

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski fakultet

Marija J. Sarić Matutinović

**Klinička vrednost antitela na TSH receptore kod
pacijenata sa Graves-ovom
oftalmopatijom/orbitopatijom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

University of Belgrade

Faculty of Pharmacy

Marija J. Sarić Matutinović

**Clinical value of thyrotropin receptor antibodies
in patients with Graves'
orbitopathy/ophthalmopathy**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

Mentori:

Dr sc. Svetlana Ignjatović

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Biljana Nedeljković Beleslin

vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Članovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Dr sc. Miloš Žarković

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr sc. Aleksandra Topić

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Neda Milinković

docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

SAŽETAK

Graves-ova orbitopatija (GO) je multifaktorska autoimuna bolest, još uvek nepotpuno istražene etiologije i patogeneze. Osnovu ove patologije čini inflamatorni poremećaj orbite. Obično se javlja u sklopu autoimunih bolesti tiroidne žlezde (AITB), prvenstveno Graves-ove bolesti (GB), međutim poznati su slučajevi njene izolovane pojave u odsustvu tiroidnih abnormalnosti. Graves-ova orbitopatija značajno remeti svakodnevne aktivnosti, funkciju vida i fizički izgled pacijenata, a u najtežim slučajevima može dovesti do potpunog gubitka vida. Smatra se da su autoreaktivna antitela na TSH receptore (TSHRA_t) prisutna u orbiti i štitnoj žlezdi glavni uzročnici nastanka GO i GB. Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje kliničkog značaja ovih autoreaktivnih antitela u dijagnostici GO, klasifikaciji pacijenata, predviđanju kliničkog toka i ishoda ove bolesti. Sa tim u vezi, analizirane su: raspodela ukupne koncentracije i funkcionalnog profila TSHRA_t u različitim grupama pacijenata, njihova asocijacija sa kliničkom slikom bolesti i dijagnostičke karakteristike primenjenih analitičkih metoda za njihovo određivanje. Dodatni cilj je bio analiza citokinskog profila i oksidativnog statusa pacijenata, kao i njihovog međusobnog odnosa sa nivoima TSHRA_t.

U studiji je učestvovao 91 pacijent sa postavljenom dijagnozom GO koji nije primao imunosupresivnu terapiju minimalno šest meseci u odnosu na datum uključenja u studiju. Pacijenti su lečeni na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, a klasifikovani su u odnosu na vrstu primarne dijagnoze na: pacijente sa GB, Hašimoto tiroiditisom (HT) i na pacijente bez tiroidne disfunkcije (eutiroidna GO, ET GO). Osim toga, klasifikacija pacijenata je izvršena i prema kliničkim karakteristikama GO, pre svega prema aktivnosti i težini. Ukupna koncentracija TSHRA_t (TSH vezujući inhibitorni imunoglobulini, TBII) određena je primenom komercijalne rutinske imunoheмиjske metode. Stimulatorna (TSHR-stimulatorna antitela, TSA_b) i blokirajuća aktivnost antitela (TSHR-blokirajuća antitela, TBA_b) određene su tehnikom bioeseja. Zasebno su kvantifikovana stimulatorna i blokirajuća antitela. Dodatno je koncentracija TSHRA_t izmerena pomoću komercijalne imunoheмиjske metode koja koristi „sendvič“ princip. Ispitivani citokini i 8-hidroksi-2-deoksigvanozin (8-OhdG) su određeni komercijalnim enzimskim imunoheмиjskim testovima, dok su totalni oksidativni stres (TOS) i totalni antioksidantni status (TAS) određeni spektrofotometrijski, primenom komercijalnih testova.

Pacijenti sa dijagnozom GB imali su značajno veću ukupnu koncentraciju (TBII) i stimulatornu aktivnost TSHRA_t (TSAb) u odnosu na pacijente sa HT i ET GO, dok je nivo inhibicije signala, ekvivalentan nivou blokirajućih antitela u uzorku (TBAb), bio značajno niži kod pacijenata sa GB. Kod 93,4% pacijenta detektovana je TSAb, dok je pozitivan rezultat određivanja TBII dobijen kod 70,3% pacijenata sa GO ($p < 0,001$). Najizraženija razlika u pozitivnosti tehnike bioeseja i rutinskog imunoeseja uočena je u grupi pacijenata sa ET GO, gde je pozitivnost bioeseja bila 87,5%, a imunoeseja 12,5% ($p = 0,031$). Kod jedne pacijentkinje je detektovana dvostruka pozitivnost TSAb i TBAb. Klinička aktivnost i težina GO bili su značajno povezani sa ukupnom koncentracijom i funkcionalnom aktivnošću TSHRA_t. Osetljivost tehnike bioeseja za identifikaciju aktivne GO bila je značajno veća u odnosu na rutinski imunoesej ($p = 0,016$). Tehnika bioeseja je takođe ispoljila značajno veću stopu osetljivosti za detekciju umerene i teške GO, u odnosu na rutinsku metodu ($p = 0,016$). Serumski nivoi TSAb bili su značajni nezavisni prediktori razvoja aktivne forme GO (univarijantni model: OR = 4,278; 95% CI = 1,762-10,388; $p = 0,001$; multivarijantni model: OR = 4,737; 95% CI = 1,757-12,772; $p = 0,002$), za razliku od koncentracije TBII koja nije imala prediktivnu vrednost (univarijantni model: OR = 2,333; 95% CI = 0,988-5,512; $p = 0,053$; multivarijantni model: OR = 2,522; 95% CI = 0,964-6,599; $p = 0,059$). Značajno veća stopa pozitivnosti rezultata TSAb u odnosu na TBII uočena je u slučaju: retrakcije kapaka ($p = 0,016$), diplopija ($p < 0,001$), proptoze ($p < 0,001$), ograničenje motiliteta očiju ($p = 0,002$), iritabilnih simptoma očiju ($p < 0,001$), fotofobije ($p = 0,016$), edema kapaka ($p < 0,001$) i zadebljanja ekstraokularnih mišića ($p = 0,002$). Stope pozitivnosti TSAb bioeseja, CLIA „sendvič“ metode i ECLIA kompetitivne rutinske metode bile su: 89,6%, 75% i 64,6%, redom za neaktivnu GO; 86,1%, 69,4% i 52,8% redom za blagu GO; 100%, 89,7% i 82,1%, redom za aktivnu GO i 100%, 90,2%, 86,3%, redom za umerenu ili tešku GO. Serumaska koncentracija IL-6 bila je značajno veća u grupi pacijenata sa umerenom/teškom GO, u poređenju sa pacijentima sa blagom GO ($p = 0,003$), dok je koncentracija IL-1 β bila značajno viša ($p = 0,027$), a IL-1RA granično niža ($p = 0,059$) kod pacijenata sa aktivnom GO u odnosu na pacijente sa neaktivnom GO. Serumaska aktivnost i koncentracija TSHRA_t bile su u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa IL-6 ($p = 0,002$; $p = 0,003$, redom). Serumski nivo TAS organizma bio je značajno povezan sa težinom GO ($p = 0,029$) i sa aktivnošću TSAb u serumu pacijenata ($p = 0,025$).

Dobijeni rezultati ukazuju na visok značaj određivanja koncentracije i funkcionalnosti TSHRA_t kod pacijenata sa GO. Klinička vrednost ovih biomarkera se ogleda u njihovom dijagnostičkom i prediktivnom potencijalu, pri čemu funkcionalna aktivnost ovih antitela ispoljava značajno naprednije kliničke karakteristike u poređenju sa njihovom ukupnom koncentracijom, izmerenom pomoću tradicionalnih metoda koje su u rutinskoj primeni. Dodatno, naši rezultati ukazuju na klinički značaj specifičnog citokinskog profila i antioksidativnog statusa u praćenju kliničkog toka bolesti i formiranju multiparametarskih laboratorijskih algoritama GO.

Ključne reči: Graves-ova orbitopatija; Graves-ova bolest; TSH-receptorska antitela; funkcionalna aktivnost TSH-receptorskih antitela; tehnika bioeseja.

Naučna oblast: Medicinske nauke - Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj:

ABSTRACT

Graves' orbitopathy (GO) is a multifactorial autoimmune disease of insufficiently investigated etiology and pathogenesis. The basis of this pathology is characterized by an inflammatory disorder of the orbit. It is mostly occurring in patients with autoimmune thyroid diseases (AITD), primarily Graves' disease (GD). However, there are known cases of its isolated occurrence in the absence of thyroid abnormalities. Graves' orbitopathy seriously impairs patients' daily activities, vision function and physical appearance, and in severe cases may cause blindness. Autoreactive antibodies to TSH receptors (TSHRAb) present in the orbit and thyroid are considered the main causes of both GO and GD. The primary goal of this study was to examine the clinical significance of these autoantibodies in the diagnosis of GO, patient classification, prediction of the clinical course and outcome of this disease. In this regard, we analyzed the distribution of the total TSHRAb concentration and functional profile in different patient groups, along with their association with the clinical profile of the disease and diagnostic accuracy of the applied analytical methods for their determination. An additional goal was to analyze the cytokine profile and oxidative status of patients, as well as their relationship with TSHRAb levels.

Ninety-one patients diagnosed with GO were enrolled in this study. They had not received any form of immunosuppressive therapy for at least six months prior the recruitment. All patients were on a regular follow-up regimen at the Clinic for Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, University Medical Center of Serbia, and were classified according to their primary diagnosis into: patients with GD, Hashimoto's thyroiditis (HT) and patients without thyroid dysfunction (euthyroid GO, ET GO). Additionally, patients were classified according to the clinical characteristics, primarily activity and severity of GO. Total TSHRAb concentration (TSH binding inhibitory immunoglobulins, TBII) was measured using a commercial routine immunoassay. Stimulatory and blocking antibody activity (TSHR-stimulating antibodies, TSAb and TSHR-blocking antibodies, TBAb, respectively) were determined using a bioassay technique. Stimulatory and blocking antibodies were separately quantified. In addition, TSHRAb concentration was measured using a commercial "bridge" immunoassay. The analyzed cytokines and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OhdG) were determined by commercial enzyme

immunoassays, while total oxidative stress (TOS) and total antioxidant status (TAS) were spectrophotometrically quantified, using commercial assays.

Patients diagnosed with GD had significantly higher total concentration (TBII) and stimulatory activity of TSHRAb (TSAb) compared to the patients with HT and ET GO. The level of signal inhibition, equivalent to the level of blocking antibodies in patients' samples (TBAb), was significantly lower in patients with GD. TSAb was detected in 93.4% of patients, while TBII was positive in 70.3% of patients with GO ($p < 0.001$). The most prominent difference in the positivity of the bioassay and routine immunoassay was observed in the group of ET GO patients (bioassay and immunoassay positivity was 87.5% and 12.5%, respectively) ($p = 0.031$). Dual positivity of TSAb and TBAb was observed in one patient. Clinical activity and severity of GO were significantly associated with both total TSHRAb concentration and its functional activity. Bioassay technique demonstrated significantly better discriminatory ability for the identification of active GO compared to the routine immunoassay ($p = 0.016$). The bioassay technique also showed a significantly higher sensitivity rate for the detection of moderate and severe GO, compared to the routine method ($p = 0.016$). Serum TSAb levels were significant independent predictors of GO activity (odds ratio, OR, 95%CI: 4,278; 95% CI 1,762-10,388, $p = 0.001$, univariate analysis and OR 4,737, 95% CI 1,757-12,772, $p = 0.002$, multivariate analysis), in contrast to the TBII concentration, which showed no predictive value (OR 2,333; 95% CI 0,988-5,512, $p = 0,053$, univariate analysis and OR 2,522, 95% CI 0,964-6,599, $p = 0,059$, multivariate analysis). A significantly higher positivity rate of TSAb compared to TBII results was observed in the presence of the following clinical parameters: eyelid retraction ($p = 0.016$), diplopia ($p < 0.001$), proptosis ($p < 0.001$), eye motility restriction ($p = 0.002$), irritable eye symptoms ($p < 0.001$), photophobia ($p = 0.016$), eyelid edema ($p < 0.001$) and the extraocular muscles enlargement ($p = 0.002$). Positivity rates of TSAb bioassay, CLIA "bridge" and routine ECLIA competitive immunoassay were: 89.6%, 75%, and 64.6%, respectively, for inactive GO; 86.1%, 69.4%, and 52.8%, respectively for mild GO; 100%, 89.7%, and 82.1%, respectively, for active GO, and 100%, 90.2%, 86.3%, respectively for moderate or severe GO. Patients with moderate/severe GO had significantly higher serum IL-6 concentrations ($p = 0.003$) compared to patients presented with mild form of GO, while IL-1 β concentrations were significantly higher ($p = 0.027$) and IL-1RA significantly lower ($p = 0.059$) in patients with active GO in comparison to patients with inactive GO. Significant positive correlation was detected between TSHRAb and

IL-6 levels in patients' sera ($p = 0.002$, $p = 0.003$, for TBII and TSAAb, respectively). Serum TAS level was significantly associated with both the severity of GO ($p = 0.029$) and the level of TSAAb in patients' sera ($p = 0.025$).

Results of this study indicate the high importance of determining the concentration and functionality of TSHRAb in GO patients. The clinical value of these biomarkers is reflected in their diagnostic and predictive potential, whereas their functional activity exhibits superior clinical characteristics compared to the traditionally measured total concentration of these parameters. Moreover, our results indicate the clinical importance of specific cytokine profile and antioxidant status in monitoring the clinical course of the disease and the development of multimarker laboratory algorithms.

Keywords: Graves' orbitopathy; Graves' disease; TSH-receptor antibodies; functional activity of TSH-receptor antibodies; bioassay technique.

Scientific field: Medical sciences - Pharmacy

Scientific subfield: Medical biochemistry

UDK number:

Lista skraćenica:

5C9	sintetsko humano monoklonsko antitelo, blokirajuće aktivnosti	
8- OHdG	8-hidroksi-2-deoksigvanozin	<i>engl. Hydroxy-2-DeoxyGuanosine</i>
8-oxoG	7,8-dihidroksi-8-oksogvanin	<i>engl. 7, 8-dihydro-8-oxoguanine</i>
ABTS[•]	radikal azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonske kiseline	<i>engl. azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid</i>
AITB	autoimune tiroidne bolesti	<i>engl. Autoimmune Thyroid Diseases</i>
ATP	adenozin-tri-fosfat	<i>engl. Adenosine Triphosphate</i>
AUC	površina ispod krive	<i>engl. Area Under the Curve</i>
cAMP	ciklični adenzin monofosfat	<i>engl. Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CAS	zbir kliničke aktivnosti	<i>engl. Clinical Activity Score</i>
CD40	klaster diferencijacije 40	<i>engl. Cluster of Differentiation 40</i>
CHO	ovarijalne ćelije kineskog hrčka	<i>engl. Chinese Hamster Ovary Cells</i>
CI	interval pouzdanosti	<i>engl. Confidence Interval</i>
CLIA	hemiluminescentno imunohemijsko određivanje	<i>engl. Chemiluminescent Immunoassay</i>
CLSI	Institut za kliničko-laboratorijske standarde	<i>engl. Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CRE	elementi koji odgovaraju na cAMP	<i>engl. cAMP-Response Elements</i>
CREB	CREB transkripcioni faktor	<i>engl. cAMP Response Element Binding Protein</i>
CT	komputerizovana tomografija	<i>engl. Computerized Tomography</i>

CTLA-4	protein 4 povezan sa citotoksičnim T-limfocitima	<i>engl. Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4</i>
CXC	Hemokin	<i>engl. chemokine</i>
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina	<i>engl. Deoxyribonucleic Acid</i>
DON	distiridna optička neuropatija	<i>engl. Disthyroid Optic Neuropathy</i>
dTPF	razlika u frakciji stvarno pozitivnih rezultata	<i>engl. True Positive Fraction difference</i>
EDTA	etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina	<i>engl. Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	enzimsko imunohemijsko određivanje	<i>engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ET GO	eutiroidna Graves-ova orbitopatija	<i>engl. Euthyroid Graves' Orbitopathy</i>
ETA	Evropsko tiroidno udruženje	<i>engl. European Thyroid Association</i>
EUGOGO	Evropska grupa za Graves-ovu orbitopatiju	<i>engl. European Group on Graves' Orbitopathy</i>
EOM	ekstraokularni mišići	<i>engl. Extraocular Muscles</i>
ECLIA	elektrohemiluminescentno određivanje	<i>engl. Electrochemiluminescence Immunoassay</i>
FDA	Američka agencija za hranu i lekove	<i>engl. Food and Drug Agency</i>
FRTL-5	tiroidne ćelije Fisher pacova	<i>engl. Fischer Rat Thyroid Cell Line</i>
FSH	folikulostimulirajući hormon	<i>engl. Folliculostimulating Hormone</i>
FT4	slobodan tiroksin, tetrajodtironin	<i>engl. Free Thyroxine</i>
GAG	Glikozaminoglikani	<i>engl. Glycosaminoglycans</i>
GB	Graves-ova bolest	<i>engl. Graves' Disease</i>

GO	Graves-ova oftalmopatija/orbitopatija	<i>engl. Graves' Orbitopathy/Ophthalmopathy</i>
G-protein	gvanil-nukleotid vezujući protein	<i>engl. guanine nucleotide-binding proteins</i>
Gαq	gvanil-nukleotid vezujući protein q subjedinica	<i>engl. guanine nucleotide-binding protein q subunit</i>
Gas	gvanil-nukleotid vezujući protein α subjedinica	<i>engl. guanine nucleotide-binding protein α subunit</i>
GC/MS	gasna hromatografija visokih performansi sa masenom spektrometrijom	<i>engl. Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i>
hCG	humani horioni gonadotropin	<i>engl. Human Chorionic Gonadotropin</i>
HLA-DR3	humani leukocitni antigen DR3	<i>engl. Human Leukocyte Antigen DR3</i>
hOGG1	8-oxoG DNK N-glikozilaza-1	<i>engl. 8-oxoG DNA N-glycosylase 1</i>
HSP-72	HSP-72 proteini	<i>engl. Heat Shock Proteins-72</i>
HT	Hašimoto tiroiditis	<i>engl. Hashimoto's thyroiditis</i>
HPLC/EC	tečna hromatografija visokih performansi sa elektrohemijском detekcijom	<i>engl. High Performance Liquid Chromatography/Electrochemical Detection</i>
HPLC/MS	tečna hromatografija visokih performansi sa masenom spektrometrijom	<i>engl. High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i>
ICAM-1	intracelularni adhezioni molekul-1	<i>engl. Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN-γ	interferon gama	<i>engl. Interferon Gamma</i>
IGF-1	insulinu sličan faktor rasta	<i>engl. Insulin-like Growth Factor</i>
IgG	imunoglobulini G klase	<i>engl. Immunoglobulin-G class</i>

iIL-1RA	intracelularni antagonista interleukin-1 receptora	<i>engl. intracellular Interleukin-1 Receptor Antagonist</i>
IL	Interleukin	<i>engl. Interleukin</i>
IL-1RA	antagonista receptora interleukina-1	<i>engl. Interleukin-1 Receptor Antagonist</i>
IP3	inozitol 1,4,5-trifosfat	<i>engl. Inositol 1,4,5-Trisphosphate</i>
IQR	interkvartilni opseg	<i>engl. Interquartile Range</i>
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina	<i>engl. Messenger Ribonucleic Acid</i>
ITM	indeks telesne mase	<i>engl. Body Mass Index</i>
JAK/STAT	janus kinaza/sprovodilac signala i aktivator transkripcije	<i>engl. Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
K1-18	sintetsko humano monoklonsko antitelo, stimulatorne aktivnosti	
K1-70	sintetsko humano monoklonsko antitelo, blokirajuće aktivnosti	
Kv	koeficijent varijacije	<i>engl. Coefficient of variance</i>
Kvul	koeficijent varijacije unutar laboratorije	<i>engl. Intralaboratory Coefficient of variance</i>
LATS	dugodelujući tiroidni stimulator	<i>engl. Long Acting Thyroid Stimulator, LATS</i>
LC/MS	tečna hromatografija/masena spektrometrija	<i>engl. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i>
LH	luteinizirajući hormon	<i>engl. Luteinizing Hormone</i>
LoD	limit detekcije	<i>engl. Limit of Detektion</i>
LRR	leucinom bogate ponavljajuće sekvence	<i>engl. Leucine Rich Repeating</i>
M22	sintetsko humano monoklonsko antitelo, stimulatorne aktivnosti	

MAPK	mitogenom aktivirana proteinska kinaza	<i>engl. Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	protein hemoatraktant makrofaga-1	<i>engl. Macrophage Chemoattractant Protein-1</i>
MHC class II	klasa II glavnog kompleksa histokompatibilnosti	<i>engl. Major Histocompatibility complex type II</i>
MR	magnetna rezonanca	<i>engl. Magnetic Resonance, MR</i>
MTHFR	metilen-tetrahidrofolat reduktaza	<i>engl. Methylenetetrahydrofolate reductase</i>
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat	<i>engl. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF-κB1	nuklearni faktor kapa B1	<i>engl. Nuclear Factor kappa-B</i>
NPV	negativna prediktivna vrednost	<i>engl. Negative Predictive Value</i>
NRBC	Nacionalni Institut za biološke standarde i kontrole	<i>engl. National Institute for Biological Standards and Control</i>
OSI	indeks oksidativnog stresa	<i>engl. Oxidative Stress Index</i>
OR	odnos šansi	<i>engl. Odds Ratio</i>
PAI-1	inhibitor aktivatora plazminogena	<i>engl. Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PGE2	prostaglandina E2	<i>engl. Prostaglandin E2</i>
PGHS-2	prostaglandin sintaza-2	<i>engl. Prostaglandin Endoperoxide H Synthase 2</i>
PKA	protein-kinaza A	<i>engl. Protein-Kinase A</i>
PLC	fosfolipaza C	<i>engl. Phospholipase C</i>
PPAR-γ	aktivator proliferacije peroksizoma- γ	<i>engl. Peroxisome Proliferator Activated Receptor-γ</i>
PPV	pozitivna prediktivna vrednost	<i>engl. Positive Predictive Value</i>
PTPN22	protein tirozin fosfataza ne-receptor tipa	<i>engl. Protein Tyrosine</i>

PTU	Propiltiouracil	<i>engl. Propylthiouracile</i>
RA	reumatoidni artritis	<i>engl. Rheumatoid Arthritis</i>
RAI	radioaktivni jod	<i>engl. Radioactive Iodine</i>
RANTES	hemokin regulisan nakon aktivacije, koga eksprimiraju i sekretuju normalne T – ćelije	<i>engl. Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i>
RCF	relativna centrifugalna sila	<i>engl. Relative Centrifugal Force</i>
RIA	radioimunohemijsko određivanje	<i>engl. Radioimmunoassay</i>
rLH/CG	humani TSHR/receptor luteinizirajućeg-choriogonadotropnog hormona pacova	<i>engl. luteinizing/rat choriogonadotropin</i>
RLU	relativne svetlosne jedinice	<i>engl. Relative Light Units</i>
ROC	ROC analiza, ROC kriva	<i>engl. Receiver Operating Characteristic</i>
ROS	reaktivne kiseonične vrste	<i>engl. Reactive Oxigene Species</i>
rTPF	relativni odnos frakcije stvarno pozitivnih rezultata	<i>engl. True Positive Fraction relative ratio</i>
Sd	standardna devijacija	<i>engl. Standard deviation</i>
SDH	sukcinat-dehidrogenaza	<i>engl. Succinate Dehydrogenase</i>
sIL-1RA	solubilni antagonista interleukin-1 receptora	<i>engl. soluble Interleukin-1 Receptor Antagonist</i>
SLE	sistemska eritemski luus	<i>engl. Sistemic Lupus Erimatosus</i>
SNP	polimorfizam pojedinačnih nukleotida	<i>engl. Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOD	superoksid-dismutaza	<i>engl. Superoxid-Dismutase</i>
SRR	odnos uzorka i standarda	<i>engl. Specimen to Reference Ratio</i>

Sdul	standardna devijacija unutar laboratorije	<i>engl. Intralaboratory Standard deviation</i>
T3	Trijodtironin	<i>engl. Triiodothyronine</i>
T4	tiroksin, tetrajodtironin	<i>engl. Thyroxine</i>
TAO	oftalmopatija povezana sa štitnom žlezdom	<i>engl. Thyroid-Associated Ophthalmopathy</i>
TAS	totalni antioksidantni status	<i>engl. Total antioxidant status</i>
TBAb	TSHR blokirajuća antitela	<i>engl. TSHR-Blocking Antibodies</i>
TBI	TSHR blokirajući imunoglobulini	<i>engl. TSHR-Blocking Immunoglobulins</i>
TBII	TSH vezujući inhibitorni imunoglobulini, ukupna koncentracija TSHRA _t	<i>engl. TSH Binding Inhibitory Immunoglobulins</i>
TED	tiroidna bolest očiju	<i>engl. Thyroid Eye Disease</i>
TES	totalni očni skor	<i>engl. Total Eye Score</i>
TG	Tireoglobulin	<i>engl. Thyroglobulin</i>
TGA_t	antitela na tireoglobulin	<i>engl. Thyroglobulin Antibodies</i>
TGF	transformišući faktor rasta	<i>engl. Transforming Growth Factor</i>
Th-1	T pomoćne ćelije 1	<i>engl. T-helper cells-1</i>
TNF-α	faktor nekroze tumora α	<i>engl. Tumor Necrosis Factor</i>
TOS	totalni oksidantni status	<i>engl. Total oxidant status</i>
TPO	tiroidna peroksidaza	<i>engl. Thyroid Peroxidase</i>
TPOA_t	antitela na tiroidnu-peroksidazu	<i>engl. Thyroid Peroxidase Antibodies</i>
TRA_t	antitela na tireotropni hormon	<i>engl. Thyrotropin Receptor Antibodies, TRAb</i>
TRBA_b	TSHR stimulirajuće blokirajuće antitelo	<i>engl. TSHR-Stimulating Blocking</i>

		<i>Antibody</i>
TSAb	TSHR stimulatorna antitela	<i>engl. TSHR-Stimulating Antibodies</i>
TSH	tireostimulirajući hormon	<i>engl. Thyroid-Stimulating Hormone</i>
TSHR	receptor za tireostimulirajući hormon/tireotropni receptor	<i>engl. Thyroid-Stimulating Hormone-Receptor</i>
TSHRA_t	antitela na receptore za tirostimulirajući hormon	<i>engl. Thyroid-Stimulating Hormone-Receptor Antibodies, TSHRA_b</i>
TSI	TSHR stimulatorni imunoglobulini	<i>engl. TSHR-Stimulating Immunoglobulins</i>
TAT	Obrtno vreme	<i>engl. Turnaround Time</i>
WHO	Svetska zdravstvena organizacija	<i>engl. World Health Organisation, WHO</i>
Wt	divlji soj	<i>engl. wild type,</i>

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Graves-ova oftalmopatija/orbitopatija.....	1
1.2. Istorijat Graves-ove bolesti i Graves-ove orbitopatije.....	2
1.3. Epidemiologija Graves-ove orbitopatije.....	4
1.4. Faktori rizika za razvoj Graves-ove orbitopatije.....	5
1.4.1. Endogeni (nemodifikujući) faktori.....	5
1.4.1.1. Genetska komponenta Graves-ove orbitopatije.....	5
1.4.1.2. Tiroidni status.....	6
1.4.2. Egzogeni faktori.....	6
1.4.2.1. Pušački status.....	6
1.4.2.2. Upotreba radioaktivnog joda u terapiji hipertiroidizma.....	6
1.4.3. Dodatni potencijalni faktori rizika.....	7
1.5. Kliničke manifestacije Graves-ove orbitopatije.....	7
1.5.1. Simptomi Graves-ove orbitopatije.....	7
1.5.2. Znakovi Graves-ove orbitopatije.....	8
1.6. Klinička evaluacija Graves-ove orbitopatije.....	9
1.6.1. Aktivnost Graves-ove orbitopatije.....	10
1.6.2. Težina Graves-ove orbitopatije.....	11
1.7. Prirodni tok Graves-ove orbitopatije.....	13
1.8. Patogeneza Graves-ove orbitopatije.....	14
1.8.1. Autoimuna osnova Graves-ove orbitopatije i uloga TSH receptora.....	14
1.8.2. Histološke i mehaničke karakteristike Graves-ove orbitopatije.....	16
1.8.3. Imunološki procesi unutar orbite.....	17
1.8.4. Antigenski kandidati unutar orbite.....	18
1.8.5. Tiroidno-orbitalna veza: moguće hipoteze.....	20
1.9. Anti-TSHR antitela.....	20
1.9.1. Uloga TSHRA _t u patogenezi Graves-ove orbitopatije.....	20
1.9.2. Nomenklatura TSHRA _t	22
1.9.3. Stimulatorna i blokirajuća TSHRA _t (TSA _b i TBA _b).....	23

1.9.4. Epitopi i strukturne karakteristike TSHR.....	26
1.9.5. Metode za određivanje TSHRA.....	30
1.9.5.1. Kompetitivni imunohemijski testovi.....	31
1.9.5.2. Biološki testovi (bioeseji).....	32
1.9.5.3. Metode za određivanje neutrališućih TSHRA.....	35
1.9.6. Potencijalne kliničke indikacije za određivanje TSHRA.....	35
1.10. Citokini kao biomarkeri Graves-ove orbitopatije.....	39
1.10.1. Uloga interleukina-1 β i interleukin-1 receptor antagoniste u patogenezi Graves-ove orbitopatije.....	41
1.10.2. Uloga interleukina-6 u patogenezi Graves-ove orbitopatije.....	42
1.10.3. Uloga interleukina-8 u patogenezi Graves-ove orbitopatije.....	43
1.11. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u patogenezi Graves-ove orbitopatije.....	44
2. CILJEVI NAUČNOG ISTRAŽIVANJA.....	48
3. MATERIJAL I METODE.....	50
3.1. Materijal.....	50
3.2. Metode.....	53
3.2.1. Klinička evaluacija simptoma i znakova Graves-ove orbitoaptije.....	53
3.2.1.1. Klinička evaluacija simptoma i znakova aktivnosti Graves-ove orbitopatije.....	53
3.2.1.2. Klinička evaluacija simptoma i znakova težine Graves-ove orbitopatije.....	54
3.2.1.2.1. Klinička evaluacija palpebralne aperture.....	55
3.2.1.2.2. Klinička evaluacija egzoftalmusa/proptoze.....	56
3.2.1.2.3. Klinička evaluacija diplopija.....	56
3.2.1.2.4. Klinička evaluacija pokretljivosti očnih mišića.....	57
3.2.1.2.5. Klinička procena distiroidne optičke neuropatije.....	57
3.2.2. Određivanje funkcionalne aktivnosti TSHRA.....	57
3.2.3. Određivanje ukupne koncentracije TSHRA.....	62
3.2.4. Određivanje koncentracije TSHRA primenom CLIA „sendvič“ metode.....	66

3.2.5. Određivanje nivoa interleukina primenom enzimskih imunohemijskih testova.....	69
3.2.5.1. Određivanje koncentracije interleukina-6 u serumu pacijenata.....	69
3.2.5.2. Određivanje koncentracije interleukina-1 receptor antagoniste u serumu pacijenata.....	70
3.2.5.3. Određivanje koncentracije interleukina-1 beta u serumu pacijenata.....	71
3.2.5.4. Određivanje koncentracije interleukina-8 u serumu pacijenata.....	73
3.2.6. Određivanje nivoa parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite...74	
3.2.6.1. Određivanje nivoa totalnog oksidantnog statusa u serumu pacijenata....	74
3.2.6.2. Određivanje nivoa totalnog antioksidativnog statusa organizma u serumu pacijenata.....	75
3.2.6.3. Određivanje indeksa oksidativnog statusa pacijenata.....	76
3.2.6.4. Određivanje koncentracija 8-OHdG u plazmi pacijenata.....	76
3.2.7. Verifikacija analitičkih karakteristika imunohemijske CLIA metode (IMMULITE ® 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRAt.....	78
3.2.7.1. Nepreciznost u seriji.....	79
3.2.7.2. Nepreciznost između serija.....	79
3.2.7.3. Ponovljivost merenja (repeatability).....	79
3.2.7.4. Nepreciznost iz dana u dan.....	80
3.2.7.5. Nepreciznost unutar laboratorije.....	80
3.2.7.6. Tačnost metode.....	81
3.2.8. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti imunohemijske CLIA metode (IMMULITE ® 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRAt.....	81
3.3. Statistička analiza.....	82
4. REZULTATI.....	84
4.1. Analiza demografskih i kliničkih karakteristika ispitivane populacije.....	84
4.1.1. Demografski podaci ispitivanih pacijenata.....	84
4.1.2. Klinički podaci ispitivanih pacijenata.....	87
4.2. Analiza koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRAt.....	90
4.2.1. Analiza koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRAt u serumu različitih grupa pacijenata sa GO.....	90

4.2.2. Povezanost demografskih i kliničkih podataka pacijenata sa koncentracijom i funkcionalnom aktivnošću TSHRA _t	96
4.3. Analiza povezanosti TSHRA _t sa kliničkim fenotipom GO.....	101
4.3.1. Analiza povezanosti TSHRA _t sa aktivnošću i težinom GO.....	101
4.3.2. Analiza prediktivnog potencijala TSHRA _t	105
4.3.3. Raspodela TSA _b i TBII u zavisnosti od trajanja simptoma i težine GO.....	107
4.3.4. Analiza pojedinačnih oftalmoloških parametara i njihove povezanosti sa TSHRA _t	112
4.4. Evaluacija analitičkih i dijagnostičkih karakteristika imunohemijske CLIA metode (IMMULITE ® 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA _t	125
4.4.1. Verifikacija imunohemijske CLIA metode (IMMULITE ® 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA _t	126
4.4.1.1. Nepreciznost u seriji.....	126
4.4.1.2. Nepreciznost između serija.....	127
4.4.1.3. Nepreciznost iz dana u dan.....	128
4.4.1.4. Nepreciznost unutar laboratorije.....	129
4.4.1.5. Tačnost.....	130
4.4.2. Dijagnostička tačnost imunohemijske CLIA metode (IMMULITE ® 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA _t	131
4.5. Komparativna analiza dijagnostičkih karakteristika tri metode za određivanje TSHRA _t (bioesej, rutinska kompetitivna imunohemijska ECLIA metoda i imunohemijska CLIA metoda).....	133
4.6. Analiza kliničkog značaja određivanja IL-6, IL-1RA, IL-1β i IL-8 kao i njihove povezanosti sa TSHRA _t kod pacijenata sa GO.....	140
4.7. Analiza kliničkog značaja određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i njihove povezanosti sa TSHRA _t kod pacijenata sa GO.....	146
4.7.1. Totalni antioksidativni status (TAS), totalni oksidativni stres (TOS) i indeks oksidativnog stresa (OSI) pacijenata sa GO.....	146
4.7.2. 8-OhdG kod pacijenata sa GO.....	152
4.8. Dijagnostički potencijal multiparametarskih modela.....	154

5. DISKUSIJA.....	157
5.1. Analiza demografskih i kliničkih karakteristika pacijenata i njihove povezanosti sa TSHRAt.....	160
5.1.1. Demografski podaci ispitivanih pacijenata i njihova povezanost sa serumskim nivoom TSHRAt.....	160
5.1.2. Klinički podaci ispitivanih pacijenata i njihova povezanost sa serumskim nivoom TSHRAt.....	162
5.2. Analiza koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRAt u serumu različitih grupa pacijenata sa GO.....	163
5.3. Analiza povezanosti TSHRAt sa kliničkim fenotipom GO.....	169
5.3.1. Analiza povezanosti TSHRAt sa aktivnošću i težinom GO.....	169
5.3.2. Analiza prediktivnog potencijala TSHRAt.....	170
5.3.3. Raspodela TSAb i TBII u zavisnosti od trajanja simptoma i težine GO.....	171
5.3.4. Analiza pojedinačnih oftalmoloških parametara i njihove povezanosti sa TSHRAt.....	173
5.4. Evaluacija analitičkih i dijagnostičkih karakteristika imunohemijske CLIA metode (IMMULITE ® 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRAt.....	180
5.5. Komparativna analiza dijagnostičkih karakteristika tri metode za određivanje TSHRAt (bioesej, rutinska kompetitivna imunohemijska ECLIA metoda i imunohemijska CLIA metoda).....	183
5.6. Analiza kliničkog značaja određivanja IL-6, IL-1RA, IL-1 β i IL-8 kao i njihove povezanosti sa TSHRAt kod pacijenata sa GO.....	187
5.7. Analiza kliničkog značaja određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i njihove povezanosti sa TSHRAt kod pacijenata sa GO.....	190
5.7.1. Totalni antioksidativni status (TAS), totalni oksidativni stres (TOS) i indeks oksidativnog stresa (OSI) pacijenata sa GO.....	190
5.7.2. 8-OHdG kod pacijenata sa GO.....	192
5.8. Prediktivni potencijal multiparametarskih modela.....	193
5.9. Snaga i ograničenja studije.....	194

6. ZAKLJUČCI.....	196
7. LITERATURA.....	199
8. BIOGRAFIJA AUTORA.....	232

1. UVOD

1.1. Graves-ova oftalmopatija/orbitopatija

Graves-ova oftalmopatija/orbitopatija (GO) predstavlja autoimuni inflamatorni poremećaj orbite i najčešću ekstratiroidnu manifestaciju Graves-ove bolesti (GB) (1). Bliska vremenska i klinička povezanost GB i GO podrazumeva zajednički sistemski proces u osnovi ovih patoloških stanja (2). Iako je prošlo više od dva veka od prvih značajnih opservacija ove patologije, ona i dalje predstavlja patogenetsku enigmu i svojevrsan klinički izazov (3). GO je uglavnom hronično stanje koje spontano prolazi kod jednog dela pacijenata sa blagim simptomima, dok se kod težih oblika bolesti kompletan oporavak obično nikada ne postiže (4, 5). Iako često ima blaži klinički tok, kod velikog broja pacijenata medicinski tretman je neophodan, a optimalan klinički pristup je i dalje kontroverzan (6). Otprilike 3-5% pacijenata razvija težak oblik bolesti, praćen intenzivnim bolom i razvojem distiroidne optičke neuropatije, urgentnog zdravstvenog stanja koje može dovesti do trajnog gubitka vida i zahteva hitnu medicinsku intervenciju (3, 7). Graves-ova orbitopatija u značajnoj meri remeti kvalitet života obolelih osoba, te predstavlja i svojevrsan socioekonomski problem. U izvesnom stepenu ovo je onesposobljavajuća bolest koja značajno narušava fizički izgled, funkciju vida i negativno utiče na radnu i psihosocijalnu sposobnost pacijenata. U prethodnim istraživanjima GO je dovedena u vezu sa neuropsihijatrijskim poremećajima, primarno sa stopom anksioznosti, depresije i emotivnog stresa (8, 9).

