c</sup> MS	0,29 $\pm$ 0,15	0,29 $\pm$ 0,21	0,968	0,27 $\pm$ 0,22	0,29 $\pm$ 0,19	0,729
<b>Ukupno MS</b>	0,36 $\pm$ 0,22	0,36 $\pm$ 0,25	0,984	0,32 $\pm$ 0,21	0,37 $\pm$ 0,25	0,313

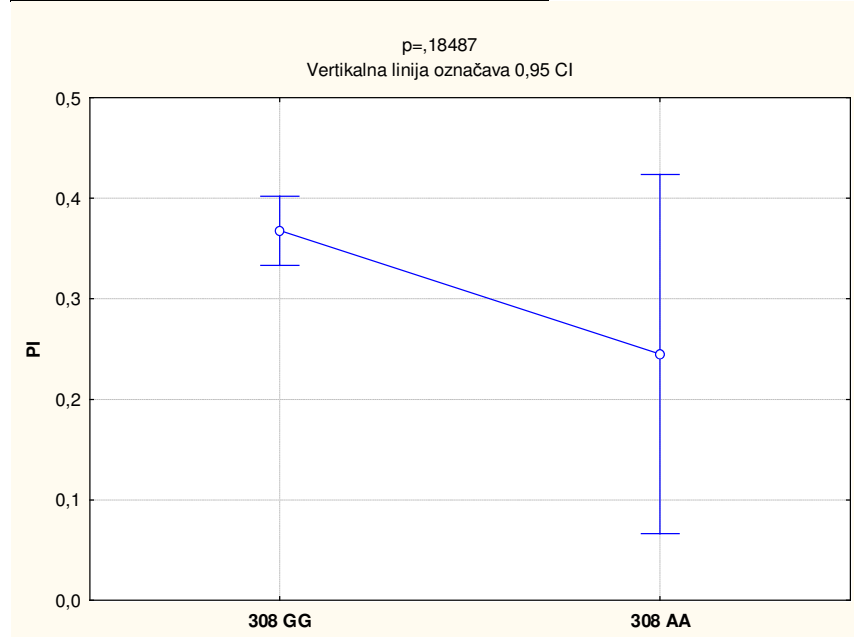
<sup>a</sup> PP - primarno progresivni tijek bolesti

\*  $\bar{X} \pm SD$  – srednja vrijednost i standardna devijacija

<sup>b</sup> SP - sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup> RR - relapsno-remitirajući tijek bolesti

	N	Srednja vrijednost	SD
308 GG	216	0,367685	0,259718
308 AA	8	0,245000	0,099283



Slika 24. Progresijski indeks (PI) u bolesnika homozigota TNF- $\alpha$ -308 GG odnosno -308 AA

#### 4.8. Učinak međudjelovanja HFE i TNF- $\alpha$ gena na kliničku ekspresiju MS

##### 4.8.1. Međudjelovanje HFE C282Y i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizama

S obzirom da smo u našem uzorku bolesnika imali svega jednu osobu s kombinacijom HFE C282Y mutacije i TNF- $\alpha$ -238 A alela, prikazali smo promatrane kliničke parametre (dob nastupa i trajanje bolesti, EDSS, PI) za nosioce C282Y mutacije u kombinaciji s TNF- $\alpha$ -238 GG odnosno AG genotipom u tablici 52. Nadalje, utjecaj na kliničke parametre interakcije TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma bili smo u mogućnosti računati samo u osoba bez C282Y mutacije što je prikazano na slikama 25, 26, 27 i 28.

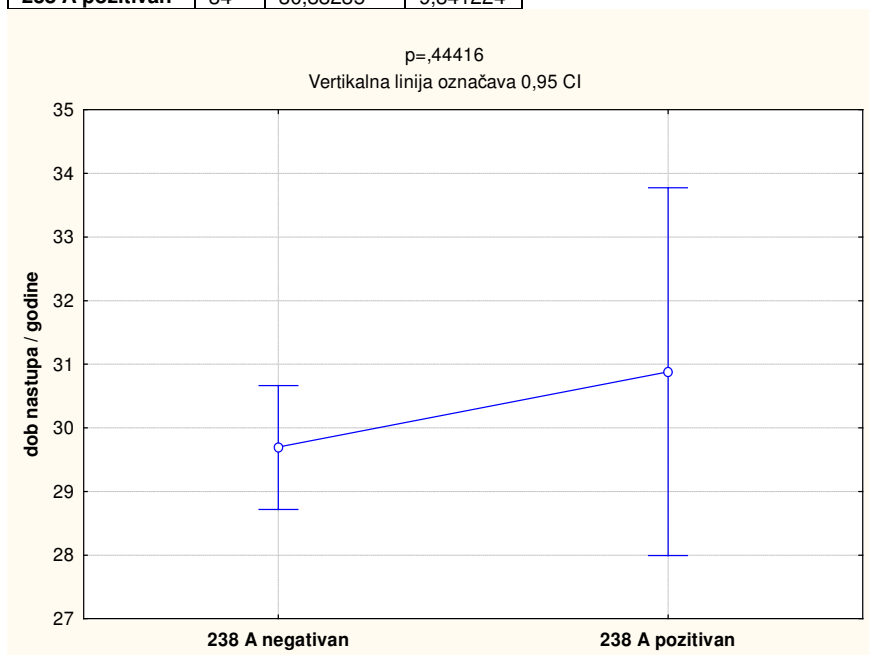
Tablica 52. Učinak polimorfizma TNF- $\alpha$ -238 na kliničke parametre u C282Y pozitivnih MS bolesnika

TNF- $\alpha$	N	Dob nastupa*	Trajanje bolesti*	EDSS	PI
238 GG	23	27,4 (11,9)	12,0 (9,9)	4,1 (2,4)	0,42 (0,33)
238 GA+AA	1	28,0	19,0	3,5	0,18

\* srednja vrijednost (godine)  $\pm$  (SD)

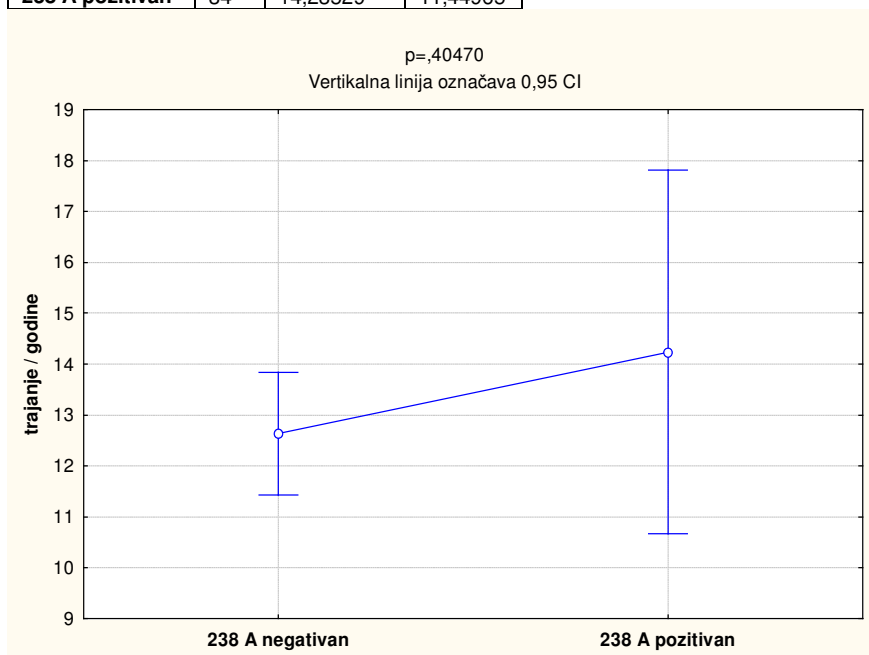
TNF- $\alpha$ -238 polimorfizam ne modificira statistički značajno ( $p > 0,05$ ) ni dob nastupa ni trajanje bolesti u bolesnika bez HFE C282Y mutacije (slika 25, slika 26).

	N	Srednja vrijednost	SD
238 A negativan	300	29,69333	8,488392
238 A pozitivan	34	30,88235	9,341224



Slika 25. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u C282Y negativnih MS bolesnika u ovisnosti o TNF- $\alpha$ -238 polimorfizmu

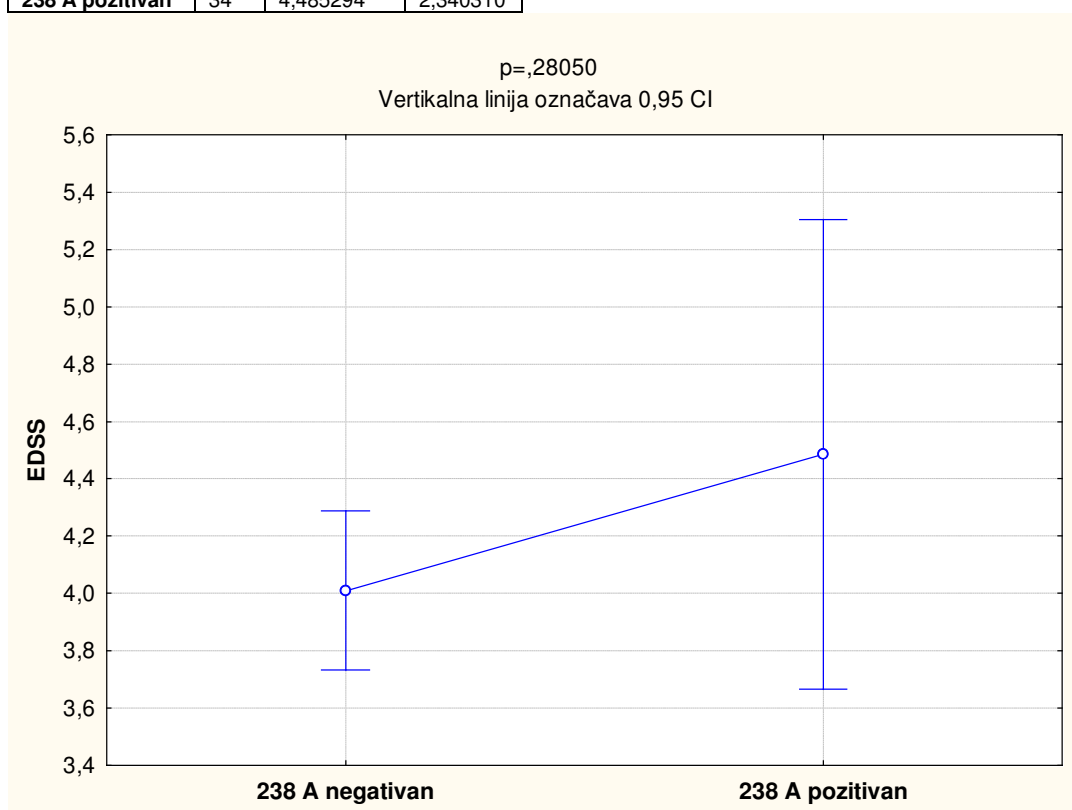
	N	Srednja vrijednost	SD
238 A negativan	299	12,63545	10,49581
238 A pozitivan	34	14,23529	11,44965



Slika 26. Trajanje bolesti (godine) u C282Y negativnih MS bolesnika u ovisnosti o TNF- $\alpha$ -238 polimorfizmu

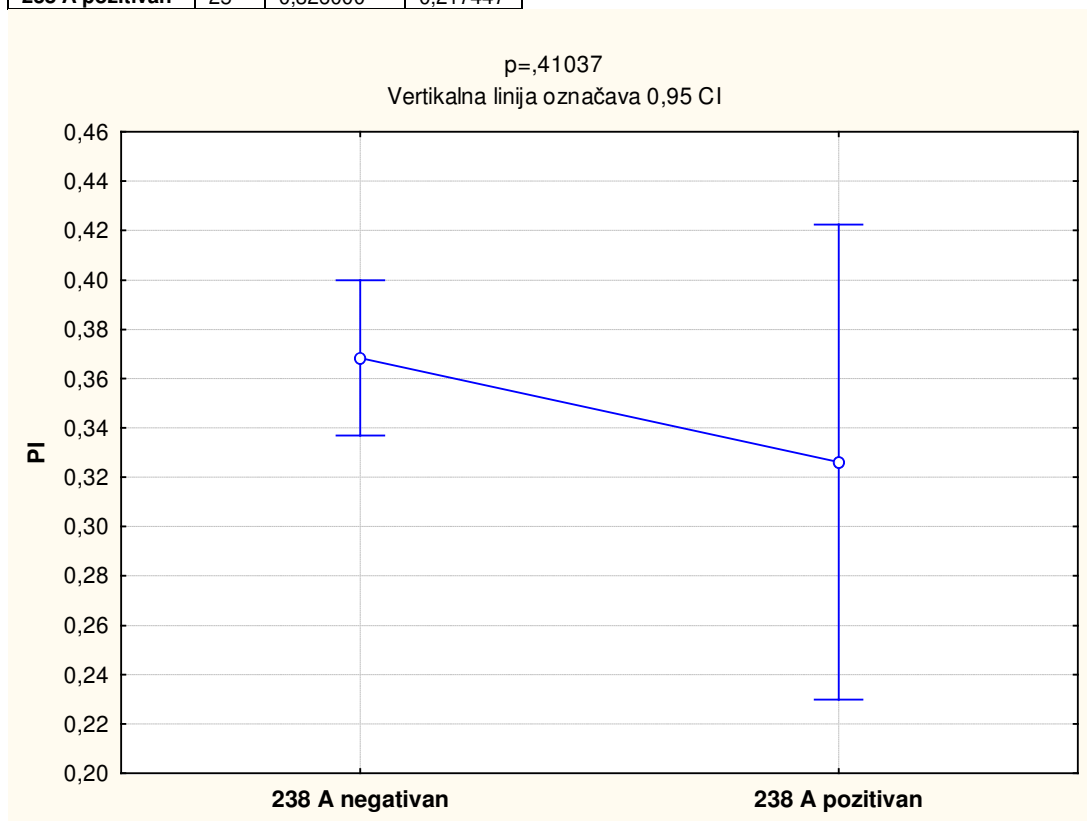
Stupanj invalidnosti u osoba bez HFE C282Y mutacije pokazuje blagi trend porasta (na 4,5) ukoliko osobe imaju TNF- $\alpha$ -238 A alel, a EDSS je nešto niži (4,0) u bolesnika bez HFE C282Y i TNF- $\alpha$ -238 A alela, ali razlika nije statistički značajna ( $p=0,280$ ) (slika 27). Međutim, progresijski indeks u osoba bez HFE C282Y koje imaju TNF- $\alpha$ -238 A alel (i bolest traje nešto duže) niži je za 0,04 negoli u homozigota za TNF- $\alpha$ -238 G alel, ali razlika također nije statistički značajna ( $p=0,410$ ) (slika 28).

	N	Srednja vrijednost	SD
<b>238 A negativan</b>	296	4,010135	2,436982
<b>238 A pozitivan</b>	34	4,485294	2,340310



Slika 27. Stupanj invalidnosti (EDSS) u C282Y negativnih MS bolesnika u ovisnosti o TNF- $\alpha$ -308 polimorfizmu

	N	Srednja vrijednost	SD
238 A negativan	235	0,368383	0,246919
238 A pozitivan	25	0,326000	0,217447

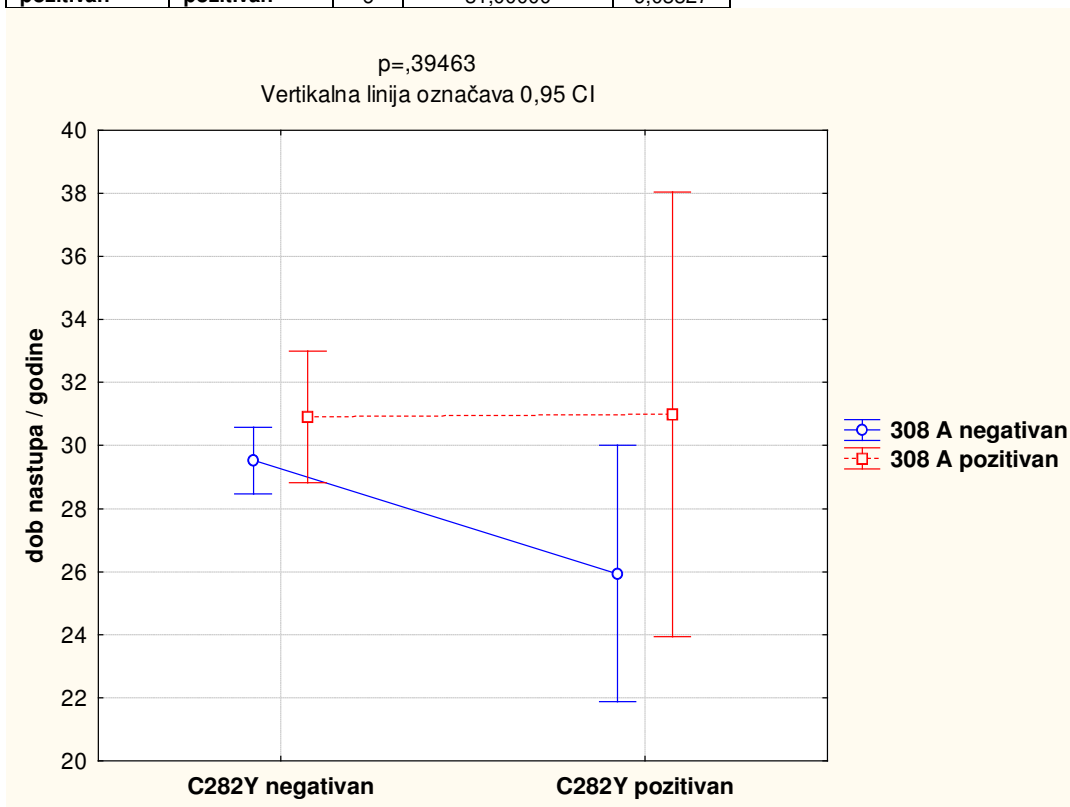


Slika 28. Progresijski indeks (PI) u C282Y negativnih MS bolesnika u ovisnosti o TNF- $\alpha$ -238 polimorfizmu

#### 4.8.2. Međudjelovanje HFE C282Y i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizama

Međudjelovanje HFE C282Y i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizama ne utječe statistički značajno ( $p=0,395$ ) na dob nastupa bolesti. Ipak TNF- $\alpha$ -308 A alel modulira dob nastupa bolesti te se bolest u C282Y negativnih bolesnika javlja 1,4 godine kasnije u prisutnosti TNF- $\alpha$ -308 A alela, a u C282Y pozitivnih bolesnika s TNF- $\alpha$ -308 A alelom (N=6) čak 5 godina kasnije (slika 29).

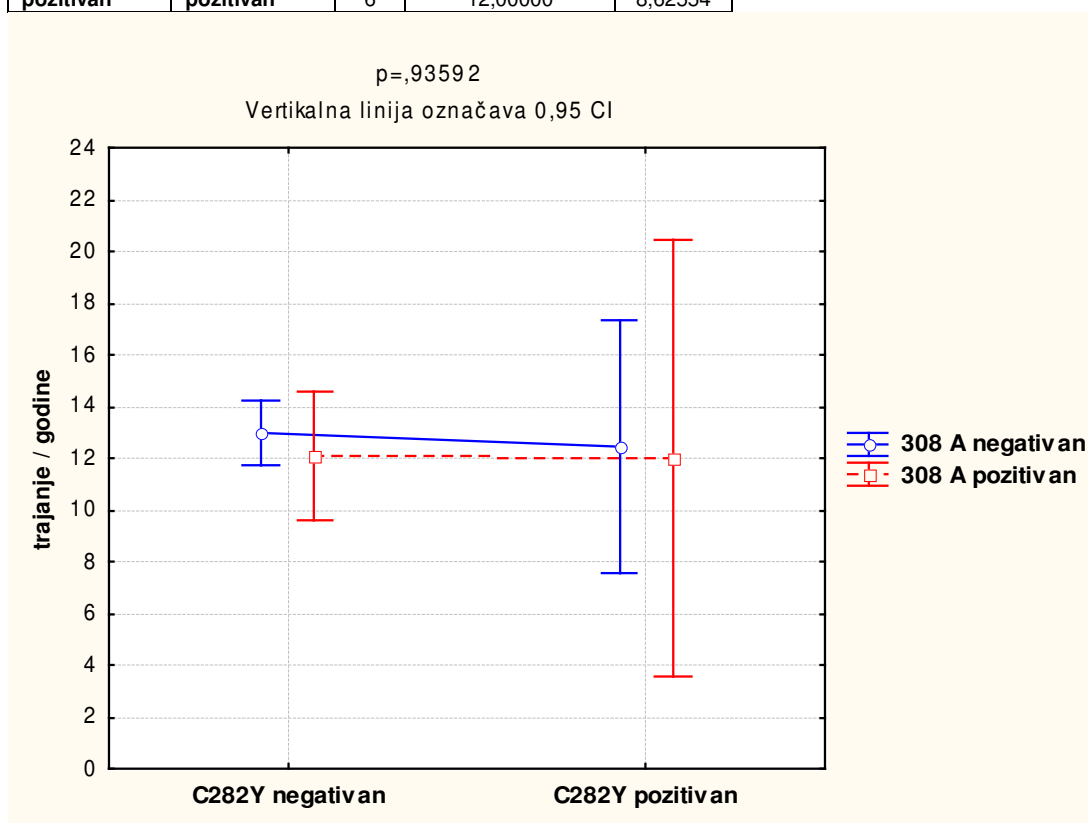
HFE C282Y	TNF- $\alpha$ -308 A	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	265	29,52830	8,73994
negativan	pozitivan	69	30,91304	7,85482
pozitivan	negativan	18	25,94444	12,21606
pozitivan	pozitivan	6	31,00000	9,03327



Slika 29. Učinak međudjelovanja HFE C282Y mutacije i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma na dob nastupa bolesti (godine)

Međudjelovanja HFE C282Y i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma nema ( $p=0,936$ ) s obzirom na trajanje bolesti (slika 30). TNF- $\alpha$ -308 A alel neznatno smanjuje (od 0,4 – 0,8 godina) trajanje bolesti i u bolesnika bez C282Y mutacije i u bolesnika s ovom mutacijom.