Postoji nekoliko kliničkih varijanti GO. Iako se u oko 80% slučajeva razvija kod hipertiroidnih pacijenata sa GB, GO se javlja i u sklopu drugih varijanti autoimunih tiroidnih bolesti (*engl. Autoimmune Thyroid Disease, AITD*), kao i nezavisno od funkcije tiroidne žlezde (10). U oko 10% slučajeva GO je prisutna i kod hipotiroidnih pacijenata sa primarnom dijagnozom Hašimoto tiroiditisa (HT), kao i kod eutiroidnih (ET) pacijenata bez tiroidnih abnormalnosti (5-10%). Iz ovog razloga su danas u upotrebi i termini tiroidna bolest očiju (*engl. Thyroid Eye Disease, TED*) i oftalmopatija povezana sa štitnom žlezdom (*engl. Thyroid-Associated Ophthalmopathy, TAO*), kako bi se bolje opisala specifična priroda ove patologije (11-13). Graves-ova orbitopatija

ima nepredvidljiv klinički tok i ne zna se sa sigurnošću kod kojih će se pacijenata razviti i u kom trenutku, niti kakav će klinički fenotip imati. Najčešće se hipertiroidizam i oftalmološki simptomi ispoljavaju istovremeno ili sa razmakom od 18 meseci, mada su poznati slučajevi pacijenata kod kojih se orbitopatija razvija više godina pre ili nakon tiroidne disfunkcije (2, 14). Graves-ova orbitopatija je klinički manifestovana kod oko polovine pacijenata obolelih od GB, međutim, smatra se da značajan broj asimptomatskih ili pacijenata sa blagim i nespecifičnim simptomima ostaje nedetektovan. Primenom tehnika magnetne rezonance (*engl. Magnetic Resonance*, MR) i kompjuterizovane tomografije (*engl. Computerized Tomography*, CT) orbite kod otprilike 70% pacijenata sa GB primećeno je suptilno uvećanje ekstraokularnih mišića, što ukazuje na relativno veliku učestalost subkliničkih oblika GO u ovoj populaciji pacijenata (15).

1.2. Istorijat Graves-ove bolesti i Graves-ove orbitopatije

Prvi medicinski zapisi o GB i GO datiraju od 11. veka kada je persijski lekar i filozof Avicena uočio povezanost tiroidnih i oftalmoloških simptoma (16). U Evropi je mnogo godina potom GB prvi put opisao engleski lekar Kejleb Peri (*Caleb Hillier Parry*, 1755-1822) 1786. godine nakon što je kod nekoliko pacijentkinja primetio istovremeno uvećanje tiroidne žlezde, tahikardiju i isturenost očnih jabučica. Njegova zapažanja su posthumno objavljena, tek 1825. godine, zbog čega bolest dobija ime po irskom lekaru Robertu Grejvsu (*Robert James Graves*, 1796-1853) koji je detaljan klinički opis ove bolesti objavio 1835. godine u Londonskom medicinskom žurnalu. On je agresivne srčane palpitacije doveo u direktnu vezu sa hipertrofijom tiroidne žlezde, a kao specifičan simptom je opisao uočljivo uvećanje očnih jabučica i nemogućnost zatvaranja očnih kapaka kod jedne od pacijentkinja (17, 18).

Graves-ova bolest je poznata još i kao Bazedovljeva ili Graves-Bazedovljeva bolest, prema nemačkom lekaru opšte prakse iz Merzeburga, Karlu fon Bazedovu (Karl von Basedow). On je prvi definisao karakterističnu konstelaciju simptoma (struma, egzoftalmus i tahikardija) koja je od tada u medicini poznata kao „Merzeburska trijada“. U jednom od njegovih opisa orbitopatije, on navodi primetnu protruziju inače potpuno funkcionalnih očnih jabučica, a pacijentkinju opisuje kao „osobu zastrašujućeg pogleda koja je u celom gradu bila poznata kao luda“ (19). On

je dao veliki doprinos definisanju znakova i simptoma ove patologije i prepoznao da je egzoftalmus rezultat uvećanja retro-orbitalnog tkiva, a ne funkcionalni poremećaj očnih jabučica.

Uzrok nastanka ove patologije, međutim, nije otkriven još dugi niz godina. Postojale su brojne teorije kojima se objašnjavala etiologija tiroidno-orbitalne veze: infektivne bolesti (tuberkuloza, sifilis), slabost ekstraokularnih mišića, disfunkcija adrenalnog korteksa, psihološki poremećaji, emotivni stres, kardiovaskularni poremećaji, vaskularna kongestija, edem orbitalnog tkiva, itd. Prvi koji su prepoznali hipertiroidizam kao primarni uzrok orbitalnih promena su bili Rehn (1884) i Moebius (1887). Nakon otkrića tireostimulišućeg hormona (TSH) 1928. godine smatralo se da su poremećaj hipofize i posledična hipersekrecija ovog hormona medijatori nastanka GB, međutim ubrzo je postalo jasno da se proptoza javlja i nezavisno od lučenja TSH, kao i da prekomerno delovanje TSH ne bi moglo da objasni limfocitnu infiltraciju tiroidnog tkiva (20-22).

Prvi jasan dokaz zajedničke autoimune osnove GB i GO bilo je otkriće tiroidnih stimulatornih imunoglobulina u serumu hipertiroidnih pacijenata. Novozelandski naučnici Adams i Purves su 1956. godine detektovali dugodelujući tiroidni stimulator (*engl. Long Acting Thyroid Stimulator, LATS*) u serumu pacijenata sa tireotoksikozom. Oni su uočili da serum ovih pacijenata stimuliše sekreciju radioaktivno obeleženih tiroidnih hormona kod zamoraca mnogo duže vremena nego pituitarni TSH preparat. Ovi dugodelujući tiroidni stimulatori izazivaju sporo otpuštanje radioaktivnog joda, do 24 h nakon davanja intravenske injekcije seruma, u poređenju sa TSH koji dovodi do otpuštanja 3h nakon injektovanja (23, 24). Manley i saradnici (25) su utvrdili precizan princip delovanja ovih dugodeljućih tiroidnih aktivatora nakon što su demonstrirali da se kompetitivno vezuju i aktiviraju tireotropne receptore (TSHR) tiroidnih folikularnih ćelija. Dugodeljući tiroidni aktivatori su time identifikovani kao autoantitela na TSHR čime se objašnjava tireostimulišuća aktivnost seruma pacijenata sa GB (26). Apsolutnu potvrdu postojanja i uloge TSHR antitela (TSHRA_t) su dali Adams i saradnici (22) nakon što su sebi dali infuziju plazme pacijenata sa GB, što je rezultovalo značajnom stimulacijom štitne žlezde. Ovim eksperimentom je potvrđeno da je GB autoimuni poremećaja prouzrokovan TSHRA_t i time su otvorena vrata za dalja istraživanja tiroidno-orbitalne veze.

1.3. Epidemiologija Graves-ove orbitopatije

Najveća epidemiološka studija koja je ispitivala incidenciju GO je izvedena u Okrugu Olmsted, u Sjedinjenim Američkim Državama i retrospektivno je pratila populaciju pacijenata sa dijagnostifikovanom GO u periodu od 1976. do 1990. godine. Ukupna stopa incidencije podešena za godine starosti bila je 16 žena i 2,9 muškaraca na 100000 ljudi godišnje. Kod žena je najviša stopa incidencije GO uočena u starosnoj grupi od 40 do 44 godine i 60 do 64 godine, a kod muškaraca od 45 do 49 i 65 do 69 godina starosti (19).

Na osnovu podataka skorašnje studije koju je izvela Evropska grupa za Graves-ovu orbitopatiju (*engl. European Group on Graves' Orbitopathy, EUGOGO*) opšta prevalencija GO svih oblika u Evropi iznosi između 90 i 155 ljudi u populaciji od 100000 (27). Prevalencija GO je izračunata na osnovu podataka tri velike populacione studije izvedene u Švedskoj, Danskoj i Sloveniji, pri čemu se uočava značajno niža stopa GO u odnosu na podatke dobijene u američkoj studiji (procenjena prevalencija u Okrugu Olmsted je bila oko 250/100000 ljudi) (28-30). Uzrok ovakvih razlika bi mogao biti otežana detekcija pacijenata sa blagim oblicima GO, kao i niska stopa upućivanja ovih pacijenata kod lekara specijaliste. Pojedine kliničke varijante GO svrstane su u listu retkih bolesti (prevalencija < 5/10000 ljudi): eutiroidna/hipotiroidna GO (0,02-1,10/10000), asimetrična GO (1-5/10000), unilateralna GO (0,5-1,5/10000), GO udružena sa dermatopatijom (0,15/10000) i GO udružena sa akropahijom (karakteristične promene prstiju) (0,03/10000) (27).

Graves-ova orbitopatija je kao i GB značajno učestalija kod žena nego kod muškaraca, s tim da muškarci češće ispoljavaju teži oblik GO (4). Težina GO je takođe usko povezana sa godinama starosti, pri čemu su teški oblici GO znatno učestaliji kod starije populacije pacijenata (31, 32). Za sada nije u potpunosti jasno da li postoje značajne etničke i rasne razlike u stopi incidencije GO. Uočena je specifičnost u genetskoj predispoziciji kod različitih rasa, kao i varijacije u fiziološkim vrednostima egzoftalmusa usled različite anatomije orbita (33-35). Više studija je potvrdilo kako izmenu fenotipa GB i GO od težih ka blažim oblicima bolesti, tako i smanjenje opšte prevalencije GO u poslednjih 20 do 30 godina. Nekoliko potencijalnih hipoteza objašnjava ovakva zapažanja: ranija dijagnostika i multidisciplinarni pristup lečenju GO, napredak

laboratorijskog ispitivanja tiroidne funkcije, jodoprofilaksa i bolja kontrola faktora rizika za nastanak GO, prvenstveno smanjenje stope pušenja širom sveta (36-38).

1.4. Faktori rizika za razvoj Graves-ove orbitopatije

Smatra se da GO nastaje kao rezultat međusobne interakcije endogenih (genetska predispozicija, ženski pol, starija životna dob, anatomske faktori) i egzogenih faktora, odnosno faktora sredine (pušačke navike, terapija radioaktivnim jodom, tiroidni status, oksidativni stres, pojedini lekovi, emotivni stres, itd.). Kompleksni mehanizmi njihovog delovanja na patofiziologiju nastanka GO još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni, ali je od naročitog interesa primarno prepoznati i kontrolisati egzogene faktore rizika u cilju prevencije i usporavanja progresije GO (4, 39).

1.4.1. Endogeni (nemodifikujući) faktori

Učestalost GO je značajno veća u ženskoj populaciji srednje životne dobi, s tim da se teški oblici češće javljaju u starijoj, muškoj populaciji. Anatomska građa orbita pokazuje rasne, etničke i individualne varijacije, te se može smatrati jednim od uzročnika varijabilne manifestacije GO (34, 39).

1.4.1.1. Genetska komponenta Graves-ove orbitopatije

Danas je poznato da je GB familijarna bolest, dok je genetska osnova GO daleko manje istražena. Smatra se da GO i GB većinski dele zajedničku genetsku predispoziciju, a za nekoliko gena i genetskih regiona je utvrđeno da doprinose razvoju tiroidne autoimunosti i GO: gen za humani leukocitni antigen DR3 (*engl. Human Leukocyte Antigen DR3, HLA-DR3*), gen za protein 4 povezan sa citotoksičnim T-limfocitima (*engl. Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4, CTLA-4*), gen za aktivator proliferacije peroksizoma- γ (*engl. Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ , PPAR- γ*), gen za protein tirozin fosfataza ne-receptor tipa 22 (*engl. Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 22, PTPN22*), gen za metilen-tetrahidrofolat reduktazu (MTHFR), gen za tiroidnu peroksidazu (TPO), gen za nuklearni faktor kapa B1 (NF- κ B1), geni za citokine: interferon gama (IFN- γ), interleukin 1 (IL-1) i faktor nekroze tumora α (*engl. Tumor*

Necrosis Factor, TNF- α). Najverovatnije je da ovi geni stupaju u međusobne interakcije i utiču na fenotip i težinu bolesti. Za pojedine od ovih genetskih varijanti je uočena zajednička osnova sa drugim autoimunim bolestima. Ovim se objašnjava česta istovremena pojava dijabetes melitusa tip 1, celijačne bolesti, psorijaze, sistemskog lupusa, reumatoidnog artritisa, sarkoidoze i AITB, što je klasifikovano kao autoimuni poliglandularni sindrom (40-42).

1.4.1.2. Tiroidni status

Imperativ u menadžmentu pacijenata sa GO je uspostavljanje eutiroidnog stanja i stalna kontrola tiroidnog statusa. Disbalans tiroidnih hormona, bilo da je u pitanju hipotiroidizam ili hipertiroidizam dovodi do pogoršanja GO (44, 45).

1.4.2. Egzogeni faktori

1.4.2.1. Pušački status

Smatra se da je duvanski dim najznačajniji izmenjivi faktor rizika na koji se može uticati u cilju prevencije razvoja i progresije GO. Postoje brojni dokazi dozno-zavisne povezanosti GO i izloženosti duvanskom dimu. Procenjuje se da su oko 40% pacijenata sa GO pušači. Utvrđeno je da je broj konzumiranih cigareta na dan direktno proporcionalan težini kliničkih manifestacija GO. Osim povećanog rizika za nastanak i progresiju GO, trenutni pušači pokazuju i znatno lošiji odgovor na terapiju (43).

1.4.2.2. Upotreba radioaktivnog joda u terapiji hipertiroidizma

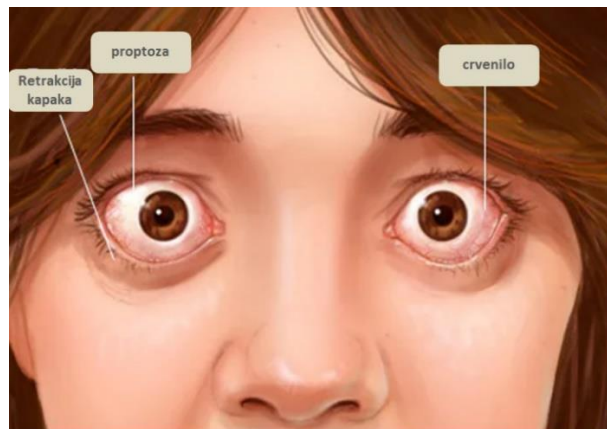
U Evropi se radioaktivni jod (RAI) koristi kao druga linija terapije hipertiroidizma, u slučaju hipertiroidizma koji ne odgovara na uobičajenu terapiju antitiroidnim lekovima, dok se u Americi koristi kao primarna terapija (46). Upotreba RAI može dovesti do *de novo* nastanka ili progresije GO, a smatra se da je ovo posledica pogoršavanja autoimune reakcije u organizmu. Za razliku od RAI, drugi vidovi tretmana hipertiroidizma (antitiroidni lekovi ili hirurški tretman) ne utiču na tok i pojavu GO, tako da su prvi izbor i preporuka kliničkih vodiča. Ukoliko je, ipak, neophodna primena RAI u ove svrhe, primenjuje se steroidna profilaksa kao mera prevencije (47, 48).

1.4.3. Dodatni potencijalni faktori rizika

Nekoliko dodatnih faktora se dovodi u potencijalnu vezu sa povećanim rizikom za razvoj GO: primena određenih lekova (terapija litijumom i interferonom- α), oksidativni stres, hiperholesterolemija i emotivni stres (49-52). Intestinalna mikrobiota je dovedena u vezu sa predispozicijom za nastanak brojnih autoimunih bolesti, između ostalog GB i GO, a razvojem animalnih modela GO dokazana je značajna korelacija između specifičnog mikrobiološkog sastava creva i heterogenog kliničkog profila GO (40, 53, 54).

1.5. Kliničke manifestacije Graves-ove orbitopatije

GO predstavlja inflamatorni poremećaj orbite koje karakteriše skup funkcionalnih i estetskih znakova i simptoma bolesti, u zavisnosti od toga da li primarno remete funkciju vida ili narušavaju fizionomiju lica pacijenta (*Slika 1*).



Slika 1. Klasične kliničke karakteristike GO. Preuzeto sa internet stranice <https://www.mayoclinic.org/>, sa modifikacijom

1.5.1. Simptomi Graves-ove orbitopatije

Obično se primarno razvijaju blaži, nespecifični simptomi iritacije oka (osećaj neprijatnosti, grebanja, peckanja, osećaj prisustva stranog tela), fotofobije (osetljivost na svetlost) i prekomernog suzenja oka. Kao najčešći inicijalni simptom GO se javlja karakteristična promena

fizionomije lica pacijenta, bilo kao posledica protruzije bulbusa (egzoftalmus, proptoza), retrakcije kapaka ili znakova inflamacije (34, 55). Diplopija (duple slike) se razvija s vremenom i obično se prvo primećuje prilikom ekstremnih pokreta oka, umora ili nakon buđenja. Uznapredovale forme bolesti se manifestuju sa diplopijama u svim pravcima pogleda i onima koje su stalno prisutne. Diplopije nastaju kao posledica ograničene pokretljivosti ekstraokularnih mišića i, u slučaju hroničnog toka bolesti, mogu biti perzistentne sa značajnim negativnim uticajem na svakodnevne aktivnosti i radnu sposobnost pacijenta. Bol u retrobulbarnom regionu se može takođe javiti, naročito u slučaju težih oblika bolesti. Izmenjena funkcija vida se inicijalno manifestuje kao zamućenje vida i/ili poremećaj na nivou kolornog vida, a zatim dolazi do smanjenja oštine vida. Vizuelni simptomi GO su često posledica distiroidne optičke neuropatije, urgentnog stanja koji zahteva hitnu medicinsku negu kako bi se sprečio gubitak vida, međutim mogu nastati i kao rezultat prekomernog suzenja, diplopija, fotofobije, keratitisa i otoka kapaka (6, 56). U veoma retkim slučajevima (0,1% pacijenata), može doći do subluksacije očne jabučice, odnosno dislokacije oka iz orbite što predstavlja izrazito alarmantno stanje koje zahteva hitnu intervenciju (57).

1.5.2. Znakovi Graves-ove orbitopatije

Retrakcija gornjeg kapka predstavlja najčešći znak GO, koji je prisutan kod 90 do 98% pacijenata i delimično je odgovoran za njihov karakterističan izgled (58). Osim estetskog značaja, ovaj znak GO se dovodi u vezu i sa stepenom oštećenja površine oka, a posledica je uvećanja ili fibroze mišića orbite koji se javljaju kao posledica inflamacije tkiva (56, 59). Retrakcija donjeg kapka se javlja znatno ređe i obično je u pozitivnoj korelaciji sa stepenom proptoze (60).

Proptoza ili egzoftalmus, definiše se kao abnormalna protruzija, odnosno izbočenost očne jabučice i posledica je ekspanzije orbitalnog adipoznog i mišićnog tkiva unutar ograničenog koštanog prostora orbite koja rezultira povećanjem intraorbitalnog pritiska. Kao sekundarna manifestacija ovih procesa nastaje proptoza koja predstavlja kompenzatorni mehanizam organizma sa ciljem da snizi povišen pritisak u orbiti, odnosno izvrši dekompresiju orbite. U slučaju nemogućnosti displasiranja oka na napred povećava se verovatnoća za nastanak

distiroidne optičke neuropatije usled kompresije optičkog nerva (34, 61). Proptoza je takođe veoma učestao i karakterističan znak GO, a posmatra se značajno odstupanje od normalnih vrednosti za određenu rasu, pol i godine starosti. Utvrđeno je da žene imaju fiziološki niže vrednosti proptoze u odnosu na muškarce, kao i da se niže vrednosti normalno susreću kod dece (34, 62). Po pitanju ovog parametra, uočene su i značajne rasne razlike što je objašnjeno različitom građom lobanje. Crna rasa ima fiziološki najveće vrednosti proptoze, dok azijati imaju najniže (63). Usko povezani sa pojavom retrakcije kapaka i proptoze su i lagofthalmos (nemogućnost zaklapanja kapaka), kašnjenje jednog kapka i odsustvo Belovog fenomena koji predstavlja odsustvo prirodnog refleksa pomeranja oka na gore prilikom zatvaranja oka. Ovi znaci GO dovode do povećane izloženosti rožnjače i posledične podložnosti za razvoj keratitisa i ulcera rožnjače (56).

Znaci inflamacije mekih tkiva se javljaju kod 34-72% pacijenata i obuhvataju: otok i crvenilo kapaka, crvenilo konjunktiva, otok plike i karunkula, hemozu (otok konjunktiva) (56). Inflammatory znaci GO, zajedno sa retrakcijom kapaka i proptozom, u različitoj meri narušavaju periorbitalnu estetiku i odgovorni su za nastanak karakterističnog izgleda ovih pacijenata (64). Kod velikog broja pacijenata je prisutno i ograničenje motiliteta očiju (do 50% pacijenata) koje se može proceniti sekundarno, na osnovu stepena diplopija ili direktnim merenjem stepena restrikcije pokretljivosti očnih mišića (restrikcija motiliteta veća od 8 stepeni je značajna) (58, 65, 66). Iako je procena diplopija uobičajena surogat metoda za određivanje stepena disfunkcije ekstraokularnih mišića, adekvatna klinička evaluacija zahteva primenu obe metode, s obzirom da restrikcija motiliteta ne izaziva pojavu diplopija u svim slučajevima (56).

1.6. Klinička evaluacija Graves-ove orbitopatije

Dijagnoza GO se postavlja na osnovu kombinovanog endokrinološkog i oftalmološkog specijalističkog pregleda, ultrazvučnog pregleda štitaste žlezde, ultrazvuka, CT/MR orbite i rutinskih laboratorijskih ispitivanja tiroidne funkcije i tiroidne autoimunosti. Pored inicijalnog postavljanja dijagnoze, klinička evaluacija GO podrazumeva i definisanje stepena aktivnosti i težine GO, koji predstavljaju fundamentalne kliničke parametre ove bolesti. Procena aktivnosti i težine se izvodi pregledom niza oftalmoloških znakova i simptoma, u skladu sa važećim

smernicama Evropskog tiroidnog udruženja (*European thyroid association*, ETA) i Evropske grupe za GO (*European group on Graves' orbitopathy*, EUGOGO) (56, 67). Definisanje stepena aktivnosti i težine je važno pošto ukazuje na fazu razvoja GO i krucijalno je za formulisanje odgovarajućeg terapijskog režima (34). Terapijski pristupi lečenju GO obuhvataju primenu medikamentozne, imunomodulatorne terapije i rehabilitativnih hirurških procedura. Primena imunomodulatornih lekova može biti efikasna isključivo u aktivnoj fazi bolesti, odnosno ukoliko je prisutna inflamacije mekih tkiva orbite, a verovatnoća za efikasnost ovog vida terapije se smanjuje sa dužinom trajanja simptoma (uspešnost je najveća u prvih 18 meseci od pojave simptoma) (67). Subjektivna percepcija bolesti takođe predstavlja važan faktor, zbog čega su u kliničku upotrebu uvedeni upitnici koji ocenjuju stepen kvaliteta života pacijenata (8, 9).

1.6.1. Aktivnost Graves-ove orbitopatije

Aktivnost je definisana inflamatornim procesima unutar orbite i kao takva podložna je promeni, bilo da je u pitanju spontana inaktivacija orbitopatije (u manjem broju slučajeva) ili posledica primene imunomodulatornih lekova (uglavnom glukokortikoida) (56). U aktivnoj fazi bolesti postoji najveća verovatnoća da će pacijent ispoljiti klasične simptome GO, kao i da će doći do pogoršanja već postojećih manifestacija bolesti (34). Stepenn orbitalne inflamacije nije moguće izmeriti direktno, već se procena aktivnosti GO izvodi pomoću komparativnog atlasa sa fotografijama u boji, Jane A Dickinson (56), a aktivnost boduje pomoću zbira kliničke aktivnosti (*engl. Clinical Activity Score, CAS*). Ovaj sistem uveli su u kliničku praksu Morits i saradnici (68) 1989. godine. Procena znakova inflamacije mekih tkiva je u velikom stepenu subjektivna i zavisi isključivo od stručnosti kliničara zbog čega postoji stalna tendencija za standardizacijom ovih procedura i uvođenjem objektivnih i preciznih, kako dijagnostičkih, tako i laboratorijskih, merljivih markera. Tehnika MR se takođe pokazala korisnom u proceni aktivnosti GO, ali je dostupnost i cena ove metode još uvek problematična, te nije primenjiva za rutinsku upotrebu (67). Uvođenje komparativnog atlasa u praksu je u znatnoj meri unapredilo reproducibilnost procene aktivnosti GO, ali i dalje postoji velika potreba za unapređenjem i objektivizacijom ovog kliničkog postupka (69).

1.6.2. Težina Graves-ove orbitopatije

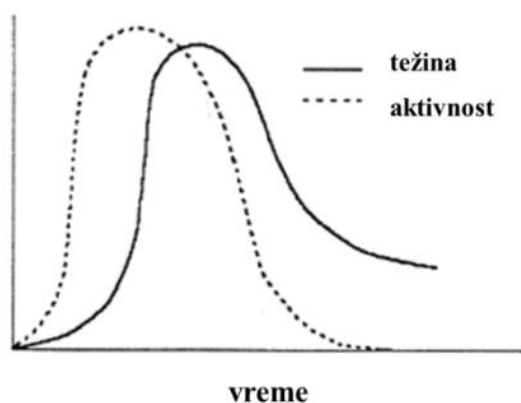
Težina GO se odnosi na stepen funkcionalnog defekta i promene fizičkog izgleda pacijenta u bilo kom stadijumu bolesti. Težina obuhvata primarne poremećaje na nivou orbitalnog adipoznog, vezivnog tkiva i ekstraokularnih mišića, kao i sekundarne promene, kao što su oštećenje rožnjače i kompresija optičkog nerva (56). Danas se težina GO uglavnom klasifikuje na osnovu aktuelnih EUGOGO preporuka (67), a razvijeno je nekoliko sistema klasifikacije. Jedan od najznačajnijih bodovnih sistema je NO SPECS (*Tabela 1*), a u upotrebi su i VISA i totalni očni skor (*engl. Total Eye Score, TES*) (70-73).

Tabela 1. Modifikovana NO SPECS klasifikacija. Preuzeto iz: *Bartalena L, Kahaly GJ, Baldeschi L, Dayan CM, Eckstein A, Marcocci C. The 2021 European group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) clinical practice guidelines for the medical management of Graves' orbitopathy. Eur J Endocrinol 2021;185(4): G43–67.*, sa modifikacijom

Klasa	Stepen
0	Bez fizičkih znakova i simptoma
I	Samo znaci
II	Zahvaćenost mekih tkiva <ul style="list-style-type: none"> o. Odsutna a. Minimalna b. Umerena c. Izražena
III	Proptoza <ul style="list-style-type: none"> o. Odsutna a. Minimalna b. Umerena c. Izražena
IV	Zahvaćenost ekstraokularnih mišića <ul style="list-style-type: none"> o. Odsutna a. Ograničenje pokreta pri ekstremnim pogledima b. Očigledno ograničenje motiliteta c. Fiksirana jedna ili obe očne jabučice
V	Zahvaćenost rožnjače <ul style="list-style-type: none"> o. Odsutna b. Stippling of the cornea c. Ulceracija d. Zamućenje, nekroza, perforacija
VI	Gubitak vida (usled kompresije optičkog nerva) <ul style="list-style-type: none"> o. Odsutan b. Oštrina vida 0,63-0,5 c. Oštrina vida 0,4-0,1 d. Oštrina vida <0,1-bez percepcije svetlosti

1.7. Prirodni tok Graves-ove orbitopatije

GO uglavnom predstavlja hronično stanje u kome se smenjuju periodi remisije i relapsa. Tok GO je prvi opisao Rundle 1944. godine i može se podeliti u četiri faze (74). Inicijalna faza GO se karakteriše aktivnom inflamacijom i progresivnim pogoršanjem simptoma, te se naziva i aktivna progresivna ili dinamička faza GO. Ova faza bolesti je obično akutnog karaktera, a prati je stabilizacija aktivnosti orbitopatije. Nakon dostizanje platoa, dolazi do postepenog poboljšanja kliničkih simptoma i eventualne inaktivacije bolesti. Ovo je treća faza, odnosno faza stabilizacije ili remisije GO. Obično je za inaktivaciju potrebno od 18 do 24 meseca, mada se javlja i kasna reaktivacija bolesti. Četvrta faza GO je statična, odnosno neaktivna faza u kojoj je došlo do povlačenja simptoma i znakova inflamacije, međutim kod velikog broja pacijenata razvijaju se hronične, rezidualne posledice (4, 5, 75). Hronične karakteristike (fibroza tkiva, smanjen motilitet ekstraokularnih mišića, duple slike) su posledica fibroze ekstraokularnih mišića koja nastaje kao rezultat inflamacije, a može biti potencijalno ireverzibilna u slučaju višestruke reaktivacije bolesti. Ove karakteristike definišu težinu orbitopatije koja je hroničnog karaktera, a nastupa nakon akutne faze progresije i remisije GO koja je ukrštena sa aktivnošću bolesti (Slika 2) (56).



Slika 2. Vremenska povezanost između aktivnosti i težine GO. Preuzeto iz: Dickinson AJ, Perros P. *Controversies in the clinical evaluation of active thyroid-associated orbitopathy: use of a detailed protocol with comparative photographs for objective assessment.* Clin Endocrinol (Oxf) 2001;55(3):283–303., sa modifikacijom

1.8. Patogeneza Graves-ove orbitopatije

1.8.1. Autoimuna osnova Graves-ove orbitopatije i uloga TSH receptora

Prekretnica u današnjem razumevanju etiologije GO i GB je bilo otkriće njihove zajedničke autoimune osnove. Danas se antitela na TSH receptore (TSHRA_t) smatraju glavnim krivcima odgovornim za pokretanje patogenetskih mehanizama unutar tiroidnog i orbitalnog tkiva koji uzrokuju karakteristične hormonske i inflamatorne promene (76). Kao glavni antigen za koji se ova autoantitela vezuju, izdvaja se TSH receptor (TSHR) lokalizovan na folikularnim ćelijama štitne žlezde i orbitalnim fibroblastima, specifičnim target ćelijama u orbitalnom tkivu. Aktivacijom ovog receptora na površini tiroidnih ćelija dolazi do njihove nekontrolisane, kontinuirane stimulacije i hiperplazije, sa posledičnom pojačanom produkcijom i lučenjem tiroidnih hormona. Autoimuna stimulacija orbitalnih ćelija pokreće niz promena na nivou vezivnog tkiva orbite i stvara specifičnu inflamatornu sredinu u okviru ovog prostora (1). Opšte prihvaćena hipoteza je da je TSHR ključni autoantigen u osnovi oba autoimuna poremećaja, kako autoimunog hipertiroidizma, tako i GO (77). Detekcijom TSHR iRNK (informaciona ribonukleinska kiselina) definitivno je dokazano njegovo prisustvo u orbitalnom tkivu, a zajednička imunoreaktivnost na ovaj receptor potvrđena je razvojem animalnih modela GB i GO, na kojima je uočena istovremena ekspresija ovog receptora na tireocitima i orbitalnim fibroblastima (78-80).

TSHR je hormonski receptor, glikoproteinske strukture, koji pripada familiji G-protein kuplovanih receptora. Fiziološki agonista ovog receptora je TSH koga sekretuju tireotropne ćelije adenohipofize, sa centralnom ulogom u regulaciji tiroidne funkcije. TSH je glavni regulator normalnog rasta ćelija štitne žlezde i sekrecije tiroidnih hormona (81). Utvrđeno je da ekspresija TSHR nije isključivo ograničena na tiroidno tkivo, već da je TSHR široko rasprostranjen u organizmu, uključujući: orbitalno i koštano tkivo, mlečne žlezde, kardiomiocite, kožu, ovarijume, ćelije imunog sistema, adipoznog tkiva, itd. Njegova tačna uloga u netiroidnim tkivima još uvek nije u potpunosti poznata, a pretpostavlja se da je TSHR uključen u modulaciju brojnih ćelijskih procesa i diferencijacije tkiva (82). Heterogena konstitutivna ekspresija TSHR jednim delom objašnjava blagu sistemsku inflamaciju vezivnog tkiva u GB, za koju se

pretpostavlja da je predispozicija za razvoj kaskade procesa koja vodi nastanku ekstratiroidnih manifestacija (83). U prilog ovome ide i činjenica da je dokazano da je slobodna α -subjedinica ovog receptora mnogo potentniji inicijator autoimunih procesa, kako u štitnoj žlezdi, tako i u orbitalnom tkivu (84).

U AITD, uključujući autoimuni hipertiroidizam (GB) i autoimuni hipotiroidizam (HT), TSHR, zajedno sa TPO i tireoglobulinom (TG), predstavlja glavnu metu autoreaktivnih T-limfocita i antitela. Iako se autoimunost na ovaj receptor smatra ekskluzivnom biohemijskom karakteristikom GB i njenih ekstratiroidnih manifestacija, određen stepen preklapanja sa drugim AITB postoji, što se potencijalno može objasniti ukrštanjem autoimunih procesa i bliskom patogenetskom osnovom ovih bolesti. Antitela na TPO (TPOAt) i TG (TGAt) predstavljaju klasične biomarkere HT, međutim njihovo istovremeno prisustvo sa TSHRAAt u serumu pacijenata sa GB nije retkost (83, 85, 86). S druge strane, TSHRAAt su detektabilna kod većine pacijenata sa GB, a značajno ređe kod pacijenata sa HT (87). Potencijalno objašnjenje ovog fenomena pružaju animalni modeli GB na kojima je dokazano da se indukcijom autoimunog odgovora na TSHR može stimulisati intermolekularno širenje TSHRAAt, odnosno interakcija ovih antitela sa drugim receptorima tiroidne žlezde (TPO i TG), sa posledičnom pojačanom limfocitnom infiltracijom, destrukcijom tiroidnog tkiva i prelasakom iz autoimunog hipertiroidizma u hipotiroidizam (85). Važno pitanje koje se postavlja je to da li ova autoantitela imaju i dodatnu ulogu antigenprezentujućih ćelija u tiroidnoj autoimunosti čime se stvara začarani krug inflamatornih reakcija (83). Graves-ova bolest i HT se mogu posmatrati kao dve strane iste medalje, pri čemu je u oba slučaja moguća pojava ekstratiroidnih manifestacija (85).

Tačni mehanizmi koji objašnjavaju orbitalnu inflamaciju i ostale ekstratiroidne manifestacije još uvek nisu u potpunosti poznati, kao ni njihov odnos sa procesima koji se dešavaju u štitnoj žlezdi. Kao potencijalna objašnjenja izdvajaju se sistemska inflamacija vezivnog tkiva prisutna u GB, specifičan lokalni fenotip i potencijalni dodatni lokalni autoantigeni (83, 88). Jedna od hipoteza koja objašnjava zajedničku pojavu GO i pretibijalne dermopatije, kao i njihove vrlo slične histopatološke karakteristike, je jedinstvena anatomska građa i karakteristike donjih ekstremiteta i orbite. Fiksne granice orbite čine ovaj prostor podložnim za smanjenje limfnog i venskog protoka, dok se isto dešava u donjim ekstremitetima dejstvom gravitacionih sila usled produženog stajanja. Moguće je i da su specifičnosti u anatomske građi orbite ili krvnih i

limfnih sudova pojedinca individualna predispozicija za razvoj ovih poremećaja. Nije definitivno da li su anatomske karakteristike odgovorne za nastanak ili za progresiju GO i pretibijalne dermatopatije usled smanjenog klirensa medijatora inflamacije (88).

1.8.2. Histološke i mehaničke karakteristike Graves-ove orbitopatije

Patološki procesi u orbiti obuhvataju inflamaciju i remodelovanje orbitalnog tkiva. Mehaničko objašnjenje za pojavu kliničkih manifestacija GO pruža uvećanje ekstraokularnih mišića i adipoznog tkiva orbite (88). Step en ekspanzije tkiva je moguće direktno izmeriti primenom tehnika CT ili MR (89). Pretpostavlja se da su TSHRA t glavni pokretači metaboličkih promena u orbiti koji vezivanjem za receptore na orbitalnim fibroblastima dovode do proliferacije kolagena i adipocita, i posledičnog razvoja edema (76). Kod mlađih pacijenata je pojačana adipogeneza predominantna anatomska promena, dok se kod starijih pacijenata češće razvija prekomerna ekspanzija mišićnog tkiva i fibrozne promene (90). U oba slučaja oticanje tkiva u okviru orbite koja predstavlja jedan fizički ograničen, nefleksibilan prostor, dovodi do porasta pritiska i posledičnih kliničkih manifestacija bolesti (kompresija mekog tkiva orbite sa sekundarnim smanjenjem venske drenaže, kompenzatorna protruzija očnih jabučica, bolovi i potencijalna kompresija i oštećenje optičkog nerva (91). Periorbitalni edemi i hemoza su uglavnom posledice smanjene venske drenaže iz orbite. Restrikcija pokretljivosti orbitalnih mišića je posledica inflamacije, uvećanja i fibroze mišićnog tkiva (90).