HFE C282Y	TNF- $\alpha$ -308 A	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	264	12,97727	11,00697
negativan	pozitivan	69	12,11594	8,85220
pozitivan	negativan	18	12,44444	10,42182
pozitivan	pozitivan	6	12,00000	8,62554

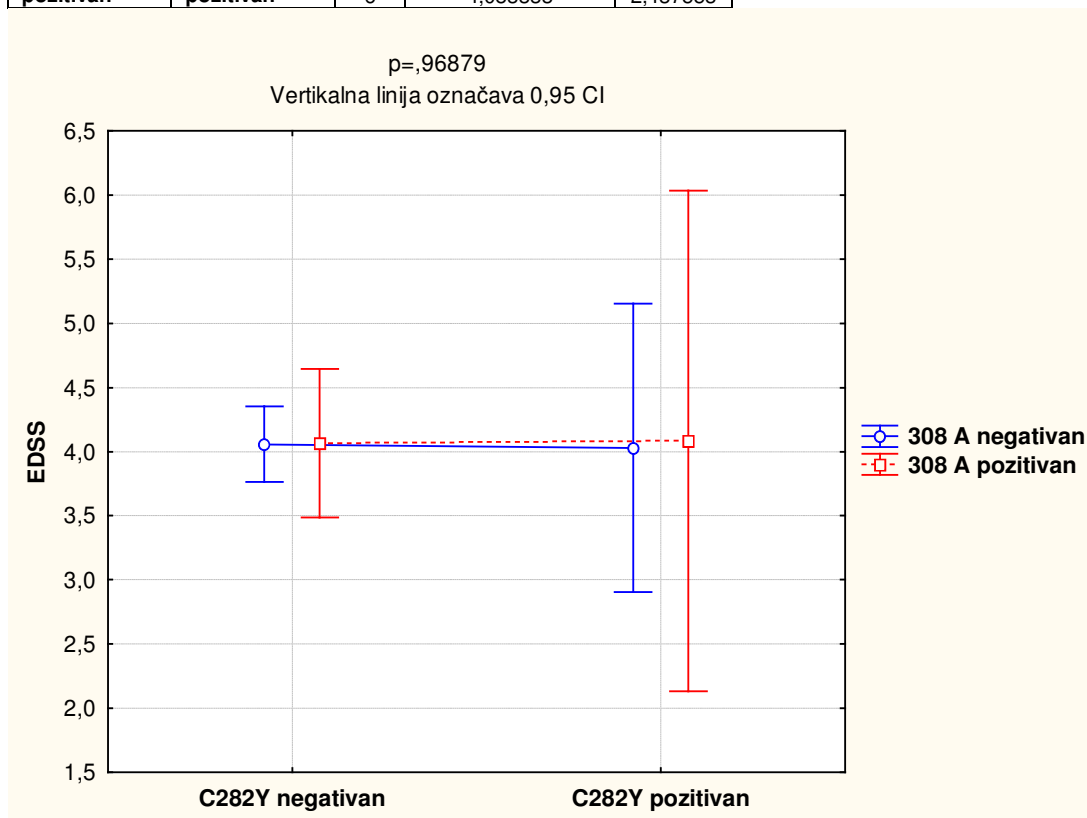


Slika 30. Učinak međudjelovanja HFE C282Y mutacije i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma na trajanje bolesti (godine)



Međudjelovanje HFE C282Y i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma ne očituje se niti na stupanj invalidnosti MS bolesnika ( $p=0,969$ ) (slika 31).

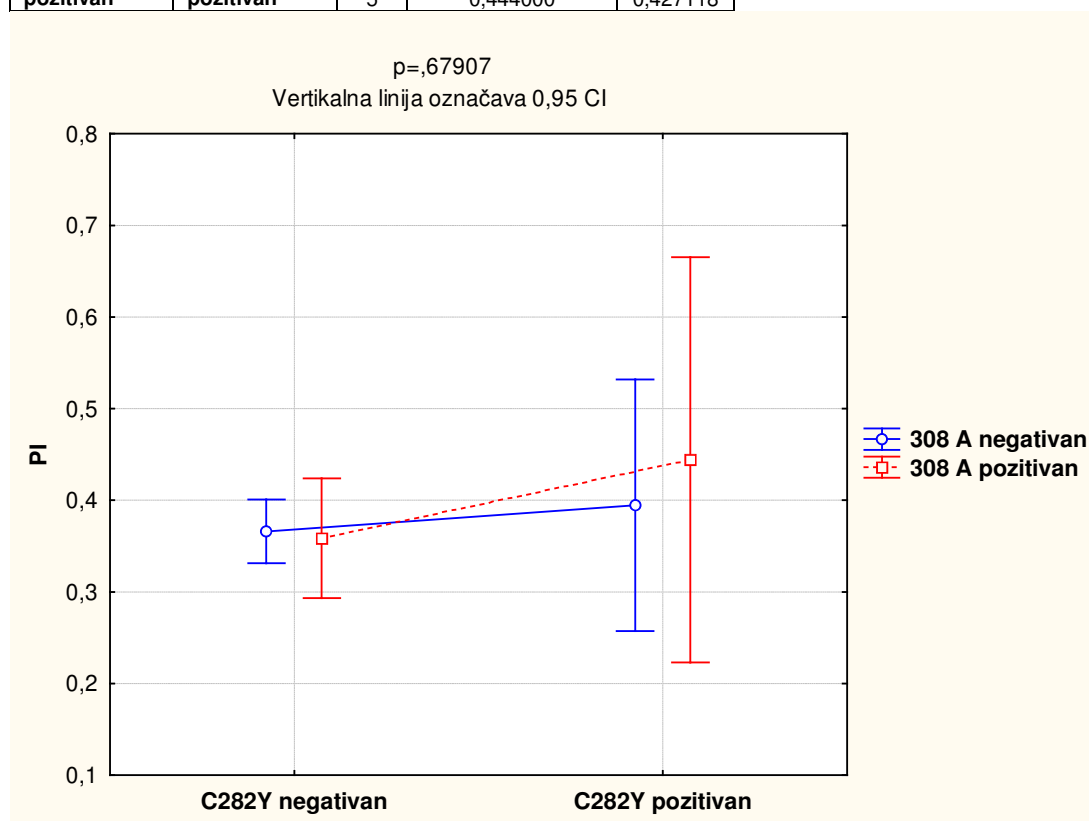
HFE C282Y	TNF- $\alpha$ -308 A	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	262	4,057252	2,486470
negativan	pozitivan	68	4,066176	2,205665
pozitivan	negativan	18	4,027778	2,335608
pozitivan	pozitivan	6	4,083333	2,437553



Slika 31. Učinak međudjelovanja HFE C282Y mutacije i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma na stupanj invalidnosti (EDSS)

Međudjelovanje HFE C282Y i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma ne utječe statistički značajno ( $p=0,679$ ) niti na progresijski indeks bolesti (slika 32).

HFE C282Y	TNF- $\alpha$ -308 A	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	203	0,365961	0,257314
negativan	pozitivan	57	0,358421	0,192036
pozitivan	negativan	13	0,394615	0,305222
pozitivan	pozitivan	5	0,444000	0,427118

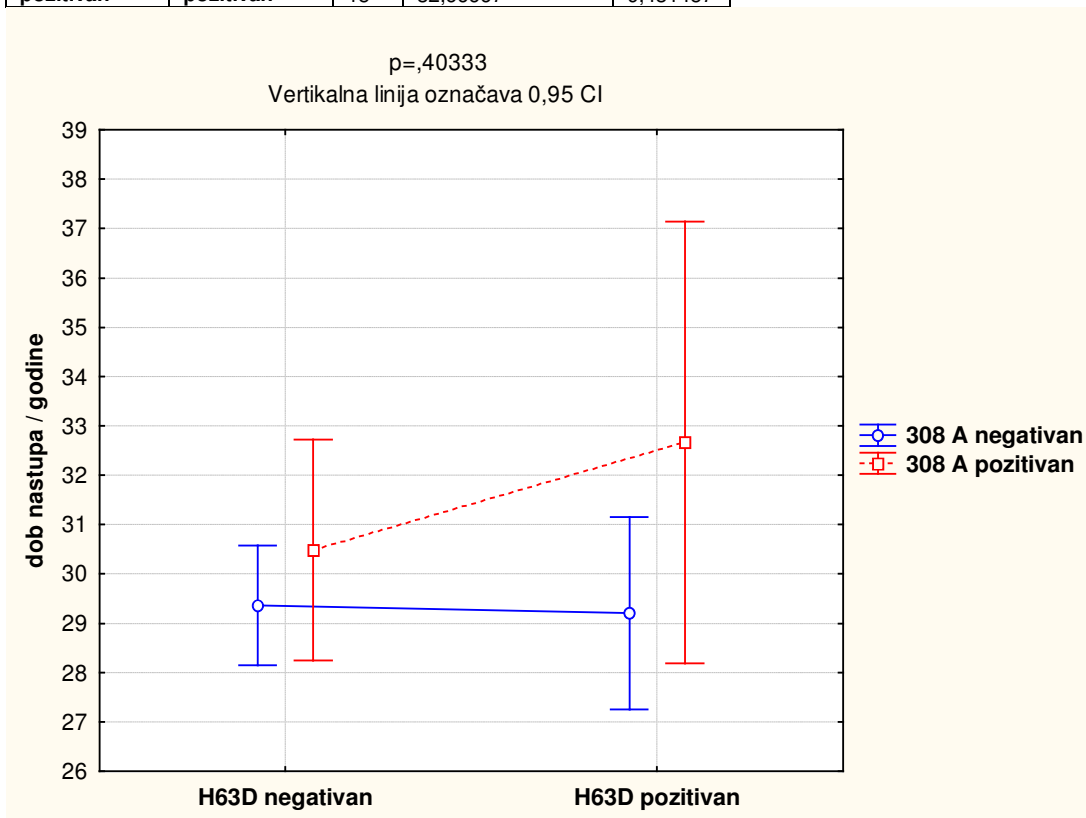


Slika 32. Učinak međudjelovanja HFE C282Y mutacije i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma na progresijski indeks (PI)

#### 4.8.3. Međudjelovanje HFE H63D i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizama

U MS bolesnika bez H63D mutacije i bez TNF- $\alpha$ -308 A alela bolest se javlja u dobi od 29,4 godine, dok u bolesnika s oba polimorfizma bolest nastupa 3,3 godine kasnije ranije, ali razlika nije statistički značajna ( $p=0,403$ ) (slika 33).

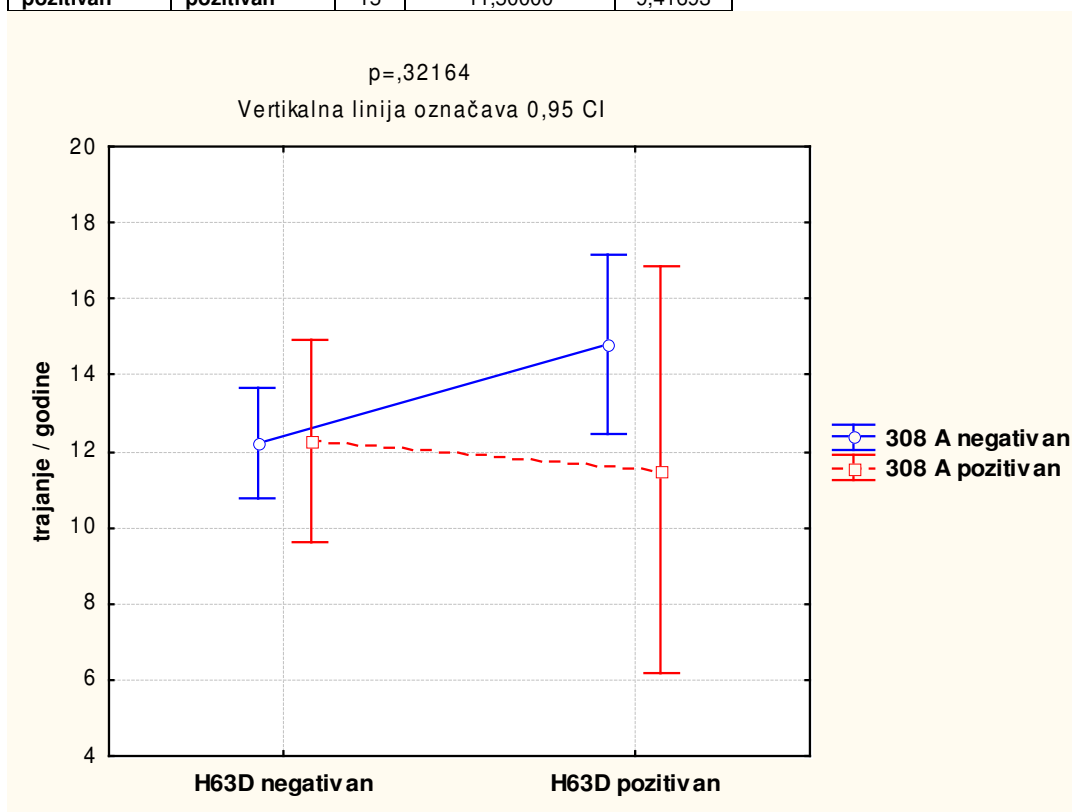
HFE H63D	TNF- $\alpha$ -308 A	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	204	29,36275	9,167612
negativan	pozitivan	60	30,48333	7,479898
pozitivan	negativan	79	29,20253	8,711001
pozitivan	pozitivan	15	32,66667	9,431457



Slika 33. Učinak međudjelovanja HFE H63D mutacije i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma na dob nastupa bolesti (godine)

Trajanje bolesti najkraće je (11,5 godina) u bolesnika s H63D mutacijom i TNF- $\alpha$ -308 A alelom, ali u odnosu na druge kombinacije ovih polimorfizama razlika nije statistički značajna ( $p=0,322$ ) (slika 34).

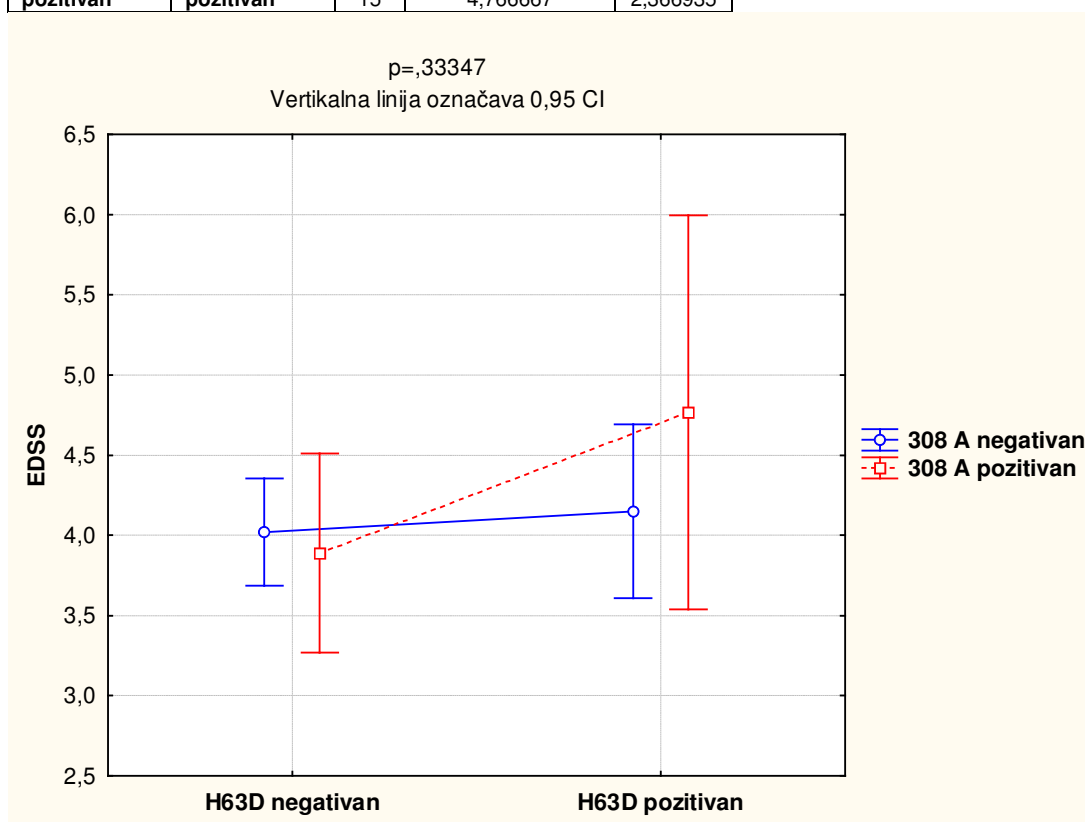
HFE H63D	TNF- $\alpha$ -308 A	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	204	12,23529	10,57094
negativan	pozitivan	60	12,25833	8,68687
pozitivan	negativan	78	14,79487	11,76652
pozitivan	pozitivan	15	11,50000	9,41693



Slika 34. Učinak međudjelovanja HFE H63D mutacije i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma na trajanje bolesti

Bolesnici s H63D mutacijom i TNF- $\alpha$ -308 A alelom imaju nešto veći EDSS (4,8), međutim, više od polovice ovih bolesnika ima progresivni tijek bolesti koji je karakteriziran i višim EDSS-om. U svakom slučaju, razlika u odnosu na ostale kombinacije ovih polimorfizama nije statistički značajna ( $p=0,333$ ) (slika 35).

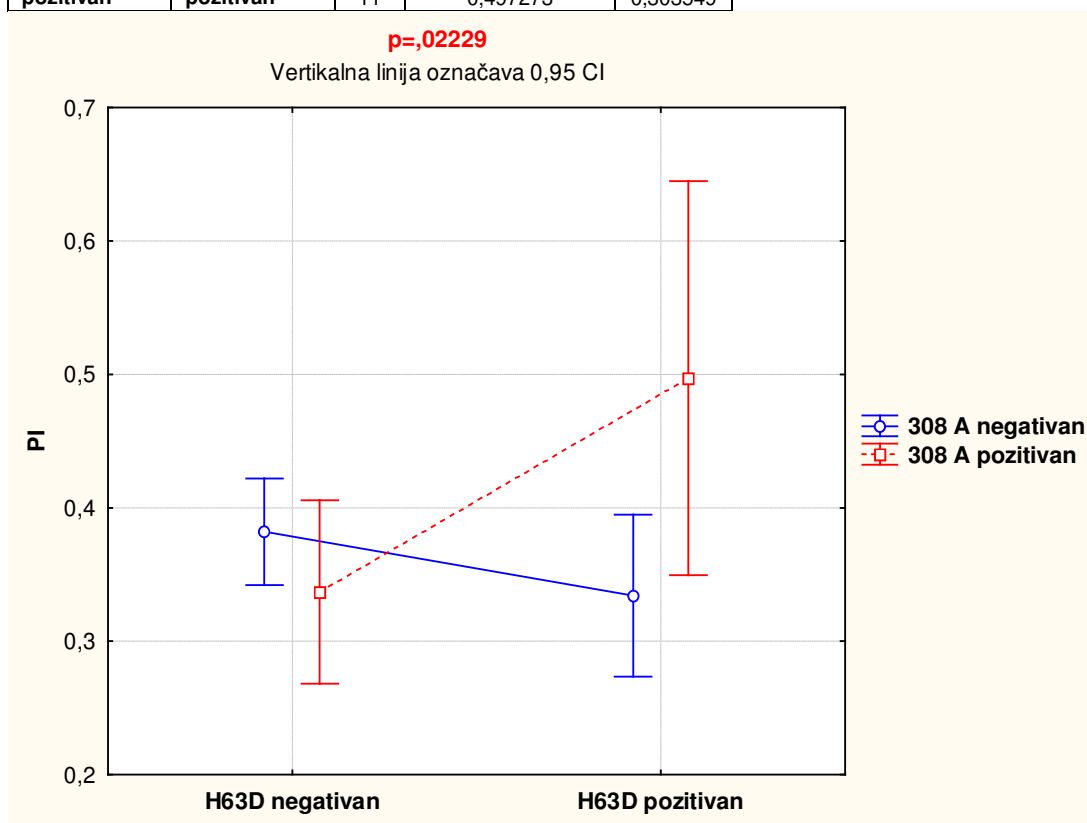
HFE H63D	TNF- $\alpha$ -308 A	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	203	4,019704	2,464522
negativan	pozitivan	59	3,889831	2,149715
pozitivan	negativan	77	4,149351	2,509279
pozitivan	pozitivan	15	4,766667	2,366935



Slika 35. Učinak međudjelovanja HFE H63D mutacije i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma na stupanj invalidnosti (EDSS)

Statistička značajnost ( $p=0,022$ ) utvrđena je s obzirom na interakciju HFE H63D mutacije i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma i njihov utjecaj na progresijski indeks (slika 36). Tako bolesnici s H63D mutacijom i TNF- $\alpha$ -308 A polimorfizmom imaju veći PI koji iznosi 0,50. Međutim čak 8 od ovih 11 bolesnika ima progresivan tijek bolesti, što se onda očituje i kroz veći progresijski indeks.