Istraživanja ukazuju na to da su orbitalni fibroblasti glavne mete autoimunog napada i inicijatori kaskade patofizioloških procesa unutar orbite. Kod osoba sa GO uočeno je pojačano stvaranje ovih ćelija u orbitalnom tkivu u poređenju sa zdravim ispitanicima, kao i ushodna regulacija TSHR (92). Njihova proliferacija se smatra odgovornom za evoluciju remodelovanja tkiva i razvoja fibroze koja postaje evidentna tokom neaktivne faze bolesti. In vitro studije su pokazale da se stimulacijom ovih ćelija postiže isti skup metaboličkih promena odgovornih za ekspresiju GO. Smatra se da je specifičan fenotip fibroblasta uključen u mehanizam nastanka i progresije GO, sa funkcionalnim karakteristikama koje ih čine podložnim za prekomerni inflamatorni odgovor (93).

Histopatološke analize orbitalnog vezivnog tkiva pacijenata sa GO detektovale su lokalnu limfocitnu infiltraciju i visok nivo glikozaminoglikana (GAG), predominantno hijaluronske kiseline. GAG predstavljaju specifičnu grupu ugljenohidratnih, visoko hidrofилnih molekula koji dovode do hidratacije i posledičnog mnogostrukog uvećanja volumena kolagena i adipoznog tkiva odgovornog za razvoj klasičnih simptoma bolesti (93). Glavno histopatološko obeležje vezivnog tkiva pacijenata sa GO je akumulacija hijaluronske kiseline. Fibroblasti su glavni izvor hijaluronske kiseline i drugih GAG (hondroitin sulfat, heparin, itd.) (94, 95). Eksperimentalno je dokazano da, kada se tretiraju inflamatornim citokinima, kulture orbitalnih fibroblasta pokazuju višestruko povećanje sinteze hijaluronske kiseline, za razliku od dermalnih fibroblasta (96). Fenotipska karakteristika orbitalnih fibroblasta je i nedostatak hijaluronidaze, enzima neophodnog za razgradnju hijaluronske kiseline, što doprinosi lokalnoj akumulaciji ovog molekula u orbiti (90).

Osim posredstvom GAG, uvećanje adipoznog tkiva jednim delom potiče i od *de novo* adipogeneze, odnosno diferencijacije specijalizovane subpopulacije orbitalnih fibroblasta (preadipocita) pod specifičnim adipogenim uslovima (91). Na ovakav zaključak je uputila opservacija pojačane proptoze kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip II, tretiranih agonistom PPAR- γ receptora koji je potentan stimulator adipogeneze (97).

1.8.3. Imunološki procesi unutar orbite

Inflamacija orbitalnog tkiva posredovana je dejstvom ćelijskog i humoralnog imunog odgovora organizma (*Slika 3*). Karakteriše se lokalnom infiltracijom T limfocita (CD4+ i CD8+), B limfocita, mast ćelija i makrofaga. Predominantne T limfocite u orbitalnom tkivu čine CD4+ ćelije koje u ranoj fazi bolesti iniciraju prevashodno Th-1 (*engl. T-helper type-1*) ćelijski odgovor, sa karakterističnim Th-1 profilom citokina, dok je Th-2 (*engl. T-helper type-2*) odgovor odgovoran za remisiju GO (98). Grubeck-Loebenstein i saradnici (99) su utvrdili da se T limfoci vezuju za orbitalne fibroblaste putem klase II glavnog kompleksa histokompatibilnosti (*engl. Major Histocompatibility complex type II, MHC class II*), dok ekstrakte mišićnih ćelija ne prepoznaju. Povišena ekspresija HLA-DR na orbitalnim fibroblastima detektovana je u svim fazama GO, što ukazuje na njihovu ulogu antigen-prezentujućih ćelija (100).

Fibroblasti učestvuju u inicijaciji inflamatornih procesa u orbiti kroz ekspresiju receptora, adhezionih molekula, kao i stimulaciju sinteze citokina i hemokina (91). Proinflamatorni citokini koordiniraju dalji razvoj inflamatornih procesa, kroz indukciju imunomodulatornih molekula, IL-6 (interleukin-6), IL-8 (interleukin-8), IL-16, RANTES (*engl. Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), transformišućeg faktora rasta (*engl. Transforming Growth Factor, TGF*) i prostaglandina E2 (PGE2). IL-16 i RANTES su potentni hemoatraktanti koji stimulišu dalju regrutaciju aktiviranih T-limfocita, dendritskih ćelija i makrofaga i olakšavaju lokalnu infiltraciju imunskim ćelijama (88). Utvrđeno je da aktivirani T-limfociti dodatno sintetišu leukoregulin, citokin koji stimuliše sintezu hijaluronske kiseline (101). Studije su pokazale da citokini pojačavaju orbitalnu inflamaciju direktnom lokalnom stimulacijom orbitalnih fibroblasta (102). Kod pacijenata sa GO takođe je dokazana supresija T-regulatornih ćelija što doprinosi nedostatku prirodnih mehanizama tolerancije i supresije inflamatornih procesa (103).

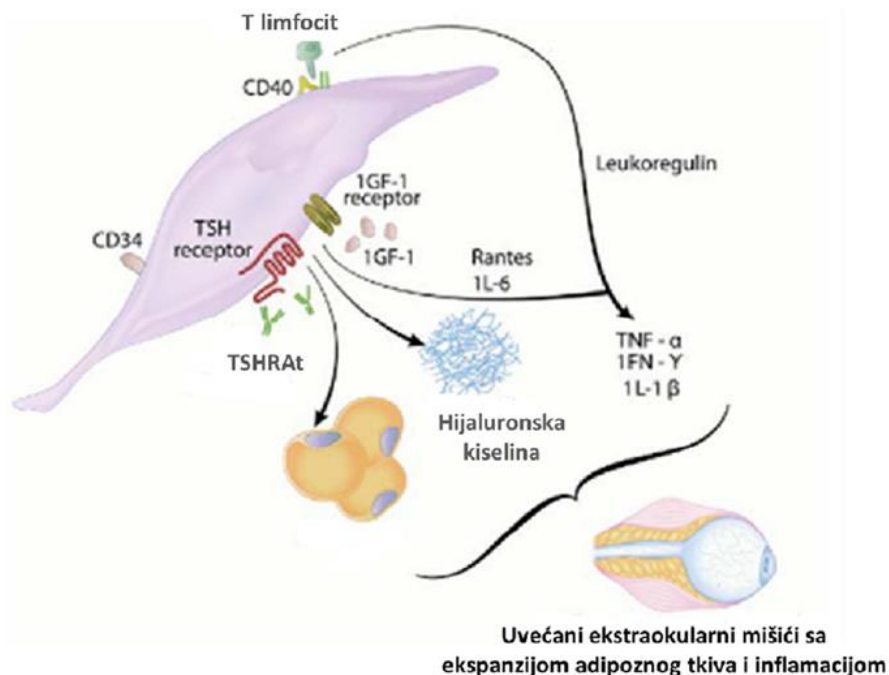
Pojačana adipogeneza, ushodna regulacija proinflamatornih citokina, faktora rasta i adhezionih molekula unutar orbite dovode do povećane ekspresije TSHR i proliferacije orbitalnih fibroblasta, što stvara uslove za stvaranje mehanizma pozitivne sprege i daljeg perpetuiranja bolesti (104).

Pitanje koje ostaje da se razreši budućim studijama jeste da li je važnija uloga lokalnog ćelijskog imuniteta, sa produkcijom proinflamatornih citokina ili direktnog humoralnog odgovora u patogenezi GO.

1.8.4. Antigenski kandidati unutar orbite

Koncept autoimune reakcije na TSHR ne može u potpunosti da objasni sve patološke procese unutar orbite i smatra se da oni nastaju kao rezultat delovanja većeg broja antigena i ukrštene reaktivnosti antigena između tiroidnog i orbitalnog vezivnog tkiva. Predloženo je nekoliko verovatnih antigenskih kandidata, a brojna istraživanja novih potencijalnih receptora se i dalje sprovode. Tireoglobulin je predložen kao potencijalni antigen čije je prisustvo dokazano u adipoznom tkivu orbite, a potvrđeno tiroidno poreklo s obzirom na sadržaj tiroksina (T4). Ipak, nekoliko studija je pokazalo da ne postoji korelacija između ovog molekula i GO, te se smatra da

on predstavlja samo jedan od kofaktora u kompleksnoj mreži procesa koji se odvijaju unutar ovog prostora (105). Istraživanja su obuhvatila i nekoliko proteina ekstraokularnih mišića (G2 protein, kalsekvestrin, flavoproteinska jedinica sukcinat-dehidrogenaze (SDH), sarkolumenin, itd.), ali nije sigurno da li oni imaju definisanu ulogu u nastanku GO ili samo reflektuju inflamaciju i oštećenje tkiva, pa kao takvi predstavljaju potencijalne biomarkere ove bolesti (106, 107). Prethodne studije ukazuju i na koekspresiju TSHR i receptora za insulinu sličan faktor rasta (*engl. Insulin-like Growth Factor, IGF-1*) na limfocitima i specijalizovanom podskupu fibroblasta (Slika 3) (108). Prva zapažanja ovog fenomena objavili su Tramontano i saradnici koji su uočili da je za potpuni efekat TSH i autoantitela neophodan dodatak IGF-1 (109). U prilog tome da IGF-1R i TSHR stvaraju funkcionalni kompleks govori studija Tsui i saradnika (110) koji su utvrdili da se blokiranjem IGF-1R ujedno blokira i TSHR i TSHRA_t signalizacija.



Slika 3. Šematski prikaz patofizioloških procesa u GO. Preuzeto iz: Bahn RS. *Current Insights into the Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy*. *Horm Metab Res* 2015;47(10):773–8., sa modifikacijom

1.8.5. Tiroidno-orbitalna veza: moguće hipoteze

Osim autoantigena koje prepoznaju T limfociti i antitela tiroidnog autoimuniteta, postoji nekoliko mogućih hipoteza kojima se objašnjava koncept tiroidno-orbitalne povezanosti GB i GO: jedinstveni lokalni uslovi, pre svega specifičan fenotip orbitalnih fibroblasta, razmena antigen-prezentujućih ćelija između štitne žlezde i orbite putem zajedničkih limfnih čvorova, kao i polimorfizam CTLA-4 gena za koji je utvrđeno da je povezan sa predispozicijom za razvoj GO (111). CTLA-4 je molekul koji učestvuje u modulaciji T-ćelijskog odgovora, odnosno interakciji T limfocita i antigen-prezentujućih ćelija (91, 102).

1.9. Anti-TSHR antitela

1.9.1. Uloga TSHRA_t u patogenezi Graves-ove orbitopatije

Skoro 7 decenija od kada su Adams i Purves (22) prvi put uočili postojanje autoreaktivnih TSHRA_t, njihova uloga u patofiziološkom mehanizmu nastanka prvenstveno AITB, ali i drugih patologija, je predmet istraživanja u različitim poljima biomedicinskih nauka. Eksperimentalni dokazi ukazuju na njihovu krucijalnu ulogu u započinjanju i progresiji AITB, prvenstveno GB. TSHRA_t predstavljaju specifične biomarkere tiroidnog autoimuniteta, ali i sistemske i lokalne inflamacije tkiva u kojima je pojačana ekspresija TSHR (112, 113).

Na nivou štitne žlezde, TSHRA_t stimulišu sintezu jodiranog tireoglobulina i posledične sekrecije tiroidnih hormona. Pored toga što ispoljavaju aktivnost koja je slična metaboličkoj aktivnosti TSH, ova antitela pokazuju i specifične osobine, uključujući značajno produženu aktivnost u poređenju sa ovim hormonom (81). Odavde potiče njihov originalni naziv, dugodelujući tiroidni stimulatori (LATS), kako su ih prvobitno definisali Adams i Purves (22).

Prvi koji su razvili animalni model GB, sa karakterističnim simptomima hipertiroidizma i povećane koncentracije TSHRA_t bili su Shimojo i saradnici (114). Primarno se smatralo da je uloga TSHRA_t isključivo ograničena na tiroidno tkivo. Intenzivne eksperimentalne studije su dovele do toga da je koncept specifičnih tiroidnih autoantitela naknadno proširen i na njihove

efekte na nivou drugih tkiva, primarno orbitopatije i pretibijalne dermatopatije (115). Rotella i saradnici (116) su primetili da imunoglobulini izolovani iz seruma pacijenata sa GB izazivaju pojačanu sintezu kolagena u kulturama fibroblasta kože. Na ovo su se nadovezali Smith i saradnici (117) koji su utvrdili da TSHRA_t pacijenata sa GB izazivaju pojačanu sintezu hijaluronske kiseline u orbitalnim fibroblastima osoba sa GO, dok ovaj efekat izostaje u fibroblastima zdravih individua. Naknadno je dokazano da se ovaj efekat TSHRA_t postiže ushodnom regulacijom enzima hijaluron-sintaze u ovim ćelijama (118, 119). Utvrđeno je da TSHRA_t svoj efekat na nivou orbitalnog tkiva postižu i putem ushodne regulacije adipogeneze, što je dokazano na osnovu pojačane ekspresije adiponektina i lektina, kao i lokalne akumulacije adipocita nakon dodatka ovih antitela kulturama orbitalnih fibroblasta (120). Najznačajniji dokaz primarne uloge TSHR i TSHRA_t dali su Moshkelgoshia i saradnici (78) koji su razvili prvi uspešan animalni model GO, sa razvojem karakterističnih simptoma orbitopatije kod genetski imunizovanih miševa humanim rekombinantnim TSHR. Kliničke manifestacije GO, kao i lokalna infiltracija orbitalnog tkiva T-limfocitima, makrofagama i mast ćelijama, bile su slične onima koje su prisutne kod ljudi. Životinje su razvile antitela različite biološke aktivnosti i posledično simptome hipertiroidizma ili hipotiroidizma na nivou štitne žlezde.

TSHRA_t su merljiva kod većine pacijenata sa GB i manifestovanom orbitopatijom, a značajno ređe kod eutiroidnih i pacijenata sa autoimunim hipotiroidizmom (87, 121, 122). U serumu zdravih osoba do sada nije detektovano prisustvo ovih antitela što takođe potvrđuje zaključke o njihovoj ulozi u AITB i njihovim ekstratiroidnim manifestacijama (123, 124). Dosadašnje kliničke studije su pokazale da su nivoi TSHRA_t u pozitivnoj korelaciji sa kliničkim karakteristikama GO, a povećana ekspresija TSHR u orbitalnom tkivu je u najvećem stepenu bila ispoljena kod pacijenata sa aktivnom formom bolesti (122, 125). Studija praćenja pacijenata sa GO je utvrdila da je visok titar TSHRA_t samostalan faktor rizika za razvoj teškog oblika GO, te da u ranoj fazi bolesti ukazuju na lošu prognozu. Ispitivanje prognostičkog potencijala biomarkera GO je izrazito važno, s obzirom na nepredvidljiv karakter kliničkog toka GO, visok stepen lošeg odgovora na terapiju, kao i potrebu za dugotrajnim praćenjem pacijenata (126).

TSHRA_t su oligoklonska antitela većinski IgG1 subklase (127). Utvrđeno je da TSHRA_t dele slične karakteristike sa autoreaktivnim antitelima koja su specifična za druge autoimune bolesti, npr. sklerodermu (sistemska skleroza) (128, 129). TSHRA_t ispoljavaju heterogenu biološku

aktivnost, a ova njihova karakteristika je upotrebljena za dizajn novih metodologija određivanja i prepoznata kao fundamentalna za dalja istraživanja i eventualno razjašnjenje ove kompleksne patologije (81, 124, 127). Funkcionalna frakcija ovih antitela ne vrši destrukciju ćelija, već ometa njihov metabolizam i posledično narušava funkciju. Klasifikacija TSHRt se zasniva na sposobnosti mimikrije TSH koji je prirodni ligand TSHR i svoju funkciju ispoljava posredstvom cikličnog adenozin monofosfat (cAMP) puta signalizacije. Razlikuju se tri klase TSHRAt: stimulaciona, blokirajuća i neutralna (130, 131). Stimulatorna antitela stimulišu cAMP-posredovan signal i aktivacijom TSHR izazivaju hipertiroidizam na nivou štitne žlezde i orbitopatiju na nivou orbite. Blokirajuća antitela blokiraju cAMP signalni put ili direktnom fizičkom blokadom vezivanja TSH za receptor ili vezivanjem za epitope TSHR odgovornih za inhibiciju stvaranja cAMP-a. Kao posledica njihovog dejstva na nivou štitne žlezde nastaje atrofični hipotiroidizam, dok na nivou orbitalnog tkiva efekat još uvek nije razjašnjen (132). Neutralna antitela se vezuju za TSHR bez uticaja na vezivanje prirodnog liganda i cAMP put signalizacije, a njihova tačna uloga još uvek nije poznata. Postoje dokazi koji ukazuju na to da neutralna antitela ostvaruju svoj efekat indukcijom alternativnih puteva signalizacije što rezultuje nastankom apoptoze (133).

1.9.2. Nomenklatura TSHRAt

U literaturi se susreću brojni termini kojima se opisuje ova heterogena grupa antitela, zavisno od vrste metodologije koja se koristi za njihovo određivanje, proizvođača testova, regiona i autora, što dodatno doprinosi kompleksnosti njihovog izučavanja. Za kliničare je izuzetno važno da budu upoznati sa aktuelnom nomenklaturom s obzirom na to da izbor odgovarajućeg parametra i metode kojom će se isti kvantifikovati uveliko može da utiče na kliničku odluku (132). Osnovna razlika u terminima koji se koriste za imenovanje ovih antitela je u tome da li se odnose na njihovu ukupnu koncentraciju ili funkcionalnu aktivnost, kao i šta se tačno meri primenjenom analitičkom metodom. TSHRAt (*engl. Thyroid Stimulating Hormone-Receptor Antibody, TSH-R-Ab*), alternativno TRAt (*engl. Thyrotropin Receptor Antibody, TRAb*), je opšti termin koji se koristi za označavanje ukupnih TSH receptorskih antitela, nevezano za njihovu funkciju, niti vrstu upotrebljene metode za njihovo određivanje. TSH vezujući inhibitorni imunoglobulini (*engl. TSH-Binding Inhibiting Immunoglobulin, TBII*) predstavljaju ukupnu koncentraciju

TSHRA_t, odnosno sumu stimulatornih, blokirajućih i neutralnih antitela. TBII se obično mere primenom kompetitivnih imunohemijskih testova vezivanja za TSHR, odakle potiče njihov naziv. Ovaj parametar ne može da ukaže na funkcionalnost TSHRA_t, već samo na njihovo prisustvo u serumu. Termini u upotrebi kojima se opisuje stimulatorna aktivnost TSHRA_t su TSHR stimulatorna antitela ili imunoglobulini (*engl. TSH-R-Stimulating Antibody or Immunoglobulin, TSA_b or TSI*), dok je blokirajuća aktivnost označena kao TSHR blokirajuća antitela ili imunoglobulini (*engl. TSH-R-Blocking Antibody or Immunoglobulin, TBA_b or TBI*). Alternativni naziv za blokirajuća antitela je i TSHR stimulirajuće blokirajuće antitelo (*engl. TSH-R-Stimulating Blocking Ab, TRBA_b*) (131, 132). Konsenzus što se tiče nomenklature još uvek nije uspostavljen, mada postoje tendencije ka tome da terminologija bude što uniformnija. U ovoj disertaciji će se upotrebljavati sledeći nazivi: TSHRA_t kao opšti naziv ovih autoreaktivnih antitela, TBII za ukupnu koncentraciju TSHRA_t, TSA_b za antitela sa stimulatornom aktivnošću i TBA_b za antitela sa blokirajućom aktivnošću.

1.9.3. Stimulatorna i blokirajuća TSHRA_t (TSA_b i TBA_b)

Stimulatorna klasa TSHRA_t se smatra glavnim obeležjem i uzročnikom GB, a brojne studije su pokazale značaj njihovog određivanja prilikom praćenja toka bolesti i efekta antitiroidne terapije, kako u adultnoj, tako i u dečijoj populaciji (134, 135). Utvrđeno je da njihova produkcija zavisi od cirkulišućih T ćelija koje prepoznaju različite epitope TSHR (76). Dok je uloga TSA_b u nastanku GB u velikoj meri poznata, još uvek nije utvrđeno da li ova grupa antitela učestvuje u iniciranju ili progresiji remodelovanja orbitalnog tkiva (90, 102, 136). Dosadašnji literaturni podaci ukazuju na to da je nivo TSA_b usko povezan sa kliničkom prezentacijom GO (137).

Prisustvo TSHRA_t sa blokirajućim dejstvom na vezivanje TSH za receptor prvi su detektovali i opisali Endo i saradnici (138), u serumu pacijenata sa HT. Ova grupa istraživača iz Japana je primetila da jedan deo IgG frakcije imunoglobulina koji inhibira vezivanje TSH poseduje jedinstvene karakteristike u tom smislu da ne izaziva stimulaciju tiroidnih ćelija i inhibira TSH indukovano stvaranje cAMP-a. Svoja zapažanja su objasnili dvojakom funkcijom TSHRA_t koja može objasniti rezistenciju na delovanje TSH i razvoj hipotiroidizma. Ista grupa istraživača je

detektovala prisustvo ovih antitela i u serumu pacijenata sa primarnim miksedomom i kod hipotiroidnih novorođenčadi majki sa HT (139, 140).

Blokirajuća aktivnost TSHRA_t je dovedena u vezu sa nastankom prolaznog neonatalnog hipotiroidizma koji se razvija kao posledica transplacentalnog transfera blokirajućih antitela majke. Njihovo zajedničko prisustvo u serumu novorođenčadi i majki je detektovano u slučajevima neonatalnog i kongenitalnog hipotiroidizma (141, 142). Zanimljivo je da je kod određenog broja trudnica sa GB uočena promena aktivnosti TSHRA_t od stimulatorne ka blokirajućoj što je objašnjeno ulaskom u fazu remisije tokom trudnoće (143). Problematika ovog fenomena je to što tiroidni status novorođenčeta ne oslikava tiroidni status majke, pa se kod fetusa i novorođenčadi eutiroidnih majki mogu detektovati kako TSA_b tako i TBA_b koja mogu da izazovu fetalnu/neonatalnu tireotoksikozu ili hipotiroidizam. Iz ovih razloga, trudnoća kod žena koje imaju ili su imale AITB predstavlja izrazito zahtevnu kliničku situaciju i zahteva kontinuirano praćenje tiroidnog statusa i nivoa TSHRA_t. Određivanje TSHRA_t je naročito značajno i s obzirom na kontraindikovani radioizotopski pregled, kao i nestabilan hormonski i imunološki status u ovoj populaciji pacijentkinja (144, 145).

Iako se TBA_b primarno dovode u vezu sa hipotiroidizmom i pojavom HT, ova grupa antitela je takođe prisutna i kod jednog broja pacijenata sa GB, naročito tokom terapije antitiroidnim lekovima ili nakon primene radioaktivnog joda (146, 147). U skorijoj studiji Diane i saradnika koja je ispitivala prevalenciju TBA_b na velikom broju pacijenata sa AITB, potvrđeno je njihovo prisustvo kod 4,2% pacijenata sa GB i 9,3% pacijenata sa HT (148). U AITB TBA_b potencijalno igraju ulogu u fluktuaciji tiroidne funkcije čime se objašnjava eventualna slaba korelacija između tiroidnog statusa i titra ovih antitela u serumu (149). Potvrdu ove hipoteze dala je detekcija simultanog prisustva TSA_b i TBA_b u serumu istog pacijenta, kao i njihova tranzitorna priroda (150). Rezultujuće stanje zavisi od finog balansa između dve grupe TSHRA_t suprotnog dejstva: ukoliko stimulatorna aktivnost prevagne, rezultat je hipertiroidizam, ukoliko je blokirajuća aktivnost dominantna, posledica je hipotiroidizam (151, 152). Studije dugotrajnog praćenja pacijenata su pokazale da se spontani ulazak pacijenata u eutiroidno stanje uočava u slučaju prolazne blokirajuće aktivnosti, dok se hipotiroidno stanje hronično održava u slučaju perzistentne blokirajuće aktivnosti. Takođe je uočena tranzicija blokirajuće u stimulatornu TSHRA_t aktivnost, što je bilo u korelaciji sa prelaskom iz HT u GB (151, 153). Oko 30%

inicijalno hipertiroidnih pacijenata sa GB koji su primali antitiroidnu terapiju razvilo je TBAb tokom 13 godina praćenja. Pojava ovih antitela bila je usko povezana sa povoljnim odgovorom na terapiju kod ovih pacijenata, kao i sa bržim uspostavljanjem eutiroidnog statusa i ranim ulaskom u remisiju (154).

Jasna razlika u prirodi TSHRA_t i tačni faktori koji uslovljavaju njihovo profilisanje ka određenom biološkom fenotipu još uvek nisu u potpunosti poznati. Brojne eksperimentalne studije su ispitivale prirodu TSHR-TSHRA_t interakcije, preciznu lokalizaciju epitopa TSHR, kao i mehanizam indukcije, odnosno blokade signala (124). Za razliku od TSA_b čija je distribucija ograničena na IgG1 subklasu što ukazuje na njihovo oligoklonsko poreklo, TBAb nisu ograničena na jednu IgG subklasu i najverovatnije su poliklonske prirode (155).

Veliki napredak u razumevanju fiziologije i dinamike TSHRA_t, kao i prirode i kompleksnosti njihove interakcije sa TSHR, dao je razvoj sintetskih monoklonskih antitela na TSHR i praćenje mehanizama njihovog dejstva na kulturama ćelija i animalnim modelima. Ispitivanje interakcije sintetskih TSHRA_t sa TSHR na molekularnom nivou, njihovih vezujućih karakteristika i dejstva na konstitutivnu ekspresiju TSHR, omogućilo je bolje razumevanje razlika između pojedinih klasa ovih antitela (156-158). Prvobitno je 1989. godine kloniran TSHR što je bio preduslov za dalju izolaciju i kloniranje prvo mišjih, a zatim i humanih monoklonskih antitela, sa snažnom stimulatornom aktivnosti (M22) (159-162). Osim sticanja boljeg uvida u patofiziologiju autoimunih procesa u osnovi GO i AITB, razvoj humanih monoklonskih antitela omogućio je i veliki tehnološki napredak u razvoju nove generacije testova sa znatno poboljšanim analitičkim karakteristikama (163, 164).

Dve vrste humanih TBAb (5C9 i K1-70) je izolovano iz perifernih limfocita pacijentkinja sa postpartalnim tiroiditisom i istorijom AITB (150, 165). Zanimljiva je činjenica da je prilikom izolacije K1-70 TBAb, uspešno izolovano i TSA_b (K1-18), iz istog uzorka pacijenta. Ovo je direktan dokaz toga da serum pacijenata predstavlja heterogenu smešu TSHRA_t, suprotnih bioloških aktivnosti (150). Na kulturama ćelija koje ekspimiraju rekombinantni humani TSHR utvrđeno je da su TBAb, osim toga što blokiraju vezivanje i aktivnost TSH, takođe i potentni inhibitori TSA_b iz seruma pacijenata. Ova karakteristika TBAb je značajan potencijal za razvoj novih terapijskih pristupa lečenju GB i GO, kao i hipertiroidizma prouzrokovanog mutacijama TSHR (157). Rezultati *in vivo* studije u kojoj je ispitivan efekat K1-70 TBAb na tiroidnu

funkciju pacova, dokazali su da ova antitela izazivaju dozno-zavisnu supresiju slobodnog tiroksina (*engl. Free Thyroxine, FT4*), što ih čini pogodnim terapijskim kandidatima (166).

Studije koje su ispitivale efekat, afinitet i koncentraciju monoklonskih TSHRA_t dokazale su da ova antitela pokazuju sličan afinitet za vezivanje za TSHR, a da su epitopi koje prepoznaju blisko postavljeni i pokazuju visok stepen preklapanja (167-171). Dok TSA_b imaju samo stimulatornu, odnosno agonističku aktivnost, TBA_b mogu da deluju kao antagonisti (sprečavaju vezivanje prirodnog agoniste, TSH i TSA_b za receptor) i inverzni agonisti TSHR (suprimiraju bazalnu signalizaciju TSHR). I jedna i druga grupa antitela ispoljavaju svoje dejstvo pri niskim koncentracijama *in vivo* (172). Izrazit napredak u razumevanju složenih molekularnih procesa u osnovi interakcije TSHRA_t i TSHR postignut je izučavanjem kristalne strukture kompleksa TSHR-TSA_b čime je postavljen temelj za dizajn novih strategija u lečenju i kontroli AITB (173).

1.9.4. Epitopi i strukturne karakteristike TSHR

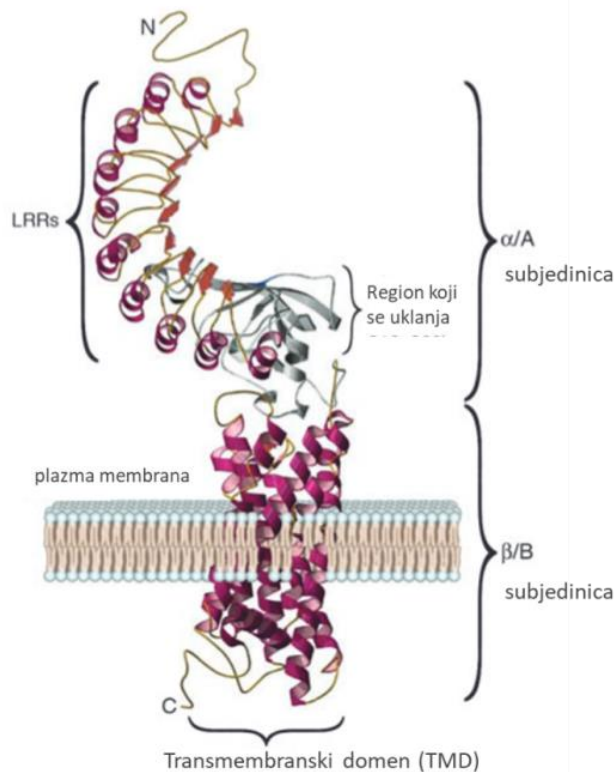
TSHR se sintetiše kao polipeptid od 764 aminokiseline koji sadrži veliki, glikozilirani ekstracelularni domen (ektodomen) od 418 aminokiselina, 7 transmembranskih domena i jedan kratki intracelularni domen (endodomen). Slične je strukture kao receptori za luteinizirajući hormon (LH), folikulostimulirajući hormon (FSH) i humani horioni gonadotropin (hCG) koji takođe pripadaju familiji G-protein kuplovanih receptora (127). G-protein (gvanil-nukleotid vezujući protein) predstavlja intracelularni efektorski molekul koji je aktiviran interakcijom receptora i hormona. Ektodomen predstavlja primarno mesto vezivanja liganda koje stupa u interakciju sa TSH i TSHRA_t. Transmembranski i intracelularni domen su vezani sa G-proteinske subjedinice (G_{αs} i G_{αq}) zbog čega imaju ulogu u procesu ćelijske signalizacije. Nakon stimulacije, G_{αs} i G_{αq} subjedinica započinju signalnu kaskadu pri čemu se često uočava izvestan stepen preklapanja signala (1).

TSHR prolazi kroz nekoliko posttranslacionih modifikacija: glikozilacija, intramolekularno cepanje, multimerizacija, otpuštanje α subjedinice. Ektodomen se sastoji iz N-terminalnog dela koga čine 9 leucinom bogatih ponavljajućih sekvenci i C-terminalnog dela koji se naknadno uklanja iz molekula. Holoreceptor podleže intramolekularnom proteolitičkom cepanju, uklanjanjem aminokiselinske sekvence od 50 aminokiselina iz ektodomena, pri čemu nastaje

polipeptid sastavljen iz dve subjedinice, α i β , odnosno A i B, međusobno povezane disulfidnim mostovima. α subjedinica je u potpunosti sastavljena iz ektodomena, dok se β subjedinica sastoji iz transmembranskog i intracelularnog domena (81, 174). Nakon cepanja molekula TSHR značajan deo α subjedinice se otpušta u cirkulaciju, dok β subjedinica ostaje na ćelijskoj membrani. S obzirom na to da se TSHRA_t u najvećoj meri vezuju za α subjedinicu receptora, smatra se da autoimuni procesi u osnovi GB i GO nisu ograničeni na tiroidno i orbitalno tkivo, već se odvijaju na sistemskom nivou. Utvrđeno je da TSA_b pokazuju veći afinitet za slobodne α subjedinice, nego za intaktni receptor. Smatra se da je jedan od uzroka veće preferencije antitela ka slobodnoj α subjedinici u tome što na taj način antitelo ima fizički lakši pristup epitopu. Na animalnim modelima GB uočena je pojava izraženije forme hipertiroidizma i gušavosti u slučaju imunizacije slobodnom α subjedinicom. Ovi podaci ukazuju na to da bi otpuštanje α subjedinice moglo biti neophodno za maturaciju B-limfocita u stimulaciona antitela na TSHR i posledičnu aktivaciju ili amplifikaciju imunskog odgovora u GB (175-177). Molekuli TSHR koji nisu prošli proces intramolekularnog cepanja se recikliraju, odnosno vraćaju se intaktni na ćelijsku membranu gde ponovo stupaju u kontakt sa ligandom (81).

Za razliku od ostalih glikoproteinskih receptora, TSHR je konstitutivno aktivan, što znači da dolazi do prenošenja signala i u odsustvu liganda, dok u prisustvu stimulacionih liganada (TSH i TSA_b), dolazi do pojačanog prenosa signala. Kao takav, TSHR je vrlo podložan delovanju mutacija pri čemu se može pojačati njegova konstitutivna aktivnost i prenošenje signala (112).

Specifičnost receptora za vezivanje liganda (TSH, LH, FSH) je definisan konformacijom leucinom bogatih ponavljajućih sekvenci koje čine strukturu u obliku potkovice u α subjedinici u okviru koje se nalazi TSH-vezujući džep (*Slika 4*) (178).



Slika 4. Struktura TSHR. Kompjuterski model TSHR pokazuje β/B subjedinicu koja se sastoji od 7 transmembranskih domena (TMD), sa kratkim intracelularnim domenom. Uklonjene aminokiselinske rezidue su od 316 do 366. Devet leucinom bogatih ponavljajućih sekvenci (*engl. leucine rich repeating, LRR*) je prikazano kao spirale sačinjene od α heliksa i β ravni. Ovaj deo molekula ima oblik potkovice, konkavne je unutrašnje strukture unutar koje se nalazi džep za vezivanje liganda. Ovaj domen predstavlja ektodomen TSHR i većinski deo α/A subjedinice. C, C-terminus; N, N-terminus. Preuzeto iz: *Davies TF, Ando T, Lin RY, Tomer Y, Latif R. Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. J Clin Invest 2005;115(8):1972–83.*, sa modifikacijom

Intracelularno sprovođenje signala sa TSHR je posredovano klasičnim G-protein efektorskim molekulima. Kada se TSH/TSHRA_t veže za receptor, otpočinje kaskadna reakcija sprovođenja signala, pri čemu G_s i G_{αq} subjedinice aktiviraju specifične enzime koji katalizuju stvaranje molekula sekundarnih glasnika. Većina TSHR signalizacije je posredovana G_s proteinskom subjedinicom koja aktivira enzim adenilat-ciklazu koja je odgovorna za nastanak cAMP sekundarnog glasnika i pokretanje cAMP zavisne signalne kaskade. U prisustvu liganda, cAMP aktivira protein-kinazu A (PKA) i CREB (*engl. cAMP Response Element Binding Protein*), kao i

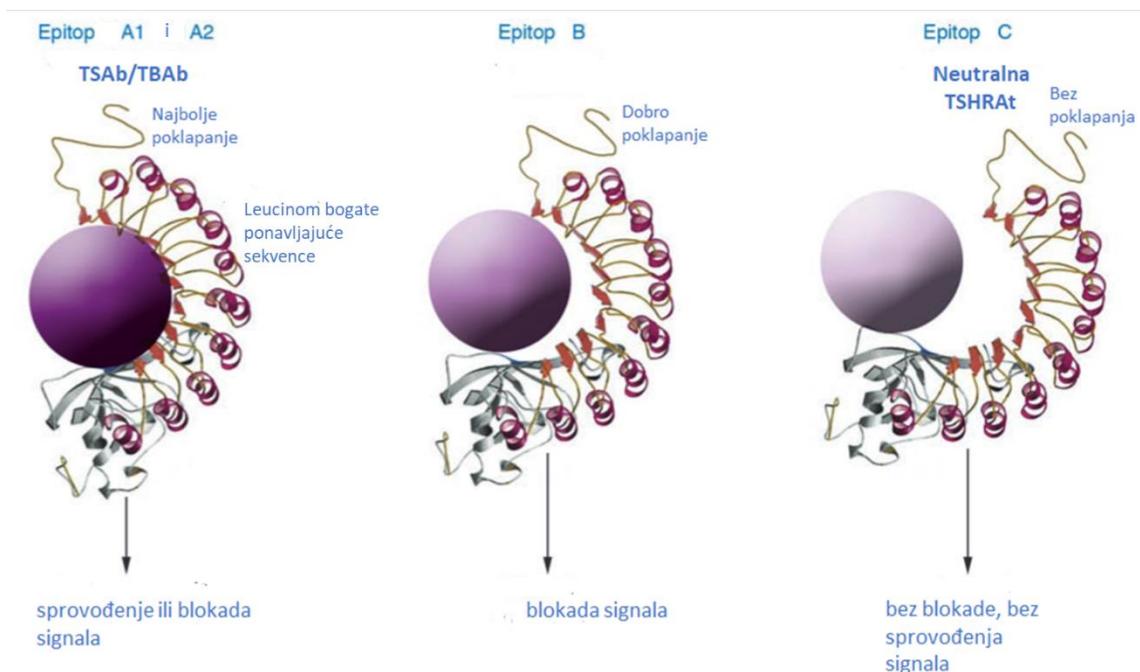
MAPK (*engl. Mitogen-Activated Protein Kinase*) signalni put. Drugi put signalizacije, nezavisan od cAMP-a, je posredovan Gαq efektor proteinom koji aktivira fosfolipazu C (PLC) pri čemu se generišu sekundarni glasnici inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol (179).