HFE H63D	TNF- $\alpha$ -308 A	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	151	0,382119	0,271187
negativan	pozitivan	51	0,336863	0,182992
pozitivan	negativan	65	0,334154	0,229353
pozitivan	pozitivan	11	0,497273	0,303549

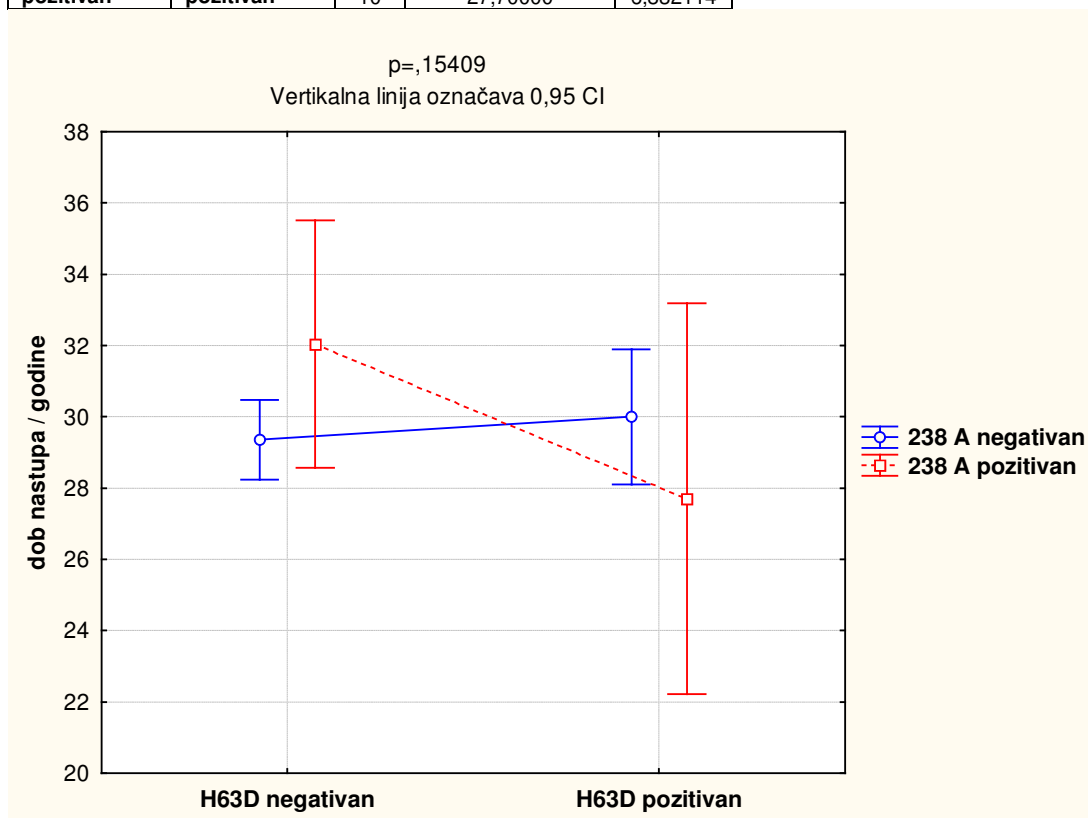


Slika 36. Učinak međudjelovanja HFE H63D mutacije i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma na progresijski indeks (PI)

#### 4.8.4. Međudjelovanje HFE H63D i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizama

Međudjelovanje HFE H63D i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizama ne utječe statistički značajno ( $p=0,154$ ) na dob nastupa bolesti. Naime, TNF- $\alpha$ -238 A alel spušta dob nastupa bolesti u bolesnika s H63D mutacijom (za 2,3 godine), ali ne i u bolesnika bez ove mutacije (slika 37).

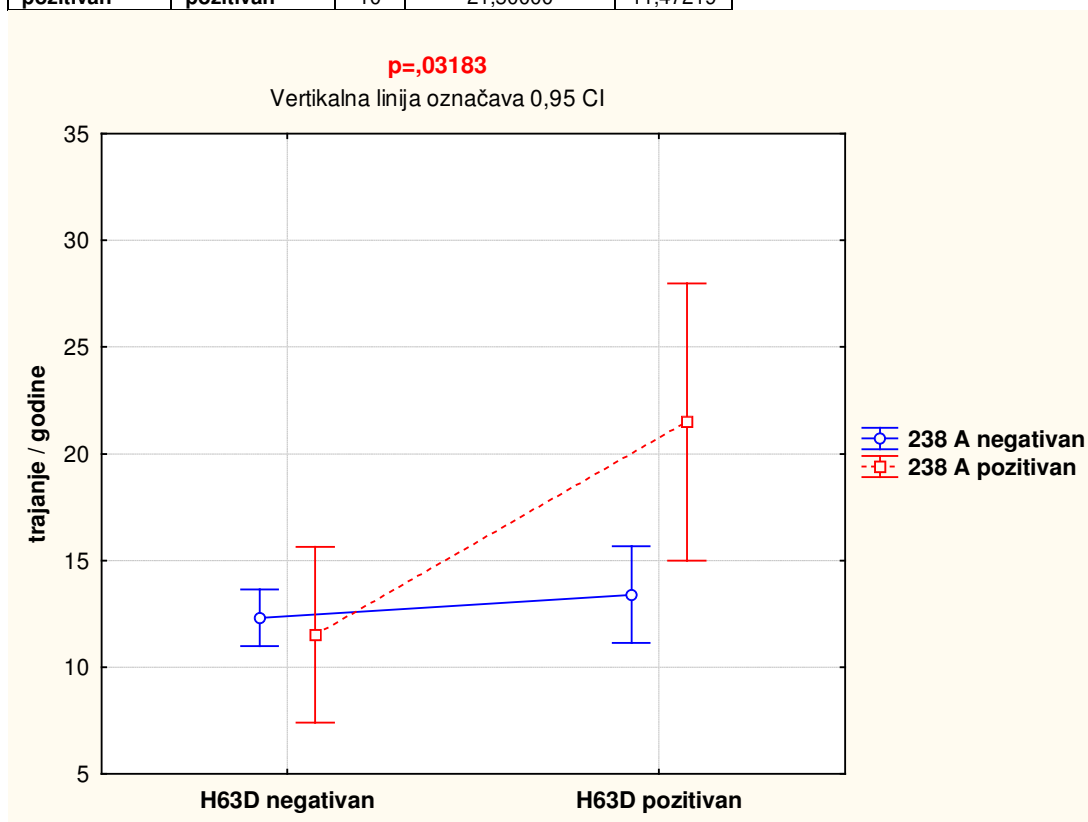
HFE H63D	TNF- $\alpha$ -238 A	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	239	29,36402	8,678509
negativan	pozitivan	25	32,04000	9,859344
pozitivan	negativan	84	30,00000	9,083283
pozitivan	pozitivan	10	27,70000	6,832114



Slika 37. Učinak međudjelovanja HFE H63D mutacije i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma na dob nastupa bolesti (godine)

Trajanje bolesti statistički se značajno razlikuje ( $p=0,032$ ) s obzirom na interakciju HFE H63D mutacije i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma. Tako u deset bolesnika koji imaju H63D i TNF- $\alpha$ -238 alel bolest traje 8,1 do 10 godina duže u odnosu na bolesnika s drugim kombinacijama ovih polimorfizama (slika 38).

HFE H63D	TNF- $\alpha$ -238 A	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	239	12,31590	10,18111
negativan	pozitivan	25	11,52000	10,10825
pozitivan	negativan	83	13,39157	11,18989
pozitivan	pozitivan	10	21,50000	11,47219

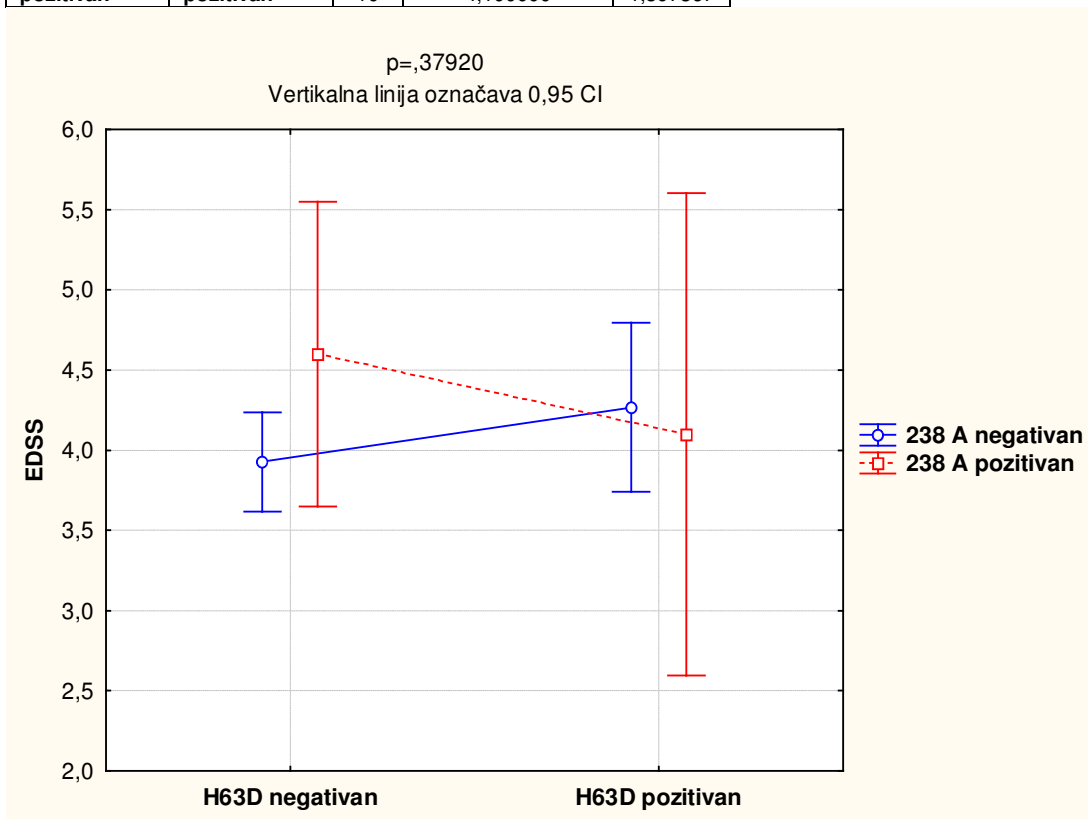


Slika 38. Učinak međudjelovanja HFE H63D mutacije i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma na trajanje bolesti (godine)



Najveći EDSS imaju bolesnici bez H63D mutacije i s TNF- $\alpha$ -238 A alelom (4,6), ali statistička analiza ne pokazuje značajnost ( $p=0,379$ ) interakcije ovih polimorfizama na stupanj invalidnosti (slika 39).

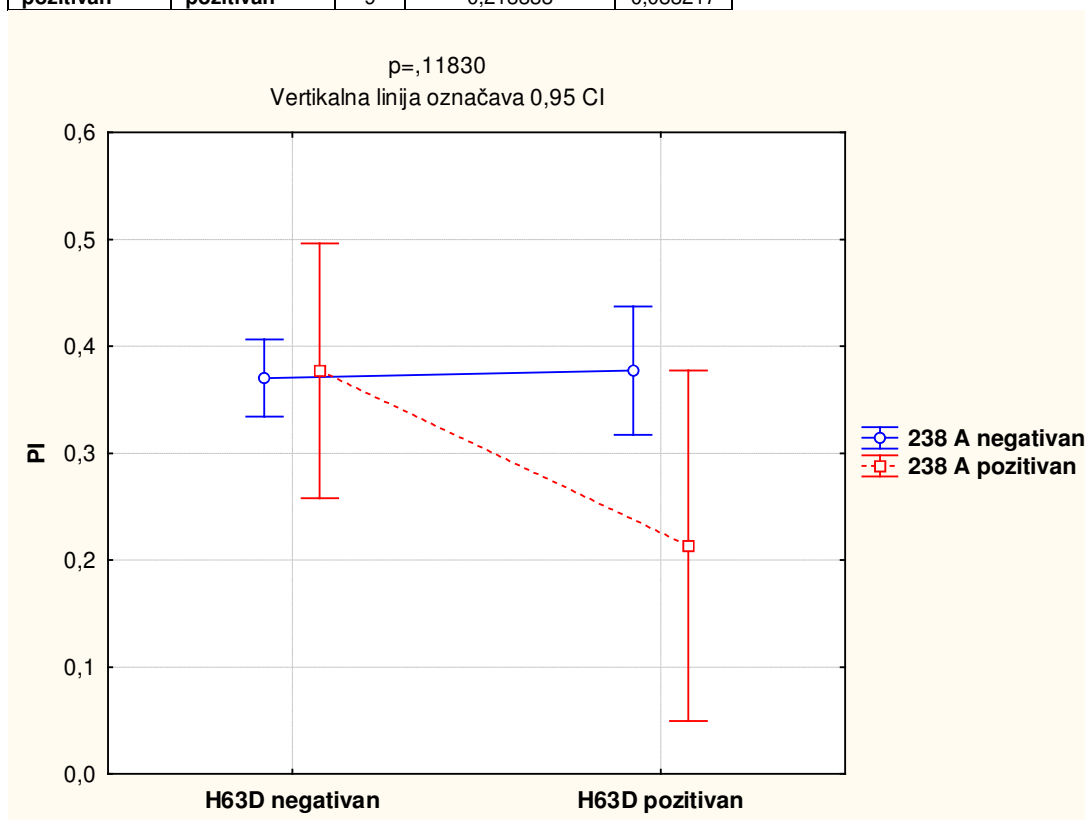
HFE H63D	TNF- $\alpha$ -238 A	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	237	3,926160	2,381032
negativan	pozitivan	25	4,600000	2,479079
pozitivan	negativan	82	4,268293	2,555791
pozitivan	pozitivan	10	4,100000	1,897367



Slika 39. Učinak međudjelovanja HFE H63D mutacije i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma na stupanj invalidnosti (EDSS)

Iako je progresijski indeks u devet bolesnika s kombinacijom HFE H63D mutacije i TNF- $\alpha$ -238 A alela niži za 0,16 u odnosu na preostale kombinacije ovih polimorfizama, razlika nije statistički značajna ( $p=0,118$ ) (slika 40). Ovaj niži progresijski indeks posljedica je dužeg trajanja bolesti (više od 21 godine) u ovih bolesnika.

HFE H63D	TNF- $\alpha$ -238 A	N	Srednja vrijednost	SD
negativan	negativan	185	0,370108	0,253677
negativan	pozitivan	17	0,377059	0,242661
pozitivan	negativan	67	0,377164	0,254355
pozitivan	pozitivan	9	0,213333	0,083217



Slika 40. Učinak međudjelovanja HFE H63D mutacije i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma na progresijski indeks (PI)

## 5. RASPRAVA

MS je neurodegenerativna bolest multifaktorijalne etiologije, od koje u svjetskoj populaciji boluje više od milijun ljudi, zbog čega i pobuđuje velik znanstveni interes. Iako je etiopatogeneza bolesti još uvijek nepoznata, značenje doprinosa genetičkih čimbenika razvoju bolesti široko je prihvaćeno (149). Smatra se da je u osnovi podložnosti za MS neovisna ili epistatska interakcija različitih polimorfizama od kojih svaki daje mali doprinos konačnom efektu nastupa i progresije bolesti.

Unatoč brojnim činjenicama koje ukazuju da željezo ima značajnu ulogu u procesima mijelogeneze, imunosti i otpornosti na infekciju (150), te da njegova disregulacija remeti navedene procese za koje se smatra da mogu doprinijeti razvoju MS, uloga željeza u patogenezi MS nije razjašnjena. Osim normalnih depozita željeza u oligodendrocitima i mijelinu, ono je detektirano i u reaktivnim i ameboidnim mikroglia stanicama te neuronima mozga MS bolesnika (9), dok tkivo miševa oboljelih od EAE pokazuje depozite željeza unutar primjerice makrofaga i neurona (83).

Disregulacija željeza očituje se i kroz otpuštanje željeza od proteina s kojima se karakteristično vezuje, nakon čega ono postaje slobodno ili tvori asocijacije s okolnim molekulama. Bilo nevezano, ili slabo vezano, obje forme imaju potencijal kataliziranja reakcija koje uzrokuju stvaranje reaktivnih kisikovih intermedijarnih spojeva (engl. reactive oxygen intermediates - ROI). ROI su pak odgovorni za oksidativno oštećenje tkiva, što uključuje oštećenje molekula poput DNA, lipida i proteina. Molekule koje ROI oštećuje implicirane su u inicijaciju autoimunog odgovora i tvorbu autoantitijela usmjerenih na vlastite antigene (83,151,150).

Prema najnovijoj hipotezi štetna uloga iona željeza može biti povezana s regulacijom T-stanica, proliferacijom i apoptozom. Pod normalnim fiziološkim uvjetima prekomjerna akumulacija T-limfocita nije moguća jer dušična oksidaza i interferon-gama vode ove stanice prema apoptozi. Međutim, u tkivu koje ima veću koncentraciju željeza, T-limfociti proliferiraju umjesto da budu uništeni apoptozom (152). Valja naglasiti da ova hipoteza ne navodi povećanu koncentraciju željeza kao direktni uzročni čimbenik u razvoju MS, već govori da je željezo čimbenik koji modulira i pojačava autoimuni proces.

S druge pak strane postoje i studije koje ukazuju na bolesnike s niskim parametrima željeza u kojih nutritivni dodatak željeza potiče regeneraciju mijelina i, posljedično, popravlja neurološki status ovih bolesnika mjeren u stupnjevima invalidnosti po Kurzkeu. (153). Grant i sur. (154) uočili su da niska koncentracija željeza u prehrani štiti miševе od razvoja EAE, što je ukazalo na mogućnost terapije kelatorima željeza, ali malobrojna dosadašnja istraživanja iz tog područja nisu dala konačne odgovore (83).

Našim smo istraživanjem nastojali rasvijetliti ulogu željeza u razvoju MS tako što smo analizirali polimorfizme gena direktno ili indirektno uključenih u metabolizam, odnosno homeostazu željeza. Genske varijante obuhvaćene istraživanjem uključuju supstitucije jednog nukleotida unutar egzona HFE (C282Y i H63D) i TF (P570S) gena te supstitucije u promotorskoj regiji TNF- $\alpha$  gena (-308 G/A i 238 G/A). Osim pojedinačne analize pet polimorfizama ispitali smo i utjecaj interakcije HFE i TF gena, čiji se produkti kompetitivno vežu za isti receptor, te utjecaj TNF- $\alpha$  gena kao modifikatora HFE gena u metabolizmu željeza. Na osnovi dobivenih rezultata pokušali smo odgovoriti na postavljenu hipotezu prema kojoj navedeni polimorfizmi predstavljaju čimbenik rizika za razvoj MS i/ili pak utječu na ekspresiju bolesti u našem uzorku bolesnika iz Hrvatske i Slovenije. Kako analizom navedenih polimorfizama nije ustanovljena značajna razlika ( $p > 0,05$ ) u distribuciji alela i genotipova u ispitanika iz hrvatske i slovenske populacije, u daljnoj obradi rezultata tretira ih se kao jedinstveni uzorak, čime smo povećali statističku snagu naše studije.

Činjenica da se depoziti željeza, koji se vide kao T2-hipointenzitet na slikama magnetske rezonancije, u sivoj tvari MS bolesnika povezuju s atrofijom mozga, invalidnošću i progresijom bolesti (9,12) navele su nas na istraživanje ponajprije mutacija HFE gena. Pretpostavili smo da osobe s mutacijama HFE gena, koje rezultiraju u manje efikasnom transportu željeza uz pomoć makrofaga, imaju povećan rizik za MS. Uz to, fenotip hemokromatoze, koji se najčešće javlja kao posljedica C282Y i u manjoj mjeri H63D mutacija HFE gena, karakteriziran je progresivnom akumulacijom željeza u tkivu zbog njegove povećane apsorpcije, što s vremenom dovodi do oštećenja vitalnih organa (97,100). U HH poremećene su vrijednosti željeza, saturacije transferina i feritina u serumu, a Valberg

i sur. (155) pronašli su značajno povećanje srednje vrijednosti feritina u serumu na uzorku od 49 MS bolesnika.