Epitop A1 (*Slika 5*) predstavlja konformaciono vezujuće mesto za TSAb koje se nalazi na α-subjedinici TSHR. TSAb se vezuju za N-terminalni deo epitopa A1, u okviru vezujućeg džepa sastavljenog od leucinom bogatih vezujućih sekvenci. Prilikom vezivanja antitela za ovaj epitop dolazi do strukturnih promena u receptoru koje dovode do sprovođenja signala. Slično TSH molekulu, TSAb imaju sposobnost aktivacije IP3 i dominantno cAMP signalne kaskade, ali sa značajnom razlikom u jačini sprovedenog signala. Utvrđeno je da monoklonska TSAb dovode do stvaranja značajno veće količine cAMP-a u odnosu na TSH i da, za razliku od TSH, stimulišu i p90RSK (112, 179, 180).

Jedan deo TBAb se vezuje za sličan epitop kao i stimulatorna antitela (epitop A2) (*Slika 5*) blisko postavljen epitopu A1, na domenu α-subjedinice TSHR sastavljenom od leucinom bogatih ponavljajućih sekvenci. Većina blokirajućih antitela se vezuje za epitop B (*Slika 5*) koji je fizički udaljen od epitopa A, tako da se prilikom vezivanja ne takmiče za mesto na receptoru sa TSAb. Iako se TBAb vezuju delom za vezujući domen TSHR, ona ne dovode pritom do strukturnih promena koje su neophodne za transdukciju signala, već samo ometaju vezivanje TSH. TBAb ne aktiviraju enzim adenilat-ciklazu, već u najvećoj meri ispoljavaju slabe agonističke aktivnosti koje ostvaruju primarno preko Gαq/IP3 signalne kaskade (112, 179, 180).

Neutralna TSHRAntitela ne utiču niti na vezivanje TSH za receptor, niti na sprovođenje cAMP signala. Ova antitela se vezuju za poseban linearni epitop na TSH receptoru, označen kao Epitop C (*Slika 5*), koji se nalazi izvan TSH vezujućeg džepa, na mestu koje nije relevantno za vezivanje molekula TSH za receptor. Epitop C se nalazi ili na N-terminusu ektodomena ili na mestu koje biva uklonjeno nakon proteolitičkog cepanja receptora, zbog čega vezivanje neutralnih antitela za ovo mesto ne dovodi do neophodnih konformacionih promena i ostavlja leucinom bogat region slobodnim za vezivanje TSH ili drugih TSHRAntitela. Iz ovog razloga, neutralna antitela niti blokiraju vezivanje TSH, niti dovode do sprovođenja cAMP signala. Postoje indikacije za to da ova antitela nisu neutralna kad su u pitanju drugi putevi signalizacije, odnosno dovode do aktivacije alternativnih puteva signalizacije, uključujući PI3/Akt/mTOR/NF-κB/STAT i p38MAPK/c-Jun N-terminalne kinaza signalne puteve. Osim toga, s obzirom da se

vezuju za epitope koji su predodređeni za uklanjanje prilikom intramolekularnog cepanja, smatra se da bi potencijalno uloga ovih antitela mogla biti sprečavanje intramolekularnog cepanja i produžetak poluzivota TSHR. Do danas nije jasan klinički značaj, niti tačna uloga ove grupe antitela u patogenezi GB i GO, međutim postoje indikacije za to da učestvuju u indukciji oksidativnog stresa i procesa apoptoze (81, 112, 133).



Slika 5. Struktura epitopa za vezivanje različitih klasa TSHRAt. Preuzeto iz: *Davies TF, Ando T, Lin RY, Tomer Y, Latif R. Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. J Clin Invest 2005;115(8):1972–83., sa modifikacijom*

1.9.5. Metode za određivanje TSHRAt

Postoje dve osnovne grupe metoda za određivanje TSHRAt:

1. kompetitivna imunohemijska određivanja (imunoeseji) koja se označavaju kao TBII/TRAb testovi

Kao i ostale imunohemijske metode, imunoeseji za određivanje TSHRAt se zasnivaju na reakciji antitelo-antigen i stvaranju imunskih kompleksa. Naziv ove grupe testova potiče od mehanizma imunohemijskog određivanja analita. U reakcionoj smeši uzorka i reagensa dolazi

do kompeticije radiobeženog ili hemiluminescentno obeleženog intaktnog molekula TSH, fragmenta TSH ili monoklonskog antitela (u zavisnosti od generacije imunoeseja) sa TSHRA_t iz seruma pacijenta za ista vezujuća mesta na TSHR. Ovi testovi mere ukupnu koncentraciju TSHRA_t, odnosno detektuju prisustvo sume ovih antitela u uzorku pacijenata. Oni, međutim, ne prave razliku između TSHRA_t sa stimulatornom, blokirajućom ili neutralnom aktivnošću, odnosno nemaju sposobnost određivanja funkcionalne aktivnosti TSHRA_t. Ovi testovi su jedini koji se danas nalaze u rutinskoj upotrebi u svetu i obično se navode kao tradicionalne ili rutinske metode (181).

2. biološki testovi (bioeseji) koji se najčešće označavaju kao TSA_b/TSI, odnosno TBA_b/TBI testovi

Biološki testovi predstavljaju grupu metoda koja se zasniva na primeni živih, genetski modifikovanih kultura ćelija. Ova grupa metoda se koristi za detekciju specifičnih TSHRA_t u serumu pacijenata, odnosno pruža informaciju o funkcionalnoj aktivnosti i potentnosti ovih antitela. Tokom godina su razvijeni zasebni bioeseji kojima se meri stimulatorna (TSA_b) i blokirajuća aktivnost TSHRA_t (TBA_b). Ekskluzivnost bioeseja se ogleda u njihovoj sposobnosti detekcije biološke funkcije TSHRA_t (131).

I biološki i imunohemijski testovi su znatno precizniji i povoljniji nego procedure koje se zasnivaju na primeni tehnika vizualizacije, a koje se tradicionalno koriste za razlikovanje GB od drugih uzroka tirotoksikoze (182). Osim toga, serološki testovi predstavljaju neinvazivne metode pogodne za kontinuirano praćenje pacijenata.

1.9.5.1. Kompetitivni imunohemijski testovi

Skoro 50 godina je prošlo od razvoja prvog testa za određivanje TSHRA_t. Ovaj test su razvili Rees Smit i Hall 1974. godine (183), a zasnivao se na kompeticiji TSHAt iz ekstrakta tiroidnog tkiva pacijenata i radioobeženog (I-125) goveđeg TSH. Ova procedura je zahtevala prethodnu precipitaciju imunoglobulina iz uzoraka pacijenata što je uveliko produžilo vreme izvođenja analize. Tokom godina je ova grupa testova prošla kroz brojne modifikacije i značajan napredak tehničkih i analitičkih karakteristika. Imunoeseji prve generacije su koristili preparate svinjskih tireocita i zasnivali se na primeni RIA (*engl. Radioimmunoassay*) tehnologije (184). Kloniranjem TSHR omogućena je primena rekombinantnog humanog TSHR u tečnoj fazi, pri čemu se merio

stepen inhibicije vezivanja I-125 obeleženog TSH (185). Imunoeseji druge generacije su razvijeni devedesetih godina 20. veka, nakon sinteze monoklonskih TSHRA_t. RIA princip je zamenjen merenjem fluorescentnog i hemiluminescentnog signala što je predstavljalo značajan napredak zbog napuštanja rada sa radioaktivnim izotopima i problemima uklanjanja otpada i bezbednosti rada u laboratoriji (135, 186). Ovi testovi su se zasnivali na principu enzimskog imunoeseja (*engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA*) čime je procedura rada značajno pojednostavljena i skraćeno vreme izvođenja testa (187).

U imunoesejima treće generacije zamenjen je obeleženi TSH sa obeleženim monoklonskim humanim TSA_b, M22. Cilj ovakvog dizajna metode je povećanje osetljivosti testa, s obzirom na to da M22 i antitela pacijenata prepoznaju slične epitope na TSHR. U ovoj grupi testova se meri koliko TSHRA_t iz seruma pacijenata inhibiraju vezivanje obeleženog M22 antitela za TSHR (188). Razvojem prvog potpuno automatizovanog kompetitivnog imunoeseja određivanje koncentracije TSHRA_t je prilagođeno rutinskom radu u laboratoriji i značajno poboljšane preciznost i tačnost testa (189, 190). Danas je dostupan veći broj kompetitivnih imunoeseja zasnovanih na različitim imunohemijskim principima (hemiluminescencija, elektrohemiluminescencija, ELISA, fluorescencija, RIA), sa poluautomatizovanim ili potpuno automatizovanim procesom rada (191).

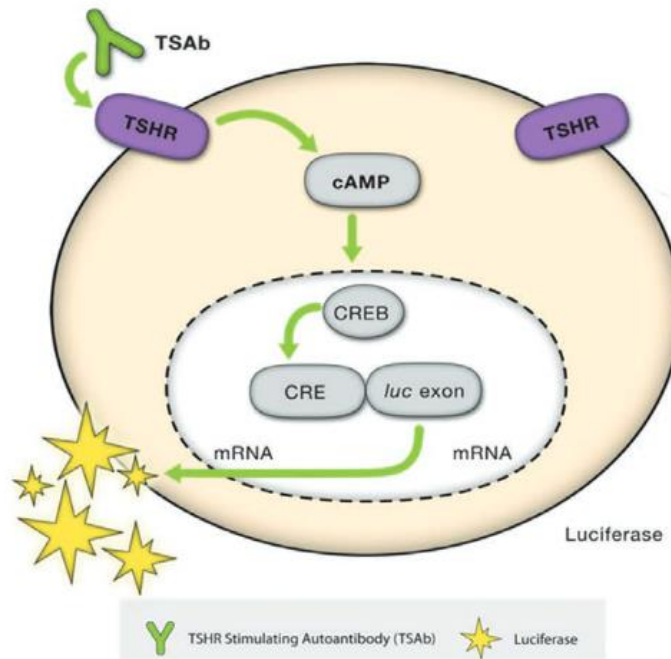
1.9.5.2. Biološki testovi (bioeseji)

Prvi bioeseji koji su merili funkcionalnu aktivnost TSHRA_t bili su animalni modeli miševa i zamoraca kojima je injektovan I-131 tiroksin i serum pacijenata. Nakon 24h merio se radioaktivni signal koji je bio proporcionalan TSHRA_t iz uzorka. Ovi inicijalni *in vivo* bioeseji su pokazivali izrazito nisku preciznost merenja i pogodni su bili isključivo za istraživačke svrhe (131, 192). Prva generacija ćelijskih bioeseja koristila je preparate radioobeleženog mišjeg tiroidnog tkiva i svinjskih tireocita (131). Nakon uspešnog kloniranja humanog TSHR, omogućena je upotreba kompletno funkcionalnog rekombinantnog receptora koji je eksprimiran na živim ćelijama. Za njega se vezuju specifična TSHRA_t i na taj način se direktno meri njihova funkcionalna aktivnost (193). Značajan napredak ćelijskih bioeseja je bilo merenje cAMP signala. Prvi testovi ove generacije su koristili humane tiroidne ćelije inkubirane sa serumom pacijenta, međutim zbog komplikovanog postupka dobijanja uzoraka humanog tkiva razvijena je kultura tireocita pacova, FRTL-5 (*engl. Fischer Rat Thyroid Cell Line*). Ukupno vreme za

izvođenje bioeseja koji koriste FRTL-5 ćelije je oko nedelju dana i podrazumevalo je merenje krajnjeg radioaktivnog cAMP signala (194, 195).

Zahvaljujući dostignućima molekularne biologije, razvijene su genetski modifikovane ovarijalne ćelije kineskog hrčka (*engl. Chinese Hamster Ovary Cells, CHO*) sposobne da eksprimiraju humani divlji soj-vajld tajp (*engl. wild type, wt*) ili himerni TSHR. Inicijalni CHO bioeseji su bili relativno kompleksni za rad, uključivali su višestruke korake i obično trajali 2 dana. CHO ćelije su se inkubirale sa serumom pacijenta, nakon čega se merio nivo stvorenog cAMP-a, obično upotrebom RIA principa (131, 196).

Glavni pomak u tehnologiji bioeseja, koji je značajno pojednostavio i skratio protokol rada, bio je primena principa hemiluminescencije. Nova generacija bioeseja meri produkciju cAMP-a u CHO ćelijama pomoću enzima luciferaze koji ove ćelije stvaraju kao odgovor na stimulaciju receptora. Ove bioinženjeringom modifikovane himere sposobne su da eksprimiraju rekombinantni humani TSHR i cAMP-indukujući reporter gen za luciferazu. Transfekcija CHO ćelija je izvršena genom za luciferazu koji je kontrolisan elementima koji odgovaraju na cAMP (*engl. cAMP-Response Elements, CRE*). Ove ćelije se inkubiraju sa serumom pacijenta i kada su izložene TSA b iz uzorka dolazi do sinteze cAMP-a koji aktivira promotere gena za luciferazu. Posledično dolazi do cAMP-zavisne produkcije luciferaze koja se kvantifikuje primenom supstrata luciferina (*Slika 6*).



Slika 6. Šematski prikaz funkcionalnog ćelijskog bioeseja. Preuzeto iz: *Diana T, Kahaly GJ. Thyroid Stimulating Hormone Receptor Antibodies in Thyroid Eye Disease-Methodology and Clinical Applications. Ophthalmic Plast Reconstr Surg 2018;34(4S Suppl 1): S13–S19.*, sa modifikacijom

Kao rezultat reakcije luciferin-luciferaza nastaje svetlost koja se meri pomoću luminometra. Hemiluminescentni signal je direktno proporcionalan količini TSAb u uzorku pacijenta. Suprotno ovome, TBAb inhibiraju stvaranje cAMP-a i posledično generisanje svetlosnog signala. Na ovaj način, biološka aktivnost TSHRA se određuje primenom jednostavnog načina detekcije (135, 193, 197). Naknadno je razvijen novi Mc4 himerni konstrukt (humani TSHR/receptor luteinizirajućeg-horiogonadotropnog hormona pacova, rLH/CG) zamenom aminokiselinskih rezidua 262-368 humanog wt TSHR sa aminokiselinama 262-334 rLH/CG. Utvrđeno je da Mc4 konstrukt znatno bolje prepoznaje TBAb prisutna u serumu pacijenata sa HT i idiopatskim miksedomom. Upravo iz ovih razloga, CHO-K1 ćelijska linija sa Mc4 TSHR izabrana je za razvoj prvog bioeseja koji je dobio odobrenje Američke agencije za hranu i lekove (*engl. Food and Drug Administration, FDA*) (193, 198). Ovaj test je značajno robusniji od svojih prethodnika, pogodan je za eventualnu automatizaciju i skraćeno je vreme analize na manje od 24h. Grupa istraživača sa Johanes Gutenberg univerzitetskog medicinskog centra u Majncu, na čelu sa prof. dr Kahalijem uspešno je standardizovala ovaj test prema internacionalnom standard

(199), a bavi se i dalje njegovim usavršavanjem i postepenim uvođenjem bioeseja u rutinsku laboratorijsku upotrebu (200). Naknadno je razvijen i validovan bioesej koji specifično meri blokirajuću aktivnost TSHRA_t (201). Danas su oba adaptirana za komercijalnu upotrebu, međutim dostupna su samo u nekoliko referentnih laboratorija u svetu (193).

Iako skorašnji vodiči za lečenje AITB prepoznaju značaj funkcionalnog karaktera TSHRA_t, upotreba bioeseja još uvek nije ušla u rutinsku upotrebu i još uvek se uglavnom koristi u istraživačke svrhe.

Od nedavno je dostupan i imunohemijski test koji koristi „sendvič“ imunohemijski princip i, prema navodima proizvođača, ima sposobnost specifičnog merenja koncentracije TSA_b u uzorku. Ovaj test je komercijalno dostupan i namenjen za upotrebu na potpuno automatizovanim imunohemijskim analizatorima (202). Međutim, princip detekcije antitela i merenja svetlosnog signala je sličan kompetitivnim imunoesejima u tom smislu da se detektuje vezivanje antitela za TSHR i meri se generisani hemiluminescentni signal putem luminometra (191).

1.9.5.3. Metode za određivanje neutrališućih TSHRA_t

Do danas nisu razvijeni komercijalni testovi za specifično određivanje klase neutrališućih TSHRA_t. U eksperimentalnim uslovima se funkcionalna aktivnost ovih antitela može izmeriti pomoću genetski modifikovanih CHO ćelija i metoda protočne citometrije, imunoprecipitacije ili Vestern blota (*engl. Western blot*) (127, 203).

1.9.6. Potencijalne kliničke indikacije za određivanje TSHRA_t

Potencijalne kliničke indikacije za određivanje TSHRA_t su: dijagnoza, diferencijalna dijagnoza i procena težine i kliničkog toka GB, predikcija remisije i relapsa GB, predikcija, dijagnoza, diferencijalna dijagnoza GO i procena aktivnosti i težine GO, dijagnoza HT, diferencijalna dijagnoza postpartalne tireotoksikoze, predikcija i dijagnoza neonatalne tireotoksikoze ili neonatalnog hipotiroidizma i diferencijalna dijagnoza GB i toksične multinodularne strume.

- Dijagnoza, diferencijalna dijagnoza i procena težine i kliničkog toka GB

Prevalencija TSHRA_t u serumu pacijenata je izrazito visoka prilikom postavljanja dijagnoze GB i kreće se između 75% i 100%, u zavisnosti od upotrebene metode za određivanje ovog visoko osetljivog markera. Smatra se da TSHRA_t predstavljaju najosetljiviji i najspecifičniji biomarker GB, od izuzetne vrednosti za rutinsku kliničku praksu (186, 204, 205). Određivanje TSHRA_t je naročito značajno u slučaju subkliničkih oblika hipertiroidizma, kao i u slučajevima nejasnih kliničkih znakova GB (136). Važna klinička indikacija za određivanje titra TSHRA_t kod pacijenata sa GB jeste procena težine i predikcija kliničkog toka bolesti. Takođe, postoje indikacije da određivanje TSHRA_t može biti korisno i prilikom izbora optimalnog tretmana GB (204). Velika multicentrična studija izvedena paralelno u sedam evropskih i američkih akademskih kliničkih centara je dodatno potvrdila značaj ovog biomarkera u dijagnostici GB u pedijatrijskoj populaciji (206).

- Predikcija ulaska u stanje remisije i relapsa GB nakon primene antitiroidne medikamentozne terapije

GB se, kao i mnoge druge autoimmune bolesti, karakteriše naizmeničnim periodima remisije i relapse. Procenjuje se da kod okvirno 50% pacijenata dolazi do stanja relapsa nakon prekida antitiroidne terapije s obzirom da prava imunološka remisija kod njih nije postignuta. Određivanje TSHRA_t je korisno za razlikovanje pacijenata sa aktivnim oblikom bolesti kod kojih je eutiroidno stanje izazvano isključivo medikamentoznom terapijom od pacijenata u remisiji kod kojih je moguće bezbedno prekinuti terapiju. U slučaju postizanja imunološke remisije TSHRA_t su negativna u serumu pacijenata, dok se u slučaju aktivne bolesti detektuju čak i u slučaju postignutog biohemijskog eutiroidizma (135, 207).

- Dijagnoza, diferencijalna dijagnoza GO, kao i procena aktivnosti i težine bolesti

Osim postavljanja tačne i pravovremene dijagnoze GO, problematika menadžmenta ove bolesti je i neadekvatan odgovor na terapiju kod jedne trećine pacijenata, kao i komplikovana prognoza kliničkog toka bolesti. Ovo predstavlja specifičan klinički problem, naročito u situacijama atipičnih oblika orbitopatije (unilateralna, bez znakova inflamacije) i GO bez tiroidnih abnormalnosti. S obzirom na to da je GO hronična bolest, sa periodima remisije i reaktivacije, neophodno je kontinuirano i multidisciplinarno pratiti ove pacijente, u specijalizovanim ustanovama tercijarne zdravstvene zaštite (208, 209). Problematika u dijagnostici i lečenju GO

kod pacijenata sa AITB se ogleda i u kontraindikovanoj upotrebi radioaktivnog joda, kako u lečenju, tako i u postavljanju dijagnoze tiroidne osnovne bolesti, s obzirom na to da je uočena povećana incidencija pojave i pogoršanja oftalmoloških simptoma nakon njegove primene (210).

- Predikcija razvoja GO kod pacijenata sa GB

Literaturni podaci ukazuju na potencijalnu prediktivnu vrednost prisustva i aktivnosti TSHRA_t za *de novo* razvoj GO kod pacijenata sa GB (88, 211).

- Dijagnoza HT

Iako su anti-TPO antitela najprevalentnija u hroničnom autoimunom tiroiditisu (pozitivna kod čak 90% pacijenata), utvrđeno je da su kod 10% do 20% ovih pacijenata prisutna TSHRA_t, blokirajućeg funkcionalnog karaktera (212, 213). Takasu i saradnici (214) su doveli u vezu nestanak ovih antitela iz cirkulacije pacijenata sa spontanom oporavkom što ukazuje na njihovu direktnu ulogu u destrukciji tiroidnog tkiva i disfunkciji štitne žlezde. Osim TBAb, kod pacijenata sa istovremenim HT i GO, detektovana su i TSA_b (12).

- Diferencijalna dijagnoza postpartalne tireotoksikoze

Procenjuje se da se kod oko 5% do 9% javlja prolazna postpartalna tiroidna disfunkcija, sa 50% većim rizikom kod žena koje su imale pozitivna tiroidna autoreaktivna antitela tokom prvog trimestra trudnoće. Uočena je i povećana stopa postpartalne depresije u ovoj grupi žena, kao i poremećaj na nivou normalnog rasta i razvoja novorođenčeta (212, 215). Sa kliničkog stanovišta je izrazito značajno razlikovati postpartalnu tireotoksikozu od relapsa ili *de novo* GB. Ovo je, međutim, veoma zahtevno izvesti, naročito kada se uzme u obzir nemogućnost upotrebe radioaktivnog joda kod žena koje doje. U ovoj populaciji je jednostavno kontinuirano pratiti nivo TSHRA_t koji je u dobroj korelaciji sa kliničkim ishodom i može pomoći u postavljanju tačne dijagnoze (135, 212).

- Predikcija neonatalne GB i dijagnoza prolazne neonatalne tireotoksikoze i neonatalnog hipotiroidizma

S obzirom na to da se AITB najčešće javljaju u reproduktivnom period žene, fetalna i neonatalna tireotoksikoza nisu retka pojava i procenjuje se da se javljaju kod oko 1% do 5% novorođene

dece majki koje su imale ili imaju GB. Fetalna tireotoksikoza predstavlja izrazito opasno zdravstveno stanje, sa ozbiljnim posledicama po fetus i majku: spontani pobačaj, prevremeni porođaj, intrauterina smrt i zastoj u rastu fetusa, preeklampsija (135, 18, 212). Kod novorođenčeta hipertiroidizam može izazvati aritmije, srčani zastoj, zastoj rasta, gastrointestinalne smetnje, hipertenziju, itd. (216). Jedinствен klinički problem predstavlja i činjenica da se čak i kod trudnica kod kojih je eutiroidno stanje uspostavljeno nakon medikamentozne terapije, kao i kod onih koje su postale hipotiroidne nakon terapije radioaktivnim jodom ili potpune tireidektomije, može detektovati visok titar TSHRA_t u serumu (135, 215). Stoga je praćenje titra TSHRA_t klinički imperativ u ovoj populaciji trudnica od koga zavise dalji koraci u evaluaciji stanja kako majke, tako i fetusa. Na osnovu sistematičnog pregleda Laurberga i saradnika (217), izvedenom na 454 trudnice sa trenutno lečenom ili istorijom lečene GB, analizirana je klinička vrednost koncentracije i funkcionalnosti TSHRA_t, na osnovu čega su uvedene smernice ETA organizacije za merenje ovih antitela u različitim trimestrima trudnoće. Regularno praćenje nivoa TSHRA_t u trudnoći i postpartumu pruža bolji uvid u autoimuni status i naročito je korisno za žene sa naizmeničnim epizodama hiper i hipotiroidizma (144, 46).

- Diferencijalna dijagnoza GB i toksične multinodularne strume

Za uspešnu diferencijaciju GB od multinodularne toksične strume indikovana je upotreba testova visoke osetljivosti za određivanje TSHRA_t, u cilju izbora adekvatne terapije (218, 219). Relativno visoka prevalencija TSHAR_t je uočena kod pacijenata sa multinodularnom strumom što ukazuje na potencijalno preklapanje ova dva hipertiroidna stanja u određenim slučajevima (220). Primećena je tranzicija multinodularne strume u potpuno ispoljenu GB nakon terapije radioaktivnim jodom. Ovaj fenomen ukazuje na to da je autoimuna reakcija posledica destrukcije ćelija i posledične sekrecije antigena u krvotok (221). Jedno od potencijalnih objašnjenja prolaznog povećanja TSHRA_t nakon ovog vida terapije je gubitak regularnih T limfocita (222).

1.10. Citokini kao biomarkeri Graves-ove orbitopatije

U patogenezi GO citokini predstavljaju glavne medijatore interakcija orbitalnih fibroblasta i imunskih ćelija koje infiltriraju orbitu koji stimulišu proliferaciju i metaboličke aktivnosti ovih ćelija. Na njihovu ulogu u GO upućuju rane *in vitro* studije u kojima je dokazano prisustvo IL-1, IFN- γ i TNF- α u retro-orbitalnom vezivnom tkivu pacijenata, za razliku od orbitalnog tkiva zdravih pojedinaca (223). Citokini čine sponu između orbitalnih fibroblasta, TSHR, IGF-1R, TSHRA α i T-limfocita, a smatra se da imaju važnu ulogu, kako u iniciranju, tako i u perpetuiranju autoimunih procesa u GO. Eksperimentalno je dokazano da pojedini citokini imaju ulogu u stimulaciji ekspresije TSHR na kulturama orbitalnih fibroblasta (88, 224). Osim toga, citokini ispoljavaju brojne efekte na nivou ovih ćelija kojima modulišu lokalni imunski odgovor: pojačavaju ekspresiju adhezionih molekula, MHC kompleksa tip II, HLA molekula, CD40 (*engl. Cluster of Differentiation 40, CD40*), HSP-72 (*engl. Heat Shock Proteins-72*), stimulišu sintezu PGE2 i hemoatraktanata (IL-16, RANTES). Oni takođe stimulišu adipogenezu i remodelovanje ekstracelularnog matriksa (91). Specifična fenotipska karakteristika orbitalnih fibroblasta je njihova izražena osetljivost na dejstvo proinflamatornih citokina u okviru orbite, po čemu se razlikuju od fibroblasta na drugim anatomskim lokacijama u organizmu (91, 102). U orbitalnom tkivu pacijenata detektovan je specifičan profil genske ekspresije inflamatornih molekula što doprinosi naročitoj podložnosti orbite za razvoj inflamacije i karakterističnog remodelovanja tkiva prisutnog u GO (225).

Inicijalna, aktivna faza GO se karakteriše dominantnim Th1 citokinskim profilom (IFN- γ , IL-1, IL-2, TNF- α), što je potvrđeno detekcijom pozitivne korelacije Th1 ćelijskog odgovora i CAS vrednosti kod pacijenata sa GO. Sinergistička aktivnost ovih proinflamatornih citokina stimuliše proliferaciju fibroblasta i sintezu glikozaminoglikana, a takođe dovodi do stimulacije drugih medijatora inflamacije (citokina, hemokina, prostaglandina, itd.) (226, 227). Na nivou orbitalnih fibroblasta, IL-1, TNF- α i IFN- γ pojačavaju ekspresiju intracelularnog adhezionog molekula 1 (*engl. Intercellular Adhesion Molecule, ICAM-1*) čime se pojačava lokalna regrutacija T-limfocita i ćelijski imunitet, i posledično doprinosi razvoju aktivne faze GO (226). Povišena serumska koncentracija ICAM-1 i L-selektina je izmerena u serumu pacijenata sa aktivnom GO (228). Studije proteomike su ispitivale uticaj IFN- γ i TGF- β na regulaciju ekspresije potencijalno relevantnih proteina u kulturama orbitalnih fibroblasta. Uočeno je da IFN- γ i TGF- β indukuje

reprogramiranje ovih ćelija ka specifičnom profibroznom fenotipu, dok ovaj efekat izostaje kada se dermalni fibroblasti tretiraju na isti način. Od svih ispitivanih proteina, najizraženija ushodna regulacija u IFN- γ -stimulisanim fibroblastima pacijenata sa GO je uočena za inhibitor aktivatora plazminogena (*engl. Plasminogen Activator Inhibitor-1, PAI-1*) koji je jedini protein prisutan u značajno višoj koncentraciji kod pacijenata sa GB i orbitopatijom u odnosu na pacijente sa GB bez okularnih simptoma (229, 230). On je negativni regulator fibrinolize i kaskade proteolitičkih reakcija uključenih u razgradnju ekstracelularnog matriksa. Svoje efekte postiže kroz inhibiciju aktivatora plazminogena čime se sprečava stvaranje plazmina i posledična aktivacija niza enzima i metaloproteinaza matriksa (*engl. Matrix-Metalloproteinase*). Krajnji efekat PAI-1 je indukcija fibroze i akumulacije vezivnog tkiva (231). Postoje dokazi koji ukazuju i na ulogu PAI-1 u regulaciji imunskog odgovora organizma, pri čemu se smatra da on učestvuje u regulaciji intenziteta i trajanja inflamacije (229).

U hroničnoj fazi GO predominantno se sekretuju Th2 citokini (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) koji aktiviraju humoralni imunski odgovor, učestvuju u remodelovanju tkiva i nastanku fibroze (226, 229). Eksperimentalno je dokazano da autoreaktivna antitela stimulišu otpuštanje inflamatornih citokina i hemokina iz orbitalnih fibroblasta, prvenstveno TNF- α i IL-6, pri čemu je ovaj efekat potencijalno posredovan vezivanjem za IGF-1R (91, 92). Specifičan citokinski milje u GO uključuje i povećanje aktivnosti i koncentracije IL-8, IL-16, IL-17, IL-23, TGF- β , kao i većeg broja hemokina (CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL5) (226, 229).

Uočeno je da se citokinski profil razlikuje između pacijenata i može biti uslovljen kliničkom slikom orbitopatije, prvenstveno aktivnošću i težinom. Ova karakteristika bi mogla da se iskoristi za identifikaciju pacijenata za koje je potreban agresivniji pristup lečenja. Antagonisti pojedinih citokina su izuzetno atraktivni terapijski kandidati, od kojih su neki već u upotrebi, sa ohrabrujućim rezultatima kliničkih studija (91). Interleukin-6 i TNF- α su mete targetirane biološke terapije GO (tocilizumab, etanercept/adalimumab, redom) koja se primenjuje kod pacijenata koji ne odgovaraju na primarnu terapiju glukokortikoidima (232-234).

1.10.1. Uloga interleukina-1 β i interleukin-1 receptor antagoniste u patogenezi Graves-ove orbitopatije

Familija citokina IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-1RA, IL-18, itd.) obuhvata 11 proinflamatornih i antiinflamatornih proteina srodnih strukturnih karakteristika, za koje je poznato da učestvuju u patogenezi autoimunih bolesti. Smatra se da mutacije gena koji kodiraju pojedine citokine ove familije definišu njihovu ulogu u nastanku ovih bolesti. Interleukin-1 α i IL-1 β su do danas najistraženiji citokini IL-1 familije. Ovi potentni proinflamatorni molekuli stimuliraju proliferaciju T i B-limfocita i sintezu imunoglobulina, a oslobađaju se iz makrofaga, monocita i dendritskih ćelija. Familija antagonista IL-1 receptora (IL-1RA) ima antiinflamatorne karakteristike i vrši regulaciju prekomernog inflamatornog odgovora organizma (235). Ova familija proteina obuhvata sekretovani oblik i intracelularni oblik IL-1RA (sIL-1RA i iIL-1RA, redom) (236). Studija Khalilzadeh i saradnika (237) je dokazala postojanje pozitivne korelacije polimorfizama pojedinačnih nukleotida (*engl. Single Nucleotide Polymorphism, SNP*) ove familije gena i podložnosti za razvoj GO.

Interleukin-1 stimuliše sintezu hijaluronske kiseline na kulturama orbitalnih fibroblasta, ushodnom regulacijom hijaluron-sintaze, dok IL-1RA inhibira ovaj efekat. Interleukin-1 β dovodi do značajne indukcije ekspresije brojnih inflamatornih molekula: IL-6 i IL-8, IL-16, RANTES, proteina komplementa (CD44, CD55, CD59), hemokina, adhezionih molekula fibroblasta i enzima ključnih za sintezu prostaglandina (225, 236, 238, 239). Lantz i saradnici (240) su dokazali pojačanu ekspresiju gena za IL-1 u orbitalnom tkivu pacijenata sa GO. Ushodnu regulaciju IL-1 β pojačava IFN- γ , dok zajedno ispoljavaju višestruke sinergističke efekte na nivou orbitalnog tkiva (226). Jedno od potencijalnih objašnjenja prekomernog odgovora orbitalnih fibroblasta na dejstvo ovog citokina je disbalans između IL-1 β i njegovog prirodnog anatagoniste, IL-1RA. U kulturi orbitalnih fibroblasta pacijenata sa GO nivo ekspresije i koncentracije solubilnog IL-1RA je značajno snižen, u poređenju sa cirkulišućim fibroblastima. Narušavanjem ravnoteže između ova dva molekula gubi se prirodni regulatorni mehanizam koji se suprotstavlja aktivnosti IL-1 β . Ovim se stvara karakterističan inflamatorni fenotip orbitalnih fibroblasta koji koordiniše dalje inflamatorne procese u osnovi ove bolesti (236).

Interleukin-1 β stimuliše sintezu prostaglandina ushodnom regulacijom enzima prostaglandin sintaze 2 (*engl. Prostaglandin Endoperoxide H Synthase 2, PGHS-2*), inflamatorne ciklooksigenaze eksprimirane u ćelijama u uslovima stresa, dok je stimulatorni efekat na nivou remodelovanja ekstracelularnog matriksa posredovan stimulacijom tkivnog inhibitora matriks-metaloproteinaze-1 (239, 241). Dokazano je da IL-1 β stimuliše i adipogenezu, indukcijom diferencijacije adipogene subklase orbitalnih fibroblasta u zrele adipocite (225, 242).

1.10.2. Uloga interleukina-6 u patogenezi Graves-ove orbitopatije

Danas je poznato da IL-6 igra važnu ulogu u nastanku autoimunih bolesti što je vremenom dovelo do novih pristupa na polju imunoterapije ovih bolesti. Familija IL-6 citokina ispoljava pleiotropne efekte, ne samo na nivou fiziološkog i patološkog imunskog odgovora organizma, već i u regulaciji metabolizma kostiju, hematopoeze i razvoja nervnog i kardiovaskularnog sistema. Inicijalno je opisana njihova uloga u modulaciji aktivnosti B-limfocita. U zavisnosti od uslova i konteksta delovanja, IL-6 ispoljava proinflamatorne ili antiinflamatorne karakteristike i predstavlja važan faktor u hroničnim inflamatornim stanjima. Iz ovih razloga našao je kliničku primenu u lečenju mnogih autoimunih bolesti, prvenstveno reumatoidnog artritisa (243, 244).

Interleukin-6 zauzima važno mesto u heterogenom citokinskom repertoaru i kompleksnoj mreži patofizioloških procesa koji se odvijaju u orbiti. U serumu pacijenata sa GO detektovana je značajno povišena koncentracija IL-6 i njegovog solubilnog receptora (245). Interleukin-6 je prisutan u orbitalnom adipoznom tkivu i ekstraokularnim mišićima pacijenata sa GO, na šta ukazuje povišena ekspresija njegove iRNK detektovana u kulturama ovih ćelija. Osim toga, zaključeno je da je stepen ekspresije IL-6 u pozitivnoj korelaciji sa volumenom orbitalnog tkiva (246). Kao odgovor na stimulaciju IFN- γ i IL-1 β , dolazi do pojačane aktivacije orbitalnih fibroblasta i ushodne regulacije CD40-CD154 mosta, što rezultuje pojačanim lučenjem IL-6, IL-8 i MCP-1 (*engl. Macrophage Chemoattractant Protein-1*) (247, 248). Stimulacija sinteze IL-6 se dešava na nivou pojačane aktivnosti IL-6 gena i produžene stabilnosti iRNK (informaciona ribonukleinska kiselina) (249). Postoji nekoliko potencijalnih objašnjenja patofiziološke uloge IL-6 u imunološkim procesima koji se odvijaju u orbiti. Kao prvo, IL-6 je neophodan faktor za normalan razvoj plazma ćelija i sintezu imunoglobulina. Na nivou T-limfocita, IL-6 usmerava

diferencijaciju T helper ćelija od Th1, ka Th2 ćelijskom odgovoru. Takođe je dokazana njegova uloga u diferencijaciji makrofaga i dendritskih ćelija. Pretpostavlja se da aktivirani orbitalni fibroblasti, putem pojačanog lučenja IL-6, pospešuju aktivaciju B-limfocita i lokalnu produkciju autoreaktivnih antitela (248).