Dva dosadašnja istraživanja (87, 121) o utjecaju SLC11A1 polimorfizma, inače odgovornog za rjeđi tip 4 HH, provedena u MS bolesnika dala su pretežno negativne, ali i nekonzistentne rezultate. Potom su publicirana i dva rada (88, 122) o utjecaju mutacija HFE gena na podložnost i kliničku ekspresiju MS. Genskom analizom HFE C282Y mutacije Rubio i sur. (88) utvrdili su veću frekvenciju ove mutacije u MS bolesnika podrijetlom iz sjeverozapadne Europe. Unatoč frekvenciji C282Y mutacije višoj od 10% autori sugeriraju da ona ne igra nezavisnu ulogu u predispoziciji za MS, ali ipak ukazuju na svrsishodnost istraživanja C282Y mutacije u MS bolesnika iz različitih populacija. Naime prva genetska povezanost HH (156), ali i MS, bila je s HLA-A\*3, a dvadeset godina kasnije HFE gen lociran je 3,8 Mb distalno od HLA-A. Rubio i sur. (88) stoga su na osnovi neravnoteže vezanosti i provedene *log linear modelling* analize pretpostavili da je ova mutacija povećana u bolesnika uslijed LD s rizičnim rodovskim DR15 haplotipom. Objavili su i 10 puta nižu učestalost ovog alela u MS bolesnika koji nisu porijeklom iz sjeverozapadne Europe, što nije bilo praćeno adekvatnom redukcijom u frekvenciji DR15. Moguće je da je uzrok tome reducirani LD između C282Y i DR15 u populacijama koje nisu podrijetlom iz sjeverozapadne Europe ili, pak, da se C282Y mutacija pojavila u neko vrijeme na određenom rodovskom haplotipu u sjeverozapadnoj Europi i da varijanta tog rodovskog haplotipa koja nosi C282Y mutaciju drugdje nije uobičajena.

Držimo zanimljivom podudarnost Poserove teorije (32) o rasprostranjenosti MS, koja pretpostavlja da su Vikinzi imali odlučujuću ulogu u diseminaciji genetičke podložnosti za bolest, s teorijom da se C282Y mutacija izvorno pojavila u Vikinga te se preko njih prenosila diljem Europe (157). Naime nalet Vikinga na Europu počinje 789. godine, što bi se podudaralo s procjenama o vremenskom pojavljivanju C282Y mutacije (99). U prilog toj teoriji govore činjenice da je frekvencija C282Y mutacije visoka u skandinavskim zemljama (odakle Vikinzi potječu), uključujući Island i Faraonske otoke, zatim duž europske obale gdje

su Vikinzi plovili i smještali se, a najniža je na prostorima gdje je Vikinga bilo malo (centralna Europa, Balkan, Mediteran i Rusija).

U svakom slučaju C282Y mutaciju valja proučavati i u kontekstu populacijske genetike pri čemu su brojna populacijsko-genetička istraživanja pokazala različitu učestalost ove mutacije u različitim zemljama i etničkim grupama. Prosječna frekvencija C282Y mutacije u Europi iznosi 6,6%, ali njena distribucija u Europi pokazuje opadanje učestalosti od sjeverozapada (5–10%) prema jugoistoku (1-5%), (113). Hrvatska i Slovenija dijelom pripadaju srednjoj Europi, a dijelom u zemlje Mediterana i frekvencije C282Y alela u hrvatskoj i slovenskoj populaciji odgovaraju njihovom geografskom položaju i dobro se uklapaju u prisutni sjever/jug gradijent (158). Sličan gradijent rasprostranjenosti u Europi pokazuje i MS zbog veće prevalencije u nordijskim zemljama i na britanskom otočju negoli u južnijim zemljama Mediterana (23), pri čemu se žarišna područja bolesti javljaju nevezano uz taj gradijent.

Budući da naši prvi publicirani rezultati (122) o učestalosti ove mutacije u MS bolesnika iz Hrvatske i Slovenije nisu pokazali značajno veću frekvenciju C282Y alela u odnosu na kontrolu niti nakon uključivanja većeg broja ispitanika u ovom istraživanju ( $p=0,054$ ) (tablica 27), podijelili smo ispitanike na one iz žarišta i izvan žarišta. Naime, jedno od žarišta u Europi je i područje Gorskog kotara i Kočevja (27,28), gdje bolest pokazuje neke posebne karakteristike kao što su raniji početak i duže trajanje bolesti, veći broj obiteljskih slučajeva i veća pojavnost PP tijekom bolesti.

Utvrđena je značajno veća frekvencija C282Y heterozigota u MS bolesnika izvan žarišta u odnosu na bolesnike u žarištu ( $p=0,023$ ). Usporedbom učestalosti nositelja C282Y mutacije u MS bolesnika (8,7%) i kontrolnih ispitanika izvan žarišta (3,9%) utvrdili smo statistički značajnu razliku ( $p=0,019$ ) (tablica 28). Broj nosilaca C282Y mutacije također je značajno veći ( $p=0,013$ ) u neobiteljskih slučajeva MS u odnosu na kontrolu (tablica 29), što je očekivano jer su ti neobiteljski slučajevi MS gotovo dva puta češći u općoj populaciji negoli u žarištu. Tek kada bi neki polimorfizam imao ključnu ulogu u patogenezi bolesti, bilo bi

očekivati da se njegov utjecaj ispolji u bolesnika iz žarišnog područja zbog činjenice da pripadnici male homogene populacije imaju i zajedničku genetičku pozadinu.

Zanimljivo je, budući da žene 2,5 puta češće oboljevaju od MS, i da smo statistički značajno više ( $p < 0,05$ ) nosilaca ove mutacije pronašli u žena oboljelih od MS (slika 5) premda u općoj populaciji nema razlike u frekvenciji alela s obzirom na spol. To dodatno govori u prilog moguće uloge ove mutacije u predispoziciji za MS.

O samoj ulozi ove mutacije ipak je teško donijeti siguran zaključak isključivo na osnovi njene frekvencije jer se u heterozigotnom obliku poremećaj parametara željeza (željezo u serumu, saturacija transferina i feritin u serumu) i njegovo nakupljanje javlja tek u kombinaciji s još nekim genskim (npr. druge mutacije HFE gena) ili okolišnim čimbenikom (101,114,115). Tako iz naših rezultata proizlazi i da je rizik podložnosti za MS dva puta veći u osoba koje su složeni heterozigoti (imaju C282Y i H63D mutaciju), premda razlika nije statistički značajna ( $p > 0,05$ ) s obzirom na mali broj ispitanika s takvim genotipom (slika 6).

Do sada je u literaturi objavljen samo jedan slučaj osobe koja istovremeno ima MS i HH (88). To ne čudi s obzirom da se MS češće javlja u žena u kojih je ionako diskutabilna penetrabilnost C282Y mutacije reducirana uslijed menstrualnih ciklusa, te se HH najčešće javlja tek nakon menopauze, iako nakupljanje željeza posebice u kombinaciji s nekim drugim okolišnim ili genskim čimbenicima može početi i ranije.

Naime, penetrabilnost HFE gena nije potpuna, tako da pojedine osobe s rizičnim HFE genotipovima ne manifestiraju kliničke simptome bolesti. Stoga izgleda da su mutacije HFE gena nužan, ali ne i dostatan razlog za razvoj kliničke slike hemokromatoze (115,159). Procjene o penetrabilnosti C282Y mutacije kreću se od 1% (ukoliko se promatra krajnji stadij oštećenja jetre) pa do relativno visokih 75% ili čak 96% penetrabilnosti u C282Y homozigota s obzirom na prekomjerno nakupljanje željeza u tkivima (114). Složeni heterozigoti (C282Y/H63D) imaju umjereno nakupljanje željeza, što naglašava nižu penetrabilnost ovog genotipa. Otvorena su pitanja što točno čini penetrabilnost i kako se ona može procijeniti kada je potreban cijeli niz godina do potpunog ispoljavanja bolesti uz postojanje drugih genetičkih i okolišnih čimbenika koji na nju mogu utjecati. Treba tek utvrditi koji su to

genetički i okolišni faktori i kako oni utječu na ekspresiju HFE mutacija. Mogućnost da HFE mutacije ulaze u interakciju s drugim genima prijavljene su u eksperimentalnih životinja gdje je praćeno nakupljanje željeza u jetri. Moguće je da se ti čimbenici u ljudi razlikuju i od populacije do populacije i da je penetrabilnost veća u jednim negoli u drugim populacijama (159).

Unatoč nepotpunoj penetrabilnosti, koja se još teže očituje u heterozigotnom obliku, nastojali smo procijeniti utječe li C282Y mutacija na dob nastupa i klinički tijek MS. Tako smo u osoba s C282Y mutacijom utvrdili trend ranijeg javljanja bolesti (2,7 godina) u odnosu na bolesnike bez te mutacije (tablica 42). Nakon što smo napravili korekciju i isključili osobe s H63D mutacijom, utvrdili smo statistički značajno ( $p=0,035$ ) raniji (4,5 godina) nastup bolesti u bolesnika s C282Y mutacijom (slika 8). Pozitivna korelacija između C282Y heterozigotnosti i ranijeg javljanja bolesti znači da je genotip C282Y/wt dobar prediktor ranog nastupa MS, što je u skladu s našim već prethodno publiciranim podacima o utjecaju ove mutacije (122). Ovaj rezultat ujedno potvrđuje C282Y mutaciju kao rizični čimbenik u razvoju MS.

U odnosu na ostale promatrane kliničke parametre nismo utvrdili statistički značajnu razliku ( $p>0,05$ ) s obzirom na C282Y mutaciju ni nakon što smo napravili korekciju za osobe s H63D mutacijom (tablice 43,44,45). Također nismo zapazili ni specifični trend djelovanja na trajanje bolesti, EDSS i PI, te možemo zaključiti da kad se bolest već javi, C282Y mutacija u heterozigotnom obliku ne utječe na njenu kliničku sliku. Moguće je ipak da bi mutacija u homozigotnom obliku utjecala na depozite željeza i u mozgu te doprinosila težoj kliničkoj slici bolesti. Od te su pretpostavke krenuli i Rubio i sur. (88), ali, također, nisu potvrdili značajne promjene u težini bolesti, no, kako i sami navode, nedostatak u njihovu istraživanju jest svega šest homozigota za C282Y mutaciju. U našem relativno velikom uzorku ( $N=368$ ) bolesnika, s obzirom na još uvijek nisku frekvenciju mutacije (3,5%) prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi, očekivana prevalencija C282Y homozigota u MS bolesnika iznosila bi 1:903.



Na temelju dobivenih rezultata proizlazi da C282Y mutacija može predstavljati potencijalni rizični čimbenik u podložnosti za MS te da utječe na raniju pojavnost bolesti, ali ne mijenja njenu daljnju kliničku ekspresiju. Ovi rezultati odgovaraju rezultatima istraživanjima o utjecaju C282Y mutacije u Parkinsonovoj (160) i Alzheimerovoj bolesti (161).

Iako se misli da je prvenstveno C282Y mutacija odgovorna za prekomjerno nakupljanje željeza u vitalnim organima te potencijalno i na razini CNS, ono može biti i posljedica mutacija drugih gena uključenih u metabolizam željeza.

Stoga, da bismo potpunije procijenili utjecaj HFE gena u razvoju MS, analizirali smo još jedan polimorfizam koji ima blaži utjecaj i u manjoj se mjeri povezuje s taloženjem željeza. To je H63D mutacija na koju etničko podrijetlo manje utječe, te ima podjednaku zastupljenost u svim europskim populacijama, a njena frekvencija iznosi više od 10%. U hrvatskoj populaciji frekvencija ove mutacije iznosi 14,5%, kao i u nama susjednoj Sloveniji (158).

Činjenice ukazuju i da H63D mutacija ima ulogu u nakupljanju željeza, ali s niskom penetrabilnošću (162). Uloga H63D mutacije još uvijek je kontroverzna, a Moirand i sur. (163) sugeriraju da H63D mutacija sama po sebi nije dovoljna da prouzroči prekomjerno nakupljanje željeza, ali može biti kofaktor fenotipske ekspresije u nekim situacijama za koje se sumnja da su povezane s nakupljanjem željeza. Prema njihovoj teoriji divlji tip HFE proteina tvori stabilan kompleks s transferinskim receptorom i regulira apsorpciju željeza smanjujući afinitet receptora za transferin. Nadalje pretpostavljaju da se u H63D heterozigota može pojaviti kompeticija između proteina divljeg tipa i mutiranog proteina u vezanju na transferinski receptor. U tom slučaju prisutnost proteina divljeg tipa može djelomično djelovati protiv H63D proteina, što vodi lagano povišenoj apsorpciji željeza i odgođenom nakupljanju željeza u organizmu. Stoga nismo očekivali očit utjecaj ove mutacije kao rizičnog čimbenika u predispoziciji za MS, ali je ostalo otvoreno pitanje njenog utjecaja na klinički tijek bolesti.

Značaj našeg istraživanja naglašava činjenica da prema našem saznanju H63D mutacija još nije istraživana u MS bolesnika iako je nekoliko radova ispitalo ovu mutaciju u drugih neuroloških bolesti poput AD (164) i Parkinsonove bolesti (165,166). Guerio i sur. (161) napravili su i meta-analizu radova objavljenih do 2006. godine, koja nije pokazala značajnu povezanost ovih mutacija ni s Parkinsonovom, ni s Alzheimerovom bolesti, premda su pojedini autori zabilježili blagi utjecaj na predispoziciju ili tijek bolesti. Međutim, analizirane studije provedene u različitim populacijama daju kontradiktorne rezultate, a i broj ispitanika ponekad je ograničavajući čimbenik, dok neki rezultati postaju interesantni tek u kombinaciji s drugim genskim varijantama.

Suprotno prvotnoj pretpostavci o HFE mutacijama kao rizičnom čimbeniku u MS, udio osoba s H63D mutacijom kao i frekvencija te mutacije neznatno su niži u MS bolesnika negoli u kontrolnih ispitanika (tablica 27), ali razlika nije statistički značajna ( $p > 0,05$ ). Međutim, u homozigota za H63D mutaciju potvrđen je ovaj trend i utvrđena granična vrijednost statističke značajnosti ( $p = 0,0501$ ). Zbog blažeg učinka te mutacije u nakupljanju željeza unatoč malom broju homozigota u našem uzorku, rezultat ukazuje na njenu eventualnu protektivnu ulogu, bilo kroz njenu funkciju, bilo kroz interakciju s drugim polimorfizmima. To je ipak u skladu sa statistički značajnom protektivnom ulogom H63D mutacije zabilježenom u najnovijem radu Blazguez i sur. (167), provedenom u AD bolesnika iz baskijske populacije koja inače ima jednu od najvećih frekvencija ove mutacije u Europi (29,3%) (168). Objašnjenje možemo potražiti u novoj, nedavno predloženoj ulozi HFE gena kao inhibitora staničnog otpuštanja željeza u nekim stanicama kao što su makrofazi, Kupferove stanice i kriptalne stanice crijeva (169). Kad je H63D mutacija prisutna, HFE nije u mogućnosti inhibirati istjecanje željeza iz tih stanica i tako reducirati sadržaj željeza u stanici. O funkciji HFE proteina na nivou mozga nema puno informacija, ali ne može se isključiti mogućnost da ova mutacija može reducirati razinu željeza u nekim tipovima stanica i moguće imati blagotvoran utjecaj na homeostazu željeza u mozgu. S druge strane, H63D mutacija može imati protektivnu ulogu zahvaljujući asocijaciji s drugim polimorfizmima. Tako je npr. u baskijskoj populaciji utvrđen LD između H63D i HLA-A29 alela (170). U literaturi je

opisan veći broj CD8+T limfocita u osoba s tim haplotipom u odnosu na one koji imaju samo HLA-29 alel. U bolesnika s hemokromatozom broj CD8+ stanica obrnuto proporcionalno korelira s težinom kliničke slike i s integritetom zaliha željeza (171). Nazočnost većeg broja CD8+T limfocita u zdravih osoba s H63D-A29 haplotipom mogla bi doprinositi regulaciji metabolizma željeza smanjujući njegove zalihe. Autori zaključuju da limfociti uistinu mogu migrirati na mjesto akumulacije željeza i ponašati se kao odjeljak za čuvanje željeza s obzirom da imaju ekspresiju transferinskog receptora i sintetiziraju feritin koji se ne izlučuje. Takvu potencijalnu ulogu H63D mutacije i njenu povezanost s HLA haplotipovima u našoj populaciji valjalo bi tek istražiti, kao i eventualnu uključenost HFE proteina u patologiju MS. Zanimljivo je da noviji radovi ukazuju na važnost CD8+ i regulatornih T stanica i njihovu kritičnu ulogu u razvoju MS, premda točnu uključenost tih stanica u razvoj bolesti također tek treba utvrditi (172,173).

U naših MS bolesnika utvrdili smo veću učestalost H63D heterozigota u neobiteljskih slučajeva bolesti u odnosu na obiteljske ( $p=0,044$ ) (tablica 29). Statistički značajno ( $p=0,027$ ) manja učestalost bolesnika s H63D mutacijom u obiteljskoj MS u odnosu na kontrolne ispitanike ukazuje na protektivnu ulogu samo u obiteljskih MS slučajeva. Međutim, rezultat može biti i posljedica nasljeđivanja te mutacije u obitelji, u kombinaciji s nekim drugim rizičnim alelom u HLA regiji. Teško je usporediti naše rezultate s rezultatima dobivenim u drugim neurološkim poremećajima, ali ipak možemo spomenuti nešto nižu frekvenciju (2 – 5,6%) H63D alela u AD bolesnika koju su opazili su Moalem i sur., te Sampietro i sur. (174,175), dok su Guerreiro i sur. (160) pronašli 5,1% manje heterozigota za ovu mutaciju u oboljelih od Parkinsonove bolesti.

Istražujući utjecaj polimorfizama u AD bolesti Combarros i sur. (176) utvrdili su da H63D mutacija snižava dob nastupa bolesti, ali tek u potencijalnoj interakciji s ApoE  $\epsilon 4$  rizičnim alelom. Dob nastupa bolesti u naših se MS bolesnika koji imaju H63D alel ne mijenja (tablica 42), ali pokazuje blagi trend kasnije pojave (2,1 godina) simptoma u homozigota za ovu mutaciju i bolest traje kraće, ali ne statistički značajno ( $p=0,241$ ). Nakon korekcije za nosioce C282Y mutacije, dobili smo graničnu vrijednost statističke značajnosti

( $p=0,0504$ ) s obzirom na duže trajanje (2,1 godinu) bolesti u nositelja H63D mutacije (slika 9). Razlika je dosegla tu značajnost dijelom poradi duljeg trajanja bolesti (6,3 godine) u bolesnika s PP tijekom bolesti, a kao izdvojeni parametar bez značajnih promjena u dobi nastupa i stupnju invalidnosti (tablica 44) ne govori mnogo o utjecaju H63D mutacije na klinički tijek bolesti. Ipak za 0,5 niži stupanj invalidnosti (EDSS=3,5) imaju osobe homozigoti za H63D mutaciju, premda razlika nije statistički značajna ( $p=0,723$ ). Berlin i sur. (177) uočili su trend bržeg napredovanja od blažeg poremećaja kognitivnih funkcija ka klinički sigurnoj AD u homozigota za H63D mutaciju, ali ovaj parametar ne možemo usporediti s progresijom bolesti u MS.

Ipak, mišljenja smo da dobiveni rezultati otvaraju mogućnost eventualnog daljnjeg istraživanja uloge H63D mutacije kao jednog od kofaktora koji modificira predispoziciju za razvoj MS prvenstveno u homozigota za tu mutaciju ili, pak, u njenoj kombinaciji s polimorfizmima drugih gena.

Zbog međusobne interakcije produkata HFE i TF gena u metabolizmu željeza, TF gen je sljedeći gen koji smo uključili u naše istraživanje. Osim toga TF gen mapiran je u području koje također odgovara jednom od lokusa podložnosti za MS. Značaj željeza za funkcije CNS reflektira se prisutnošću transferinskog receptora na endotelnim stanicama kapilara mozga (9). Za dostavu željeza u mozak tradicionalno se smatra odgovornim transferin koji željezo donosi i do makrofaga (153). Nekolicina istraživača (94,178,179,180,181) pratila je koncentracije i ulogu sTfR i/ili transferina u MS bolesnika. Iako Levine i sur. (181), kao ni kasnije Sfagos i sur. (94), nisu pronašli značajnu razliku u razini transferina u CSF između MS bolesnika i kontrole, taj je nivo bio povišen u bolesnika s povećanim vrijednostima CSF IgG. Zeman i sur. (179) utvrdili su niži i subnormalan nivo transferina u serumu MS bolesnika s PP tijekom bolesti u usporedbi s vrijednostima u SP i RR MS, dok je transferinski indeks (izračunava se iz omjera kvocijenta transferina u CSF i serumu te kvocijenta albumina) bio značajno viši u PP negoli u SP i RR obliku bolesti.