Interleukin-6 značajno povećava ekspresiju TSHR na orbitalnim fibroblastima pacijenata sa GO, što je dokazano tretiranjem kultura ovih ćelija IL-6. Ovaj efekat izostaje kada su u pitanju orbitalni fibroblasti zdravih osoba, što potvrđuje hipotezu o diverzitetu ovih ćelija, ne samo po pitanju njihove anatomske lokalizacije, već i predispozicije za prekomernu inflamatornu reakciju (250). Efekti IL-6 su posredovani uglavnom preko JAK/STAT (*engl. Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*) i MAPK puta signalizacije (251).

Nedavno sprovedena klinička studija je ispitivala efikasnost primene tocilizumaba, odnosno monoklonskih antitela na IL-6 receptor, u terapiji GO koja je rezistentna na dejstvo glukokortikoida. Rezultati studije upućuju na povoljan efekat ovog leka koji se ogleda u značajno sniženoj aktivnosti i težini orbitopatije u ispitivanoj populaciji (252). Najnoviji vodič kliničke prakse za terapiju i menadžment GO navodi da se tocilizumab može razmotriti kao druga linija terapije kod srednjih do teških i aktivnih oblika bolesti, otpornih na dejstvo glukokortikoida koji predstavljaju prvu liniju terapije (67).

1.10.3. Uloga interleukina-8 u patogenezi Graves-ove orbitopatije

Interleukin-8 je proinflamatorni citokin koji je prvobitno otkriven kao hemokin koji primarno regrutuje neutrofile na mesto inflamacije (253). Osim na neutrofile, IL-8 ispoljava hemoatraktantno dejstvo i na limfocite i bazofile. Nekoliko vrsta ćelija proizvodi IL-8, uključujući: makrofage, limfocite, neutrofile, endotelne ćelije, fibroblaste i epitelne ćelije. Na nivou fibroblasta, IL-8 se sekretuje kao odgovor na CD40-CD40L interakciju. Smatra se da interakcija između imunih ćelija koje ekspimiraju CD40 ligand i CD40 receptora na fibroblastima vodi ka amplifikaciji imunih procesa i citokinskoj i hemokinskoj kaskadi koja doprinosi razvoju hronične inflamacije kakva je prisutna u autoimunim bolestima (254). Literaturni podaci ukazuju na potencijalni značaj IL-8 u različitim autoimunim bolestima (psorijaza, multipla skleroza, itd.). Weetman i saradnici (255) su prvi opisali sekreciju ovog

citokina u tiroidnim folikularnim ćelijama i postavili hipotezu o njegovoj patofiziološkoj ulozi u AITB. Japanska grupa naučnika (256) je dokazala da je 251T/A polimorfizam gena za IL-8 značajno učestaliji u populaciji pacijenata sa GB i HT u odnosu na kontrolne subjekte. Utvrđeno je da tretiranje fibroblasta IL-1 i TNF- α dovodi do pojačane sekrecije IL-8 koja zauzvrat dovodi do povećane limfocitne infiltracije (253). Hwang i saradnici (247) su dokazali da pojedine ćelijske linije orbitalnih fibroblasta dobijenih od pacijenata sa GO pokazuju značajno veći stepen ekspresije IL-8 u poređenju sa fibroblastima zdravih dobrovoljaca. Dodatno, utvrđeno je da je rs2227306 polimorfizam IL-8 gena odgovoran za individualnu predispoziciju za razvoj GB i GO u kineskoj populaciji (253).

1.11. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u patogenezi Graves-ove orbitopatije

Disbalans oksidoredukcionog statusa ćelije čini jedan od važnih molekularnih mehanizama u osnovi patogeneze GB i GO. Na ćelijskom nivou, utvrđeno je da TSHRA_t indukuju oksidativni stres kroz pojačanu sintezu reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) (257). Očuvanje ravnoteže između oksidanasa i antioksidanasa je neophodan preduslov za postizanje ćelijske homeostaze. Fiziološki se antioksidantni markeri stvaraju kao kompenzatorni odgovor organizma na oksidativni stres koji je rezultat određenog patološkog procesa. Uloga antioksidanasa je da se suprotstave štetnom delovanju oksidanasa i oštećenju ključnih ćelijskih komponenti. U akutnoj fazi bolesti je očekivano da se detektuje povećana koncentracija i jednih i drugih parametara, dok su u hroničnoj fazi dominantni oksidantni markeri, kao rezultat potrošnje antioksidantnih rezervi organizma. Višak ROS remeti intracelularni redoks status i posledično oštećuje lipide, proteine i DNK (dezoribonukleinska kiselina) ćelije. Produženo stanje oksidativnog stresa može biti naročito štetno s obzirom na mutageni potencijal DNK lezija koje izazivaju genetsku nestabilnost ćelije 8 (258).

Štitna žlezda je organ izrazito podložan nastanku slobodnih radikala, a hipertiroidizam se dovodi u vezu sa disfunkcijom anaerobnog metabolizma, mitohondrija, prekomernom potrošnjom kiseonika i ATP-a (adenozin-tri-fosfat), kao i povećanim stvaranjem ROS (258). Vodonik peroksid (H₂O₂) se fiziološki kontinuirano stvara u tireocitima, u takozvanoj reakciji tiroidne

organifikacije joda u kojoj se sintetišu tiroidni hormoni. Ovu reakciju katalizuje enzim TPO, a rezultat je ugradnja joda u molekul tireoglobulina i posledična sinteza trijodtironina (T3) i tetrajodtironina, odnosno T4. U normalnim uslovima, reakcija peroksidacije i tiroidni antioksidantni sistem u potpunosti troše stvoreni H_2O_2 . Jod i H_2O_2 predstavljaju supstrate iste enzimske reakcije zbog čega imaju međusobno inhibitorno dejstvo. Ovo je jedno od potencijalnih objašnjenja negativnog dejstva duvanskog dima na razvoj i progresiju GB (259, 260). Tiocijanat predstavlja jedan od sastojaka duvanskog dima sa potvrđenim antitiroidnim dejstvom. On sprečava transport joda u tireocite zbog čega je favorizovana produkcija H_2O_2 i posledično opterećenje ovih ćelija slobodnim radikalima (259, 261).

Kliničke studije koje su ispitivale efekat suplementacije antioksidansima na tiroidni status pacijenata sa GB utvrdile su da se kod ovih pacijenata znatno brže postiže eutiroidno stanje nego sa uobičajenom medikamentoznom terapijom (262). Ovaj efekat je, međutim, izostao kada su ispitivani pacijenti koji su imali GB sa orbitalnim manifestacijama. Takođe, u grupi pacijenata sa GB koji nisu imali GO došlo je do normalizacije nivoa oksidativnih parametara nakon postizanja eutiroidnog stanja (263). Ovo zapažanje ukazuje na orbitalno stvaranje slobodnih radikala koje je nezavisno od tiroidnog statusa organizma, kao i na potencijalno važnu ulogu redoks statusa u patogenezi GO. Dodatno, ovo je i indikacija za potencijal upotrebe parametara oksidativnog stresa u dugotrajnom monitoringu pacijenata (258).

Oksidativni stres koji nije adekvatno izbalansiran antioksidantnim odgovorom organizma pospešuje inflamaciju i time doprinosi razvoju nekontrolisane, prekomerne inflamacije koja je u osnovi GO (259). Burch i saradnici (264) su dokazali da superoksidni anjon indukuje dozno-zavisnu proliferaciju orbitalnih fibroblasta. Ovaj efekat se uočava samo u kulturi orbitalnih fibroblasta pacijenata sa GO, ne i kontrolnih ispitanika. Vodonik-peroksid snažno stimuliše ekspresiju HLA-DR i HSP-72 proteina u kulturama orbitalnih fibroblasta čime se pospešuje regrutacija T-limfocita u orbitu (258, 265). U orbitalnom tkivu pacijenata sa GO je detektovana povišena koncentracija superoksid-dismutaze (SOD), lipidnog hidroperoksida, malondialdehida i markera oksidativnog oštećenja DNK, a snižena koncentracija glutation-peroksidaze (266, 267). Tretiranje orbitalnih fibroblasta IL-1 β značajno pospešuje stvaranje ROS i indukuje aktivnost enzima SOD (268).

Nekoliko kliničkih studija je ispitivalo efikasnost primene antioksidanasa kod pacijenata sa GO, prevashodno nikotinamida, alopurinola, pentoksifilina i preparata selena. Kod većine ispitanika primećeno je značajno poboljšanje pojedinačnih znakova i simptoma, aktivnosti i težine GO, praćeno izraženim padom serumske koncentracije GAG i pojedinih citokina (269-271). Selen se pokazao najadekvatnijim kandidatom za antioksidantnu suplementaciju kod blagih manifestacija bolesti. Na kulturama orbitalnih fibroblasta selen je doveo do značajne redukcije ćelijske proliferacije, sinteze hijaluronske kiseline i nivoa parametara oksidativnog stresa (262). Selen predstavlja mineral koji, u obliku selenocisteina, ulazi u sastav selenoproteina za koje je poznato da imaju antioksidantna svojstva i učestvuju u metabolizmu tiroidnih hormona. Hipoteza je da nedostatak selena narušava odbrambene antioksidativne mehanizme organizma i time doprinosi razvoju GB i GO. Selenoproteini ispoljavaju imunomodulatorne efekte i neophodni su za funkcionisanje T-limfocita. Smatra se da smanjuju prekomerni inflamatorni odgovor kroz redukciju transkripcionog faktora NF- κ B, TNF- α i enzima ciklooksigenaze (272). Multicentrična randomizirana klinička studija pratila je efekat primene selena u zemljama sa blagom deficijencijom ovog minerala, 6 meseci i godinu dana. Zaključak ove studije bio je da primena selena dovodi do značajnog poboljšanja kvaliteta života, ublažava simptome i usporava progresiju bolesti (271). Iz ovih razloga, šestomesečna primena selena je zvanična preporuka EUGOGO vodiča kliničke prakse kod pacijenata sa blagom formom GO (67).

Određivanje produkata oksidativnog oštećenja DNK je važno zbog procene posledica i mutagenog potencijala modifikacije DNK. 8-hidroksi-2-deoksigvanozin (*Hydroxy-2-deoxyGuanosine*, *8-OHdG*) se izdvaja kao jedan od glavnih markera oksidacije DNK za koji je utvrđeno da značajno korelira sa ekspresijom TSH receptora u orbitalnim fibroblastima i kliničkom prezentacijom GO. Značajno više koncentracije urinarnog 8-dOHG su detektovane kod pacijenata sa GO u odnosu na kontrolne ispitanike, dok je glukokortikoidna terapija povezana sa primetnim padom ovih vrednosti (266, 273). 7,8-dihidroksi-8-oksogvanin (*7, 8-dihydro-8-oxoguanine*, *8-oxoG*) predstavlja jedan od glavnih formi DNK lezija i jedan od najispitivnijih biomarkera oksidacije nukleinskih kiselina. U normalnim uslovima reparativni mehanizmi DNK uklanjaju oksidovane nukleobaze iz DNK lanca. Oksidovani gvanin se uklanja pod dejstvom enzima 8-oxoG DNK N-glikozilaza 1 (*8-oxoG DNA N-glycosylase 1*, *hOGG1*) koji je izrazito podložan polimorfizmu. hOGG1 Ser326Cys polimorfizam (substitucija serina cisteinom na kodonu 326) je prepoznat kao potencijalan faktor rizika za razvoj GB, a

pretpotstavlja se da može stvoriti pogodnu sredinu za razvoj GO (259, 274). 8-OHdG i 8-oxoG su, dakle, parametri oksidativnog stresa koji oslikavaju trenutno oksidativno oštećenje DNK, kao i stanje sistema reparacije.

Poremećaj ravnoteže oksidanasa i antioksidanasa se procenjuje na osnovu niza seroloških parametara koji oslikavaju oksidativni stres i status antioksidativne zaštite organizma. Određivanje koncentracije i aktivnosti pojedinačnih oksidanasa i antioksidanasa je moguće, ali s obzirom na njihov aditivni potencijal, kao i praktične razloge, razvijene su metode kojima se meri totalni oksidantni status (TOS) i antioksidantni status (TAS) organizma (275, 276).

2. CILJEVI NAUČNOG ISTRAŽIVANJA

Cilj naučnog istraživanja doktorske disertacije bio je da se utvrdi klinički značaj određivanja TSHRA_t u GO: kao specifičnog biomarkera kliničke prezentacije i ishoda GO. S tim u vezi, ciljevi su bili sledeći:

- Analiza demografskih i kliničkih karakteristika ispitivane populacije
- Određivanje i analiza koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRA_t u serumu različitih grupa pacijenata sa GO. U tom smislu cilj je bio da se analizira raspodela ukupne koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRA_t u serumu ukupne ispitivane populacije i različitih grupa pacijenata sa GO, sa posebnom pažnjom na analizu raspodele ovih autoreaktivnih antitela u grupi pacijenata sa GB, HT i eutiroidnim oblikom GO. Dodatno je cilj bio da se ispita razlika u pozitivnosti primenjene metode bioeseja i rutinskog kompetitivnog imunoeseja za određivanje TSA_b i TBII, redom, u ukupnoj ispitivanoj populaciji i pojedinačnim grupama pacijenata.
- Ispitivanje povezanosti TSHRA_t sa demografskim i antropometrijskim karakteristikama pacijenata, statusom pušenja, porodičnom istorijom autoimunih bolesti štitne žlezde, udruženim drugim autoimunim bolestima i komorbiditetima od interesa.
- Ispitivanje povezanosti TSHRA_t sa trajanjem GO, terapijom, suplementacijom selenom, kao i analiza korelacije TSHRA_t sa serološkim parametrima od interesa (tiroidni funkcionalni testovi). Dodatni cilj je bio analiza raspodele pozitivnosti primenjene metode bioeseja i rutinskog kompetitivnog imunoeseja za određivanje TSA_b i TBII, redom, u odnosu na tiroidni status pacijenata.
- Analiza korelacije i povezanosti koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRA_t sa aktivnošću i težinom GO, kao i sa pojedinačnim kliničkim parametrima od značaja. Takođe je cilj bio da se ispita raspodela pozitivnosti primenjenih metoda za određivanje TSA_b i TBII u odnosu na analizirane kliničke parametre. Dodatni cilj je bio analiza prediktivnog potencijal funkcionalne aktivnosti i ukupne koncentracije TSHRA_t za razvoj klinički aktivne i/ili teške GO.
- Ispitivanje i upoređivanje dijagnostičkih karakteristika primenjenih laboratorijskih testova za određivanje TSHRA_t. Poseban fokus ovog istraživanja je bio da se ispita da li

testovi koji mere specifičnu aktivnost antitela poseduju zadovoljavajuće karakteristike za uvođenje u rutinsku praksu, kao zamena za tradicionalne testove koji su u rutinskoj upotrebi.

- Dodatni cilj je bio verifikacija karakteristika nove imunohemijske metode (Immulite 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA_t.
- Ispitivanje povezanosti TSHRA_t sa parametrima inflamatornog statusa organizma. Sa tim u vezi, cilj je bio da se analiziraju masene koncentracije sledećih citokina: IL-6, IL-1RA, IL-1 β i IL-8.
- Ispitivanje povezanosti TSHRA_t sa parametrima oksidativnog statusa organizma (TOS, TAS, OSI, 8-OHdG).
- Ispitivanje dijagnostičke tačnosti multiparametarskih modela GO

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Ova studija je dizajnirana kao opservaciona, a regrutovanje ispitanika je sprovedeno u periodu od februara 2017. do juna 2019. godine. Ukupno je regrutovan 91 pacijent sa postavljenom dijagnozom GO. Svi pacijenti su redovno lečeni na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, prema važećim smernicama i protokolima (67, 277, 278). Za istraživanje su selektovane osobe kod kojih je dijagnoza GO postavljena prvi put, pacijenti koji su došli na redovnu kontrolu i pacijenti koji su hospitalizovani usled pogoršanja stanja.

Glavni kriterijum za uključenje ispitanika u studiju bila je klinički prisutna GO kod pacijenata koji nisu bili na terapiji kortikosteroidima, niti drugim imunosupresivnim lekovima minimalno šest meseci u odnosu na datum uključanja u studiju. Kod svih pacijenata je sproveden endokrinološki i oftalmološki pregled, ultrazvuk volumena štitne žlezde, ultrazvuk/CT orbite i rutinska laboratorijska analiza tiroidne funkcije i tiroidne autoimunosti (tiroidni funkcionalni testovi). Na osnovu kliničkih, radioloških i seroloških parametara, dijagnoza je klasifikovana kao GB sa GO, HT sa GO i GO bez tiroidnih abnormalnosti (eutiroidna GO). Svi pacijenti sa distiroidnom orbitopatijom bili su na odgovarajućem terapijskom režimu (levotiroksin/antitiroidni lekovi) kako bi se normalizovao njihov tiroidni status. Pacijenti su primali levotiroksin u prosečnoj dozi 87,5 (50,5-112,5) mg na dan, metimazol u prosečnoj dozi od 10 (5-20) mg na dan, a propiltiouracil (PTU) u prosečnoj dozi 100 (62-175) mg na dan. Sve dijagnostičke i terapijske procedure bile su usaglašene sa smernicama *Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse za poremećaj rada štitaste žlezde* (277), kao i sa smernicama ETA (278) u EUGOGO organizacija (67).

Pacijenti su dalje klasifikovani na osnovu aktivnosti i težine GO. Aktivnost GO je procenjena na osnovu zbira kliničke aktivnosti (CAS), pri čemu je GO klasifikovana kao aktivna, u slučaju vrednosti CAS skora iznad 3 od ukupno 7 bodova, ili kao neaktivna, u slučaju vrednosti CAS skora ispod 3 od ukupno 7 bodova (69). Težina GO je klasifikovana na osnovu EUGOGO

preporuka kao blaga, srednje teška do teška GO i GO koja ugrožava vid (distiroidna optička neuropatija i/ili oštećenje rožnjače) (67).

Po prijemu pacijenata uzeta je detaljna medicinska istorija, demografski i osnovni antropometrijski podaci pacijenata (visina, telesna masa, indeks telesne mase). Indeks telesne mase (ITM) je određen računskim putem, na osnovu podataka o težini i visini svakog ispitanika, upotrebom sledeće formule: $ITM = \text{telesna težina (kg)} / \text{telesna visina (m}^2\text{)}$. Podaci o pacijentima preuzeti su iz medicinske baze podataka Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, a njihovi uzorci su sakupljeni prema protokolu.

Svi ispitanici su popunili upitnik sa podacima o starosti, polu, statusu menopauze, o konzumiranju cigareta, fizičkoj aktivnosti, ishrani i upotrebi dijetetskih suplemenata, o komorbiditetima, ličnoj i porodičnoj anamnezi i o trenutnoj i prethodnoj terapiji. Etički odbor Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu je odobrio korišćeni upitnik. Prilikom regrutovanja, svaki od ispitanika je prvo detaljno informisan o ciljevima i protokolu istraživanja, nakon čega je potpisao informisani pristanak za učešće u studiji. U svrhe ovog istraživanja korišćen je standardni informisani pristanak Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa smernicama kliničke i laboratorijske prakse, Helsinškom deklaracijom i važećim institucionalnim i nacionalnim propisima. Etički odbor Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu je prethodno dao odobrenje za izvođenje ovog istraživanja (17.06.2019/944/3).

Uzorkovanje pacijenata bilo bi sprovedeno na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Svim pacijentima je uzet uzorak venske krvi, u jutarnjim časovima, nakon 12 sati gladovanja. Nakon uzorkovanja krvi, uzorci su na odgovarajući način transportovani u Laboratoriju za medicinsko-biohemijske analize, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu gde je izvršena trijaža uzoraka. Nakon perioda potrebnog za koagulaciju krvi, krv je centrifugirana 10 minuta na 3000 obrtaja/minuti na sobnoj temperaturi radi odvajanja seruma i 15 minuta na 1500 RCF (relativna centrifugalna sila) radi odvajanja plazme. Nakon odvajanja seruma i plazme, uzorci su na odgovarajući način podeljeni na alikvote i čuvani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, do analize. U cilju evaluacije kliničkih karakteristika nove CLIA imunohemijske IMMULITE TSI 2000 metode, dodatno je u studiju uključeno 23

zdrava ispitanika zaposlena na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu. Uzorci kontrolne grupe uzeti su tokom redovnog sistematskog pregleda zaposlenih, sprovedenog u toku decembra 2019. godine. Kriterijum uključenja zdravih ispitanika u studiju bio je odsustvo bilo kakvih tiroidnih i inflamatornih bolesti, što je potvrđeno rutinskim laboratorijskim analizama. Kriterijum isključenja bila je pozitivna istorija tiroidnih bolesti i bilo koji vid imunosupresivne terapije.

Prilikom uzorkovanja krvi neophodne za analize rađene u ovoj studiji, uzorkovana je krv i za standardne laboratorijske analize koje su rađene u Centru za Medicinsku biohemiju, Službi za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Odeljenja Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Rezultati tiroidnih funkcionalnih testova (TSH, FT4, TPOAt, TGAt) za procenu stanja štitne žlezde preuzeti su iz bolničke baze podataka. Iz uzoraka venske krvi određeni su koncentracija i funkcionalna aktivnost TSHRA_t, nivo parametara oksidativnog stresa i antioksidantne zaštite (TOS i TAS, kao pokazatelji ukupnog oksidativnog stresa u organizmu i njegove antioksidativne zaštite, 8-OHdG, kao pokazatelj oksidativne modifikacije DNK), kao i koncentracija citokina od interesa (IL-6, IL-1RA, IL-1β, IL-8). U uzorcima seruma su kvantifikovani sledeći parametri: TSHRA_t, TOS, TAS, IL-6, IL-1RA, IL-1β, IL-8), dok je u uzorcima plazme određen nivo 8-OHdG.

Funkcionalna aktivnost TSHRA_t, kao i njihova ukupna koncentracija određeni su kod svakog od 91 ispitanika uključenog u studiju. Kod ukupno 87 ispitanika izmerena je koncentracija TSHRA_t primenom nove IMMULITE TSI 2000 CLIA metode, zbog čega je uporedna komparativna analiza sve tri primenjene laboratorijske metode za određivanje nivoa TSHRA_t izvedena na uzorcima seruma 87 ispitanika. Nivo TOS i TAS je određen uporedno u uzorcima seruma 91 ispitanika, nakon čega je računskim putem određena vrednost OSI. Masena koncentracija IL-6 i IL-1RA je izmerena u serumu 91 ispitanika, dok je koncentracija IL-1β i IL-8 određena kod 65 i 78 ispitanika, redom. Nivo 8-OHdG je određen u uzorcima plazme ukupno 68 ispitanika. Dodatno je za ovu studiju selektovano 23 zdrava ispitanika, 20 žena i 3 muškaraca, prosečne starosti $45,7 \pm 10,3$ godina.

3.2. Metode

Eksperimentalni rad je izveden u Laboratoriji za medicinsko-biohemijske analize, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za molekularna tiroidna istraživanja, Johannes Gutenberg univerzitetskog medicinskog centra u Majncu, Nemačka, u Službi za laboratorijsku dijagnostiku Kliničko bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ u Beogradu, kao i u privatnoj kliničko-biohemijskoj laboratoriji „Beograd“.

3.2.1. Klinička evaluacija simptoma i znakova Graves-ove orbitoaptije

Isti specijalista oftalmologije je izveo oftalmološki pregled kod svakog od pacijenata. Oftalmološki pregled je podrazumevao ispitivanje sledećih znakova i simptoma GO, prema važećim kliničkim protokolima: znakova inflamacije mekog tkiva orbite, retrakcije kapaka, proptoze/egzoftalmusa, prisustva duplih slika, motiliteta ekstraokularnih mišića, oštine vida, kolornog vida, očnog pritiska, lagoftalmusa, integriteta očnog živca, kao i prisutva bolova, osećaja zatezanja, simptoma iritacije oka i fotofobije.

3.2.1.1. Klinička evaluacija simptoma i znakova aktivnosti Graves-ove orbitopatije

Aktivnost GO predstavlja stepen orbitalne inflamacije i procenjena je na osnovu zbira kliničke aktivnosti (CAS) u okviru koga su analizirani sledeći znakovi i simptomi GO: znaci inflamacije mekih tkiva orbite (otok kapaka, crvenilo kapaka, crvenilo konjuktiva, hemoza i inflamacija plike ili karunkule), bol prilikom pogleda na gore ili dole i spontani retrobulbarni bol u mirovanju (*Tabela 2*).

Tabela 2. Zbir kliničke aktivnosti (CAS). Preuzeto iz: *Bartalena L, Kahaly GJ, Baldeschi L, Dayan CM, Eckstein A, Marcocci C. The 2021 European group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) clinical practice guidelines for the medical management of Graves' orbitopathy. Eur J Endocrinol 2021;185(4): G43–67.*, sa modifikacijom

Parametar	Bodovanje
Retrobulbarni bol prilikom pogleda na gore ili na dole	0/1
Spontani retrobulbarni bol u miru	0/1
Crvenilo kapaka	0/1
Crvenilo konjunktiva	0/1
Hemoza	0/1
Otok kapaka	0/1
Otok plike ili karunkule	0/1
Povećanje od 2 mm ili više egzoftalmusa u poslednja 1 do 3 meseca	0/1
Smanjenje oštine vida u poslednja 1 do 3 meseca	0/1
Smanjenje motiliteta oka od 8 stepeni ili više u poslednja 1 do 3 meseca	0/1

Na ovaj način GO je klasifikovana kao aktivna i neaktivna. U slučaju kontrolnog pregleda pacijenta, analizirana je promena sledećih parametara težine GO: povećanje od 2 mm ili više egzoftalmusa u poslednjih 1 do 3 meseca, smanjenje oštine vida u poslednjih 1 do 3 meseca i smanjenje motiliteta oka od 8 stepeni ili više u poslednjih 1 do 3 meseca. Zbir kliničke aktivnosti obuhvata ukupno 10 bodova, od kojih se 2 boda odnose na simptome, 5 na znakove inflamacije i 3 na promenu težine bolesti tokom vremena, a svaki od ispitivanih znakova i simptoma GO nosi po jedan bod (69). Prilikom prvog pregleda pacijenta, prisustvo 3 od 7 bodova se klasifikuje kao aktivna GO, dok se prilikom sledećeg pregleda 3 od 10 bodova klasifikuje kao značajna aktivnost bolesti, odnosno posmatra se da li je došlo do značajne promene težine GO (69).

Svi navedeni znakovi inflamacije mekih tkiva orbite procenjeni su na osnovu komparativnog atlasa sa fotografijama u boji (56), prema aktuelnim preporukama EUGOGO vodiča (67). Ovaj atlas sadrži smernice za procenu svih parametara inflamacije mekih tkiva orbite i primere precizno definisanih oftalmoloških znakova (56, 67).

3.2.1.2. Klinička evaluacija simptoma i znakova težine Graves-ove orbitopatije

Težina GO je procenjena na osnovu kliničkog pregleda sledećih znakova i simptoma bolesti: retrakcija kapaka, zahvaćenost mekih tkiva orbite (otok kapaka, crvenilo kapaka, crvenilo konjunktiva, hemoza, otok plike ili karunkula), egzoftalmus, diplopije, zahvaćenost očnih mišića

(motilitet očiju), zahvaćenost rožnjače (odsutna/keratopatija/ulceracija rožnjače) i zahvaćenost optičkog nerva (67, 279). Na osnovu težine GO, GO je klasifikovana kao blaga, srednje teška do teška i po vid ugrožavajuća GO (usled distiroidne optičke neuropatije i/ili oštećenja rožnjače) (Tabela 3). Evaluacija težine GO je izvršena u skladu sa važećim preporukama EUGOGO organizacije (67).

Tabela 3. EUGOGO klasifikacija težine GO. Preuzeto iz: *Bartalena L, Kahaly GJ, Baldeschi L, Dayan CM, Eckstein A, Marcocci C. The 2021 European group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) clinical practice guidelines for the medical management of Graves' orbitopathy. Eur J Endocrinol 2021;185(4): G43–67.*, sa modifikacijom

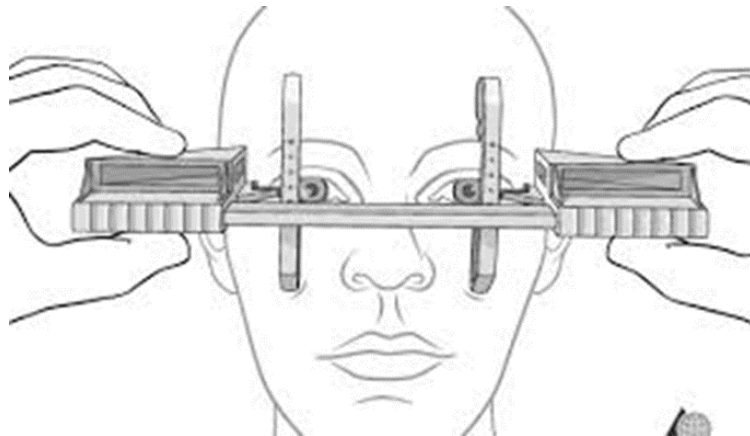
Klasifikacija	Karakteristike
Blaga GO	Pacijenti čije karakteristike imaju samo blaži uticaj na svakodnevne aktivnosti, nedovoljan kako bi se opravdala imunomodulatorna terapija ili hirurški tretman. Imaju prisutnu jednu ili više sledećih karakteristika: blaga retrakcija kapaka (<2 mm), blaga inflamacija mekog tkiva, egzoftalmus < 3 mm iznad normalnog za rasu i pol, diplopije nisu prisutne ili su povremene, izloženost rožnjače koja pokazuje odgovor na primenu lubrikantnih sredstava
Umerena do teška GO	Pacijenti koji nemaju GO koja ugrožava vid, ali bolest ima dovoljan uticaj na svakodnevne aktivnosti da se opravdava rizik od primene imunosupresiva (u slučaju aktivne GO) ili hirurške intervencije (u slučaju neaktivne GO). Obično imaju dve ili više sledećih karakteristika: retrakcija kapaka ≥ 2 mm, umerena do teška inflamacija mekih tkiva, egzoftalmus ≥ 3 mm iznad proseka za rasu i pol, nestalne ili stalne diplopije.
Ugrožavajuća po vid (veoma teška) GO	Pacijenti sa distiroidnom optičkom neuropatijom i/ili ulcerom rožnjače.

3.2.1.2.1. Klinička evaluacija palpebralne aperture

Palpebralna apertura predstavlja razdaljinu između ivica kapaka izraženu u mm koja se meri u cilju procene prisustva i stepena retrakcije gornjeg i donjeg kapka. Kao referentna tačka u odnosu na koju se meri palpebralna apertura koristi se središte zenice oka. Kako bi se merenje pravilno izvršilo, neophodno je da pacijent sedi relaksirano, sa pogledom u primarnom položaju, sa udaljenom fiksacijom. Kod odraslih osoba gornji kapak je normalno pozicioniran na 2 mm (34, 279).

3.2.1.2.2. Klinička evaluacija egzoftalmusa/proptoze

Egzoftalmus je kod pacijenata izmeren pomoću Hertelovog egzoftalmometra, postupkom koji se naziva egzoftalmometrija. Kod svih pacijenata, korišćen je isti model egzoftalmometra, a merenje je izvršio isti oftalmolog, kako bi se smanjio stepen varijacije. Proptoza je definisana kao vrednost koja je 2 mm veća u odnosu na vrednost koja je prosečna za pol, starost i rasu pacijenta. Aparat se čvrsto postavlja na obod orbite, u regionu slepoočnica pacijenta, pri čemu je neophodno da se referentne tačke instrumenta adekvatno poravnaju (*Slika 7*). Vrednost egzoftalmusa se zatim očitava sa instrumenta, kao razdaljina između najdublje palpabilne tačke spoljašnjeg oboda orbite i površine, odnosno vrha rožnjače. Rezultati merenja se izražavaju u mm (34).



Slika 7. Prikaz egzoftalmometrije po Hertelu; preuzeto sa internet stranice:

<https://surgeryreference.aofoundation.org/>

3.2.1.2.3. Klinička evaluacija diplopija

Klinička evaluacija diplopija, odnosno duplih slika se kod pacijenata sa GO sprovodi u cilju procene stepena zahvaćenosti ekstraokularnih mišića. U ovom istraživanju, prisustvo i stepen diplopija procenjeni su na osnovu subjektivnog skora diplopija koga su definisali Bahn i Gorman (*Tabela 4*) (65).

Tabela 4. Prikaz diplopija skora

Stepen diplopija	Opis diplopija
Stepen I	Povremene diplopije, prisutne samo prilikom umora oka
Stepen II	Nestalne diplopije, prisutne u ekstremnim pozicijama oka (pogled na gore ili u stranu)
Stepen III	Stalne diplopije, stalne, prisutne u primarnoj poziciji, koriguju se prizmama
Stepen IV	Stalne diplopije koje se ne mogu korigovati prizmama

3.2.1.2.4. Klinička evaluacija pokretljivosti očnih mišića

Pokretljivost očnih mišića je procenjena primenom objektivnog merenja dukcije u stepenima. Zasebno su analizirani pokreti abdukcije, addukcije, elevacije i depresije oka, pojedinačno na svakom oku. Za svaki od ovih pokreta postoji definisan fiziološki opseg vrednosti. Merenje pokretljivosti očnih mišića predstavlja objektivan princip za procenu stepena zahvaćenosti očnih mišića (34).

3.2.1.2.5. Klinička procena distiroidne optičke neuropatije

Klinička procena vizuelnog oštećenja u okviru GO se izvodi na osnovu detekcije prisustva distiroidne optičke neuropatije (DON), odnosno oštećenja optičkog nerva. Kliničko ispitivanje DON obuhvata: merenje oštine vida (obično pomoću Logmar dijagrama, a u obzir se uzima najbolje korigovan vizus), procenu kolornog vida ispitivanjem u crvenom i zelenom delu spektra (Ishihara) ili plavom i žutom, aferentni pupilarni defekt (odsutan/prisutan), pregled vidnog polja ukoliko se sumnja na DON (fundoskopija-pregled očnog dna i perimetrija-ispitivanje perifernog vida). Dodatno je kod svih pacijenata izmeren intraokularni pritisak, pri čemu se visoke vrednosti često javljaju ukoliko postoji kompresija optičkog nerva (34, 279).

3.2.2. Određivanje funkcionalne aktivnosti TSHRA_t

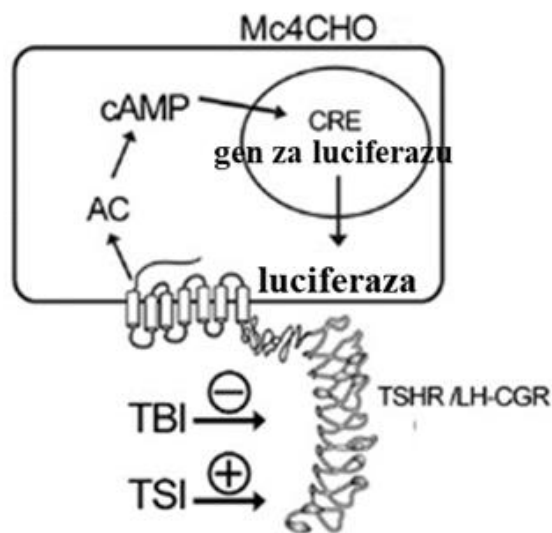
Funkcionalna aktivnost TSHRA_t izmerena je primenom tehnike bioeseja u Laboratoriji za molekularna tiroidna istraživanja, Johannes Gutenberg univerzitetskog medicinskog centra u Majncu, u Nemačkoj, gde su zamrznuti uzorci seruma poslani iz Laboratorije za medicinsko-

biohemijske analize, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu kurirskom službom na suvom ledu. Uzorci su primljeni u veoma dobrom stanju. Nakon jednog postupka odmrzavanja, u uzorcima su izmerena stimulatorna i blokirajuća aktivnost TSHRA_t (TSA_b i TBA_b) u jednoj seriji, primenom reagensa jednog lota. Osooblje Laboratorije za molekularna tiroidna istraživanja, Johannes Gutenberg univerzitetskog medicinskog centra, nije bilo upoznato sa kliničkim podacima pacijenata, niti sa rezultatima ostalih laboratorijskih testova sprovedenih u ovom istraživanju.

Stimulatorna i blokirajuća aktivnost TSHRA_t su zasebno određene primenom komercijalnih bioloških testova za kvantifikaciju TSA_b i TBA_b. Serumska aktivnost TSA_b je određena pomoću komercijalnog bioeseja koji je dobio odobrenje FDA (Thyretain TSI, Stimulating Reporter BioAssay, Quidel, San Diego, CA, SAD), prema uputstvima proizvođača (198, 199, 280, 281). Serumska aktivnost TBA_b izmerena je pomoću komercijalnog bioeseja koji ima CE oznaku (ispunjava osnovne zahteve svih relevantnih evropskih direktiva o medicinskim sredstvima) (Thyretain TBI, Blocking Reporter BioAssay, Quidel, San Diego, CA, SAD), prema uputstvima proizvođača (201, 282, 283). Nivo TSA_b je izražen kao procenat odnosa uzorka i standarda (*engl. Specimen to Reference Ratio, SRR%*), a TBA_b kao procenat inhibicije signala (% inhibicije). Deklarisana *cut-off* vrednost za TSA_b je 140 SRR% i 34% inhibicije za TBA_b.

Oba testa koriste genetskim inženjeringom dobijene jajne ćelije kineskog hrčka (CHO) koje eksprimiraju himerni TSHR (Mc4) i cAMP-inducibilni reporter gen za luciferazu. Primenjene CHO-Mc4 ćelije su vijabilne, kriogeniski zamrznute i obezbeđene u izmerenim alikvotima. Ćelije su preko noći zasejane i uzgajane na mikrotitarskoj ploči od 96 mesta, 15 do 18 sati do stvaranja konfluentnog monosloja ćelija. U ovoj fazi se mešaju odmrznute CHO-Mc4 ćelije, medijum za rast ćelija i rastvor za vezivanje ćelija za mikrotitarsku ploču. Sve korake ove faze reakcionog procesa je neophodno izvesti u sterilnim uslovima, u lamilarnoj komori kako bi se sprečila bilo kakva kontaminacija. Nakon 15 do 18 sati inkubacije u 5% CO₂ inkubatoru na 35 do 37 °C, prvo je bilo neophodno da se mikroskopski proveriti da nije došlo do kontaminacije mikroorganizmima i da su ćelije raspoređene u jednom kontinuiranom sloju. U slučaju znakova kontaminacije, nagomilavanja ćelija ili više slojeva ćelija, bilo je neophodno odbaciti datu mikrotitarsku ploču. Nakon toga su na ploču dodati prethodno razblaženi uzorci seruma pacijenata, referentni standard i kontrole. Ova smeša je zatim inkubirana 3 sata, u 5% CO₂ inkubatoru na 35 do 37 °C

kako bi se omogućila reakcija između CHO-Mc4 ćelija i analita (280, 282). Ukoliko su TSAb prisutna u serumu pacijenta, ona se vezuju za himerni humani TSHR na površini ćelije. Kada su CHO-Mc4 ćelije izložene delovanju TSAb pokreće se signalna kaskada što rezultuje povećanim stvaranjem cAMP, aktivacijom cAMP-inducibilnog reporter gena za luciferazu i posledične pojačane sinteze luciferaze koja se kvantifikuje dodatkom luciferina. Reakcijom luciferina i luciferaze stvara se luminescentni svetlosni signal koji se meri pomoću luminometra kao relativne svetlosne jedinice (*engl. Relative Light Units, RLU*). Nakon inkubacije reakcione smeše ćelije se liziraju, nakon čega je moguće kvantifikovati nivo luciferaze. Značajno povećanje luminescentnog signala u odnosu na referentni standard ukazuje na prisustvo TSAb u analiziranom uzorku (280). Nasuprot tome, TBAb antitela inhibiraju proizvodnju cAMP i generisanje svetlosnog signala (*Slika 8*).



Slika 8. Šematski prikaz Elecsys Anti-TSHR ECLIA metode. Preuzeto iz: Jang SY, Shin DY, Lee EJ, Lee SY, Yoon JS. Relevance of TSH-receptor antibody levels in predicting disease course in Graves' orbitopathy: comparison of the third-generation TBII assay and Mc4-TSI bioassay. *Eye (Lond)* 2013;27:964–71., sa modifikacijom.

U TBAb bioeseju, uzorci seruma, pozitivne i negativne kontrole, kao i standarda, mešaju se sa radnim rastvorom goveđeg TSH u odnosu 1:11, pre dodavanja na mikrotitarsku ploču sa CHO-

Mc4 ćelijama. Ukoliko su TBAb prisutna u uzorku, ona se vezuju za himerni TSHR i blokiraju vezivanje TSH za TSHR što rezultuje inhibicijom signalne kaskade i stvaranja cAMP (282). Smanjen nivo cAMP se detektuje na osnovu smanjene sinteze luciferase i svetlosnog signala, pa se zato blokirajuća aktivnost ovih antitela izražava kao % inhibicije.

Svi uzorci, standard i kontrole su analizirani u duplikatu, pri čemu je dozvoljeno odstupanje između ponovljenih merenja bilo $\leq 15\%$ (280, 282).

Vrednost SRR% uzorka se izračunava kao: (prosečna vrednost RLU uzorka / prosečna vrednost RLU referentnog standarda) x 100 = SRR% (280).

Vrednost % inhibicije uzorka se izražava kao: ((prosečna vrednost RLU referentnog standarda - prosečna vrednost RLU uzorka) / prosečna vrednost RLU referentnog standarda) x 100 = % inhibicije (282).

Oba testa su namenjena isključivo za analizu uzoraka seruma. Uzorke plazme i pune krvi nije moguće koristiti (280, 282).

U ovom istraživanju su poštovane preporuke proizvođača o stabilnosti, čuvanju i transportu uzoraka. Stabilnost uzoraka na 2-8 °C je do 72 sata, 2 meseca na -20 °C, a ukoliko se uzorci čuvaju duže od 2 meseca, neophodno je obezbediti -80 °C (280, 282). Uzorci su transportovani na temperaturi od 2-8 °C nakon uzorkovanja do Laboratorije za medicinsko-biohemijske analize, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, nakon čega su skladišteni na -80 °C.

Analitičke i kliničke karakteristike ispitane i deklarirane od strane proizvođača za oba primenjena bioeseja prikazane su u *Tabeli 5* (280, 282).

Tabela 5. Analitičke i kliničke karakteristike Thyretain TSAb i Thyretain TBAb bioeseja

Prikazane karakteristike testa	Thyretain TSAb bioesej	Thyretain TBAb bioesej
Granica detekcije (LoD)	89,14 SRR%	22% inhibicije
Interferencija nije bilo za ispitivane analite do navedenih vrednosti:	LH do 625 IU/L hCG do 40625 IU/L FSH do 2000 IU/L TSH 0,35 IU/L bilirubin do 626 µmol/L hemoglobin do 0,155 mmol/L trigliceridi do 13,2 mmol/L	LH do 625 IU/L hCG do 40625 IU/L FSH do 2000 IU/L TSH 0,35 IU/L bilirubin do 626 µmol/L hemoglobin do 0,155 mmol/L trigliceridi do 13,2 mmol/L
<i>Cut-off</i>	≥140 SRR%	≥34% inhibicije
Ukrštena reaktivnost sa drugim antitelima	Testirano je ukupno 36 uzoraka sa drugim autoimunim bolestima (16 HT, 10 RA i 10 SLE). U jednom uzorku ispitanika sa HT dobijen je pozitivan rezultat TSAb, međutim u tom uzorku je izmeren nivo TSH blizu nivoa iznad navedenih granica interferencija. U svim ostalim uzorcima dobijen je negativan rezultat TSAb.	Od ukupno 20 testiranih uzoraka pacijenata sa drugim autoimunim bolestima (10 RA i 10 SLE), ni u jednom uzorku nije detektovan pozitivna aktivnost TBAb.
Preciznost unutar serije (Kv%)	3,7% (30 ponavljanja)	5,7% i 2,1%, za uzorak niske i visoke TBAb aktivnosti, redom
Preciznost između serija (Kv%)	1,9%, 5,0% i 3,4%, za uzorak visoke, srednje i niske TSAb vrednosti, redom	/
Preciznost iz dana u dan (Kv%)	8,9%, 8,6%, 6,8%, 14,6% i 19, 2%, za uzorak visoke, srednje, niske, visoke normalne i normalne TSAb vrednosti, redom (15 dana)	16,4%, 6,3%, za uzorak niske i visoke TBAb aktivnosti, redom
Ponovljivost (Kv %)	23,6%, 23,5%, 25,4% i 17,9%, za uzorke A, B, C i D, redom	26,3%, 12,7%, 10,7%, za uzorke A, B, C i D, redom
Dijagnostička osetljivost	92%	/
Dijagnostička specifičnost	99,4%	/
Nevalidni rezultati	7,6 %	/

LoD-limit detekcije, Kv%-koeficijent varijacije, LH-luteinizirajući hormon, hCG-humani horioni gonadotropin, FSH- folikulostimulirajući hormone, TSH-tireostimulirajući hormon, HT-Hashimoto tiroiditis, RA-reumatoidni artritis, SLE-sistemska eritemski lupus

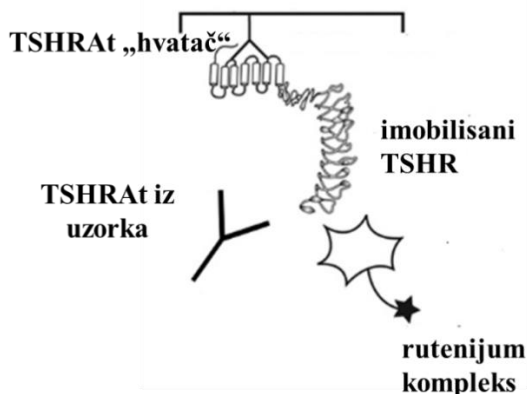
Diana i saradnici (199) su sprovedi standardizaciju Thyretain TSAb bioeseja, pri čemu su kalibrisali dobijene vrednosti TSAb prema drugom međunarodnom standardu (IS) TSAb, broj 08/204, Nacionalnog Instituta za biološke standarde i kontrole (National Institute for Biological Standards and Control, NRBC). Na taj način su vrednosti dobijene bioesejom za kvantifikaciju stimulatornih TSHRA_t, izražene u SRR%, prevedene u mIU/L. Kalibraciona kriva je konstruisana upotrebom standarda opsega koncentracija od 0,313 mIU/L do 200 mIU/L. Dobijena prosečna vrednost od 9,54-1,68 mIU/L je odgovarala *cut-off* vrednosti testa (SRR 140%), što je dokazano na uzorku od 60 pacijenata sa GB. Ovo je važan korak ka omogućavanju šire upotrebe ove metode i standardizaciji i uporedivosti rezultata merenja među laboratorijama. Na ovaj način se omogućava i direktno poređenje sirovih rezultata dobijenih tradicionalnim kompetitivnim testovima i tehnikom bioeseja, ne samo dobijene stope pozitivnosti rezultata testova.

3.2.3. Određivanje ukupne koncentracije TSHRA_t

Ukupna koncentracija TSHRA_t određena je komercijalnom rutinskom, kompetitivnom ECLIA metodom (Elecsys Anti-TSHR Immunoassay Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Nemačka), na imunohemijskom analizatoru Cobas e411, proizvođača Roche Diagnostics u privatnoj kliničko-biohemijskoj laboratoriji „Beograd“. Metoda je izvedena prateći uputstva koje je deklarirao proizvođač. Korišćen je reagens lota 46072901 (datum isteka roka 31.03.2021. godine). Za kontrolu kvaliteta upotrebljenog reagensa, takođe su korišćena dva nivoa komercijalnih kontrolnih uzoraka, *Preci Control Thyro 1* (LOT 479113) i *Preci Control Thyro 2* (LOT 479114), sa naznačenim srednjim vrednostima i dozvoljenim opsegom merenja od 5,14 IU/L (3,60-6,68) i 17,0 IU/L (13,4-20,6), redom.

Elecsys Anti-TSHR imunohemijski test zasniva se na kompetitivnom imunohemijskom principu i elektrohemioluminescentnom obliku detekcije (284). Ovaj oblik detekcije je vrsta hemiluminiscentnog određivanja u kome je ekscitacija posledica elektrohemijske reakcije (285). Ovaj test pripada trećoj generaciji kompetitivnih imunoeseja koja koriste sintetsko monoklonsko stimulatorno TSHRA_t (M22) (162). Reagens sadrži solubilizovani svinjski TSHR imobilisan mišjim monoklonskim antitelom na C-terminalni deo svinjskog TSHR, obeleženim biotinom i

humano monoklonsko autoantitelo M22 obeleženo kompleksom rutenijuma (rutenijum (II)-tris (bipiridil) helat, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) (Slika 9) (284).



Slika 9. Šematski prikaz Elecsys Anti-TSHR ECLIA metode. Preuzeto iz: Jang SY, Shin DY, Lee EJ, Lee SY, Yoon JS. Relevance of TSH-receptor antibody levels in predicting disease course in Graves' orbitopathy: comparison of the third-generation TBII assay and Mc4-TSI bioassay. *Eye (Lond)* 2013;27:964–71., sa modifikacijom.

U prvoj fazi reakcionog procesa se uzorak seruma inkubira sa rastvorom pufera za pretretman i reagensom pufera za predtretman koji sadrži imunokompleks rastvorenog svinjskog TSHR i monoklonskog mišjeg TSHRAt obeleženog biotinom. U ovoj fazi autoreaktivna antitela iz uzorka stupaju u interakciju sa TSHR kompleksom.

U drugoj fazi reakcionog procesa, nastalom kompleksu se dodaje puferski rastvor.

U sledećoj fazi reakcije se prethodnoj smeši dodaju magnetne mikročestice obložene streptavidinom i rutenijom obeleženo humano monoklonsko TSHRAt (M22). Vezana TSHRAt iz uzorka inhibiraju vezivanje rutenijom obeleženog M22 antitela. Nastali imunski kompleks se vezuje za magnetne čestice (čvrstu fazu) interakcijom biotina i streptavidina.

Na kraju se reakciona smeša premešta u mernu ćeliju, pri čemu se magnetne mikročestice sa streptavidinom i nastalim imunskim kompleksima uniformno raspoređuju na površini elektrode primenom magnetne sile (284).

Primena napona na elektrodu pokreće elektrohemiluminiscentnu reakciju koja se meri fotomultiplikatorom. Oslobođena količina svetlosti je indirektno proporcionalna količini antigena u uzorku. Rezultati se određuju preko kalibracione krive (284, 285). Analizator automatski preračunava rezultat u IU/L.

Test je sledljiv prema prvom međunarodnom standardu TSHRA_t, broj 90/672, koji definiše Svetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organisation, WHO*), a potvrđuje NRBC.

Ovaj test je namenjen za analiziranje uzoraka seruma, a navedena stabilnost uzoraka je do 7 sati na sobnoj temperaturi, do 6 dana na 2 do 8 °C i 12 meseci na -20 °C. Nije preporučljivo višestruko odmrzavanje i zamrzavanje uzoraka.

Kao preporučenu *cut-off* vrednost, određenu na uzorku od 436 zdravih osoba, 210 pacijenata bez GB, sa drugim bolestima štitne žlezde i 102 pacijenta sa nelečenom GB, proizvođač navodi 1,75 IU/L.

Proizvođač navodi da natrijum heparin može interferirati sa određivanjem TSHRA_t u ovoj metodi, pa se preporučuje da se ne koriste uzorci pacijenata koji su na terapiji natrijum heparinom. Frakcionisani heparin ne interferira u ovoj metodi do koncentracije od 50 IU/L. Dodatno je navedeno da u retkim slučajevim može doći do interferencija visokog titra antitela na antitela prisutna u reagensu, streptavidin ili rutenijum, međutim ovi efekti su svedeni na minimum (284).

Analitičke i kliničke karakteristike opisane metode su prikazane u *Tabeli 6*.

Tabela 6. Analitičke i kliničke karakteristike Elecsys Anti-TSHR ECLIA metode

Prikazane karakteristike testa	Anti-TSHR ECLIA metoda
Merni opseg (IU/L)	0,80-40 IU/L
Granica detekcije (LoD)	0,80 IU/L
<i>Cut-off</i>	1,75 IU/L
Preporučeno razblaženje uzorka	1:5 i 1:10
Interferencija nije bilo za sledeće vrednosti ispitivanih analita:	Bilirubin \leq 427 μ mol/L Hemoglobin \leq 0,248 mmol/L Lipidi \leq 16,94 mmol/L Biotin \leq 41 nmol/L (\leq 10 ng/mL)* RF \leq 600 IU/mL natrijum-heparin
Ukrštena reaktivnost nije utvrđena za sledeće vrednosti ispitivanih analita:	LH $<$ 10000 IU/L antiTGAt $<$ 4000 IU/mL FSH $<$ 10000 IU/L antiTPOAt $<$ 600 IU/mL hCG $<$ 50000 IU/L
Ponovljivost (Kv %)	11,6%, 9,3%, 1,2%, 0,6%, 3,1%, 1,5%, za uzorak pacijenta 1, 2, 3, 4 i uzorak kontrole 1 i 2, redom
Tačnost	$y = 0,95x + 0,76$; $r = 0,939$
Dijagnostička osetljivost	96%
Dijagnostička specifičnost	99%
AUC	0,99

LoD-limit detekcije, RF-reumatoidni faktor, LH-luteinizirajući hormon, FSH-folikulostimulirajući hormon, hCG-humani horioni gonadotropin, TGAt-antitireoglobulinska antitela, TPOAt-antitela na tiroidnu-peroksidazu, Kv%-koeficijent varijacije; *Kod pacijenata koji su na terapiji sa visokim dozama biotina (tj. $>$ 5 mg/dnevno) uzorak se ne sme uzeti do 8 sati nakon poslednjeg uzimanja biotina. Tačnost je ispitana poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima dobijenim radioimunohemijskom metodom za određivanje TSHRAt. Slaganje rezultata je analizirano primenom linearne regresione analize.; AUC-površina ispod krive.

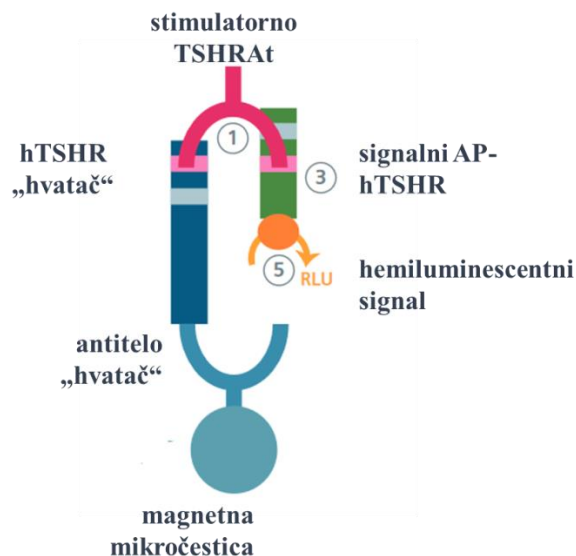
3.2.4. Određivanje koncentracije TSHRA_t primenom CLIA „sendvič“ metode

Koncentracija TSHRA_t izmerena je dodatno primenom komercijalne CLIA imunohemijske metode zasnovane na „sendvič“ principu određivanja (IMMULITE TSI 2000, Siemens Healthcare Diagnostics, UK), u Službi za laboratorijsku dijagnostiku Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ u Beogradu. Analiza je izvedena prema uputstvima proizvođača, na imunohemijskom analizatoru IMMULITE 2000, proizvođača Siemens (286).

Ovo je potpuno automatizovana imunohemijska metoda koja koristi dvostepeni hemiluminiscentni princip detekcije signala. Metoda upotrebljava par rekombinantnih himernih TSHR (hTSHR) u „sendvič“ formatu, odnosno nekompetitivnom principu antigen-antitelo reakcije. Jedan hTSHR je receptor „hvatač“ koji je imobilisan za čvrstu fazu (polistirenske mikročestice), a drugi hTSHR je signalni, obeležen enzimom alkalnom fosfatazom (*Slika 10*). Himerni receptor „hvatač“ je dobijen zamenom glavnog epitopa za vezivanje blokirajućih TSHRA_t, sa aminokiselinskom sekvencom LH/CG receptora pacova. Cilj ovakvog metodološkog dizajna bila je specifična detekcija stimulatornih TSHRA_t. Signalna himera koristi amino kraj aminokiselina hTSHR konjugovanog sa alkalnom fosfatazom.

Reakcioni proces uključuje dva ciklusa, inkubaciju uzorka sa receptorom „hvatačem“ i inkubaciju sa signalnim receptorom, sa ispiranjem nevezanog materijala između ciklusa. U prvom ciklusu se TSHRA_t iz uzorka vezuje jednim krajem za receptor „hvatač“, a drugim krajem za signalni TSHR, formirajući na taj način „sendvič“ ili most. Nakon dodavanja hemiluminiscentnog supstrata u reakcionu smešu, stvara se svetlosni signal kao posledica hemijske reakcije oksido-redukcije i nastala svetlost se meri luminometrom kao RLU jedinice izmerene u sekundi (*Slika 10*). Izmereni signal je direktno proporcionalan koncentraciji TSHRA_t u uzorku (202, 286).

Inkubacioni ciklusi traju sat vremena, a vreme koje je potrebno do dobijanja rezultata analize je 65 minuta (286).



Slika 10. Šematski prikaz IMMULITE 2000 TSI CLIA metode. Preuzeto iz: Kiaei D, Conarpe C, Birmingham N, Lei J, Bitcon V. *Clinical Evaluation of the IMMULITE 2000 TSI Assay*. Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA, sa modifikacijom

Ovaj laboratorijski test je sledljiv prema drugom međunarodnom standardu za TSHRAr, broj 08/204, koji definiše WHO, a potvrdio ga je NRBC.

Test je namenjen za određivanje TSHRAr u uzorcima seruma ili plazme, pri čemu kao antikoagulansi mogu da se koriste EDTA (etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina) ili litijum-heparin. Kako navodi proizvođač, stabilnost uzorka je 7 dana na 2 do 8 °C ili na -20 °C 12 meseci.

Definisana *cut-off* vrednost proizvođača, određena na uzorku od 133 lečenih pacijenata sa GB i 298 osoba sa drugim bolestima štitne žlezde ili autoimunim bolestima, je 0,55 IU/L (286).

Analitičke i kliničke karakteristike IMMULITE TSI 2000 CLIA metode prikazane su u *Tabeli 7*.

Tabela 7. Analitičke i kliničke karakteristike IMMULITE TSI 2000 CLIA metode

Prikazane karakteristike testa	IMMULITE TSI 2000 CLIA metoda
Merni opseg (IU/L)	0,10 - 40 IU/L
Granica detekcije (LoD)	0,06 IU/L
Granica kvantifikacije (LoQ)	0,10 IU/L
Cut-off	0,55 IU/L
High-dose hook efekat	> 800 IU/L
Interferencija nije bilo za sledeće vrednosti ispitivanih analita:	Bilirubin \leq 684 μ mol/L Hemoglobin \leq 0,125 mmol/L Lipidi \leq 5,64 mmol/L RF \leq 289 IU/mL
Ukrštena reaktivnost nije utvrđena za sledeće vrednosti ispitivanih analita, za koncentraciju TSI 0 IU/L i 0,4 IU/L:	LH na 500 IU/L (0,01% i 0%) FSH na 750 IU/L (0,01% i -0,01%) hCG 100000 IU/L (0,01% i 0,01%) TSH 0,14 IU/L (0,01% i -0,02%) antiTGAt 2000000 IU/mL (0,02% i 0,01%) antiTPOAt 2000000 IU/mL (0,02% i 0,02%)
Ponovljivost (Kv %)	7%, 4,1%, 4,4%, 4%, 3,5% i 6,6%, za uzorke srednje vrednosti 0,34 IU/L, 0,69 IU/L, 1,57 IU/L, 4,43 IU/L, 7,80 IU/L i 29,09 IU/L, redom
Preciznost unutar laboratorije (Kv%)	8,3%, 5%, 5,3%, 5,9%, 5,4% i 7,3%, za uzorke srednje vrednosti 0,34 IU/L, 0,69 IU/L, 1,57 IU/L, 4,43 IU/L, 7,80 IU/L i 29,09 IU/L, redom
Dijagnostička osetljivost	98,3%
Dijagnostička specifičnost	99,7%

LoD-limit detekcije, LoQ-limit kvantifikacije, LH-luteinizirajući hormon, FSH-folikulostimulirajući hormon, hCG-humanu horioni gonadotropin, TGAt-antitireoglobulinska antitela, TPOAt-antitela na tiroidnu-peroksidazu, Kv%-koeficijent varijacije; *Dijagnostička specifičnost je ispitana na 138 osoba sa drugim tiroidnim ili autoimunim bolestima (10 sa Adisonovom, 20 sa Sjogrenovom bolešću, 9 sa Hashimoto tiroiditisom, 2 sa multinodularnom strumom, 12 sa tiroidnim karcinomom, 10 sa dijabetes mellitusom tip 1, 10 sa sistemskim eritemskim lupusom, 10 sa reumatoidnim artritisom, 20 sa celijakijom, 15 sa Kronovom bolešću, 10 sa ulceroznim kolitisom, 10 sa pernicioznom anemijom) i na 200 zdravih ispitanika.

U ovom radu je upotrebljen reagens lota 264 (datum isteka roka 31.01.2020. godine), kao i standardi niske i visoke koncentracije (L (LOT L2SIL 111) i H (LOT L2SIH 111), datum isteka

31.03.2020. godine). Za kontrolu kvaliteta upotrebljenog reagensa, korišćena su dva nivoa komercijalnih kontrolnih uzoraka (QC 1 (LOT L2SIC1) 121 i QC2 (LOT L2SIC2) 121, datum isteka roka 31.03.2020. godine).

3.2.5. Određivanje nivoa interleukina primenom enzimskih imunohemijskih testova

U Laboratoriji za medicinsko-biohemijske analize, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, određena je masena koncentracija sledećih interleukina : IL-6, IL-1RA, IL-1 β i IL-8, u uzorcima seruma pacijenata. Masena koncentracija IL-6, IL-1RA, IL-1 β , IL-8 izmerena je primenom komercijalnih ELISA metoda, različitih proizvođača, detaljno prateći uputstva proizvođača testova.

3.2.5.1. Određivanje koncentracije interleukina-6 u serumu pacijenata

Koncentracija IL-6 u serumu pacijenata određena je primenom komercijalne ELISA metode visoke osetljivosti (Human IL-6 Quantikine® HS ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD). Primenjeni komercijalni kit sadržao je mikrotitarsku ploču prethodno obloženu odgovarajućim antitelima (monoklonska anti-IL-6 antitela), standarde, detekciona poliklonska anti-IL-6 antitela obeležena alkalnom fosfatazom i sve ostale neophodne reagensne. Metoda se zasniva na „sandvič“ imunohemijskom principu, odnosno stvaranju imunskog kompleksa IL-6 sa antitelom čvrste faze sa jedne strane i signalnim antitelom sa druge strane. Nevezani materijal se ispira u međufazama reakcionog procesa, a krajnji signal nastaje dodatkom supstrata (nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat, NADPH) i amplifikatora enzimske reakcije u reakcionu smešu, usled čega se razvija ružičasta boja. Na kraju se reakcionoj smeši dodaje stop rastvor (sumporna kiselina) za zaustavljanje enzimske reakcije, nakon čega se meri apsorbanacija na definisanoj talasnoj dužini (490 nm, sa korekcijom na 650 do 690 nm) (287). Preporuka proizvođača je da se svi uzorci analiziraju u duplikatu i da se konačan rezultat predstavlja kao srednja vrednost dva merenja. Test je namenjen za određivanje nivoa IL-6 u serumu, EDTA ili citratnoj plazmi i urinu. Za očitavanje apsorbanacija primenjen je automatski čitač mikrotitarskih ploča Rayto RT-6100, kompanije Rayto Life and Analytical Sciences, dok je za pranje

mikrotitarske ploče u međufazama procesa korišćen takođe automatski sistem za ispiranje ploča, kompanije Rayto Life and Analytical Sciences. Za konstruisanje standardne krive i preračunavanje masenih koncentracija uzoraka upotrebljen je automatski program kompanije Rayto. Dobijena koncentracija IL-6 je direktno proporcionalna intenzitetu stvorene svetlosti tokom reakcije.

Metoda je izvedena prema procedurama koje je definisao proizvođač testa. Korišćen je reagens lota p101090.

Definisani dinamički opseg testa bio je 0,2-10 pg/mL, a analitička osetljivost 0,110 pg/mL. Test je dizajniran tako da prepozna prirodan oblik i rekombinatni humani IL-6. Što se tiče analitičke specifičnosti testa, nije uočena značajna ukrštena reakcija antitela reagensa (< 5% ukrštene reaktivnosti sa srodnim molekulima).

Proizvođač navodi koeficijente varijacije za preciznost u seriji: 6,9%, 7,8% i 7,4% i za preciznost između serija: 9,6%, 7,2% i 6,5%, redom za 3 analizirana uzorka seruma.

U uzorcima seruma 52 zdrava dobrovoljca dobijena je srednja vrednost koncentracije IL-6 od 1,77 pg/mL, u opsegu od 0,447-9,96 pg/mL.

Metoda je sledljiva prema prvom međunarodnom standardu za IL-6, broj 89/548, koji definiše WHO, a potvrdio ga je NRBC. Ovaj standard predstavlja rekombinatni humani IL-6 dobijen iz CHO ćelija (287).

3.2.5.2. Određivanje koncentracije interleukina-1 receptor antagoniste u serumu pacijenata

Masena koncentracija IL-1RA u serumu pacijenata određena je primenom komercijalne ELISA metode (Human IL-1ra/IL-1F3 Quantikine® ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD), prema protokolu koji je definisao proizvođač testa. U sklopu komercijalnog kita bila je mikrotitarska ploča prethodno obložena odgovarajućim antitelima (monoklonska anti-IL-1RA antitela), standarde, detekciona poliklonska anti-IL-1RA antitela obeležena peroksidazom rena i sve ostale neophodne reagentse. Metoda se zasniva na kvantitativnom „sendvič“ imunohemijskom principu u kome dolazi do stvaranja imunskog kompleksa između IL-1RA i antitela čvrste faze sa jedne strane i IL-1RA i detekcionog antitela sa druge strane. Sav nevezani materijal se ispira u međufazama reakcionog procesa, a krajnji signal nastaje dodatkom supstrata

(H₂O₂ i tetrametilbenzidin) u reakcionu smešu, pri čemu nastaje plava boja. Enzimaska reakcija se zaustavlja dodatkom stop reagensa (sumporna kiselina) nakon čega se boja menja iz plave u žutu. Po zaustavljanju enzimske reakcije apsorbancija se meri na definisanoj talasnoj dužini (450 nm, sa korekcijom na 540 do 570 nm) (288). Preporuka proizvođača je da se svi uzorci analiziraju u duplikatu i da se srednja vrednost dva merenja uzima kao konačan rezultat. Test je namenjen za određivanje nivoa IL-1RA u uzorcima seruma, EDTA i heparinizirane plazme i u ćelijskim kulturama. Za očitavanje apsorbancija primenjen je automatski čitač mikrotitarskih ploča Rayto RT-6100, kompanije Rayto Life and Analytical Sciences, dok je za pranje mikrotitarske ploče u međufazama procesa korišćen takođe automatski sistem za ispiranje ploča, kompanije Rayto Life and Analytical Sciences. Za konstruisanje standardne krive i preračunavanje masenih koncentracija uzoraka upotrebljen je automatski program kompanije Rayto. Dobijena koncentracija IL-1RA je direktno proporcionalna intenzitetu stvorene svetlosti tokom reakcije.

Analitička osetljivost primenjenog testa je 18,3 pg/mL. Definisani dinamički opseg testa je 31,2-2000 pg/mL, za koji proizvođač navodi linearan odnos izmerenih apsorbancija i masenih koncentracija. Test je specifičan za prirodni i rekombinantni IL-1RA, pri čemu je utvrđeno postojanje < 0,5% ukrštene reaktivnosti sa srodnim molekulima.

Proizvođač testa navodi koeficijente varijacije za preciznost u seriji: 5,7%, 4,1% i 4,1% i za preciznost između serija: 10,3%, 6,8% i 5,7%, redom za 3 analizirana uzorka seruma.

U serumu 35 zdravih dobrovoljaca prosečna izmerena masena koncentracija IL-1RA bila je 360 ± 214 pg/mL.

Za kalibraciju je upotrebljen visoko prečišćen standard rekombinantnog humanog IL-1RA, koga je proizveo R&D Systems (288).

3.2.5.3. Određivanje koncentracije interleukina-1 beta u serumu pacijenata

Masena koncentracija IL-1β u serumu pacijenata određena je primenom komercijalnog ELISA kita (Human IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine® ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD), koji sadrži mikrotitarsku ploču prethodno obloženu odgovarajućim antitelima (monoklonska anti-IL-1β antitela), standarde, detekciona poliklonska anti-IL-1β antitela

obeležena peroksidazom rena i sve ostale neophodne reagense. Prilikom izvođenja metode u potpunosti su poštovane procedure koje je definisao proizvođač testa. Ova metoda je kalibrisana upotrebom zrelog oblika IL-1 β , zbog čega ima smanjenu sposobnost detekcije nezrelog molekula, odnosno prekursora IL-1 β u biološkim uzorcima. Međutim, kako proizvođač navodi, prekursor IL-1 β nije predominantan, niti aktivan oblik molekula u biološkim tečnostima, zbog čega se ova metoda može koristiti za kvantifikaciju aktivnog oblika IL-1 β u uzorcima bioloških tečnosti (289).

Princip metode je zasnovan na stvaranju imunskog kompleksa IL-1 β sa antitelom čvrste faze sa jedne strane i signalnim antitelom sa druge strane. Nevezani materijal se ispira u međufazama reakcionog procesa, a plavo obojeni proizvod enzimske reakcije nastaje dodatkom supstrata u reakcionu smešu (H_2O_2 i tetrametilbenzidin). Enzimska reakcija se zaustavlja dodatkom stop rastvora (sumporna kiselina) usled čega se boja menja iz plave u žutu, nakon čega se meri apsorbanacija na talasnoj dužini 450 nm, sa korekcijom na 540 nm ili 570 nm (289). Za očitavanje apsorbanacija primenjen je automatski čitač mikrotitarskih ploča Rayto RT-6100, kompanije Rayto Life and Analytical Sciences, dok je za ispiranje mikrotitarske ploče u međufazama procesa korišćen takođe automatski sistem za ispiranje ploča, kompanije Rayto Life and Analytical Sciences. Za konstruisanje standardne krive i preračunavanje masenih koncentracija uzoraka upotrebljen je automatski program kompanije Rayto. Preporuka proizvođača je da se svi uzorci analiziraju u duplikatu i da se srednja vrednost dva merenja uzima kao konačan rezultat. Dobijena koncentracija IL-1 β je direktno proporcionalna intenzitetu stvorene svetlosti tokom reakcije.

Ovaj test je namanjen određivanju koncentracije IL-1 β u uzorcima seruma, EDTA, citratne ili heparinizirane plazme, kao i u ćelijskim kulturama.

Što se tiče analitičkih karakteristika metode koje je deklarirao proizvođač testa, analitička osetljivost primenjenog testa je 1 pg/mL, a dinamički opseg 3,9-250 pg/mL. Test je specifičan za prirodni i rekombinantni IL-1 β , pri čemu je utvrđeno postojanje < 0,5% ukrštene reaktivnosti sa srodnim molekulima.

Proizvođač testa navodi koeficijente varijacije za preciznost u seriji: 2,4%, 3,3%, 2,3% i 3,4%, redom za 4 analizirana uzorka i za preciznost između serija: 7,1%, 3,4% i 4,1%, redom za 3 analizirana uzorka seruma.

U svih 40 uzoraka seruma, dobijenih od 40 zdravih dobrovoljaca, prosečna izmerena masena koncentracija IL-1 β bila je manja od najnižeg standarda upotrebljenog za konstruisanje kalibracione krive (< 3,9 pg/mL).

Test je sledljiv prema visoko prečišćenom standardu za IL-1 β , broj 86/552, koga je potvrdio NRBC (289).

3.2.5.4. Određivanje koncentracije interleukina-8 u serumu pacijenata

Masena koncentracija IL-8 je u serumu pacijenata određena primenom komercijalne ELISA metode visoke osetljivosti (Human IL-8/CXCL8 Quantikine® HS ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD). U sklopu komercijalnog kita bili su mikrotitarska ploča prethodno obložena odgovarajućim antitelima (monoklonska anti-IL-8 antitela), standardi, detekciona poliklonska anti-IL-8 antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom i svi ostali neophodni reagensi. Metoda primenjuje kvantitativni „sendvič“ imunohemijski princip, što podrazumeva vezivanje IL-8 za antitelo imobilisano za čvrstu fazu sa jedne strane i za signalno antitelo sa druge strane. Nevezani materijal se ispire u međufazama reakcionog procesa, a krajnji signal nastaje dodatkom supstrata (nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat, NADPH) i amplifikatora enzimske reakcije, usled čega se razvija ružičasta boja. Na kraju se reakcionoj smeši dodaje rastvor sumporne kiseline za zaustavljanje enzimske reakcije, nakon čega se meri apsorbancija na definisanoj talasnoj dužini (490 nm, sa korekcijom na 650 do 690 nm) (290). Proizvođač preporučuje da se svi uzorci analiziraju u duplikatu, nakon čega se rezultat izražava kao srednja vrednost dva merenja. Test je namenjen za određivanje masene koncentracije IL-8 u uzorcima seruma, EDTA ili heparinizirane plazme. Automatski čitač mikrotitarskih ploča Rayto RT-6100, kompanije Rayto Life and Analytical Sciences, upotrebljen je za očitavanje apsorbancija. Automatski sistem za ispiranje ploča, kompanije Rayto Life and Analytical Sciences, korišćen je za ispiranje mikrotitarske ploče. Za konstruisanje standardne krive i preračunavanje masenih koncentracija uzoraka upotrebljen je automatski program kompanije Rayto. Dobijena koncentracija IL-8 bila je direktno proporcionalna intenzitetu stvorene svetlosti.

Analitička osetljivost metode je 0,4 pg/mL, a dinamički opseg merenja iznosi 1-64 pg/mL. Metoda je specifična za prirodni i rekombinantni IL-8, sa stopom ukrštene reaktivnosti < 0,5% sa srodnim molekulima.

Proizvođač testa navodi koeficijente varijacije za preciznost u seriji: 5,5%, 3,7% i 7,3% i za preciznost između serija: 8,0%, 8,2% i 9,4%, redom za po 3 analizirana uzorka seruma.

Prosečna masena koncentracija IL-8 u 35 uzoraka seruma dobijenih od 35 zdravih dobrovoljaca, bila je $10,8 \pm 3,19$ pg/mL.

Metoda je sledljiva prema prvom međunarodnom standardu za IL-8, broj 89/520, koji je definisala WHO, a potvrdio NRBC (290).