Do sada je objavljeno nekoliko radova o učestalosti TFC1/C2 polimorfizma zasebno (126,182) ili u kombinaciji s mutacijama HFE gena (128,164,167) u oboljelih od

Alzheimerove bolesti. Prema našoj spoznaji slično genetičko istraživanje u bolesnika s MS do sada nije provedeno. Ujedno, ovo su i prvi podaci o frekvenciji TF C1 i C2 alela u našoj populaciji.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ne ukazuju na značenje TF C1/C2 polimorfizma u predispoziciji za MS. Naime, frekvencija TF genotipova kao ni C1 odnosno C2 alela ne razlikuje se ( $p \geq 1,00$ ) između MS bolesnika i kontrole (tablica 30), a distribucija genotipova ne pokazuje značajnu razliku ( $p > 0,05$ ) niti s obzirom na žarište bolesti, obiteljske slučajeve ili spol bolesnika (tablice 31, 32 i 33). Prema rezultatima Sergeanta i sur. (124) dobivenim u eksperimentalnih životinja izgleda da povećana ekspresija Tf u mozgu nije povezana samo s transportom željeza. Inače općenito povećana ekspresija Tf u većini tkiva gdje je njegova uloga posvećena prvenstveno transportu željeza, vodi do akumulacije željeza povezane s feritinom. Opažanje se slaže s prijašnjim podacima koji pokazuju da je u CNS feritin, a ne Tf, glavni izvor željeza za oligodendrocite. Povrh toga, u hipotransferinemičnih miševa, odsutnost Tf u oligodendrocitima rezultira hipomijelinizacijom unatoč činjenici da je regionalna i stanična distribucija željeza gotovo normalna u CNS-u tih životinja. Uloga Tf u CNS može biti povezana s afinitetom za metalne katione jer Tf veže ne samo željezo, već i druge metale.

U skladu s našim rezultatima Blazquez i sur. (167) nisu pronašli razliku u frekvenciji C2 alela između AD bolesnika i kontrole u baskijskoj populaciji, dok su Robson i sur. (128), te Zambenedetti i sur. (182) utvrdili nešto višu frekvenciju C2 alela u AD bolesnika, ali razlika nije bila statistički značajna ( $p > 0,05$ ). Hussain i sur. (123) također su pronašli nešto višu frekvenciju C2 polimorfizma u AD bolesnika, ali nakon stratifikacije ovog alela u AD bolesnika s obzirom na rizični APO E  $\epsilon 4$  alel zaključuju da TF nije značajan rizični faktor za bolest u njihovoj populaciji.

Ipak, usporedbom C2 homozigota među bolesnicima s obzirom na tijek bolesti utvrdili smo da ih je značajno više ( $p = 0,033$ ) u bolesnika s PP negoli u bolesnika s SP + RR tijekom bolesti (tablica 30). Moguće je da se razlika javila slučajno zbog malog broja bolesnika s PP tijekom bolesti, ali ne treba odbaciti ni mogućnost da homozigotna mutacija znatno olakšava

otpuštanje željeza u endosomu neurona, što, eventualno, može doprinijeti razvoju PP MS. Naime, PP MS često se ponaša kao zasebna bolest, javlja se kasnije, progresija je nagla, a simptomi teži.

Utjecaj TF C1/C2 polimorfizma na kliničke parametre pratili smo u bolesnika koji imaju ili nemaju C2 alel i nismo utvrdili statistički značajnu razliku ( $p > 0,05$ ) ni na dob nastupa i trajanje bolesti (tablica 46), ni na EDSS i PI (tablica 47). Međutim, opazili smo trend ranijeg nastupa bolesti (3,6 – 5,2 godine) (slika 10), te većeg EDSS (za 1,2) (slika 11) i PI (za 0,08) (slika 12) u bolesnika homozigota za C2 alel u odnosu na homozigote za C1 alel, ali razlike nisu bile statistički značajne ( $p > 0,05$ ), a broj bolesnika s genotipom C2/C2 relativno je mali ( $N=10$ ).

Teorijski bi transferin trebao spriječiti da željezo sudjeluje u oksidativnim reakcijama, ali je također utvrđeno da potiče oštećenja nastala djelovanjem slobodnih radikala. Moguće je da ovo različito djelovanje poništava konačni efekt transferina, s obzirom da iz naših rezultata proizlazi da polimorfizam C1/C2 TF gena nema utjecaja na predispoziciju ni na tijek MS. Iako bi se slično istraživanje moglo provesti u nekoj drugoj populaciji bolesnika s posebnom pažnjom usmjerenom na homozigote za C2 alel, možda bi interesantnije bilo istraživanje proširiti na gen za transferinski receptor ili pak gen za vezno mjesto feritina budući da je normalan obrazac distribucije vezanja transferina i feritina u sivoj, odnosno bijeloj tvari mozga MS bolesnika narušen (180).

Unos željeza vezanog za transferin u neurone i glija stanice reguliran je brojem TfR, ali i kompeticijom s HFE proteinom. Stoga smo pretpostavili moguću interakciju HFE i TF gena u predispoziciji za MS, premda TF C1/C2 polimorfizam kao izdvojeni čimbenik ne pridonosi razvoju MS (tablice 30–33). Robson i sur. (128) iako nisu utvrdili povezanost pojedinačnog polimorfizma HFE H63D, HFE C282Y i TF C1/C2 s Alzheimerovom bolešću, pronašli su da je kombinacija polimorfizama (C282Y i C2) ovih gena rizični čimbenik za razvoj ove bolesti jer istovremeno nosioci C282Y i C2 alela imaju čak pet puta veći rizik za AD.

Prema našim saznanjima nema publiciranih radova o interakciji HFE i TF gena u MS s kojima bismo mogli usporediti naše rezultate. U svakom slučaju, nismo utvrdili značajnu ( $p > 0,05$ ) interakciju ovih gena na predispoziciju (Tablica 34, Tablica 35) za MS. Granična vrijednost statističke značajnosti ( $p = 0,053$ ) javila se pri usporedbi heterozigota za TF C2 u bolesnika s C282Y mutacijom u odnosu na TF C2 heterozigote u cijeloj kontrolnoj skupini (tablica 34). Međutim, svega četiri bolesnika s TFC2 alelom i HFE C282Y mutacijom nisu dovoljna za izvođenje zaključka o interakciji ovih polimorfizama. Osim toga, usporedimo li samo ispitanike s HFE C282Y i TF C2 alelom, vidimo da ih je i u bolesnika i u kontroli prisutan jednaki broj (četiri), od čega po 3 heterozigota za C2 alel.

Analizom rizika javljanja bolesti u osoba koje nose kombinaciju polimorfizama HFE i TF gena utvrdili smo statistički značajano veći rizik za MS ( $OR = 2,27$ ;  $p = 0,031$ ) u osoba s C282Y alelom i C1 polimorfizmom (slika 6). Mislimo da je razlika posljedica djelovanja C282Y alela, koja se na određenom broju bolesnika ( $N = 22$ ) koji imaju C1 alel uz C282Y mutaciju pokazala značajnom u odnosu na 10 takvih ispitanika u kontroli. Za razliku od Alzheimerove bolesti, nismo pronašli povećan rizik ( $OR = 1,00$ ) za MS u bolesnika s C282Y i C2 alelom, kao što smo očekivali jer je moguće da se više kompleksa Tf-TfR unese u neurone poradi većeg vezanja Tf na TfR zbog prisutnosti C282Y mutacije te lakšeg otpuštanja željeza u stanici poradi C2 alela. Što se tiče rizika za MS u kombinaciji TF C1/C2 polimorfizma s H63D mutacijom, on je zanemarivo manji ( $OR = 0,85$  i  $OR = 0,96$ ), moguće i zbog već spomenutog eventualnog blagog protektivnog djelovanja H63D mutacije na razini neurološkog sustava.

Što se dobi nastupa tiče, C2 alel neznatno ( $p > 0,05$ ) spušta tu dob u osoba s H63D mutacijom (slika 17), a ne djeluje ni kao rizični čimbenik ranijeg javljanja bolesti u ispitanika s C282Y mutacijom, gdje povećava dob nastupa bolesti (slika 13). Ipak u naših bolesnika imali smo svega četiri osobe s C282Y i C2 alelom, od čega dvije s progresivnim tijekom bolesti u kojih se bolest razvila tek u trideset i osmoj godini. Stoga je progresijski indeks (slika 13) u prosjeku za 0,37 veći negoli u bolesnika s preostalim kombinacijama ovih polimorfizama, ali razlika nije statistički značajna ( $p = 0,123$ ). Iako C2 alel podiže PI i EDSS te skraćuje trajanje

bolesti i u bolesnika s C282Y i u bolesnika s H63D mutacijom, statistička analiza nije pokazala interakciju HFE i TF gena na kliničke parametre MS ( $p > 0,05$ ) (slike 14, 15, 18, 19, 20). Stoga možemo zaključiti da interakcija HFE i TF gena niti utječe na predispoziciju niti na klinički tijek MS, uz opasku da kombinaciju alela (C282Y i C2) za koju smo očekivali da se eventualno pokaže rizičnim čimbenikom i u većeg broja bolesnika, imaju svega četiri osobe. To smanjuje snagu statističke analize utjecaja na kliničke parametre. Mišljenja smo da je mali broj ovih ispitanika posljedica niske frekvencije C282Y alela (3,5% u bolesnika i 1,9% u kontroli) u ovoj populaciji te niže učestalosti C2 alela (16,4% i 16,3%) u odnosu na C1 alel, a da bi u slučaju značajnog doprinosa razvoju MS tih bolesnika ipak bilo više.

Još jedno područje u kojem se poremećaj akvizicije željeza od strane oligodendrocita može povezati s demijelinizacijom jest povezanost između citokina i demijelinizirajućih bolesti. Danas je poznato da je neravnoteža željeza povezana i s proinflamatornim citokinima i oksidativnim stresom koji je uključen u patogenezu MS (9).

Do danas je objavljeno dvadesetak radova o potencijalnoj ulozi TNF- $\alpha$ -308 i -238 polimorfizama uključenih u autoimuni odgovor u MS provedenih u različitim populacijama (139-144). Međutim, radovi provedeni u bolesnika s HH ukazuju na mogućnost da TNF- $\alpha$  djeluje kao modifikator kliničke ekspresije te bolesti (135,136), a eksperimentalna istraživanja ukazuju da produkcija citokina ovisi pak o koncentraciji željeza (83). U svakom slučaju, povezanost TNF- $\alpha$  polimorfizama kao segmenta metabolizma željeza i s njime povezanog oksidativnog stresa u razvoju MS još nije istražena. Osim toga, dobiveni rezultati istraživanja TNF- $\alpha$ -308 i -238 polimorfizama u MS bolesnika nerijetko su proturječni (139-144), možda zbog različitog dizajna studija ili, pak, vezanosti za drugi bliski lokus koji se razlikuje između populacija. HFE i TNF- $\alpha$  gen smješteni su u HLA regiji za koju je analizama genetičke povezanosti i studijama genomskog probira jasno i konzistentno utvrđena povezanost s MS (45), ali međusobno nisu u LD i polimorfizmi ovih gena nasljeđuju se neovisno jedni o drugima.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju nešto veću zastupljenost TNF- $\alpha$ -308 A alela u kontrolnih ispitanika nego u MS bolesnika, premda razlika u frekvenciji alela nije statistički



značajna ( $p > 0,05$ ) (tablica 36). Heterozigota za ovaj polimorfizam značajno je više ( $p < 0,05$ ) u kontroli negoli u bolesnika s RR tijekom bolesti i u svih MS bolesnika, ali distribucija ovog polimorfizma u homozigotnom obliku, iako se uklapa u Hardy-Weinbergov ekvilibrium ( $p = 0,19$ ), ne dopušta nam da zaključimo kako TNF- $\alpha$ -308 polimorfizam sam po sebi ima protektivnu ulogu (tablica 36). Nekoliko je istraživanja (183, 184, 139, 143, 144) pronašlo veću zastupljenost ovog polimorfizma u kontroli negoli u MS bolesnika, pri čemu su graničnu vrijednost statističke značajnosti ( $p = 0,088$ ) zabilježili He i sur u švedskoj populaciji, a statistički značajna razlika utvrđena je u MS bolesnika iz srpske populacije ( $p = 0,044$ ) (139). S druge strane, istraživanja u drugim slavenskim populacijama pokazuju suprotan trend nosilaca TNF- $\alpha$ -308 A alela (185,186), ali manjkavost im je što su provedena na svega 50-ak MS bolesnika, uglavnom s RR tijekom bolesti. De Joung, Fernandez-A, Luccote i Maurer sa sur. (143,187,188,189), koji su također ispitivali TNF- $\alpha$ -308 polimorfizam, nisu uspjeli potvrditi povezanost ovog polimorfizma s podložnosti za MS. Očita nekonzistentnost rezultata može biti posljedica razlika u etiologiji MS u bolesnika različitog etničkog podrijetla. Uistinu, varijabilna frekvencija TNF- $\alpha$ -308 A alela u MS bolesnika i zdravih ispitanika može ukazati na različitu pojavnost alela u populacijama heterogene genetičke pozadine.

U tom kontekstu zanimljiv je i naš rezultat koji pokazuje statistički značajno ( $p = 0,016$ ) manji broj nosilaca TNF- $\alpha$ -308 A alela u MS bolesnika u odnosu na kontrolu na području Gorskog kotara i Kočevja. Upravo to žarišno područje relativno je izolirano i karakterizirano homogenom i donekle specifičnom populacijsko-genetičkom strukturom ispitanika (27,28,29), premda postojeće razlike u distribuciji nosilaca TNF- $\alpha$ -308 A alela između bolesnika u žarištu i izvan njega, kao i kontrole u žarištu i izvan njega, ne pokazuju statističku značajnost ( $p > 0,05$ ) (tablica 37).

Značajne razlike nije bilo u utjecaju TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma na kliničke parametre bolesti između MS bolesnika u žarištu i izvan žarišta, a praćenje tih parametra u žarištu je otežano zbog manjeg broja bolesnika i s time povezane manje statističke snage takve analize. To je razlog što je u rezultatima, kao uostalom i za ostale polimorfizme, prikazan utjecaj TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma u svih MS bolesnika te u ovisnosti o samom tijeku bolesti

(tablice 48-51). U bolesnika s TNF- $\alpha$ -308 A alelom uočljiv je trend kasnijeg javljanja bolesti, ali razlika nije statistički značajna ( $p=0,157$ ), a razlika u trajanju bolesti zanemariva je ( $p=0,535$ ) (tablica 53). Stupanj invalidnosti ne pokazuje razlike u nosilaca ovog alela, ali u homozigotnom obliku spušta EDSS za 1 stupanj ( $p=0,202$ ) (slika 23). Nadalje, progresija bolesti u ovih homozigota nešto je manja ( $p=0,185$ ) (slika 28). Unatoč spomenutim blagim trendovima naši su rezultati o utjecaju ovog polimorfizma i na tijek bolesti u skladu s rezultatima istraživanja provedenog u susjednoj populaciji (139) i ne možemo zaključiti da je TNF- $\alpha$ -308 A alel odgovoran za fenotipsku heterogenost u MS bolesnika. Maurer i sur. (189) također nisu pronašli povezanost TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma s tijekom bolesti, premda je zabilježeno nešto brže pogoršanje stupnja invalidnosti u MS bolesnika s TNF- $\alpha$ -308 A alelom ( $p=0,2$ ). Značajan utjecaj polimorfizma na tijek ili progresiju bolesti nije utvrđen ni u drugim radovima iz ovog područja (144,184,185).

Rezultati dobiveni za TNF- $\alpha$ -308 polimorfizam u ovom istraživanju podudaraju se s našim već publiciranim rezultatima (190) i ukazuju na moguću protektivnu ulogu TNF $\alpha$ -308 A alela u razvoju MS. Dokazano je da je TNF- $\alpha$ -308 A alel povezan s povećanom transkripcijom i većom razinom TNF- $\alpha$  u krvi, a produkcija ovog alela in vitro povećana je 6 – 7 puta (192). Očekivati bi bilo veću frekvenciju TNF- $\alpha$ -308 A alela s obzirom na pretpostavku da TNF- $\alpha$  kao proinflamatorni citokin ima ulogu u upalnom procesu i destrukciji tkiva u CNS-u MS bolesnika. Međutim, tretman bolesnika s TNF- $\alpha$  inaktivirajućim agensom, *lenercept* u fazi II kliničkih ispitivanja, nije se pokazao blagotvornim, već suprotno, povećao je učestalost ataka bolesti. Rezultati istraživanja EAE na TNF- $\alpha$  *knockout* miševima također čine upitnom imunopatogenu ulogu koja se pripisuje TNF- $\alpha$  u razvoju MS. Tako je pokazano da TNF- $\alpha$  deficijentni miš može razviti EAE s ekstenzivnim upalama i demijelinizacijom unutar CNS-a, te da tretman s TNF- $\alpha$  značajno smanjuje jačinu autoimune demijelinizacije i u TNF-/- i u TNF+/- miševa (192). To ukazuje da TNF nije esencijalan za indukciju i ekspresiju upale i demijelinizirajućih lezija, te da može ograničiti opseg i trajanje teške patologije CNS-a. Tako, na tragu prethodnih, novija istraživanja prijavljuju da TNF, koji ima dobro poznate proinflamatorne aktivnosti, može također postići značajan protuupalni efekt, za što je

predloženo nekoliko mehanizama. Objašnjenje za eventualnu zaštitnu ulogu TNF- $\alpha$ -308 A alela možemo potražiti i u novijem radu koji govori o neuroprotektivnoj ulozi TNF- $\alpha$  kroz indukciju ekspresije moždanog derivata neurotrofičnog faktora (engl. brain-derived neurotrophic factor - BDNF) aktivacijom jezgrenog čimbenika kapa B (NF- $\kappa$ B) u astrocitima (193).

Produkcija TNF- $\alpha$  djelomično je pod genskom kontrolom, i samo djelomično ovisi o 308 polimorfizmu, te se mogući blagi protektivni doprinos ovog alela cjelokupnoj kliničkoj slici MS ne može isključiti.

Iako su literaturni podaci o funkcionalnom značenju TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma kontradiktorni, novija istraživanja potvrđuju da ovaj polimorfizam smješten, također u regulatornoj regiji gena, djeluje na taj način da -238 A alel smanjuje transkripciju i u skladu s time snižena je razina TNF- $\alpha$  (135,136). U tom slučaju smanjeno je potencijalno neuroprotektivno djelovanje, pa bi TNF- $\alpha$ -238 A predstavljao rizični čimbenik u razvoju MS.

Naši rezultati to uistinu i potvrđuju jer statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ) alela i genotipova utvrdili smo između svih skupina MS bolesnika podijeljenih prema tijeku bolesti i kontrole (tablica 36), zatim između bolesnika i kontrole izvan žarišta (tablica 37), između obiteljskih MS i kontrole te između neobiteljskih MS slučajeva i kontrole (tablica 38), kao i u žena oboljelih od MS u odnosu na žensku kontrolu (tablica 39). Razlika u učestalosti genotipova nije dosegla statističku značajnost ( $p = 0,093$ ) na području Gorskog kotara i Kočevja, dok ta značajnost u muškaraca iznosi 0,052 (tablice 37, 39). Već smo rekli da bolest u žarišnom području pokazuje mnoge specifičnosti, no statistički nema značajne razlike u frekvenciji TNF- $\alpha$ -238 G odnosno A alela ni između MS bolesnika u žarištu i izvan žarišta ( $p = 0,655$ ), niti ima između kontrole u žarištu i izvan žarišta ( $p < 0,05$ ). Nadalje, frekvencija nosilaca rizičnog TNF- $\alpha$ -238 A alela 2,5 puta je veća u MS bolesnika (11,4%) negoli u kontroli (4,7%) te možemo zaključiti da ovaj alel i u ovih bolesnika predstavlja čimbenik rizika, ali je manji broj MS bolesnika u žarištu ograničavajući faktor za statističku analizu. Isto tako granična vrijednost statističke značajnosti ( $p = 0,052$ ) u muškaraca prije je

posljedica manjeg broja muških bolesnika (N=102) nego drugačijeg mehanizma djelovanja ovog polimorfizma u muškaraca ili žena.

Manji broj radova objavljen je o ovom polimorfizmu i njegovom utjecaju na patogenezu MS. Duvefelt i sur. (194) nisu pronašli povezanost TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma s MS, kao ni Lucotte i sur. (142), premda su posljednji utvrdili korelaciju s TNF- $\alpha$  mikrosatelitima. Huizinga i sur. (144) također nisu utvrdili značajan utjecaj ovog polimorfizma, ali je njegova distribucija između hospitaliziranih i ambulantnih MS bolesnika bila različita, a frekvencija alela veća u kontrolnih ispitanika.

S druge strane, Fernandez-A i sur. (143) utvrdili su veću frekvenciju TNF- $\alpha$ -238 A alela u MS bolesnika negoli kontrolnih ispitanika, ali mala razlika nije ukazivala na značaj tog polimorfizma. Istraživanje provedeno na ograničenom broju (N=32) MS bolesnika na Sardiniji, koja spada u zonu visokog rizika za MS (s prevalencijom od preko 100/100000 stanovnika), nisu pronašla statistički značajnu razliku u učestalosti ovog alela između bolesnika i kontrole. Međutim, utvrdili su do 10 puta veću frekvenciju TNF- $\alpha$ -238 A alel populaciji sa sjevera Sardinije, koja je etnički različita u odnosu na populaciju Sicilije i ostale populacije iz Europe i svijeta. Autori su zaključili da visoka prevalencija MS može biti u korelaciji s povećanom frekvencijom polimorfizma, što zahtijeva dodatna istraživanja koja su moguća na njihovoj lokaciji. Najnovije istraživanje (141) provedeno je u populaciji iranskih MS bolesnika i kontrolnih ispitanika koja se genetički donekle razlikuje od onih iz sjeverozapadne Europe. Autori su, sukladno našim rezultatima, utvrdili statistički značajnu razliku ( $p < 0,01$ ) u frekvenciji TNF- $\alpha$ -238 alela i genotipova, te sugerirali da ova polimorfna varijanta proinflamatornog citokina ima značajnu ulogu u podložnosti za MS.