3.2.6. Određivanje nivoa parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

U Laboratoriji za medicinsko-biohemijske analize, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, određen je nivo TOS i TAS u uzorcima seruma, dok je masena koncentracija 8-OHdG određena u uzorcima plazme pacijenata.

3.2.6.1. Određivanje nivoa totalnog oksidantnog statusa u serumu pacijenata

Sadržaj ukupnih oksidanasa u serumu (TOS) određen je primenom komercijalne spektrofotometrijske metode kompanije Rel Assay Diagnostics (TOS, Total Oxidant Status, Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turska) aplikovane na biohemijski analizator Olympus AU400 proizvođača Beckman Coulter (Beckman Coulter Diagnostics, Hamburg, Nemačka), prema preporukama proizvođača. Ova metoda se zasniva na principu koji je prvi definisao Erel i optimizovao za primenu na automatskim sistemima (275).

Korišćeni reagens je dvokomponentan i sadrži pufer, sumpornu kiselinu, kompleks jona gvožđa i hromogen (O-dianizidin). Princip određivanja je zasnovan na oksidaciji fero jona u feri jon u prisustvu različitih oksidanasa koji su prisutni u uzorku. Feri jon gradi obojeni kompleks sa hromogenom u kiseloj sredini. Intenzitet boje se meri spektrofotometrijski, na talasnoj dužini od

530 nm, a ekvivalentan je ukupnoj količini prisutnih molekula oksidanasa u analiziranom uzorku. Za kalibraciju se koristi rastvor vodonik-peroksida, a rezultati se izražavaju u mikromolima vodonik-peroksida po litru (ekvivalent $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{L}$). Koncentracije TOS su određene metodom standardne kalibracione krive, na osnovu izmerenih apsorbancija standarda poznate koncentracije. Pakovanja reagensa sadrži i dva nivoa kontrolnih uzoraka, ekvivalentno 5 $\mu\text{mol/L}$ i 20 $\mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$, redom (291).

U ovom radu upotrebljen je reagens lota AK211360, standard lota AK211380 i kontrola lota AK21138C.

Metoda je namenjena za određivanje nivoa TOS u uzorcima seruma, heparinizirane plazme, salive, urina, kao i u liziranim ćelijama i homogenatima tkiva. Plazma uzorkovana sa EDTA antikoagulansom ne može se koristiti zbog interferencije koju proizvodi EDTA. Stabilnost uzoraka je do jedne nedelje na 4 °C, 6 meseci na -20 °C i godinu dana na -80 °C.

Proizvođač testa navodi koeficijente varijacije za preciznost u seriji od 3,9% i za preciznost između serija od 3,2%.

Referentni opseg TOS koji navodi proizvođač metode je 4,00-6,00 $\mu\text{mol/L}$, s tim što je preporuka da svaka laboratorija odredi svoje referentne vrednosti (291).

3.2.6.2. Određivanje nivoa totalnog antioksidativnog statusa organizma u serumu pacijenata

Ukupni antioksidantni status (TOS) u serumu pacijenata određen je primenom komercijalne spektrofotometrijske metode kompanije Rel Assay Diagnostics (TAS, Total Antioxidant Status, Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turska), aplikovane na biohemijski analizator Olympus AU400 proizvođača Beckman Coulter (Beckman Coulter Diagnostics, Hamburg, Nemačka), detaljno prateći uputstva proizvođača. Primenjena metoda je zasnovana na principu koji je prvi definisao Erel i optimizovao za primenu na automatskim sistemima (276).

Upotrebljeni reagens je dvokomponentan i sadrži acetatni pufer i hromogen (radikal azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskue kiseline (ABTS')). Antioksidansi prisutni u uzorku redukuju tamnoplavo-zeleno obojen ABTS radikal do bezbojnog redukovanog ABTS oblika. Ovo se manifestuje smanjenjem intenziteta boje i promenom apsorpcije na 660 nm koja je srazmerna

koncentraciji ukupnih antioksidansa u uzorku. Test je kalibrisan standardnim rastvorom antioksidansa koji je tradicionalno nazvan Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina), a predstavlja analog vitamina E. Koncentracije TAS su određene metodom standardne kalibracione krive, na osnovu izmerenih apsorbancija standarda poznate koncentracije. Dobijene vrednosti predstavljaju koncentraciju ukupnog antioksidativnog kapaciteta organizma, a izražavaju se u ekvivalent mmol Trolox/L. Pakovanja reagensa sadrži i dva nivoa kontrolnih uzoraka, ekvivalentno 0,5 mmol/L i 2 mmol/L Troloxa, redom (292).

Metoda je namenjena za određivanje nivoa TAS u uzorcima seruma, heparinizirane plazme, salive, urina, kao i u liziranim ćelijama i homogenatima tkiva. Takođe je moguće primeniti ovu metodu za određivanje koncentracije TAS i u namirnicama (pica, ulja i voćni sokovi). Plazmu uzorkovanu sa EDTA antikoagulansom nije moguće koristiti zbog interferencije koju proizvodi EDTA. Stabilnost uzoraka je do jedne nedelje na 4 °C, 6 meseci na -20 °C i godinu dana na -80 °C.

Proizvođač testa navodi koeficijente varijacije za preciznost u seriji od 3,3% i za preciznost između serija od 2,8%.

Referentni opseg TAS koji navodi proizvođač metode je 1,2-1,5 mmol/L, s tim što je preporuka da svaka laboratorija odredi svoje referentne vrednosti (292).

3.2.6.3. Određivanje indeksa oksidativnog statusa pacijenata

Vrednost OSI izračunata je na osnovu vrednosti TOS i TAS, prema sledećoj formuli: $OSI = TOS \text{ (mmol/L)} / TAS \text{ (mmol/L)}$.

3.2.6.4. Određivanje koncentracija 8-OHdG u plazmi pacijenata

Koncentracija 8-OHdG je u plazmi pacijenata određena primenom komercijalnog ELISA testa (DNA Damage (8-OHdG) ELISA Kit, Boster Biological Technology, Pleasanton CA, USA) koji sadrži mikrotitarsku ploču prethodno obloženu 8-OHdG, anti-8-OHdG detekciona monoklonska antitela obeležena peroksidazom poreklom iz rena, standarde, supstrat, stop rastvor i sve ostale neophodne reagense. Primenjena metoda se zasniva na kompetitivnom imunohemijskom principu što znači da se 8-OHdG koji je prisutan u uzorku takmiči sa 8-OHdG vezanim za bazenčiće mikrotitarske ploče za ista vezujuća mesta na signalnim antitelima reagensa. Analiza

je izvedena prema protokolu koji je definisao proizvođač testa. U prvoj fazi reakcionog procesa se uzorci, standardi i konjugat monoklonskih signalnih anti-8-OHdG antitela zajedno dodaju na mikrotitarsku ploču. Nakon inkubacije dobijene reakcione smeše, vrši se ispiranje nevezanog materijala (293). Automatski sistem za ispiranje ploča, kompanije Rayto Life and Analytical Sciences, korišćen je za ispiranje mikrotitarske ploče. Zatim se na ploču dodaje TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) supstrat koji stupa u enzimsku reakciju sa peroksidazom rena, pri čemu se stvara obojeni proizvod reakcije. Na kraju se enzimska reakcija zaustavlja dodatkom stop rastvora, nakon čega se meri apsorbancija na definisanoj talasnoj dužini (450 nm) (293). Automatski čitač mikrotitarskih ploča Rayto RT-6100, kompanije Rayto Life and Analytical Sciences, upotrebljen je za očitavanje apsorbancija. Za konstruisanje standardne krive i preračunavanje koncentracija 8-OHdG u uzorcima pacijenata upotrebljen je automatski program kompanije Rayto. Dobijena koncentracija 8-OHdG bila je obrnuto proporcionalna intenzitetu stvorene svetlosti.

Ovaj test prepoznaje slobodan i ugrađen u DNK 8-OHdG. Pošto se kompleksni uzorci kao što su plazma, kulture ćelija i tkiva sastoje od mešavine fragmenata DNK i slobodnog 8-OHdG, proizvođač testa napominje da se koncentracije 8-OHdG izmerene ovim ELISA testom neće slagati sa onima određenim primenom LC/MS metodologije kojom se obično mere pojedinačni nukleozidi. Ovo treba uzeti u obzir prilikom analiziranja i tumačenja eksperimentalnih rezultata (293).

Prema preporukama proizvođača, ovaj test se može koristiti za kvantifikaciju 8-OHdG u uzorcima urina, plazme, ćelijskim kulturama, kao i u drugim vrstama uzoraka.

Dinamički opseg metode je 0,94-60 ng/mL, a limit detekcije je 0,59 ng/mL. Utvrđeno je da metoda ispoljava 23% ukrštene reaktivnosti sa 8-hidroksi-gvanozinom (8-OHG), 23% ukrštene reaktivnosti sa 8-hidroksi-gvaninom (8-oxoG) i < 0,01% ukrštene reaktivnosti sa gvanozinom.

Proizvođač testa navodi da je uzastopnim analiziranjem 3 uzorka poznate koncentracije 30 puta na jednoj mikrotitarskoj ploči, koeficijent varijacije za preciznost u seriji i za preciznost između serija bio redom manji od 5% (293).

3.2.7. Verifikacija analitičkih karakteristika imunohemijske CLIA metode (IMMULITE® 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA_t

U okviru verifikacije komercijalne imunohemijske CLIA metode (IMMULITE® 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA_t analizirani su: nepreciznost u seriji, nepreciznost između serija, ponovljivost, nepreciznost iz dana u dan, nepreciznost unutar laboratorije i tačnost metode. Nepreciznost metode je ispitana upotrebom dva nivoa komercijalnih kontrolnih uzoraka tačno definisanih srednjih vrednosti i dozvoljenog opsega merenja. Naznačene centralne vrednosti i opseg za kontrolni uzorak nivoa 1 i kontrolni uzorak nivoa 2 bile su 0,88 IU/L (0,78-0,98) i 18,4 IU/L (16,6-20,2), redom. U okviru ispitivanja nepreciznosti metode, izračunavaju se sledeći statistički parametri: srednja vrednost (\bar{x}), standardna devijacija (Sd) i koeficijent varijacije (Kv).

Koeficijent varijacije se izračunava prema sledećoj formuli:

$$Kv [\%] = 100 * \frac{Sd}{\bar{x}}$$

gde su:

Kv – koeficijent varijacije

Sd – standardna devijacija

\bar{x} - srednja vrednost određivanja

Postupak analitičke evaluacije preciznosti i tačnosti IMMULITE 2000 TSI CLIA metode sproveden je prateći vodič za verifikaciju performansi preciznosti i tačnosti, Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (*engl. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline-Second Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI EP15-A2*) (294). Vrednosti izračunatih nepreciznosti ispitivane metode upoređeni su sa vrednostima koje je deklarirao proizvođač testa. Ukoliko je vrednost izračunatog Kv bila manja od one koju je definisao proizvođač, zaključak je bio da metoda zadovoljava unapred definisane zahteve proizvođača za nepreciznost. Ukoliko proizvođač nije definisao minimalne kriterijume za neku

od ispitivanih vrsta nepreciznosti merenja, u tom slučaju su vrednosti Kv upoređene sa vrednostima koje je definisao FDA za tu vrstu analitičke metode (295). Kao opšti minimum analitičkih performansi laboratorijskih metoda smatra se vrednost Kv 5%.

3.2.7.1. Nepreciznost u seriji

Nepreciznost u seriji je ispitana uzastopnim analiziranjem dva nivoa kontrolnih uzoraka, u niskom i visokom opsegu koncentracija, po 20 puta u jednoj seriji. Nakon toga su izračunati sledeći statistički parametri: srednja vrednost (\bar{x}), standardna devijacija (Sd) i koeficijent devijacije (Kv) unutar serije. Nepreciznost u seriji je izražena u procentima kao koeficijent varijacije unutar serije. Ova vrednost je upoređena sa preporukama FDA vodiča i opštim minimumom analitičkih karakteristika metoda.

3.2.7.2. Nepreciznost između serija

Nepreciznost između serija je ispitana uzastopnim određivanjem po 10 puta u jednoj seriji i 10 puta u drugoj, za dva nivoa kontrolnih uzoraka, u niskom i visokom opsegu koncentracija. Zatim su izračunati sledeći statistički parametri: srednja vrednost (\bar{x}), standardna devijacija (Sd) i koeficijent varijacije (Kv) između serija. Nepreciznost između serija je izražena u procentima kao koeficijent varijacije između serija. Ova vrednost je upoređena sa preporukama FDA vodiča i opštim minimumom analitičkih karakteristika metoda.

3.2.7.3. Ponovljivost merenja (*repeatability*)

Ponovljivost merenja IMMULITE®2000 TSI metode izračunata je prema CLSI EP15-A2 vodiču (294), prema sledećoj formuli:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}$$

gde su:

Sr = standardna devijacija ponovljivosti

D = ukupan broj dana ispitivanja (pet),

n = ukupan broj ponavljanja na dan (tri),

x_{di} = rezultat replikata i za određen dan d,

\bar{x}_d = aritmetička srednja vrednost svih vrednosti za dan d.

Nakon toga je izračunat Kv, a dobijena vrednost upoređena sa onom koju je definisao proizvođač testa za ponovljivost, za svaki nivo kontrole.

3.2.7.4. Nepreciznost iz dana u dan

Nepreciznost iz dana u dan je ispitana uzastopnim određivanjem dva nivoa kontrolnih uzoraka u triplikatu, tokom 5 dana. Nakon toga su izračunati sledeći statistički parametri: srednja vrednost (\bar{x}), standardna devijacija (Sd) i koeficijent varijacije (Kv) iz dana u dan. Nepreciznost iz dana u dan je izražena u procentima kao koeficijent varijacije iz dana u dan. Ova vrednost je upoređena sa opštim minimumom analitičkih karakteristika metoda od 5%.

3.2.7.5. Nepreciznost unutar laboratorije

Merna nepreciznost unutar laboratorije (Sdul) i ukupna nepreciznost laboratorije (Kvul) za IMMULITE®2000 TSI metodu izračunate su prema CLSI EP15-A2 vodiču (294) kombinovanom analizom nepreciznosti iz dana u dan i ponovljivosti merenja metode, prema sledećoj formuli:

$$Sdul = \sqrt{\frac{n-1}{n} * Sdr^2 + Sdp^2}$$

u kojoj je n broj ponavljanja po danu (broj ponavljanja po danu bio je 3), Sdr je ukupna standardna devijacija ponovljivosti merenja metode, Sdp ukupna standardna devijacija za nepreciznost iz dana u dan. Na osnovu dobijenih rezultata izračunati su podaci za nepreciznost unutar laboratorije na dva klinički značajna nivoa (kontrolni uzorak 1 koji sadrži nisku koncentraciju analita i kontrolni uzorak 2 koji sadrži visoku koncentraciju analita), prema sledećoj formuli:

$$K_{vul} = \frac{S_{dul}}{\bar{x}} * 100$$

K_{vul} je oznaka ukupne nepreciznosti unutar laboratorije (ukupna nesigurnost merenja rezultata, U), S_{dul} je oznaka standardne nesigurnosti merenja rezultata laboratorije, a \bar{x} ukupna srednja vrednost svih rezultata dobijenih iz dana u dan, za svaki kontrolni uzorak. Proširena nesigurnost merenja rezultata dobija se prema sledećoj formuli: $U = 2 * K_{vul}$.

Dobijena vrednost K_v unutar laboratorije upoređena je sa onom koju je definisao proizvođač testa, za svaki nivo kontrole.

3.2.7.6. Tačnost metode

Tačnost i sistematska greška metode analizirani su poređenjem ispitivane IMMULITE 2000 TSI CLIA metode sa rutinskom kompetitivnom Elecsys Anti-TSHR ECLIA metodom, u 87 uzoraka seruma, dobijenih od 87 različitih pacijenata. Rezultati određivanja TSHRA_t međusobno su upoređeni kako bi se odredila značajnost razlike merenja. Krajnji cilj je bio da se ispita da li postoji konstantno i/ili proporcionalno odstupanje rezultata određivanja i da se utvrdi da li je moguće ove metode koristiti uporedno, odnosno da li i pod kojim uslovima one mogu zameniti jedna drugu.

3.2.8. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti imunohemijske CLIA metode (IMMULITE[®] 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA_t

Dijagnostička tačnost IMMULITE 2000 TSI metode je ispitana na uzorcima seruma 87 pacijenata i 23 zdrava ispitanika. U sklopu procene dijagnostičke tačnosti metode, određeni su sledeći parametri dijagnostičke tačnosti: dijagnostička osetljivost, dijagnostička specifičnost, pozitivna prediktivna vrednost (PPV) i negativna prediktivna vrednost (NPV). Dodato je izvedena ROC analiza (*engl. Receiver Operating Characteristic*).

3.3. Statistička analiza

Statistička analiza svih podataka dobijenih u ovom radu izvedena je pomoću *Excel* (verzija 2010; Microsoft, SAD) programa i statističkih programa SPSS (IBM® SPSS® Statistics version 20, IBM, SAD) i MedCalc (verzija 12; MedCalc Software, Belgija).

Normalnost raspodele je ispitana primenom *Kolmogorov-Smirnov* i *Shapiro-Wilk* testovima, u zavisnosti od broja ispitanika. Kategoričke varijable su predstavljene kao apsolutne frekvencije, u procentima ili kao broj, dok su kontinuirane varijable koje su pratile normalnu Gausovu raspodelu predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, dok su one koje nisu pratile normalnu raspodelu predstavljene kao medijana (medijana (interkvartilni opseg, IQR)). U slučaju normalne raspodele podataka, primenjena je parametarska statistička analiza, dok je u slučaju raspodele koja nije pratila normalnu, korišćena neparametarska statistička analiza. Frekvencija distribucije pojedinačnih varijabli ispitivanih u ovom radu analizirana je primenom *Chi-kvadrat* testom.

Stope pozitivnosti različitih laboratorijskih metoda za određivanje TSHRA_t su upoređene pomoću *McNemara* testa. Za podatke koji su pratili normalnu raspodelu srednje vrednosti su upoređene primenom *Studentovog t* testa, za nezvisne uzorke ili ANOVA za upoređivanje srednjih vrednosti dve ili više promenljivih.

Za poređenje medijana dve grupe podataka koji nisu pratili normalnu raspodelu, upotrebljen je neparametarski *Mann-Whitney* test, dok je za poređenje medijana više od dve grupe podataka koji ne prate normalnu raspodelu primenjen neparametarski *Kruskal-Wallis* test. Individualne razlike su testirane višestrukim post hoc *Mann-Whitney* testovima. Korelaciona analiza je izvršena u cilju ispitivanja povezanosti između različitih analiziranih parametara. Primenjene su *Spearman* i *Pearson* korelaciona analiza u zavisnosti od raspodele podataka (*Spearmanova* analiza je rađena kod podataka koji nisu pratili normalnu raspodelu, dok se *Pearsonova* analiza koristila kod podataka sa normalnom raspodelom). U cilju ispitivanja stepena korelacije između analiziranih parametara, izračunati su korelacioni koeficijenti.

Prediktivni potencijal TSHRA_t za razvoj aktivnog i umerenog do teško ili teškog oblika GO je analiziran binarnom logističkom regresionom analizom, posebno univarijantnom i

multivarijantnom. Za procenu prediktivne vrednosti analiziranih biomarkera izračunati su interval pouzdanosti od 95% za odnos šansi (95%CI Odds ratio, OR) koji predstavlja opseg od 95% intervala pouzdanosti, od njegove donje do gornje granice. Vrednosti OR odgovara odnosu verovatnoće da će se razviti aktivni/umereni ili teški oblik GO u odnosu na verovatnoću da se neće razviti, za svaku nezavisnu promenljivu čiji se prediktivni potencijal ispituje u datom multivarijantnom modelu. Kao minimalni uslov za postojanje statističke značajnosti se smatrala vrednost od $p < 0,05$.

U sklopu analitičke verifikacije IMMULITE 2000 TSI CLIA metode, za procenu preciznosti merenja TSHRA_t, određeni su sledeći statistički parametri: srednja vrednost (\bar{x}), standardna devijacija (Sd) i koeficijent varijacije (Kv). Za procenu tačnosti ove metode, rezultati određivanja su upoređeni sa rezultatima dobijenim rutinskim kompetitivnim imunohemijskim testom, pri čemu je značajnost razlike ispitana primenom *Wilcoxon* testa ekvivalentnih parova (eng. *Wilcoxon signed-rank test*). Međusobno slaganje metoda je ispitano primenom *Passing and Bablock* regresione analize.

Provera dijagnostičke tačnosti ispitivanih analitičkih metoda sprovedena je određivanjem parametara dijagnostičke tačnosti (osetljivost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost), putem tabela kontigencije, kao i analizom ROC krive. Vrednosti površine ispod ROC krive (AUC) u opsegu od 0,90 do 1 su definisale odličnu dijagnostičku tačnost, vrednosti od 0,80 do 0,90 su definisale dobru dijagnostičku tačnost, vrednosti od 0,70 do 0,80 umerenu dijagnostičku tačnost i vrednosti od 0,6 do 0,70 su označavale slabu dijagnostičku tačnost. Za vrednosti AUC od 0,5 do 0,6 smatrano je da nisu ispunjeni kriterijumi minimalne prihvatljive dijagnostičke tačnosti za diferencijaciju ispitivanog stanja (bolesni ili zdravi ispitanici, stadijum bolesti, aktivnost ili težina bolesti).

Za ispitivanje dijagnostičkog potencijala multiparametarskih modela poređene su ROC krive i AUC vrednosti za TSA_b kao pojedinačnog biomarkera i za multiparametarski model za detekciju aktivnog i teškog oblika GO. Sirove vrednosti varijabli (TSA_b i multiparametarskog modela) koje su analizirane u ROC analizi predstavljaju verovatnoće dobijene multivarijantnom binarnom logističkom regresijom.

4. REZULTATI

4.1. Analiza demografskih i kliničkih karakteristika ispitivane populacije

4.1.1. Demografski podaci ispitivanih pacijenata

Demografski podaci ispitivanih pacijenata su prikazani u *Tabeli 8*.

Tabela 8. Demografski podaci pacijenata

Parametar	Svi GO pacijenti
N	91
Starost (godine)	53,4±11,4
Pol (žene/muškarci) (n)	63/28
ITM (kg/m ²)	26,2±4,5
Pušačke navike (n) Pušači/ Nepušači	51/38
Pušački staž (godine)	25,1±10,9
Broj konzumiranih cigareta na dan (n)	10 (5-20)
Porodična istorija AITB (n/%)	23/25,27
Udružene autoimmune bolesti (n)	4
Komorbiditeti (n)	42

ITM - indeks telesne mase; Podaci su prikazani kao broj (n), udeo pacijenata (%), medijana (interkvartilni opseg) ili srednja vrednost ± standardna devijacija.

Istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 63 žene i 28 muškaraca, prosečne starosne dobi 53,40 ± 11,40 godine. Veliki broj pacijenata su bili pušači, što odgovara visokoj stopi pušača u našoj populaciji. Udruženi komorbiditeti su bili prisutni kod velikog broja pacijenata, najvećim delom arterijska hipertenzija i *dijabetes mellitus* tip 2. Kod četiri pacijentkinje je utvrđeno prisustvo drugih autoimunih bolesti od značaja (celijačna bolest, Kronova bolest, *dijabetes mellitus* tip 1). Oko jedne četvrtine pacijenata je imalo pozitivnu porodičnu istoriju AITB.

Analizirani podaci su prikazani i u odnosu na težinu i aktivnost GO u cilju ispitivanja eventualne povezanosti ovih faktora i predispozicije za nastanak težeg kliničkog toka bolesti (Tabela 9).

Tabela 9. Povezanost demografskih podataka pacijenata sa aktivnošću i težinom GO

Parametar	Neaktivna GO	Aktivna GO	p	Blaga GO	Srednja do teška GO	GO koja ugrožava vid	p
N	51	40		38	47	6	
Starost (godine)	53,2±13,3	53,7±8,5	0,830	51,2±12,9	54,4±10,2	59,7±6,6	0,162
Pol (žene/muškarci) (n)	41/10	22/18	0,009	34/4	28/19	1/5	<0,001
ITM (kg/m ²)	25,94±4,65	26,52±4,37	0,545	25,27±3,52	26,75±5,26	27,73±2,97	0,225
Pušačke navike (n) Pušači/Nepušači	27/23	24/15	0,476	18/18	30/17	3/3	0,420
Pušački staž (godine)	22,4±10,9	28,0±10,2	0,060	24,3±10,9	25,1±9,7	29,0±19,7	0,746
Broj konzumiranih cigareta na dan (n)	10 (5-15)	10 (9-20)	0,280	10 (5-19)	10 (6-20)	10 (2-)	0,874
Porodična istorija AITB (%)	19,6	32,5	0,160	26,3	25,5	16,7	0,879
Udružene autoimune bolesti (n)	4	0	0,070	2	2	0	0,841
Komorbiditeti (n)	28	14	0,059	17	23	2	0,751

ITM - indeks telesne mase; Podaci su prikazani kao broj (n), udeo pacijenata (%), medijana (interkvartilni opseg) ili srednja vrednost ± standardna devijacija. P vrednost ≤ 0,05 se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *Studentovog t*-testa, *Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney* testa i χ^2 testa.

Dodatno su demografski podaci pacijenata analizirani i u odnosu na grupu AITB (Tabela 10).

Tabela 10. Demografski podaci pacijenata sa Graves-ovom bolešću, Hašimoto tiroiditisom i eutiroidnom GO

Parametar	Graves-ova bolest	Hašimoto tiroiditis	Eutiroidna GO	p
N	69	14	8	
Starost (godine)	54,4 ± 11,2	50,0 ± 12,9	50,1 ± 9,8	0,291
Pol (žene/muškarci) (n)	12/2	48/21	3/5	0,062
ITM (kg/m ²)	26,59 (22,64-	25,86 (22,34-28,36)	27,77 (26,27-32,52)	0,166
Pušačke navike (%) Pušači/ Nepušači	57/43	57/43	62,5/37,5	0,952
Pušački staž (godine)	27,1±12,2	24,9±10,9	24,0±9,6	0,862
Broj konzumiranih cigareta na dan (n)	10 (5-18)	15 (10-20)	15 (5-21)	0,225
Porodična istorija AITB (n/%)	19/27,5	3/21,4	1/12,5	0,610
Udružene autoimune bolesti (n)	3	0	1	0,388
Komorbidity (n)	33/47,8	5/35,7	4/50	0,691

ITM - indeks telesne mase; Podaci su prikazani kao broj (n), udeo pacijenata (%), medijana (interkvartilni opseg) ili srednja vrednost ± standardna devijacija. P vrednost ≤ 0,05 se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *Studentovog t*-testa, *Kruskal-Wallis* testa i χ^2 testa.

Starosna dob je bila slična u okviru različitih grupa pacijenata sa AITB (*Tabela 10*), a statistički značajne razlike nije bilo ni u odnosu na težinu i aktivnost GO (*Tabela 9*). Što se tiče polnih razlika u prezentaciji orbitopatije, značajno veći udeo slučajeva aktivne GO su činili muškarci, kao i srednje do teške GO (*Tabela 9*). U odnosu na primarnu dijagnozu AITB, pol se nije pokazao kao značajan faktor uticaja (*Tabela 10*). Nijedan od drugih ispitivanih demografskih parametara (ITM, status pušenja, pušački staž, broj konzumiranih cigareta na dan, porodična istorija AITB, udružene autoimune bolesti, komorbidity) nije bio statistički značajno povezan sa aktivnošću i težinom GO, niti sa vrstom AITB (*Tabela 9*, *Tabela 10*).

4.1.2. Klinički podaci ispitivanih pacijenata

Najznačajniji klinički podaci ispitanika su predstavljeni u *Tabeli 11*.

Tabela 11. Klinički parametri ispitivanih pacijenata

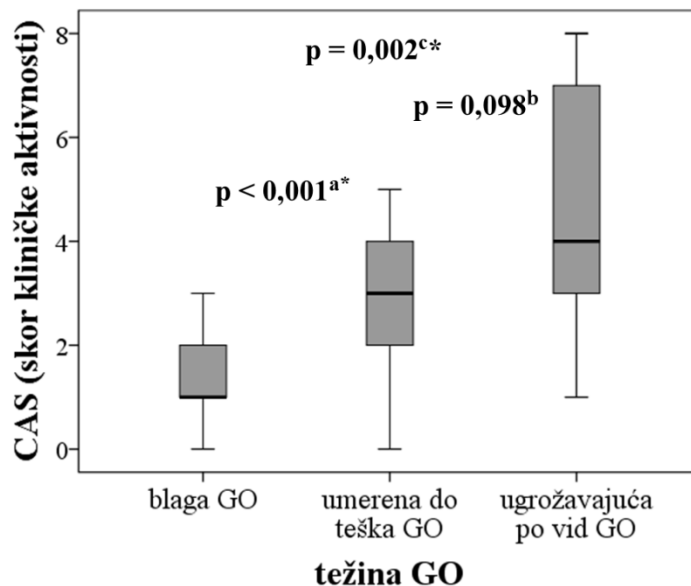
Parametar	Svi pacijenti
Aktivnost GO	
Neaktivna GO (n)	51
Aktivna GO (n)	40
CAS skor	2 (1-3)
Težina GO	
Blaga GO (n)	38
Srednja do teška GO (n)	47
Po vid ugrožavajuća GO (n)	6
Unilateralna GO	5
Trajanje GO (godine)	1,3 (0,7-3,0)
AITB:	
Graves-ova bolest (n)	69
Hašimoto tiroiditis (n)	14
Eutiroidna GO (n)	8
Terapija: bez terapije/ (L-tiroksin/antitiroidni lekovi) (n)	21/69
Suplementacija selenom: ne/da (n)	58/31
Prethodna primena RAI	12
Tiroidektomija	9
Istorija relapsa hipertiroidizma/nemogućnost remisije hipertiroidizma	8
Fluktuacije tiroidnog statusa	5
Neadekvatan odgovor na terapiju GO	5

AITB - autoimune bolesti štitne žlezde; RAI - radioaktivni jod; Podaci su prikazani kao broj (n) ili medijana (interkvartilni opseg).

Analizirani uzorak pacijenata je bio u skladu sa prirodnim tokom i epidemiologijom GO. Ukupno 69 pacijenata je imalo primarnu dijagnozu GB (76%), 14 HT (15%), 8 (9%) ET GO, a vreme proteklo od pojave prvih simptoma orbitopatije je bilo: medijana: 1,3 godine, interkvartilni opseg: 0,7-3 godine. U istraživanje su bili uključeni većinom pacijenti sa blagom i srednje teškom formom GO, dok je udeo aktivnih i neaktivnih oblika bolesti bio relativno uravnotežen. Kod 5 pacijenata je zabeležena unilateralna GO, varijabilne kliničke prezentacije. Najveći broj pacijenata bio je na terapiji antitiroidnim lekovima, a oko jedne trećine ispitanika, uglavnom onih sa blagim oblikom GO, je primalo suplemente selena. Kod jednog broja

pacijenata prethodno je primenjen ablativni tretman hipertiroidizma RAI, ili izvršena potpuna ili delimična tireidektomija (delimično ili potpuno hirurško odstranjivanje tkiva štitne žlezde). Za tretiranje srednje teške do teške GO, različiti vidovi rehabilitativne hirurgije su primenjeni kod jednog dela pacijenata.

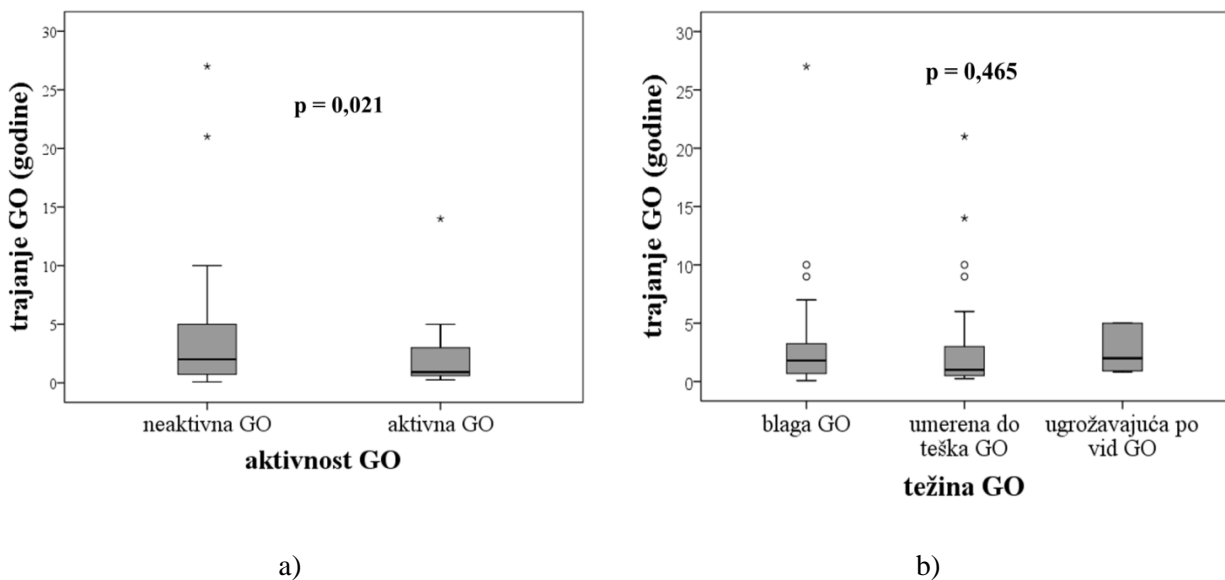
Dobijena razlika u vrednostima CAS skora kod pacijenata sa blagom, srednje teškom do teškom i GO koja ugrožava vid ukazala je na postojanje značajne međusobne povezanosti težine i aktivnosti GO ($p < 0,001$). Procenjene CAS vrednosti su bile značajno više kod pacijenata sa srednje do teškom GO (medijana: 3; interkvartilni opseg: 2-4) u odnosu na one sa blagom formom orbitopatije (medijana: 1; interkvartilni opseg: 1-2). U grupi pacijenata sa GO koja ugrožava vid (medijana: 4,00; interkvartilni opseg: 2,50-7,25) CAS je takođe bio značajno veći u odnosu na osobe sa blagim oblikom GO (medijana: 1; interkvartilni opseg: 1-2), dok nije pokazivao značajnu razliku u odnosu na grupu pacijenata sa srednje do teškom orbitopatijom (medijana: 3; interkvartilni opseg: 2-4) (Slika 11).



Slika 11. Povezanost skora kliničke aktivnosti (CAS) sa težinom Graves-ove orbitopatije; a - značajnost razlike između blage i umerene do teške GO, b - značajnost razlike između umerene do teške i ugrožavajuće po vid GO, c - značajnost razlike između blage i ugrožavajuće po vid GO

Vezano za dužinu trajanja simptoma GO, skorija pojava simptoma bolesti bila je povezana sa većom aktivnošću GO. Dužina trajanja simptoma GO je bila statistički značajno manja u grupi

pacijenata sa aktivnom GO (medijana: 0,92 godina; interkvartilni opseg: 0,6-3,0 godina) u odnosu na pacijente sa neaktivnom GO (medijana: 2,00 godina; interkvartilni opseg: 0,71-5,00 godina). Trajanje simptoma GO se nije značajno razlikovalo u grupi pacijenata sa blagim oblikom (medijana: 1,80 godina; interkvartilni opseg: 0,68-3,38 godina), srednjim do teškim (medijana: 1,0 godina; interkvartilni opseg: 0,5-3,0 godina) ili oblikom GO koja ugrožava vid (medijana: 2,0 godine; interkvartilni opseg: 0,9-5,0 godina) (*Slika 12*).



Slika 12. Povezanost dužine trajanja simptoma GO sa a) aktivnošću i b) težinom GO

Tiroidna medikamentozna terapija (antitiroidni lekovi/tiroksin) nije bila u značajnoj vezi sa aktivnošću, niti sa težinom GO. Udeo pacijenata koji su primali tiroidnu terapiju se nije statistički značajno razlikovao kod ispitanika sa aktivnom (79,5%) i neaktivnom GO (74,5%), ($p = 0,580$), kao ni kod ispitanika sa blagom GO (68%), srednje do teškom GO (83%) i po vid ugrožavajućom GO (83,3%), ($p = 0,234$).

U *Tabeli 12* je dat prikaz tiroidnog statusa ispitivanih pacijenata na osnovu rezultata osnovnih tiroidnih funkcionalnih testova.

Tabela 12. Rezultati tiroidnih funkcionalnih testova ispitivanih pacijenata

Parametar	Svi GO pacijenti	Neaktivna GO	Aktivna GO	P	Blaga GO	Umerena do teška GO	GO ugrožavajuća po vid	p
TSH (IU/L)	1,19 (0,10-3,20)	1,37 (0,21-3,20)	0,87 (0,07-3,30)	0,359	2,06 (0,30-3,63)	0,93 (0,10-2,18)	0,25 (0,07-3,53)	0,222
FT4 (pmol/L)	15,3 (13,0-19,6)	14,8 (13,2-18,8)	16,4 (12,8-20,6)	0,609	14,9 (12,8-17,8)	15,4 (13,2-21,0)	18,7 (16,2-21,4)	0,123
anti-TPOAt (IU/mL)	10 (0-61)	11 (0-48)	2,6 (0,0-242,8)	0,931	13,4 (0,0-54,8)	0,5 (0,0-61,0)	7,5 (0,38-555,75)	0,411
anti-TGAt (IU/mL)	1,8 (0,0-23,0)	10 (0-73)	1,07 (0,00-11,98)	0,472	10 (0-78)	0,9 (0,0-11,9)	6,3 (0-31,5)	0,825

TSH-tireostimilirajući hormon; FT4-slobodni T4 (slobodni tiroksin); anti-TPOAt-antitela na tiroidnu-peroksidazu; anti-TGAt-antitela na tireoglobulin; Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni opseg) ili srednja vrednost ± standardna devijacija. P vrednost ≤ 0,05 se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *Kruskal-Wallis* i *Mann-Whitney* testa.