Kako postoje radovi koji govore da i TNF- $\alpha$ -238 A alel podiže razinu TNF- $\alpha$ , premda je takvih podataka manje, ne možemo isključiti mogućnost da se rizičnost TNF- $\alpha$ -238 A alela javlja upravo poradi njegova značaja u proinflamatornom djelovanju, što je i bila naša prvotna pretpostavka. Usprkos velikoj statističkoj značajnosti ( $p=0,0008$ ) koju smo dobili usporedbom MS bolesnika i kontrole s obzirom na ovaj polimorfizam, teško je tvrditi da on u značajnoj mjeri doprinosi patogenezi MS zbog njegove još uvijek relativno niske

zastupljenosti od 10% u MS bolesnika. Zanimljivo bi bilo utvrditi mehanizam uključenosti ovog polimorfizma u PP tijekom bolesti gdje broj nositelja inače rijetkog –238 A alela seže do 21,4%, a rizik oboljevanja gotovo je 7 puta veći (OR=6,89; 95%CI=2,42-19,68) za osobe s ovim alelom u odnosu na osobe bez tog alela. Ipak, ne smijemo odbaciti mogućnost da je TNF- $\alpha$ -238 polimorfizam koristan genetički marker nekog drugog funkcionalnog polimorfizma smještenog u blizini, jer je na telomernom kraju klase III HLA regije identificirano nekoliko gena navodno uključenih u imuni odgovor (143). Kako bismo pak odbacili eventualnu povezanost ovog polimorfizma s rizičnim HLA haplotipom, mogli bismo i napraviti HLA genotipizaciju koja je dosad provedena na manjem broju naših bolesnika (55).

Naši rezultati s obzirom na ekspresiju bolesti ne ukazuju na značajan utjecaj TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma. Stupanj invalidnosti u bolesnika s TNF- $\alpha$ -238 A alelom viši je za 0,5 (tablica 50), ali je progresija bolesti manja (tablica 51), vjerojatno zbog nešto dužeg trajanja bolesti (tablica 49). Naime, PI je indirektan parametar koji se izračunava iz omjera EDSS i dužine trajanja bolesti zbog čega ne mora nužno reflektirati pravu kliničku težinu i razvoj same bolesti. U novije vrijeme ukazuje se da bi za praćenje patogeneze MS korisniji bio podatak o vremenu potrebnom da bolest iz RR tijeka prijeđe u progresivan tj. SP tijek.

S obzirom na već spomenute specifičnosti PP MS, interesantno je da se u PP bolesnika koji imaju rizični TNF- $\alpha$ -238 A alel bolest javlja 8 godina ranije ( $p=0,078$ ) (slika 19), ali je upitno da li bi se taj trend pokazao i na većem broju od naših 6 bolesnika s tim alelom.

Iako blagi donekle različit utjecaj TNF- $\alpha$ -308 i -238 polimorfizama na tijek bolesti u našem i u drugim istraživanjima moguć je i stoga što TNF- $\alpha$  ima i autokrino djelovanje, a njegov nivo u CSF mijenja se ovisno o akutnom stadiju upale, odnosno o remisijama bolesti (144,195). Tako je razina TNF- $\alpha$  zdravih ispitanika sličan nivou MS bolesnika koji nisu u relapsu bolesti, ali raste 2 – 3 tjedna prije kliničkog relapsa (138). S obzirom i na već spomenutu moguću protektivnu ulogu TNF- $\alpha$  u EAE, odnos između relapsa bolesti i TNF- $\alpha$  ostaje kompleksan i kontroverzan.

Rezultati našeg rada tako upućuju na moguću ulogu promotorske regije TNF- $\alpha$  gena u podložnosti, a možda i u progresiji MS, međutim, značaj te uloge teško je procijeniti

posebice s obzirom na nedavno prepoznatu kompleksnost uloge TNF- $\alpha$  u patogenezi MS (192).

Usporedimo li pak podatke za oba polimorfizma s podacima o tim polimorfizmima u nekoj drugoj kroničnoj upalnoj, ali ne nužno neurološkoj bolesti, možemo uočiti sličan trend distribucije ovih polimorfizama. Tako su npr. Nedoszytko i sur. (196) pronašli statistički značajno manju frekvenciju TNF- $\alpha$ -308 A alela ( $p < 0,05$ ) i veću frekvenciju TNF- $\alpha$ -238 A alela ( $p < 0,01$ ) u bolesnika s psorijazom (tip I), te utjecaj TNF- $\alpha$ -238 A alela na znatno raniju pojavnost ove bolesti u poljskoj populaciji. Konfliktni su rezultati raznih istraživanja o TNF- $\alpha$ -308 polimorfizmu u psorijazi, a podaci o TNF- $\alpha$ -238 polimorfizmu ukazuju na njegovu rizičnu ulogu u populacijama kavkaskog podrijetla (196).

Iz navedenoga možemo zaključiti da ispitivani polimorfizmi mogu imati ulogu u podložnosti za MS zbog autoimune prirode ove bolesti, dok je njihov utjecaj na tijek bolesti kao citokina uključenih u imunološki odgovor teško procijeniti. No, ipak smo odlučili ispitati moguću interakciju TNF- $\alpha$  i HFE gena u razvoju MS. Naime, nekoliko je autora (107,136,197) pratilo utjecaj TNF- $\alpha$  polimorfizama na kliničku ekspresiju hemokromatoze s obzirom da su in vitro animalne studije ukazale da TNF- $\alpha$  modulira intestinalni transport željeza. Različiti efekti nositelja TNF- $\alpha$ -308 A alela u HH bolesnika prijavljeni su u tim istraživanjima, uključujući nižu prevalenciju jetrene ciroze, blaži stupanj jetrenog oštećenja, potom neutralan učinak na cirozu jetre, siderozu ili koncentraciju feritina te, s druge strane, lagano povećanu koncentraciju kolagena u jetri. Noviji rad Krayenbuehla i sur. (197) utvrdio je da ovaj alel modulira akumulaciju željeza u HH bolesnika, ali je utjecaj alela na kliničku manifestaciju bolesti izražen slabije no što bi se očekivalo s obzirom na povećani unos željeza povezan s tim polimorfizmom.

Naši rezultati ostavljaju otvorenom mogućnost da TNF- $\alpha$ -308 polimorfizam u interakciji s HFE C282Y i H63D mutacijama modulira podložnost za MS. Naime, statistički značajna razlika ( $p = 0,028$ ), odnosno granična značajnost ( $p = 0,082$ ) utvrđena je u nosilaca TNF- $\alpha$ -308 A alela između bolesnika s H63D alelom i kontrole, odnosno kontrole s H63D alelom (tablica 41), dok se značajnost gubi u kombinaciji s C282Y mutacijom (tablica 40). S

druge strane TNF- $\alpha$ -238 polimorfizam, koji se već pokazao kao rizični čimbenik u podložnosti za MS (tablica 36), ostaje rizični čimbenik u osoba bez mutacija HFE gena (tablica 40, 41) i povećava rizik u osoba s H63D mutacijom, no razlika u odnosu na kontrolu s H63D mutacijom nije statistički značajna ( $p=0,225$ ) (tablica 41). Zanimljiva kombinacija HFE C282Y i TNF- $\alpha$ -238 A rizičnih alela prisutna je zbog niske frekvencije obaju alela (max. 5,2%) u svega jednog bolesnika, te njihovu interakciju ili modificirajući učinak, nažalost, nismo mogli procijeniti ni s obzirom na podložnost ni tijekom MS (tablica 52).

Na temelju slike 7. koja prikazuje kombinacije alela ispitivanih HFE i TNF- $\alpha$  alela razvidno je da kombinacije rizičnih alela dodatno povećavaju rizik bolesti dok ga one protektivnih smanjuju, bez obzira radi li se o modificirajućem efektu alela ili samo o sumirajućem učinku pojedinih alela. Kombinacije alela koji imaju različit utjecaj nismo prikazali na slici, ali, primjerice, osobe bez H63D mutacije koje imaju TNF- $\alpha$ -238 A alel imaju gotovo 4 puta veći rizik od MS, dok je u osoba s H63D mutacijom rizik veći približno 2 puta. Na modificirajući učinak TNF  $\alpha$ -308 polimorfizma u podložnosti za bolest ukazuje rizik u osoba s H63D mutacijom koji se mijenja s obzirom na prisutnost TNF  $\alpha$ -308 A alela kad OR iznosi 0,70 na OR 1,33 kad tog alela nema.

Što se tiče modifikacijskog djelovanja TNF- $\alpha$  polimorfizama na kliničku sliku bolesnika koji imaju mutacije HFE gena, statistička analiza pokazala je značajnost ( $p<0,05$ ) u progresiji bolesti s obzirom na H63D mutaciju i TNF- $\alpha$ -308 polimorfizam (slika 36). Smatramo da se ipak ne radi o djelovanju TNF- $\alpha$ -308 A alela na penetrabilnost H63D mutacije, već se razlika vjerojatno javila uslijed progresivnog tijeka bolesti kojeg ima 8 od 11 bolesnika s ovom kombinacijom alela. Nadalje, TNF  $\alpha$ -238 modificira dob nastupa bolesti ovisno o H63D mutaciji (slika 37), ali razlika nije statistički značajna ( $p=0,154$ ), dok je statistička značajnost ( $p=0,031$ ) prisutna u kombinaciji ovih polimorfizama na trajanje bolesti (slika 38), gdje TNF- $\alpha$ -238 A alel s obzirom da utječe na raniju dob nastupa bolesti, ujedno i produžuje vrijeme trajanja MS. Naši rezultati ne pokazuju značajnu uključenost kombinacije ovih polimorfizama u kliničku sliku bolesti kada uzmemo u obzir tijekom same bolesti.

Pratimo li interakciju TNF- $\alpha$  polimorfizama s H63D i C282Y mutacijama na različite kliničke parametre, uočiti ćemo da međudjelovanje ovih gena uistinu značajno ne utječe na tijek bolesti. Tako TNF- $\alpha$ -308 A alel lagano odgađa javljanje MS u bolesnika s C282Y alelom, ali razlika nije statistički značajna ( $p>0,05$ ) (slika 29), te ne utječe na trajanje bolesti ni na stupanj invalidnosti (slike 30, 31). U bolesnika s H63D mutacijom TNF- $\alpha$ -308 A alel također odgađa nastup bolesti, međutim smanjuje njeno trajanje i povećava EDSS, ali bez statistički značajnih razlika ( $p>0,05$ ) (slike 33, 34, 35).

Naši rezultati odgovaraju rezultatima istraživanjima o utjecaju TNF- $\alpha$  polimorfizama na kliničku sliku bolesnika s poremećajima u metabolizmu željeza (istraživanja u HH) (197) ili pak o uključenosti željeza i TNF- $\alpha$  u druge autoimune bolesti (reumatoidni artritis, sistemski eritemski lupus) (198), koja nisu pronašla jasnu korelaciju promatranih parametara, različitih naravno s obzirom na konkretni poremećaj. Povrh toga, sam mehanizam potencijalnog djelovanja TNF- $\alpha$  na akumulaciju željeza, ali i u tom slučaju dokazana manja toksičnost u nosilaca TNF- $\alpha$ -308 A alela, ostaje još uvijek nepoznat (199).

Izgleda da je aktivnost TNF- $\alpha$  regulirana složenim multifaktorijalnim procesima, pa stoga ne čudi što klinička manifestacija utjecaja TNF- $\alpha$ -308 A i -238 A alela u kombinaciji s H63D i C282Y mutacijama ne slijedi fiksirani obrazac ni u našem istraživanju.

Ipak, budući da je regeneracija mijelina nužna za remisiju bolesti, opet ćemo napomenuti da je željezo pak prijeko potrebno za sintezu mijelina. Deficijencija željeza tijekom ranog postnatalnog razvoja rezultira smanjenom količinom mijelina u leđnoj moždini i bijeloj tvari mladunčadi eksperimentalnih životinja. Limitirana količina željeza dostupnog oligodendrocitima rezultira ne samo u smanjenoj mijelinizaciji, već je promijenjena i kompaktnost, odnosno struktura mijelina. Optimalna razina željeza u organizmu stoga je nužna za održavanje fiziološkog neurološkog statusa već od rane dobi budući da njegov manjak narušava mijelinizaciju, a višak pak složenim mehanizmima vodi do demijelinizacije (200,201). Međutim, dostupnost željeza tijekom razvoja i odrastanja praktički je nemoguće retrogradno pratiti.



Ipak, cjelovita procjena parametara željeza kao što su feritin i saturacija transferina, koji se prate u bolesnika s hemokromatozom, obogatila bi naše istraživanje, premda nije nužno da vrijednosti mjerene u serumu odgovaraju količini željeza deponiranog u CNS-u. Od velike bi vrijednosti bilo napraviti radiološka mjerenja, tj. utvrditi pomoću slika MR T2-hipointenzitet u MS bolesnika za kojeg se vjeruje da pokazuje depozite željeza u mozgu. Nažalost, takve parametre do sada i za najveći broj naših ispitanika nismo mogli pribaviti.

Unatoč spomenutim nedostacima rezultati istraživanja navode nas na zaključak da HFE C282Y mutacija i TNF- $\alpha$ -238A polimorfizam predstavljaju čimbenike rizika u razvoju MS u hrvatskih i slovenskih bolesnika, što bi valjalo testirati i u drugim populacijama kavkaskog porijekla. S druge strane, podaci o HFE H63D mutaciji i TNF- $\alpha$ -308 A polimorfizmu navode na traženje činjenica koje govore za ili protiv uloge ovih genskih varijanti u razvoju bolesti. Što se tiče kliničkih parametara u ovisnosti o svakom pojedinom polimorfizmu, uočen je statistički znatno raniji početak bolesti u nosilaca C282Y mutacije, dok bi pojedine opažene trendove valjalo testirati s obzirom na tijek bolesti na većem broju bolesnika s PP MS zbog specifičnosti te podskupine bolesnika. Iako pojedine kombinacije polimorfizama HFE i TNF- $\alpha$  gena pokazuju određen trend u riziku za predispoziciju ili progresiju bolesti, teško je razlikovati je li to zbog djelovanja TNF- $\alpha$  gena kao modulatora ekspresije HFE gena ili pak sam TNF- $\alpha$  gen ima utjecaj isključivo kao proinflamatorni citokin, nevezano usko uz metabolizam željeza.

Čini se da rezultati dobiveni za TF C1/C2 polimorfizam ne ukazuju na daljnu potrebu ispitivanja utjecaja ove genske varijante ni na predispoziciju ni na kliničku sliku MS, osim eventualno u homozigota C2/C2 s PP tijekom bolesti. Međutim, provedeno istraživanje otvara mogućnost postojanja i drugih gena uključenih u regulaciju ili interakciju s HFE genom koji mogu modulirati apsorpciju željeza i stupanj njegova skladištenja u tkivima poput već spomenutog gena za transferinski receptor, ili APO E gena koji povećava rizik za AD u bolesnika s mutacijama HFE i TF gena, koji onda zajedno s okolišnim čimbenicima formiraju kliničku sliku MS.

Gen za feritin jedan je od gena koji bi se možda trebalo analizirati. Naime sinteza feritina regulirana je citokinima, uključujući i TNF- $\alpha$ , na različitom nivou (transkripcijskom, post-transkripcijskom i translacijskom) tijekom razvoja, stanične diferencijacije, proliferacije i upale. Feritin i homeostaza željeza implicirani su u patogenezi mnogih poremećaja uključujući bolesti koje se tiču akvizicije, transporta i skladištenja željeza (primarna hemokromatoza), ali i u Parkinsonovoj, Alzheimerovoj i dr. bolestima. Hiperferitinemija povezana je s upalom, a u sistemskom eritemskom lupusu korelira s aktivnošću bolesti. Novije činjenice upućuju na značenje hiperferitinemije u multiploj sklerozi, ali je potrebno daljnje ispitivanje mehanizama (202).

S obzirom da je etiologija MS kompleksna i multifaktorijalna, što uključuje genetičke i okolišne čimbenike, a nije isključena ni virusna komponenta, kombinacija različitih čimbenika može biti uzrokom bolesti u različitim bolesnika. Nadalje, moguće je i da se interakcija tih čimbenika razlikuje između etničkih skupina.

Mnoštvo nepoznanica u etiologiji i patogenezi MS još uvijek ne daje mogućnost uspješnog terapijskog liječenja. Farmakogenetička istraživanja ukazuju da je različit odgovor na neki lijek zapravo posljedica varijabilnosti genskih polimorfizama bolesnika. Procjena doprinosa viška željeza patogenezi i težini kliničke slike MS ukazala bi na potrebu odstranjivanja tog viška, čime se već bave pojedina istraživanja, što bi onda imalo implikaciju u terapiji bolesti. Tada bi rani genski probir analizom polimorfizama uključenih u metabolizam željeza u osoba s povećanim rizikom (obiteljski tip) za MS ili u osoba s pravovremeno prepoznatim simptomima bolesti eventualno usmjerio terapiju u smjeru tretmana odgovarajućim kelirajućim agensima.

Premda naše istraživanje nije usmjereno k terapiji MS, ova je studija u skladu s istraživanjima koja se provode posljednjih godina o ulozi željeza, ali i genskih polimorfizama u progresiji MS, te daje doprinos u istraživanju predispozicije za bolest.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata istraživanja uloge polimorfizama HFE, TF i TNF- $\alpha$  gena u podložnosti i kliničkoj ekspresiji MS došli smo do sljedećih zaključaka:

1. Učestalost nositelja HFE C282Y mutacije statistički je značajno veća u MS bolesnika (7,6%) sa SP+RR tijekom bolesti u odnosu na kontrolu (3,8%) ( $p=0,026$ ; OR=2,09; 95% CI=1,07-4,08), a statistička značajnost prisutna je i između MS bolesnika i kontrole izvan žarišnog područja ( $p=0,019$ ; OR=2,33; 95% CI=1,13-4,84), što ukazuje na moguć utjecaj ove mutacije kao rizičnog čimbenika u podložnosti za bolest.
2. Dob nastupa bolesti u nositelja HFE C282Y mutacije ( $25,4\pm 10,8$ ) statistički je značajno niža ( $p=0,035$ ) u odnosu na bolesnike bez te mutacije ( $29,9\pm 8,6$ ), što ukazuje da je C282Y mutacija dobar prediktor ranijeg početka MS.
3. Frekvencija HFE H63D mutacije veća je u kontroli (15,6%) negoli u MS bolesnika (13,3%), a razlika pokazuje graničnu vrijednost statističke značajnosti tek usporedbom učestalosti H63D homozigota ( $p=0,050$ ; OR=0,29; 95%CI=0,08-1,08), što govori u prilog eventualnog protektivnog učinka H63D mutacije u homozigotnom obliku na podložnost za MS.
4. Mutacija HFE H63D s obzirom na svoj blagi učinak u taloženju željeza ne korelira značajno ( $p>0,05$ ) s težinom kliničke slike u MS.
5. Izgleda da TF C1/C2 polimorfizam ne utječe na predispoziciju ni na kliničku ekspresiju MS s obzirom da nije utvrđena razlika ( $p>0,05$ ) u frekvenciji TF C1/C2 genotipova i alela između MS bolesnika i kontrole, kao ni razlika u ispitivanim kliničkim parametrima s obzirom na status nositelja TF C2.
6. Interakcija polimorfizama HFE i TF gena ne doprinosi podložnosti za MS jer usporedbom između MS bolesnika i kontrolnih ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p>0,05$ ) u frekvenciji genotipova i alela, niti je utvrđen učinak zajedničkog djelovanja ovih gena na ekspresiju bolesti.

7. Broj nositelja TNF- $\alpha$ -308 A alela na području Gorskog kotara i Kočevja statistički je značajno veći u kontrolnih ispitanika (32,6%) negoli u MS bolesnika (16,5%) ( $p=0,016$ ; OR=0,41; 95%CI=0,19-0,86), što ukazuje na moguću protektivnu ulogu ovog polimorfizma u podložnosti za MS u žarištu.
8. Polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 ne korelira statistički značajno ( $p>0,05$ ) s dobi nastupa, trajanjem bolesti, EDSS ni PI, te iako su opaženi blagi trendovi u kliničkoj ekspresiji, ovaj polimorfizam bitno ne pridonosi fenotipskoj heterogenosti MS bolesnika.
9. TNF- $\alpha$ -238 A alel pokazao se kao potencijalno važan rizični čimbenik u podložnosti za MS s obzirom na njegovu visoku učestalost u MS bolesnika (10%) u usporedbi s kontrolnom skupinom (3,8%) ( $p=0,0008$ ; OR=2,83; 95%CI=1,50-5,32).
10. TNF- $\alpha$ -238 polimorfizam ne utječe na kliničku ekspresiju bolesti s obzirom da nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p>0,05$ ) u dobi nastupa, trajanju bolesti, EDSS i PI između bolesnika s TNF- $\alpha$ -238 A alelom odnosno bez tog alela.
11. Moguće je da TNF- $\alpha$ -308 i -238 polimorfizmi moduliraju podložnost za MS u osoba s HFE C282Y ili H63D mutacijom. Naime kombinacije protektivnih alela smanjuju rizik za MS, a kombinacije rizičnih alela povećavaju taj rizik, pri čemu je statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) između MS bolesnika i kontrole utvrđena za sljedeće kombinacije alela: C282Y-/TNF- $\alpha$ -308AG+AA, C282Y-/TNF- $\alpha$ -238GG, H63D-/TNF- $\alpha$ -238AG+AA.
12. TNF- $\alpha$ -308 i -238 polimorfizmi ne pokazuju značajnu interakciju s mutacijama HFE gena na većinu promatranih kliničkih parametara ( $p>0,05$ ). Statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) međudjelovanja HFE H63D i TNF- $\alpha$ -238, odnosno -308 polimorfizama na trajanje bolesti, odnosno PI može biti posljedica manjeg broja ispitanika s pojedinim kombinacijama alela kao i progresivnog tijeka bolesti u tih bolesnika.

## 7. LITERATURA

1. Sepčić J. Multipla skleroza. U: Barac i sur., Neurologija. Zagreb: Školska knjiga, 1989; str. 336-42.
2. Compston A, Confavreux C. The distribution of multiple sclerosis. U: Compston A, ur. Multiple sclerosis. Elsevier, 2006;str. 71-105.
3. Ebers GC, Koopman WJ, Hader W i sur. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study: 8: familial multiple sclerosis. Brain 2000;123:641-9.
4. Karpuj MV, Steinman L, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: a polygenic disease involving epistatic interactions, germline rearrangements and environmental effects. Neurogenetics 1997;1:21-8.
5. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. Lancet Neurol 2004;3:104-10.
6. LeVine SM. Iron deposits in multiple sclerosis and Alzheimer's disease brains. Brain Res 1997;760:298-303.
7. Forge JK, Pedchenko T, LeVine SM. Iron deposits in the central nervous system of SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. Life Sci 1998;63:2271-84.
8. Bakshi R, Benedict RH, Bermel RA i sur. T2 hypointensity in the deep gray matter of patients with multiple sclerosis: a quantitative magnetic resonance imaging study. Arch Neurol 2002;59:62-8.
9. Abo-Krysha N, Rashed L. The role of iron dysregulation in the pathogenesis of multiple sclerosis: an Egyptian study. Mult Scler 2008 Apr 11. [Epub ahead of print].
10. Poeck K. Neurologija. Zagreb: Školska knjiga, 1994.
11. Filippi M. Multiple sclerosis: a white matter disease with associated gray matter damage. J Neurol Sci 2001;185:3-4.
12. Pirko I, Luchinetti CF, Sriram S, Bakshi R. Gray matter involvement in multiple sclerosis. Neurology 2007;68:634-42.
13. Giovannoni G, Ebers G. Multiple sclerosis: the environment and causation. Curr Opin Neurol. 2007;20:261-8.

14. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007;8:913-9.
15. Lasmann H, Smith K, Wekerle H, Compston A. The pathogenesis of multiple sclerosis. U: Compston A, ur. *Multiple sclerosis*. Elsevier, 2006;str. 661-9.
16. Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2004;113:788-94.
17. Neurologija. Multipla skleroza. <http://www.medicina.hr/studenti/download/neurologija.pdf>
18. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L i sur. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227-31.
19. McDonald WI, Compston A, Edan G i sur. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-7.
20. Kurtzke, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444-52.
21. Multiple sclerosis. Wikipedia. [http://en.wikipedia.org/wiki/Multiple\\_sclerosis](http://en.wikipedia.org/wiki/Multiple_sclerosis)
22. Kantarci O, Wingerchuk D. Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol* 2006;19:248-54.
23. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* 2001;22:117-39.
24. Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104:182-91.
25. Sadovnick AD, Ebers G. Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. *Can J Neurol Sci* 1993;20:17-29.
26. Kurtzke JF. Multiple sclerosis in time and space - geographic clues to cause. *Journal of Neurovirology* 2000;6 (Suppl 2):134-140.
27. Sepčić J, Antonelli L, Materljan E, Šepić-Grahovac D. Multiple sclerosis cluster in Gorski kotar, Croatia. U: Battaglia MA, ur. *Multiple Sclerosis Research*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B V, 1989; str. 165-9.

28. Peterlin B, Ristić S, Sepčić J i sur. Region with persistent high frequency of multiple sclerosis in Croatia and Slovenia. *J Neurol Sci* 2006; 247:169-72.
29. Materljan E, Sepčić J. Epidemiology of multiple sclerosis in Croatia. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104:192-8.
30. Tienari P, Bonetti A, Pihlaja H, Saastamoinen KP, Rantamäki T. Multiple sclerosis in G: genes and geography. *Clin Neurol Neurosurg* 2006;108:223-6.
31. Kahana E. Epidemiologic studies of multiple sclerosis: a review. *Biomed Pharmacother* 2000;54:100-2.
32. Poser CM. The dissemination of multiple sclerosis: a Viking saga? A historical essay. *Ann Neurol* 1994;36 (Suppl 2):231-43.
33. Elian M, Nightingale S, Dean G. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990;53:906-11.
34. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008;7:268-77.
35. Marrie RA. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* 2004;3:709-18.
36. Hammond SR, English DR, McLeod JG. The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain*. 2000;123:968-74.
37. Jin Y, de Pedro-Cuesta J, Söderström M, Stawiarz L, Link H. Seasonal patterns in optic neuritis and multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Sci* 2000;181:56-64.
38. Embry AF, Snowdon L, Vieth R. Vitamin D and seasonal fluctuations of gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000;48:271-2.
39. Gronning M, Riise T, Kvale G isur. Infections in childhood and adolescence in multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 1993;12:61-9.
40. Cook SD, Rohowsky-Kochan C, Bansil S, Dowling PC. Evidence for multiple sclerosis as infectious disease. *Acta Neurol Scand* 1995;161:34-42.

41. Goodin DS, Ebers GC, Johnson KP, Rodriguez M, Sibley WA, Wolinsky JS. The relationship of MS to physical trauma and psychological stress: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 1999;52:1737-45.
42. Compston A, Confavreux C. The environmental factor in multiple sclerosis. U: Compston A, ur. *Multiple sclerosis*. Elsevier, 2006;str. 105-13.
43. Nelson NA, Robins TG, White RF, Garrison RP. A case-control study of chronic neuropsychiatric disease and organic solvent exposure in automobile assembly plant workers. *Occup Environ Med* 1994;51:302-7.
44. Poser CM. The pathogenesis of multiple sclerosis: a critical reappraisal. *Acta Neuropathol* 1986;71:1-10.
45. Kenealy SJ, Pericak-Vance MA, Haines JL. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003;143:7-12.
46. Kinnunen E, Juntunen J, Ketonen L i sur. Genetic susceptibility to multiple sclerosis: a co-twin study of a nation wide series. *Arch Neurol* 1988;45:1108-11.
47. Robertson NP, O'Riordan JI, Chataway J I sur. Offspring recurrence rates and clinical characteristics of conjugal multiple sclerosis. *Lancet* 1997;349:1587-90.
48. Ebers GC, Yee IML, Sadovnick AD, Duquette P. Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. *Ann Neurol* 2000;48:927-31.
49. Sadovnick DA, Yee IML, Ebers GC. Recurrence risks to sibs of MS index cases: impact of consanguineous matings. *Neurology* 2001;56:784-5.
50. Comabella M, Martin R. Genomics in multiple sclerosis--current state and future directions. *J Neuroimmunol* 2007;187:1-8.
51. Oksenberg JR, Baranzini SE, Barcellos LF, Hauser SL. Multiple sclerosis: Genomic rewards. *J Neuroimmunol* 2001;113:171-84.
52. Compston A, Wekerle H. The genetics of multiple sclerosis. U: Compston A, ur. *Multiple sclerosis*. Elsevier, 2006;str.113-82.



53. Niino M, Fukazawa T, Kikuchi S, Sasaki H. Recent advances in genetic analysis of multiple sclerosis: genetic associations and therapeutic implications. *Expert Rev Neurother* 2007;7:1175-88.
54. Rubio JP, Speed T, Bahlo M, Kilpatrick TJ, Foote SJ. The current state of multiple sclerosis genetic research. *Ann Acad Med Singapore* 2000;29:322-30.
55. Crnić-Martinović M, Grahovac B, Jeras BV, Ristić S, Sepčić J, Brajenović-Milić B, Peterlin B, Kapović M. HLA class II polymorphism in autochthonous population of Gorski kotar, Croatia. *Coll Antropol* 2007;31:853-8.
56. Roxburgh RH, Sawcer S, Maranian M i sur. No evidence of a significant role for CTLA-4 in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006;171:193-7.
57. Lorentzen AR, Celius E, Ekstrøm PO i sur. Lack of association with the CD28/CTLA4/ICOS gene region among Norwegian multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2005;166:197-201.
58. Dincić E, Živković M, Stanković A i sur. Association of polymorphisms in CTLA-4, IL-1ra and IL-1beta genes with multiple sclerosis in Serbian population. *J Neuroimmunol* 2006;177:146-50.
59. Kantarci OH, Hebrink D, Achenbach SJ i sur. CTLA4 is associated with susceptibility to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003;134:133-41.
60. Wood NW, Sawcer S, Kellar-Wood HF i sur. Susceptibility to multiple sclerosis and the immunoglobulin heavy chain variable region. *J Neurol* 1995;242:677-82.
61. Myhr KM, Raknes G, Nyland H, Vedeler C. Immunoglobulin G Fc-receptor (FcγR) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS. *Neurology* 1999;52:1771-6.
62. Breij EC, van der Pol W, van Winsen L i sur. No association of Fc γR IIA, Fc γR IIIa and Fc γR IIIb polymorphisms with MS. *J Neuroimmunol* 2003;140:210-5.
63. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study, *N Engl J Med* 2007;357:851–62.

64. Ramagopalan S.V, Ebers GC. Genes for multiple sclerosis. *Lancet* 2008;371:283-4.
65. Mycko MP, Kwinkowski M, Tronczynska E, Szymanska B, Selmaj KW. Multiple sclerosis: the increased frequency of the ICAM-1 exon 6 gene point mutation genetic type K469. *Ann Neurol* 1998;44:70-5.
66. Gade-Andavolu R, Comings DE, MacMurray J i sur. RANTES: a genetic risk marker for multiple sclerosis. *Mult Scler* 2004;10:536-9.
67. Barcellos LF, Schito AM, Rimmler JB i sur. CC-chemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple sclerosis. *Immunogenetics* 2000 ;51:281-8.
68. Ristić S, Lovrečić L, Starčević Čizmarević N i sur. No association of CCR5 gene mutation with multiple sclerosis in Croatian and Slovenian patients. *Mult Scler* 2006;12:360-2.
69. Luomala M, Elovaara I, Ukkonen M, Koivula T, Lehtimäki T. Plasminogen activator inhibitor 1 gene and risk of MS in women. *Neurology* 2000;54:1862-4.
70. Lovrečić L, Ristić S, Starčević-Čizmarević N i sur. PAI and TPA gene polymorphisms in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008;14:243-7.
71. Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. Estrogen receptor gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2000;179:70-5.
72. Mann CL, Davies MB, Boggild MD i sur. Glutathione S-transferase polymorphisms in MS: their relationship to disability. *Neurology* 2000;54:552-7.
73. Stavropoulou C, Korakaki D, Rigana H i sur. Glutathione-S-transferase T1 and M1 gene polymorphisms in Greek patients with multiple sclerosis: a pilot study. *Eur J Neurol* 2007;14:572-4.
74. Barcellos LF, Begovich AB, Reynolds RL i sur. Linkage and association with the NOS2A locus on chromosome 17q11 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2004;55:793-800.
75. Lovrečić L, Ristić S, Starčević Čizmarević N i sur. Angiotensin-converting enzyme I/D gene polymorphism and risk of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2006;114:374-7.

76. Wood DD, Bilbao JM, O'Connors P, Moscarello MA. Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. *Ann Neurol* 1996;40:18-24.
77. Evangelou N, Jackson M, Beeson D, Palace J. Association of the APOE epsilon4 allele with disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;67:203-5.
78. Burwick RM, Ramsay PP, Haines JL i sur. APOE epsilon variation in multiple sclerosis susceptibility and disease severity: some answers. *Neurology* 2006;66:1373-83.
79. Reich D, Patterson N, De Jager PL i sur. A whole-genome admixture scan finds a candidate locus for multiple sclerosis susceptibility. *Nat Genet* 2005;37:1113-8.
80. Pirko I, Luchinetti C, Sriram S, Bakshi R. Gray matter involvement in multiple sclerosis. *Neurology* 2007;68:634-42.
81. Bakshi R, Dmochowski J, Shaikh ZA, Jacobs L. Gray matter T2 hypointensity is related to plaques and atrophy in the brains of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 2001;185:19-26.
82. Roy CN, Enns CA. Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood* 2000;96:4020-27.
83. LeVine SM, Chakrabarty A. The role of iron in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1012:252-66.
84. Aracena P, Aguire P, Muñoz P, Núñez MT. Iron and glutathione at the crossroad of redox metabolism in neurons. *Biol Res* 2006;39:157-65.
85. Connor JR, Menzies SL, Burdo JR, Boyer PJ. Iron and iron management proteins in neurobiology. *Pediatr Neurol* 2001;25:118-29.
86. Ong ST, H JZ, Ho B, Ding JL. Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology* 2006;211:295-314.

87. Kotze MJ, de Villiers JN, Rooney RN i sur. Analysis of the NRAMP1 gene implicated in iron transport: association with multiple sclerosis and age effects. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:44-53.
88. Rubio JP, Bahlo M Tubridy N i sur. Extended haplotype analysis in the HLA complex reveals an increased frequency of the HFE-C282Y mutation in individuals with multiple sclerosis. *Hum Genet* 2004;114:573-80.
89. Bartzokis G, Cummings J, Perlman S, Hance DB, Mintz J. Increased basal ganglia iron levels in Huntington disease. *Arch Neurol* 1999;56:569-74.
90. Ke Y, Qian ZM. Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* 2003;2:246-53.
91. Dekker MCJ, Giesbergen PC, Njajou OT i sur. Mutations in the hemochromatosis gene (HFE), Parkinson's disease and parkinsonism. *Neurosci Lett* 2003;348:117-9.
92. Bakshi R, Benedict RHB, Bermel RA i sur. T2 hypointensity in the deep gray matter of patients with multiple sclerosis: a quantitative magnetic resonance imaging study. *Arch Neurol* 2002;59:62–8.
93. Zhang Y, Zabad RK, Wei X, Metz LM, Hill MD, Mitchell JR. Deep grey matter "black T2" on 3 tesla magnetic resonance imaging correlates with disability in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007;13:880-3.
94. Sfagos C, Makis AC, Chaidos A i sur. Serum ferritin, transferrin and soluble transferrin receptor levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2005;11:272-5.
95. Andrews NC. A genetic view of iron homeostasis. *Semin Hematol* 2002;30:227-34.
96. Donovan A, Roy CN, Andrews NC. The ins and outs of iron homeostasis. *Physiology* 2006;21:115-23.
97. Beutler E, Felitti V, Gelbart T, Ho NJ. Genetics of iron storage and hemochromatosis. *Drug Metab Dispos* 2001;29: 495-9.
98. Philpott CC. Molecular aspects of iron absorption: insights into the role of HFE in hemochromatosis. *Hepatology* 2002;35: 993-1001.

99. Parkkila S, Niemela O, Britton RS i sur. Molecular aspects of iron absorption and HFE expression. *Gastroenterology* 2001;121:1489-96.
100. Guyton AC, Hall JE. Eritrociti, anemija i policitemija. U: Taradi SK, Andreis I, ur: *Medicinska fiziologija*. 9. izdanje, Zagreb: Medicinska naklada, 1999;str. 375-81.
101. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE Review. *Am J Epidemiol* 2001;154: 193-206.
102. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, i sur. A novel MHC class I-like is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996;13:399-408.
103. Roy CN, Andrews NC. Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. *Hum Mol Genet* 2001;10: 2181-6.
104. Roetto A, Totaro A, Cazzola M i sur. Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 1999;64:1388-93.
105. Montosi G, Donovan A, Totaro A i sur. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 2001;108:4:619-23.
106. Roetto A, Totaro A, Piperno A i sur. New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood* 2001;97:2555-60.
107. Bridle KR, Crawford D, Fletcher LM, Smith JL, Powell LW, Ramm GA. Evidence for a sub-morphological inflammatory process in the liver in haemochromatosis. *J Hepatol* 2003;38:426-33.
108. Maureen AS, Cameron C, Trenor I, Fleming JC, Fleming MD, Andrews NC. The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood* 1998;92: 2157-63.
109. Levy JE, Montross LK, Andrews NC. Genes that modify the hemochromatosis phenotype in mice. *J Clin Invest* 2000;105:1209-16.
110. Powell LW, Isselbacher KJ Hemokromatoza. U: Harrison, ur: *Principi interne medicine*. Prvo hrvatsko izdanje, Split: Placebo, 1997; str. 1814-16.
111. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:702-9.

112. Spriggs EL, Harris PE, Best LG. Hemochromatosis mutations C282Y and H63D in «cis» phase. *Am J Hum Genet* 1999;65:A492.
113. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Jouanolle AM, Rochette J, Robson KJH. Geography of the HFE C282Y and H63D mutations. *Genet Test* 2000;4:183-98.
114. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G→A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002;359:211-8.
115. Cassanelli S, Pignatti E, Montosi G i sur. Frequency and biochemical expression of C282Y/H63D hemochromatosis (HFE) gene mutations in the healthy adult population in Italy. *J Hepatol* 2001;34:523-8.
116. Feder JN, Penny DM, Irrinki A. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1472-7.
117. Gross CN, Irrinki A., Feder JN, Enns CA. Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation. *J Biol Chem* 1998;273:22068-74.
118. Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A i sur. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts  $\beta_2$ -microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 1997;272:14025-8.
119. Connor JR, Milward EA, Moalem S i sur. Is hemochromatosis a risk factor for Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 2001;3:471-7.
120. Connor JR, LEE SY. HFE mutations and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006;10:267-6.
121. Comabella M, Alet L, Peris F, Villoslada P, Sánchez A, Montalban X. Genetic analysis of SLC11A1 polymorphisms in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2004;10:618-20.
122. Ristić S, Lovrečić L, Brajenović-Milić B i sur. Mutations in the hemochromatosis gene (HFE) and multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2005;383:301-4.

123. Hussain RI, Ballard CG, Edwardson JA, Morris CM. Transferrin gene polymorphism in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies in humans. *Neurosci Lett* 2002;317:13-6.
124. Sergeant C, Vesvres MH, Deves G, Baron B, Guillou F. Iron, transferrin and myelinogenesis. *Nucl Instr Meth Phys Res* 2003;210:349-53.
125. Transferrin; TF. National Center for Biotechnology Information.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=190000>
126. Namekata K, Oyama F, Imagawa M, Ihara Y. Human transferrin (Tf): a single mutation at codon 570 determines Tf C1 or Tf C2 variant. *Hum Genet* 1997;100:457-8.
127. Berez V, Camps J, Arija V. Soluble transferrin receptor and mutations in hemochromatosis and transferrin genes in a general Catalan population. *Clin Chim Acta* 2005;353:205-8.
128. Robson KJ, Lehman DJ, Wilmhurst VL i sur. Synergy between the C2 allele of transferrin and the C282Y allele of the haemochromatosis gene (HFE) as risk factors for developing Alzheimer's disease. *J Med Genet* 2004;41:261-5.
129. Nanami M, Ookawara T, Otaki Y i sur. Tumor necrosis factor-alpha-induced iron sequestration and oxidative stress in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2495-501.
130. Tumor necrosis factor-alpha. Wikipedia. <http://en.wikipedia.org/wiki/TNF-%CE%B1>
131. Čulić S. Citokini i autoimune bolesti. *Pediatr Croat* 2005;49(Supl 1):148-61.
132. Tumor necrosis factor-alpha.  
[http://www.bio.davidson.edu/COURSES/Immunology/Students/spring2000/wolf/tnf  
alpha.html](http://www.bio.davidson.edu/COURSES/Immunology/Students/spring2000/wolf/tnf%20alpha.html)
133. Atassi MZ, Casali P. Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity* 2008;41:123-32.
134. Tumor necrosis factor-alpha, TNF- $\alpha$ . National Center for Biotechnology Information.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=191160>

135. Fargion S, Valenti L, Dongiovanni P i sur. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms influence the phenotypic expression of hereditary hemochromatosis. *Blood* 2001;97:3707-12.
136. Distante S, ElMBERG M, Foss Haug Kbi sur. Tumour necrosis factor alpha and its promoter polymorphisms' role in the phenotypic expression of hemochromatosis. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38:871-7.
137. Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol Ther* 2005;106:163-77.
138. Lalive PH, Burkhard PR, Chofflon M. TNF-alpha and psychologically stressful events in healthy subjects: potential relevance for multiple sclerosis relapse. *Behav Neurosci* 2002;116:1093-7.
139. Drulović J, Popadić D, Mesaroš S i sur. Decreased frequency of the tumor necrosis factor alpha -308 allele in Serbian patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2003;50:25-9.
140. Wirz SA, Morale MC, Marchetti B. High frequency of TNF alleles -238A and -376A in individuals from northern Sardinia. *Cytokine* 2004;26:149-54.
141. Amirzargar A, Khosravi F, Dianat S i sur. Profile of cytokine gene polymorphisms in Iranian multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2007;13:253-5.
142. Lucotte G, Bathelier C, Mercier G. TNF-alpha polymorphisms in multiple sclerosis: no association with -238 and -308 promoter alleles, but the microsatellite allele a11 is associated with the disease in French patients. *Mult Scler* 2000;6:78-80.
143. Fernandez-Arquero M, Arroyo R, Rubio A i sur. Primary association of a TNF gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis. *Neurology* 1999;53:1361-3.
144. Huizinga TW, Westendorp R, Bollen EL i sur. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* 1997;72:149-53.



145. Tran TN, Eubanks S, Schaffer KJ, Zhou CY, Linder MC. Secretion of ferritin by rat hepatoma cells and its regulation by inflammatory cytokines and iron. *Blood* 1997;90:4979-86.
146. Nanami M, Ookawara T, Otaki Y i sur. Tumor necrosis factor-alpha-induced iron sequestration and oxidative stress in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2495-501.
147. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum. Mol. Genet.* 1992;1:353-5.
148. Wilson AG, Gordon C, di Giovine FS i sur. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol* 1994;24:191-5.
149. Keegan BM, Noseworthy JH. Multiple sclerosis. *Ann Rev Med* 2002;53:285-302.
150. Ahsan H, Ali A., Ali R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 2003;131:398-404.
151. Brett R, Rumbsy M. Evidence of free radical damage in the central nervous system of guinea-pigs at the prolonged acute and early relapse stages of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Neurochem Int* 1993;23:35-44.
152. Simka M, Rybak Z. Hypothetical molecular mechanisms by which local iron overload facilitates the development of venous leg ulcers and multiple sclerosis lesions. *Med Hypotheses* 2008 Apr 7. [Epub ahead of print].
153. van Rensburg SJ, Kotze MJ, Hon D, Haug P, Kuyler J, Hendricks M, Botha J, Potocnik FC, Matsha T, Erasmus RT. Iron and the folate-vitamin B12-methylation pathway in multiple sclerosis. *Metab Brain Dis* 2006;21:121-37.
154. Grant SM, Wiesinger JA, Beard JL, Cantorna MT. Iron-deficient mice fail to develop autoimmune encephalomyelitis. *J Nutr* 2003;133:2635-8.
155. Valberg LS, Flanagan PR, Kertesz A, Ebers GC. Abnormalities in iron metabolism in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 1989;16:184-6.

156. Simon M, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. *Gut* 1976;17:332-4.
157. Milman N, Pedersen P. Evidence that the Cys282Tyr mutation of the HFE gene originated from a population in Southern Scandinavia and spread with the Vikings. *Clin Genet* 2003;64:36-47.
158. Ristić S, Makuc J, Starčević N i sur. Hemochromatosis gene mutations in the Croatian and Slovenian populations. *Clin Genet* 2003;64:444-6.
159. Beutler E. The HFE Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. *Blood* 2003;101:3347-50.
160. Guerreiro RJ, Bras JM, Santana I i sur. Association of HFE common mutations with Parkinson's disease, Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in a Portuguese cohort. *BMC Neurol* 2006;6:24-32.
161. Pulliam JF, Jennings CD, Kryscio RJ I sur. Association of HFE mutations with neurodegeneration and oxidative stress in Alzheimer's disease and correlation with APOE. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003;119B:48-53.
162. Piperno A, Sampietro M, Pietrangelo A i sur. Heterogeneity of hemochromatosis in Italy. *Gastroenterology* 1998;114:996-1002.
163. Moirand R, Jouanolle AM, Brissot P, Le Gall JY, David V, Deugnier Y. Phenotypic expression of HFE mutations: a French study of 1110 unrelated iron-overloaded patients and relatives. *Gastroenterology* 1999;116:372-377.
164. Lehmann DJ, Worwood M, Ellis R, Wimhurst VL, Merryweather-Clarke AT, Warden DR, Smith AD, Robson KJ. Iron genes, iron load and risk of Alzheimer's disease. *J Med Genet*. 2006;43:52-58.
165. Aamodt AH, Stovner L, Thorstensen K, Lydersen S, White LR, Aasly JO. Prevalence of haemochromatosis gene mutations in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:315-7.

166. Halling J, Petersen MS, Grandjean P, Weihe P, Broesen K. Genetic predisposition to Parkinson's disease: CYP2D6 and HFE in the Faroe Islands. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18:209-12.
167. Blázquez L, De Juan D, Ruiz-Martínez J i sur. Genes related to iron metabolism and susceptibility to Alzheimer's disease in Basque population. *Neurobiol Aging* 2007;28:1941-3.
168. Juan MD, Reta A, Castiella A, Pozueta J, Prada A, Cuadrado E. HFE gene mutations analysis in Basque hereditary haemochromatosis patients and controls. *Eur J Hum Genet* 2001;9:961-4.
169. Drakesmith H, Sweetland E, Schimanski L i sur. The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15602-7.
170. de Juan D, Reta A, Castiella A, Pozueta J, Prada A, Cuadrado E. HFE gene mutations analysis in Basque hereditary haemochromatosis patients and controls. *Eur J Hum Genet* 2001;9:961-4.
171. Macedo MF, Cruz E, Lacerda R, Porto G, de Sousa M. Low serum transferrin levels in HFE C282Y homozygous subjects are associated with low CD8+ T lymphocyte numbers. *Blood Cells Mol Dis* 2005;35:319-25.
172. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007;8:913-9.
173. Johnson AJ, Suidan GL, McDole J, Pirko I. The CD8 T cell in multiple sclerosis: suppressor cell or mediator of neuropathology? *Int Rev Neurobiol* 2007;79:73-97.
174. Moalem S, Percy ME, Andrews DF. i sur. Are hereditary hemochromatosis mutations involved in Alzheimer disease? *Am J Med Genet* 2000;93:58-66.
175. Sampietro M, Caputo L, Casatta A. i sur. The hemochromatosis gene affects the age of onset of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001;22:563-8.
176. Combarros O, Garcia.-Roman M, Fontalba A i sur. Interaction of the H63D mutation in the hemochromatosis gene with the apolipoprotein E epsilon 4 allele modulates age at onset of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003;15:151-4.

177. Berlin D, Chong G, Chertkow H, Bergman H, Phillips NA, Schipper HM. Evaluation of HFE (hemochromatosis) mutations as genetic modifiers in sporadic AD and MCI. *Neurobiol Aging* 2004;25:465-74.
178. van Rensburg SJ, van Zyl J, Hon D i sur. Biochemical model for inflammation of the brain: the effect of iron and transferrin on monocytes and lipid peroxidation. *Metab Brain Dis* 2004;19:97-112.
179. Zeman D, Adam P, Kalistová H i sur. Transferrin in patients with multiple sclerosis: a comparison among various subgroups of multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2000;101:89-94.
180. Hulet SW, Powers S, Connor JR. Distribution of transferrin and ferritin binding in normal and multiple sclerotic human brains. *J Neurol Sci* 1999;165:48-55.
181. LeVine SM, Lynch S, Ou CN, Wulser MJ, Tam E, Boo N. Ferritin, transferrin and iron concentrations in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Brain Res* 1999;821:511-5.
182. Zambenedetti P, De Bellis G, Biunno I, Musicco M, Zatta P. Transferrin C2 variant does confer a risk for Alzheimer's disease in caucasians. *J Alzheimers Dis* 2003;5:423-7.
183. He B, Navikas V, Lundahl J, Söderström M, Hillert J. Tumor necrosis factor alpha-308 alleles in multiple sclerosis and optic neuritis. *J Neuroimmunol* 1995;63:143-7.
184. Wingerchuk D, Liu Q, Sobell J, Sommer S, Weinshenker BG. A population-based case-control study of the tumor necrosis factor alpha-308 polymorphism in multiple sclerosis. *Neurology* 1997;49:626-8.
185. Mycko M, Kowalski W, Kwinkowski M i sur. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. *J Neuroimmunol* 1998;84:198-206.
186. Mihailova S, Ivanova M, Mihaylova A, Quin L, Mikova O, Naumova E. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphism profiles in Bulgarian multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2005;168:138-43.

187. de Jong BA, Huizinga TW, Zanelli E i sur. Evidence for additional genetic risk indicators of relapse-onset MS within the HLA region. *Neurology* 2002;59:549-55.
188. Lucotte G, Bathelier C, Mercier G. TNF-alpha polymorphisms in multiple sclerosis: no association with -238 and -308 promoter alleles, but the microsatellite allele a11 is associated with the disease in French patients. *Mult Scler* 2000;6:78-80.
189. Mäurer M, Kruse N, Giess R, Kyriallis K, Toyka KV, Rieckmann P. Gene polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor alpha promoter is not associated with disease progression in multiple sclerosis patients. *J Neurol* 1999;246:949-54.
190. Ristić S, Lovrečić L, Starčević-Čizmarević N i sur. Tumor necrosis factor-alpha-308 gene polymorphism in Croatian and Slovenian multiple sclerosis patients. *Eur Neurol* 2007;57:203-7.
191. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3195-9.
192. Liu J, Marino MW, Wong G i sur. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Med* 1998;4:78-83.
193. Saha RN, Liu X, Pahan K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006;1:212-22.
194. Duvefelt K, Anderson M, Fogdell-Hahn A, Hillert J. A NOTCH4 association with multiple sclerosis is secondary to HLA-DR\*1501. *Tissue Antigens* 2004;63:13-20.
195. Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1991;325:467-72.
196. Nedoszytko B, Szczerkowska-Dobosz A, Zabłotna M, Gleń J, Rebała K, Roszkiewicz J. Associations of promoter region polymorphisms in the tumour necrosis factor-alpha gene and early-onset psoriasis vulgaris in a northern Polish population. *Br J Dermatol* 2007;157:165-7.

197. Krayenbuehl PA, Maly FE, Hersberger M i sur. Tumor necrosis factor-alpha -308G>A allelic variant modulates iron accumulation in patients with hereditary hemochromatosis. Clin Chem 2006;52:1552-8.
198. Koca SS, Isik A, Ustundag B, Metin K, Aksoy K. Serum Pro-hepcidin Levels in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. Inflammation 2008;31:146-53.
199. Constante M, Wang D, Raymond VA, Bilodeau M, Santos MM. Repression of repulsive guidance molecule C during inflammation is independent of Hfe and involves tumor necrosis factor-alpha. Am J Pathol 2007;170:497-504.
200. Yager JY, Hartfield D. Neurologic manifestations of iron deficiency in childhood. Pediatr Neurol 2002;27:85-92.
201. Lozoff B, Georgieff MK. Iron deficiency and brain development. Semin Pediatr Neurol 2006;13:158-65.
202. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Hyperferritinemia in autoimmunity. Isr Med Assoc J 2008;10:83-4.

## ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci:

Datum i mjesto rođenja: 29. prosinca 1973., Rijeka  
Kućna adresa: Brdina 18, Rijeka  
Tel: 091-2254591  
E-mail: [snada@medri.hr](mailto:snada@medri.hr)

**Službena adresa:** Zavod za biologiju i medicinsku genetiku  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci  
Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka  
Tel: 051-625129  
Fax: 051-678896

### Izobrazba i zvanja:

1998. Diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, smjer diplomirani sanitarni inženjer  
2004. Stekla zvanje magistra prirodnih znanosti na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, poslijediplomski studij: Biologija, Toksikologija

### Radno mjesto:

1999 – 2005. Stručni suradnik na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet u Rijeci  
2005. Znanstveni novak u suradničkom zvanju asistenta na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci

### Usavršavanje:

1999. Course on Molecular Techniques and Evolutionary Biology, Faculty of science, Amsterdam, Netherlands  
2002. Program Unapređivanje kvalitete visokoškolske nastave, udruga Universitas, radionica Korištenje informacijskih tehnologija u obrazovanju, Rijeka, Hrvatska  
2004. Tečaj molekularna medicina, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska  
2005. European School of Genetic Medicine, 18<sup>th</sup> Course in Medical Genetics, Bertinoro di Romagna, Italy  
2006. tromjesečno poslijediplomsko usavršavanje iz područja biomedicinskih znanosti na Odjelu za medicinsku genetiku Univerzitetskog medicinskog centra u Ljubljani (Slovenija), u okviru bilateralnog stipendijskog programa mobilnosti

### Članstva:

Hrvatsko genetičko društvo  
European Society of Human Genetics

## **Sudjelovanje u realizaciji znanstvenih projekata:**

1. Suradnik na projektu 0062016 prof.dr.sc. Smiljane Ristić: Genetički čimbenici u multiploj sklerozi (2002 - 2006.)
2. Suradnik na hrvatsko-slovenskom bilateralnom projektu prof.dr.sc. Smiljane Ristić i prof.dr.sc. Boruta Peterlina: Genetički čimbenici u multiploj sklerozi (2002 - 2007.)
3. Suradnik na projektu 062-1962766-0470 - prof.dr.sc. Smiljane Ristić: Genetička analiza multiple skleroze (2007.)

## **Publikacije**

### **Kvalifikacijski rad**

1. Starčević Čizmarević N. Analiza mutacija gena koje dovode do hemokromatoze u bolesnika s alkoholnom cirozom jetre. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2004. (Magistarski rad)

### **I. Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koje registrira *SCI Expanded* / *CC***

1. Radojčić Badovinac A, Buretić-Tomljanović A, **Starčević N**, Kapović M, Vlastelić I, Randić Lj. Chromosome studies in patients with defective reproductive succes. *AJRI* 2000;44:279-83.
2. Ristić S, Makuc J, Starčević N, Logar N, Brajenović-Milić B, Stepec S, Pleša I, Kapović M, Milić S, Štimac D, Crnić-Martinović M, Peterlin B. Hemochromatosis gene mutations in the Croatian and Slovenian populations. *Clin Genet* 2003;64:444-6.
3. Ristić S, Lovrečić L, Brajenović-Milić B, Starčević-Čizmarević N, Šega S, Sepčić J, Kapović M, Peterlin B. Mutations in the hemochromatosis gene (HFE) and multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2005;383:301-4.
4. Ristić S, Starčević-Čizmarević N, Brajenović-Milić B, Crnić-Martinović M, Kapović M. The frequency of CCR5 gene 32-basepair deletion in Croatia normal population. *Croat Med J* 2005;46:693-4.
5. Ristić S, Lovrečić L, Starčević Čizmarević N, Brajenović-Milić B, Šega Jazbec S, Barac-Latas V, Vejnović D, Sepčić J, Kapović M. No association of CCR5 gene mutation with multiple sclerosis in Croatian and Slovenian patients. *Mult Scler* 2006;12:360-2.
6. Starčević Čizmarević N, Stepec S, Ristić S, Milić S, Brajenović-Milić B, Štimac D, Kapović M, Peterlin B. Hemochromatosis gene mutations in patients with alcoholic cirrhosis. *Clin Genet* 2006;70:257-9.
7. Lovrečić L, Ristić S, Starčević Čizmarević N, Jazbec SS, Sepčić J, Kapović M, Peterlin B. Angiotensin-converting enzyme I/D gene polymorphism and risk of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2006;114:374-7.
8. Ristić S, Lovrečić L, Starčević-Čizmarević N, Brajenović-Milić B, Šega Jazbec S, Sepčić J, Kapović M, Peterlin B. Tumor necrosis factor-alpha-308 gene polymorphism in Croatian and Slovenian multiple sclerosis patients. *Eur Neurol.* 2007;57:203-7.
9. Lovrečić L, Ristić S, Starčević-Čizmarević N, Brajenović-Milić B, Šega Jazbec S, Sepčić J, Kapović M, Peterlin B. PAI and TPA gene polymorphisms in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008;14:243-7

### **II. Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koje registriraju ostale relevantne baze (*Excerpta Medica Database - EMBASE*)**

1. Starčević Čizmarević N, Milić S, Ristić S, Štimac D, Kapović M. Mutacije gena za hemokromatozu u bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza. *Medicina* 2004;42:265-70.



2. Starčević Čizmarević N, Buretić-Tomljanović A, Ostojić S, Kapović M. Citogenetička analiza kromosomskih aberacija u osoba profesionalno izloženih ionizirajućem zračenju. *Medicina* 2004;42:305-9.
3. Ristić S, Starčević Čizmarević N, Sepčić J, Rudež J, Crnić-Martinović M, Barac-Latas V, Kapović M. Polimorfizam 4G/5G u promotorskoj regiji gena za inhibitor aktivatora plazminogena-1 kao rizični čimbenik u multiploj sklerozi. *Medicina* 2004;42:271-5.

### III. Sažeci s međunarodnih znanstvenih skupova:

1. Radojčić Badovinac A, Buretić-Tomljanović A, Starčević N, Kapović M, Stelić I, Randić Lj. Chromosome studies in patients with a defective reproductive fitness. Book of abstract / Lenzi, Andrea (ur.). Rim: AASIR, 1999:46.
2. Radojčić Badovinac A, Buretić-Tomljanović A, Starčević N, Kapović M, Vlastelić I, Randić Lj. Low level of mozaicism in couples with recurrent molar pregnancies. Book of abstract / Seckeres Bartho, Julia (ur.). Pecs: ASSIR, 2000:17.
3. Starčević Čizmarević N, Stepec S, Ristić S, Milić S, Brajenović-Milić B, Štimac D, Kapović M, Peterlin B. C282Y, H63D and S65C mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in patients with alcoholic cirrhosis. European Human Genetics Conference, Prague. *Eur J Hum Genet*, 2005;13 (suppl 1):243-4.
4. Ristić S, Lovrečić L, Brajenović-Milić B, Starčević-Čizmarević N, Šega Jazbec S, Sepčić J, Kapović M, Peterlin B. Mutations in the hemochromatosis gene (HFE) and multiple sclerosis. 37<sup>th</sup> European Human Genetics Conference, Prague. *Eur J Hum Genet*, 2005;13 (suppl 1):230.
5. Lovrečić L, Ristić S, Starčević Čizmarević N, Šega Jazbec S, Sepčić J, Brajenović-Milić B, Kapović M, Peterlin B. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) genetic polymorphism and its role in the progression of multiple sclerosis. 38<sup>th</sup> European Human Genetics Conference, Amsterdam. *Eur J Hum Genet*, 2006;14 (suppl 1).

### IV. Sažeci s domaćih znanstvenih skupova:

1. Ristić S, Starčević Čizmarević N, Brajenović-Milić B, Pleša I, Milić S, Štimac D, Peterlin B, Kapović M. Haemochromatosis gene mutations in Croatian population. Book of abstracts: 1st Croatian Congress on Molecular Life Science, 2002.
2. Ristić S, Lovrečić L, Brajenović-Milić B, Starčević-Čizmarević N, Šega Jazbec Saša, Barac-Latas V, Vejnović D, Sepčić J, Kapović M, Peterlin B. Genska mutacija CCR5Δ32 nije rizični niti preventivni čimbenik za multiplu sklerozu. (No association of CCR5Δ32 gene mutation with multiple sclerosis in Croatian and Slovenian patients). 4. hrvatski neurološki kongres, Osijek, 7-10. rujna 2005.
3. Milić S, Štimac D, Ristić S, Starčević-Čizmarević N. Frequency and clinical expression of HFE gene mutations in a Croatian population of subjects with abnormal iron metabolism. 4<sup>th</sup> Congress of Croatian Society of Gastroenterology with international participation, Zagreb, 22-25. ožujka 2006.
4. Ristić S, Makuc J, Starčević N, Logar N, Brajenović-Milić B, Stepec S, Pleša I, Kapović M, Milić S, Štimac D, Crnić-Martinović M, Peterlin B. Hemochromatosis gene mutations in Croatian and Slovenian populations. 4<sup>th</sup> Congress of Croatian Society of Gastroenterology with international participation, Zagreb, 22-25. ožujka 2006.
5. Buretić-Tomljanović A, Vlastelić I, Radojčić Badovinac A, Starčević Čizmarević N, Nadalin S, Kapović M, Ristić S. Analiza gena za transferin i hemokromatozu u idiopatskoj neplodnosti. 4. hrvatski kongres iz humane genetike s međunarodnim sudjelovanjem, Malinska, Krk, *Paediatr Croat*, 2007;51:133-4.
6. Milić S, Ristić S, Starčević-Čizmarević N, Štimac D, Brajenović-Milić B, Kapović M. The frequency and clinical expression of the gene mutations in a Croatian population of subjects with abnormal iron metabolism. 4. hrvatski kongres iz humane genetike s međunarodnim sudjelovanjem, Malinska, Krk, *Paediatr Croat*, 2007;51:135.