Dodatno je ispitana razlika u vrednostima TSH, FT4, TPOAt i TGAt u odnosu na aktivnost i težinu GO, pri čemu je utvrđeno da se medijane navedenih parametara nisu značajno razlikovale u ispitivanim grupama.

4.2. Analiza koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRAAt

4.2.1. Analiza koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRAAt u serumu različitih grupa pacijenata sa GO

U cilju ispitivanja kliničkog značaja TSHRAAt kao biomarkera GO, kao i njihove povezanosti sa kliničkim, demografskim karakteristikama ispitivane populacije, kliničkim tokom i progresijom bolesti, primarno je analizirana ukupna koncentracija (TBII) i funkcionalna aktivnost (TSAb i TBAb) ovih autoreaktivnih antitela u serumu različitih grupa pacijenata sa GO. Posebna pažnja je obraćena na analizu distribucije TSHRAAt u grupi pacijenata sa GB, HT ili eutiroidnim

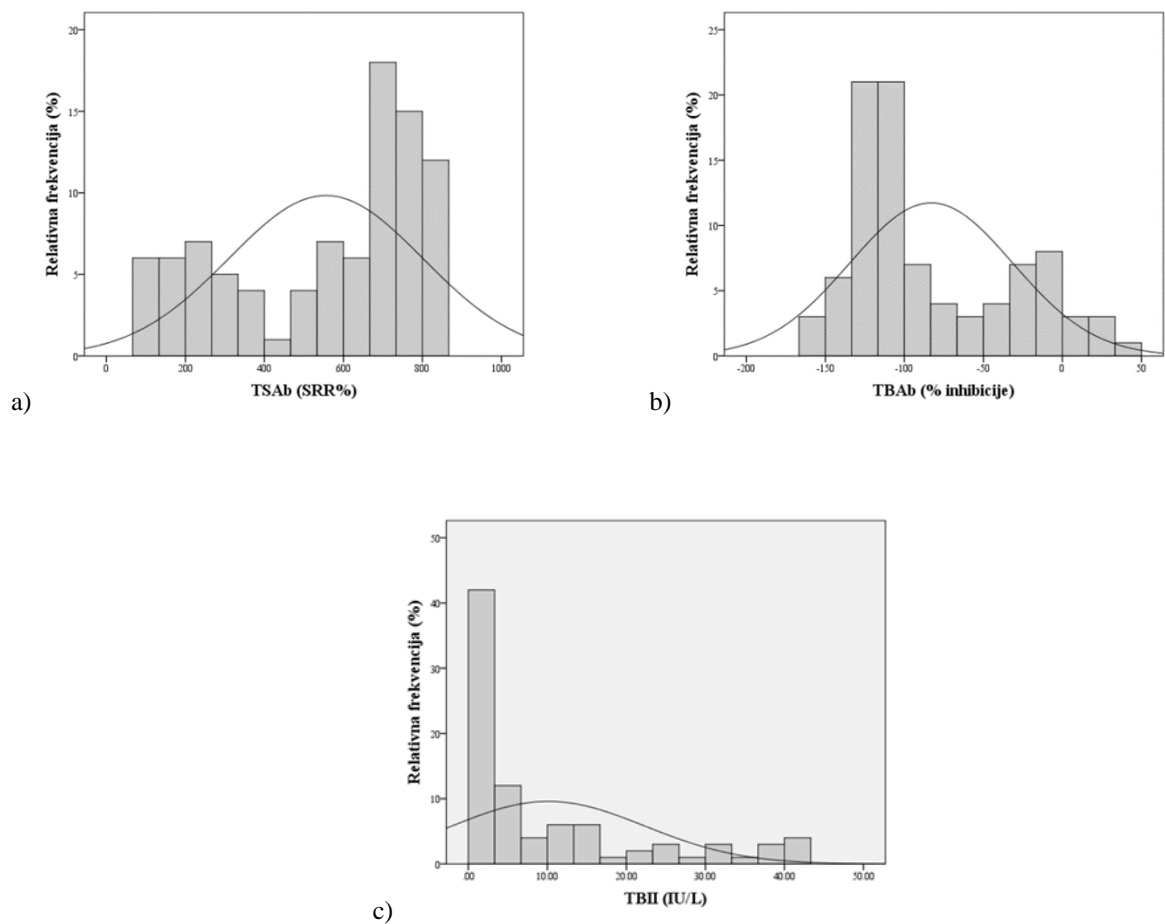
oblikom GO, kao i na ispitivanje značajnosti razlika između ispitivanih grupa. Vrednosti koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRA_t su prikazane u *Tabeli 13*.

Tabela 13. Koncentracija i funkcionalna aktivnost TSHRA_t u serumu ukupne ispitivane grupe pacijenata sa GO i pojedinačnih grupa pacijenata

Parametri	Celokupna grupa pacijenata sa GO n=91	Graves-ova bolest n=69	Hašimoto tiroiditis n=14	Eutiroidna GO n=8
TSAb (SRR%)	669 (297-761)	693 (506-778)	234 (165-557)	314 (258-621)
TBAb (% inhibicije)	-104 (-124-37)	-112,0 (-127,0- -72,5)	-23,5 (-90,3- -3,0)	-42,5 (-103,8- -21,8)
TBII (IU/L)	3,80 (1,49-14,52)	5,59 (2,42-15,71)	1,34 (0,82-3,46)	1,47 (1,41-1,67)

Podaci prikazani u tabeli su predstavljeni kao medijana (interkvartilni opseg).

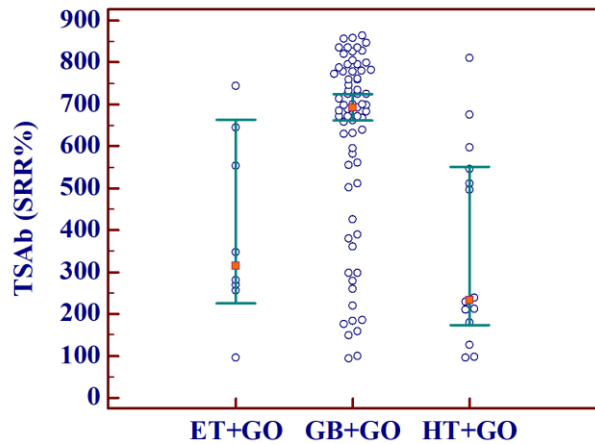
Histogrami frekvencija vrednosti biomarkera u ispitivanoj grupi pacijenata prikazani su na *Slici 13*.



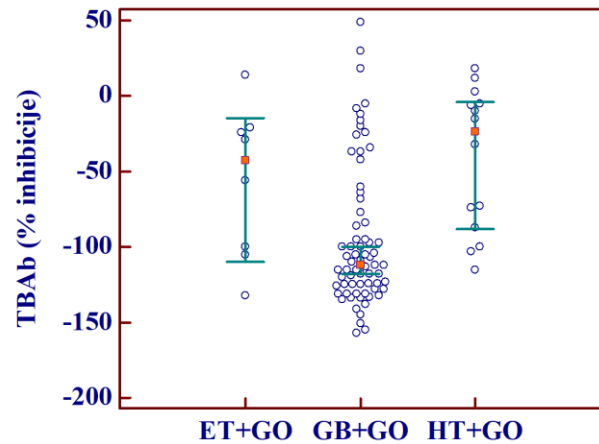
Slika 13. Distribucija relativnih frekvencija a) TSH-receptor stimulirajuća antitela (TSAb), b) TSH-receptor blokirajuća antitela (TBAb) i c) TSH vezujućih inhibitornih imunoglobulina (TBII), u ispitivanoj populaciji pacijenata

Primenom *Kolmogorov-Smirnov* testa utvrđeno je značajno odstupanje vrednosti ispitivanih parametara u serumu od Gausove raspodele, zbog čega je primenjena neparametarska statistička analiza za obradu podataka.

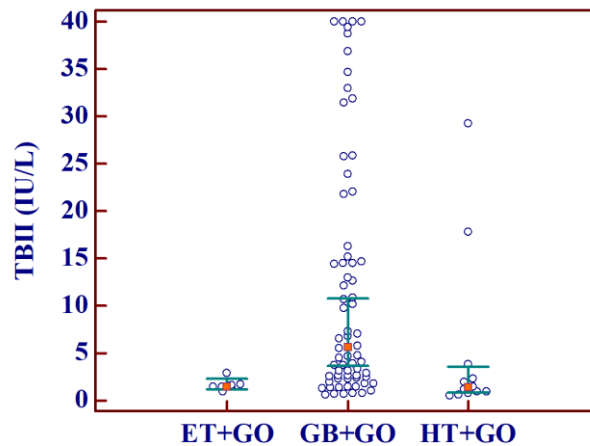
Raspodela nivoa TSAb, TBAb i TBII u različitim grupama pacijenata je prikazana na *Slici 14*.



a)



b)



c)

Slika 14. Distribucija medijana a) TSH-receptor stimulirajuća antitela (TSAb), b) TSH-receptor blokirajuća antitela (TBAb) i c) TSH vezujućih inhibitornih imunoglobulina (TBII) u grupi pacijenata sa GO, u okviru dijagnoze GB, HT i ET; GB+GO - Graves-ova orbitopatija u sklopu dijagnoze Graves-ov bolesti; HT+GO - Graves-ova orbitopatija u sklopu dijagnoze Hašimoto tiroiditisa; ET+GO - Eutiroidna Graves-ova orbitopatija bez tiroidnih abnormalnosti.

Klasifikacija pacijenata je izvršena na osnovu postavljene primarne dijagnoze AITB (GB ili HT) ili ET GO. Primenom neparametarske analize utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u aktivnosti TSAb između ispitivanih grupa pacijenata. Medijana TSAb je bila značajno viša u grupi pacijenata sa primarnom dijagnozom GB u odnosu na pacijente sa HT ($p < 0,001$), kao i u odnosu na pacijente bez klinički i serološki evidentnih tiroidnih abnormalnosti, odnosno pacijente sa ET GO ($p = 0,012$). Stimulatorna funkcionalna aktivnost TSHRA_t se nije značajno

razlikovala između pacijenata sa HT i ET GO ($p = 0,402$). Blokirajuća aktivnost ovih antitela je takođe pokazala značajnu statističku razliku u ispitivanim grupama pacijenata, iako je samo kod jednog pacijenta prešla granicu pozitivnosti ($p < 0,001$). U grupi pacijenata sa GB, registrovana je značajna razlika u vrednostima TBAb u odnosu na grupu ispitanika sa dijagnozom HT ($p < 0,001$) i ET GO ($p = 0,046$). Analogno TSAb, nije bilo značajnog odstupanja nivoa TBAb kod ispitanika sa HT u odnosu na ET oblik GO ($p = 0,402$). Što se tiče ukupne koncentracije TSHRA_t (TBII), značajna razlika je detektovana između ispitivanih grupa pacijenata ($p = 0,001$). Izmerena koncentracija TBII je bila značajno veća kod pacijenata sa GB u odnosu na pacijente sa HT ($p = 0,004$), kao i u odnosu na pacijente sa ET GO ($p = 0,004$), dok se u grupi ispitanika sa HT i ET GO nije značajno razlikovala ($p = 0,735$).

Pozitivnost TSAb i TBII se odnosi na vrednost stimulatorne funkcionalne aktivnosti i koncentracije TSHRA_t, redom iznad granične *cut-off* vrednosti koju je definisao proizvođač testa (tehnika bioeseja i kompetitivno imunohemijsko određivanje, redom). Pozitivnost TSAb i TBII u različitim grupama pacijenata je prikazana u *Tabeli 14*.

Tabela 14. Distribucija pozitivnosti TSAb i TBII između grupa ispitanika sa GB, HT i ET GO

Grupa ispitanika	TSAb ≥ 140 (SRR%) (%)	TBII $\geq 1,75$ (IU/L) (%)	p
Graves-ova bolest (n=69)	97,1	84,1	0,004
Hašimoto tiroiditis (n=14)	76,9	38,5	0,063
Eutiroidna GO (n=8)	87,5	12,5	0,031

TSAb = 140 SRR% je *cut-off* vrednost definisana od strane proizvođača; TBII = 1,75 IU/L je *cut-off* vrednost definisana od strane proizvođača; Podaci su prikazani kao udeo pacijenata (%). P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *McNemar* testa.

Stimulatorna aktivnost TSAb detektovana kod 85 od 91 (93,4%) pacijenta sa GO, dok je kod samo 64 od 91 (70,3%) pacijenata sa GO detektovan pozitivan rezultat određivanja TBII ($p < 0,001$). Među šest pacijenata sa negativnim rezultatom određivanja TSAb, tri je imalo primarnu dijagnozu HT, dva GB i jedan ET GO, a svi su imali blagu kliničku sliku orbitopatije (neaktivna, blaga GO). Jedan od pomenutih pacijenata je takođe imao udruženu dijagnozu celijačne bolesti. Blokirajuća antitela su detektovana samo kod jedne pacijentkinje u celokupnoj ispitivanoj populaciji pacijenata. Interesantno je da je kod pomenute pacijentkinje detektovana istovremena

stimulatorna i blokirajuća aktivnost TSHRA_t (TSA_b i TBA_b), odnosno dobijena je dvostruka pozitivnost rezultata sa obe vrste primenjenih bioeseja. Kod pacijentkinje je postavljena dijagnoza GB, blage i neaktivne orbitopatije, a istorija bolesti je ukazivala na neadekvatnu regulaciju tiroidnog statusa i epizode relapsa hipertiroidizma.

Ispitivanjem pozitivnosti primenjenih testova (tehnike bioeseja i kompetitivnog imunoeseja) u odnosu na primarnu dijagnozu AITB, utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u grupi pacijenata sa GB i ET oblikom GO. Stimulatorna aktivnost TSA_b je prešla granicu pozitivnosti testa kod značajno većeg procenta pacijenata sa GB u odnosu na ukupnu koncentraciju TBII (*Tabela 14*). Pozitivnost testova se nije značajno razlikovala u grupi ispitanika sa HT. Međutim, tehnika bioeseja je pokazala primetno višu stopu pozitivnosti u ovoj grupi ispitanika, a statistička značajnost se približila graničnoj. Najistaknutija razlika u stopi pozitivnosti tehnike bioeseja i imunoeseja se primećuje u grupi pacijenata sa eutiroidnom GO, u kojoj je kod samo 1 od 8 ispitanika (12,5%) detektovana pozitivna TBII koncentracija, a kod 7 od 8 (87,5%) ispitanika dobijen je pozitivan TSA_b rezultat (*Tabela 14*).

4.2.2. Povezanost demografskih i kliničkih podataka pacijenata sa koncentracijom i funkcionalnom aktivnošću TSHRA_t

Povezanost TSA_b i demografskih i kliničkih podataka pacijenata predstavljena je u *Tabeli 15*.

Tabela 15. Povezanost TSA_b i demografskih i kliničkih parametara od značaja

Parametar	TSA _b (SRR %)	p
Pol		
Muškarci	665 (457-741)	0,731
Žene	658 (268-761)	
Trajanje GO		
< 6 meseci	735 (667-781)	0,028
> 6 meseci	641 (271-759)	
Suplementacija selenom		
selen	672 (276-747)	0,360
bez selena	638 (278-743)	
Terapija		
bez terapije	297 (197-658)	0,007^a
primena levotiroksina	674 (236-783)	
antitiroidni lekovi	689 (549-763)	0,525 ^b
Status pušenja		
Pušači	644 (297-733)	0,565
Nepušači	671.5 (276-778)	
Porodična istorija AITB		
Negativna	631 (285-731)	0,046
Pozitivna	724 (297-811)	
Komorbiditeti		
Prisutni	613 (330-733)	0,312
Odsutni	683 (287-778)	

a-značajnost razlike u medijani TSA_b između pacijenata koji nisu na terapiji i pacijenata koji primaju levotiroksin ili antitiroidne lekove; b - značajnost razlike u medijani TSA_b između pacijenata koji su na terapiji levotiroksinom ili antitiroidnim lekovima; Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni opseg). P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *Mann-Whitney* testa.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da je nivo TSAb značajno povezan sa trajanjem simptoma GO ($p = 0,028$), tiroidnom terapijom ($p = 0,007$) i pozitivnom porodičnom istorijom AITB ($p = 0,046$). Pacijenti kod kojih su se simptomi prvi put pojavili u periodu manjem od 6 meseci u odnosu na vreme uzorkovanja krvi su imali značajno više nivoe TSAb, u odnosu na pacijente sa dužim trajanjem simptoma. Statistički značajno viša aktivnost TSAb je detektovana kod pacijenata koji su primali tiroidnu medikamentoznu terapiju u poređenju sa pacijentima koji nisu bili na terapijskom režimu. Vrsta tiroidne terapije (tiroksin/antitiroidni lekovi) nije pokazala relevantnom u pogledu aktivnosti TSAb. Nivo TSAb je bio značajno viši kod ispitanika sa pozitivnom porodičnom istorijom AITB u poređenju sa ispitanicima bez AITB u porodici. Funkcionalna aktivnost TSAb nije bila značajno povezana sa ostalim analiziranim parametrima (pol, suplementacija selenom, status pušenja i komorbiditeti).

Povezanost TBII i demografskih i kliničkih podataka pacijenata predstavljena je u *Tabeli 16*.

Tabela 16. Povezanost TBII i demografskih i kliničkih parametara od značaja

Parametar	TBII (IU/L)	p
Pol		
Muškarci	5,62 (2,52-13,37)	0,337
Žene	3,43 (1,41-14,78)	
Trajanje GO		
<6 meseci	12,65 (2,35-36,85)	0,047
>6 meseci	3,16 (1,47-12,56)	
Suplementacija selenom		
selen	4,64 (1,82-22,02)	0,240
bez selena	3,13 (1,46-10,86)	
Terapija		
bez terapije	1,47 (1,06-2,91)	0,001
primena tiroksina	3,87 (1,57-24,80)	
antitiroidni lekovi	5,59 (2,61-15,15)	0,444
Status pušenja		
Pušači	3,04 (1,62-10,76)	0,393
Nepušači	4,28 (1,38-25,79)	
Porodična istorija AITB		
Negativna	3,76 (1,52-13,52)	0,528
Pozitivna	4,11 (1,47-23,88)	
Komorbiditeti		
Prisutni	2,61 (1,45-14,53)	0,305
Odsutni	4,11 (1,89-14,82)	

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni opseg). P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *Mann-Whitney* testa.

Ukupna koncentracija TBII se značajno razlikovala u odnosu na trajanje simptoma GO ($p = 0,047$), pri čemu je skorija pojava simptoma (<6 meseci) bila udružena sa statistički značajno većom koncentracijom TBII. Pacijenti koji nisu primali medikamentoznu terapiju u cilju regulacije tiroidnog statusa su imali statistički značajno nižu koncentraciju TBII u odnosu na pacijente koji su primali antitiroidne lekove ili tiroksin ($p = 0,001$). Nije detektovano postojanje razlike u vrednostima TBII u odnosu na vrstu primenjene terapije. Ostali ispitivani parametri (pol, suplementacija selenom, status pušenja, porodična istorija AITB, komorbiditeti) nisu

pokazali statistički značajno slaganje sa serumskom koncentracijom TBII u ispitivanoj populaciji pacijenata.

Serumske koncentracije TBII i funkcionalne aktivnosti TSAb bile su u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa serumskom koncentracijom TSH, dok značajne korelacije sa ostalim parametrima tiroidnog statusa nije bilo (FT4, TGAt, TPOAt) (*Tabela 17*). Dodatno je detektovana statistički značajna korelacija između koncentracije TGAt i TPOAt u serumu ispitivanih pacijenata ($\rho = 0,767$; $p < 0,001$).

Tabela 17. Korelacija koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRAAt sa parametrima tiroidnog statusa u serumu pacijenata sa GO

Parametar	TSH (IU/L)	FT4 (pmol/L)	TGAt (IU/L)	TPOAt (IU/L)
TSAb (SRR%)	-0,270 (0,010)	0,087 (0,422)	-0,125 (0,238)	-0,156 (0,139)
TBAAb (% inhibicije)	0,312 (0,003)	-0,117 (0,268)	0,125 (0,239)	0,121 (0,255)
TBII (IU/L)	-0,277 (0,009)	0,210 (0,054)	0,075 (0,487)	0,060 (0,581)

TSH-tireostimulirajući hormon, FT4-slobodan T4 (slobodan tiroksin), TGAt-antitela na tireoglobulin, TPOAt-antitela na tireoidnu-peroksidazu; Rezultati su prikazani kao koeficijent korelacije i p vrednost u zagradi.

Od 57 ispitanika za koliko je bio dostupan podatak o titru TPOAt i TGAt, kod 26 pacijenata je detektovano istovremeno prisustvo TPOAt i TSAb a kod 13 pacijenata je detektovano istovremeno prisustvo TGAt i TSAb. Kod po jednog pacijenta je detektovana izolovana pozitivnost TPOAt, bez pozitivnih TSAb u serumu. Od 27 pacijenata sa pozitivnim rezultatom TPOAt, 20, 1 i 6 ispitanika je imalo dijagnozu GB GO, ET GO i HT GO, redom. Od 13 pacijenata sa pozitivnim vrednostima TGAt, kod 7, 1 i 5 osoba je postavljena dijagnoza GB GO, ET GO i HT GO, redom. Pozitivnost rezultata TSAb nije bila značajno povezana sa pozitivnošću rezultata TPOAt ($\chi^2 = 0,863$, $p = 0,353$), niti TGAt ($\chi^2 = 0,000$, $p = 1,000$). Pozitivnost rezultata TPOAt i TGAt bile su međusobno značajno povezane ($\chi^2 = 11,588$, $p = 0,001$).

Dodatno je analizirana raspodela pozitivnosti aktivnosti i ukupne serumske koncentracije TSHRAAt u grupama ispitanika prema njihovom tiroidnom statusu (*Tabela 18*).

Tabela 18. Raspodela pozitivnosti TSAb i TBII prema tiroidnom statusu ispitanika

Grupa ispitanika	TSAb \geq 140 (SRR%) (%)	TBII \geq 1,75 (IU/L) (%)	P
Tiroidni status			
hipertiroidni pacijenti (n = 35)	100	85,7	0,063
eutiroidni pacijenti (n = 39)	92,3	56,4	< 0,001
hipotiroidni pacijenti (n = 11)	81,8	72,7	/

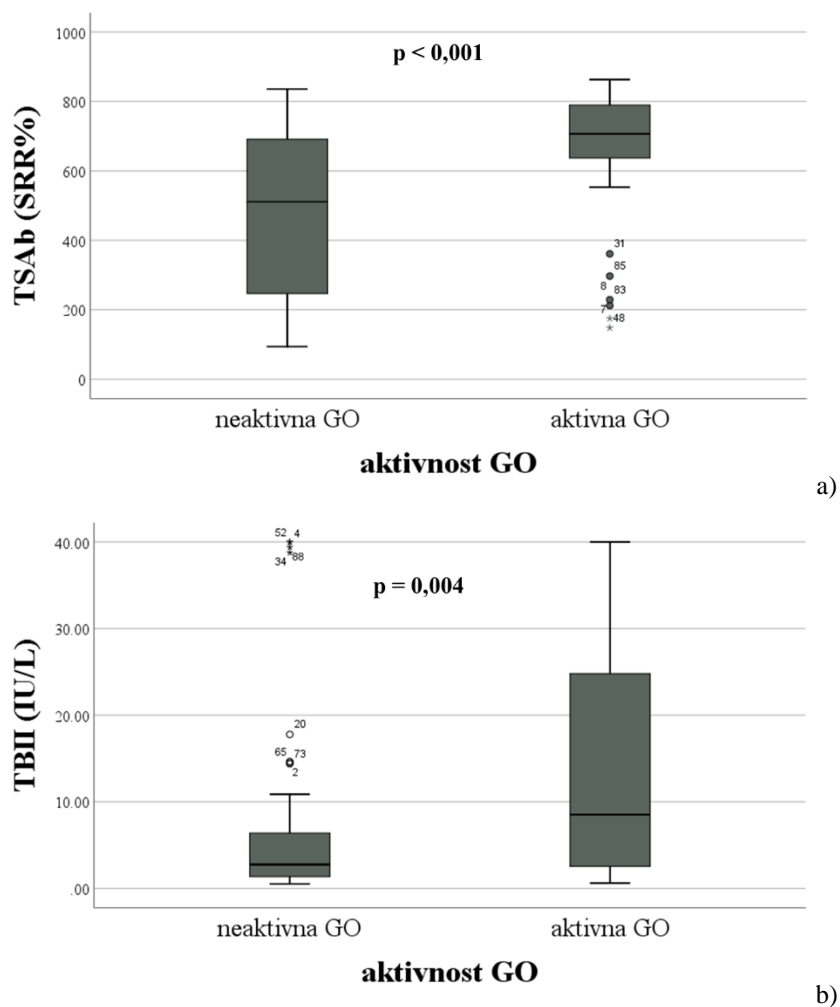
TSAb = 140 SRR% je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; TBII = 1,75 IU/L je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; Podaci su prikazani kao udeo pacijenata (%). P vrednost \leq 0,05 se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *McNemar* testa.

Pacijenti su prema tiroidnom statusu, na osnovu vrednosti TSH i FT4 hormona, klasifikovani kao hipertiroidni, eutiroidni i hipotiroidni. Kod velikog broja pacijenata je postignut biohemijski eutiroidizam, primenom adekvatne medikamentozne terapije. Primećuje da se stopa pozitivnosti TSAb i TBII značajno razlikovala u grupi eutiroidnih ispitanika ($p < 0,001$), pri čemu je stopa pozitivnih rezultata TBII bila statistički značajno manja. Kod hipertiroidnih i hipotiroidnih ispitanika nije bilo statistički značajne razlike u stopi pozitivnih rezultata između testova.

4.3. Analiza povezanosti TSHRA t sa kliničkim fenotipom GO

4.3.1. Analiza povezanosti TSHRA t sa aktivnošću i težinom GO

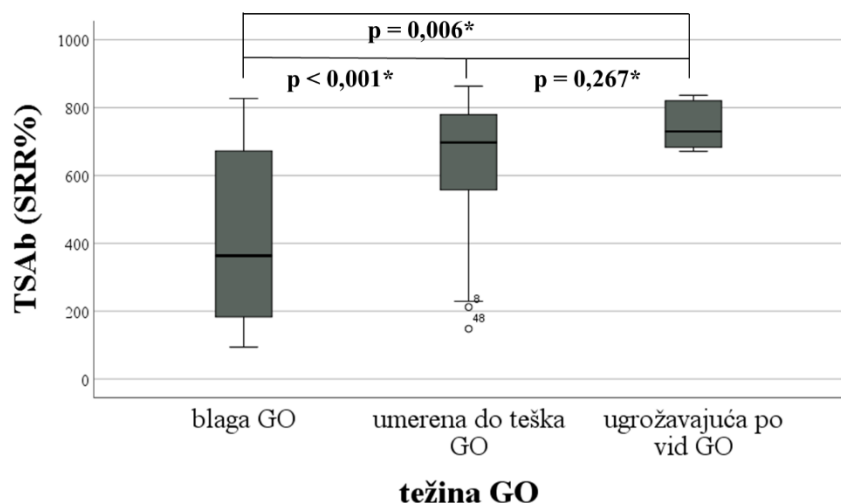
Nivoi TSA b i TBII su bili značajno povezani sa aktivnošću GO (Slika 15).



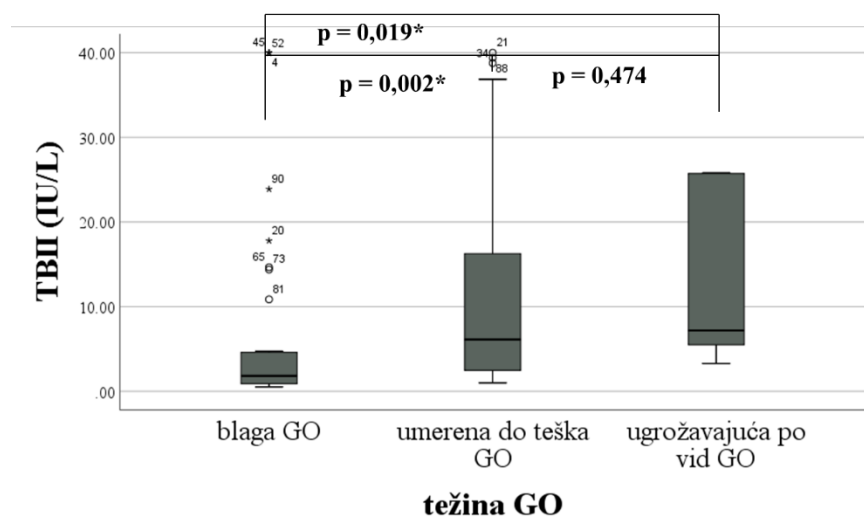
Slika 15. Poređenje a) aktivnosti TSA b i b) koncentracije TBII u zavisnosti od aktivnosti GO

Značajno viša aktivnost TSAb i ukupna koncentracija TBII su izmerene kod pacijenata sa aktivnom formom GO (medijana: 707 SRR%; interkvartilni opseg: 633-794 SRR% i medijana: 8,52 IU/L; interkvartilni opseg: 2,51-25,27 IU/L %, za TSAb i TBII, redom), u poređenju sa pacijentima sa neaktivnom GO (medijana: 511 SRR%; interkvartilni opseg: 238-693 SRR% i medijana: 2,75 IU/L, interkvartilni opseg: 1,34-6,71 IU/L, za TSAb i TBII, redom). Dodatno je detektovan i značajan stepen korelacije nivoa TSAb i CAS skora ($\rho = 0,387$, $P < 0,001$), kao i koncentracije TBII i CAS skora ($\rho = 0,337$, $p = 0,001$) (*Slika 15*).

Postojanje izražene razlike u aktivnosti TSAb i ukupne koncentracije TBII je utvrđeno i između pacijenata sa različitim stepenom težine bolesti (*Slika 16*).



a)



b)

Slika 16. Poređenje a) aktivnosti TSA b i b) koncentracije TBII u zavisnosti od težine GO

Pacijenti sa blagom GO su imali statistički značajno niže vrednosti TSA b (medijana: 363 SRR%; interkvartilni opseg: 182-673 SRR%) u odnosu na pacijente sa umerenom do teškom GO (medijana: 697 SRR%; interkvartilni opseg: 554-781 SRR%), kao i u odnosu na pacijente sa teškim oblikom GO koji ugrožava vid (medijana: 729 SRR%; interkvartilni opseg: 680-824 SRR%). Statistički značajne razlike u nivou TSA b nije bilo između pacijenata sa umerenom do teškom GO i pacijenata sa GO koja ugrožava vid (medijana: 697 SRR%; interkvartilni opseg: 554-781 SRR% i medijana: 729 SRR%; interkvartilni opseg: 680-824 SRR%, za umerenu do tešku GO i GO koja ugrožava vid, redom). Koncentracija TBII je takođe bila statistički značajno

niža kod pacijenata sa blagom GO (medijana: 1,81 IU/L; interkvartilni opseg: 0,89-4,68 IU/L) u poređenju sa pacijentima sa umerenom do teškom GO (medijana: 6,12 IU/L, interkvartilni opseg: 2,45-17,65), kao i u poređenju sa pacijentima sa GO koja je ugrožavajuća po vid (7,18 IU/L, interkvartilni opseg: 4,95-25,75 IU/L). Serumska koncentracija TBII se nije značajno razlikovala kod ispitanika sa umerenom do teškom GO i onih sa teškom GO koja ugrožava vid (Slika 16).

Iako je distribucija serumske koncentracije i aktivnosti TSHRA_t bila slična u ispitivanim grupama pacijenata, pozitivnost TSA_b i TBII se značajno razlikovala u odnosu na aktivnost i težinu GO. Distribucija pozitivnosti rezultata TSA_b i TBII, izmerenih primenom tehnike bioeseja i kompetitivnog imuneseja, redom, prikazana je u Tabeli 19.

Tabela 19. Distribucija pozitivnosti TSA_b i TBII u odnosu na aktivnost i težinu GO

Grupa ispitanika	TSA _b ≥ 140 (SRR%) (%)	TBII ≥ 1,75 (IU/L) (%)	P
Aktivna GO (n=40)	100	82,5	0,016
Neaktivna GO (n=51)	88	62	<0,001
Blaga GO (n=38)	84,2	50	<0,001
Umerena do teška GO (n=47)	100	84,8	0,016
Ugrožavajuća po vid GO (n=6)	100	100	/

TSA_b = 140 SRR% je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; TBII = 1,75 IU/L je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; Podaci su prikazani kao udeo pacijenata (%). P vrednost ≤ 0,05 se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *McNemar* testa.

Među pacijentima sa aktivnim oblikom GO, kod svih 40 pacijenata nivo aktivnosti TSA_b je bio iznad granice pozitivnosti, dok je samo 34 pacijenata bilo TBII pozitivno. Ovakvi rezultati upućuju na zaključak da TSA_b pokazuje 100% osetljivost za razlikovanje između aktivnog i neaktivnog GO, dok TBII detektuje samo 82,5% pacijenata sa aktivnim oblikom GO. Značajna povezanost između aktivnosti GO i stope pozitivnosti TSA_b i TBII je detektovana (p = 0,025, p = 0,033, redom). Kod svih 47 pacijenata sa umerenom do teškom GO i svih 6 pacijenata sa GO koja ugrožava vid dobijen je pozitivan rezultat određivanja TSA_b. Pozitivnost TBII određivanja je detektovana kod značajno manjeg broja pacijenata sa umerenim do teškim oblikom GO. Ovi podaci ukazuju na to da je TSA_b visoko osetljiv parametar sa sposobnošću 100% detekcije umerenih do teških oblika GO, u poređenju sa TBII koji pokazuje osetljivost od 84,8%. Kod svih

ispitanika sa GO koja ugrožava vid i TSAb i TBII su bili pozitivni. Pozitivnost rezultata oba parametra bila je statistički značajno povezana sa težinom GO ($p = 0,011$, $p = 0,001$, redom). Najprimetnija razlika u stopi pozitivnosti primenjenih testova uočena je u grupi pacijenata sa neaktivnom i blagom GO.

4.3.2. Analiza prediktivnog potencijala TSHRA_t

U cilju ispitivanja potencijala aktivnosti i koncentracije TSHRA_t za predviđanje kliničkog toka bolesti upotrebili smo binarnu logističku regresionu analizu. Prvenstveno je analiziran prediktivni potencijal TSAb i TBII za predviđanje razvoja aktivne forme GO (Tabela 20).

Tabela 20. Procena značaja TSAb i TBII kao prediktora aktivne GO

Prediktor	p	OR	95% CI	
			donji	gornji
<i>Univarijantna binarna logistička regresija</i>				
Medijana TSAb	0,001	4,278	1,762	10,388
Medijana TBII	0,053	2,333	0,988	5,512
<i>Multivarijantna binarna logistička regresija</i>				
Model A				
Medijana TSAb	0,002	4,737	1,757	12,772
Model B				
Medijana TBII	0,059	2,522	0,964	6,599

95% CI-95% interval pouzdanosti odnosa šansi; OR-odnos šansi; Medijana TSAb i TBII se odnosi na vrednosti iznad vrednosti medijane, odnosno treći i četvrti kvartil vrednosti TSAb i TBII; Model A: Vrednosti TSAb su podešene za godine starosti, pol, ITM i trajanje simptoma GO. Model B: Izvršeno je podešavanje vrednosti TBII za godine starosti, pol, ITM i trajanje simptoma GO. Podaci su analizirani binarnom logističkom regresijom. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom.

Kao značajan prediktivni marker aktivnosti GO izdvojila se stimulatorna aktivnost TSAb, dok ukupna koncentracija TBII nije pokazala značajna prediktivna svojstva. Univarijantnom binarnom logističkom regresijom je dokazano da pacijenti kod kojih je izmerena vrednost TSAb iznad medijane za ispitivanu populaciju imaju 4,3 puta veću šansu za razvoj klinički aktivnog

oblika GO u odnosu na pacijente sa vrednošću TSAb ispod medijane. U cilju identifikacije nezavisnih prediktivnih markera aktivnosti GO koristili smo multivarijantnu binarnu logističku analizu. Prediktivni model A uključivao je, osim medijane TSAb, i sledeće parametre: starosna dob, pol, ITM, dužina trajanja simptoma GO, dok je prediktivni model B uključivao medijanu TBII, starosnu dob, pol, ITM i dužinu trajanja simptoma GO. Starosna dob, muški pol i dužina trajanja simptoma GO su izabrani kao poznati faktori rizika za razvoj aktivne forme GO. Dobijeni rezultati potvrđuju da TSAb daje nezavisan doprinos predviđanju razvoja aktivne forme GO, za raliu od TBII koji ne pokazuje nezavisan prediktivni potencijal. Naime, utvrđeno je da postoji 4,7 puta veća šansa za razvoj aktivne GO kod osobe kod koje je vrednost TSAb iznad medijane za ispitivanu populaciju. Osim TSAb, muški pol je jedini identifikovan kao nezavisan prediktor razvoja aktivne GO. U modelu A, muškarci su imali 3,2 puta veću šansu ($p = 0,033$), a u modelu B 3 puta veću šansu ($p = 0,038$) za razvoj aktivnog oblika GO, u odnosu na žene.

Sledeći je analiziran prediktivni potencijal TSAb i TBII u predviđanju težine GO (*Tabela 21*).

Tabela 21. Procena značaja TSAb i TBII kao prediktora umerene i teške GO

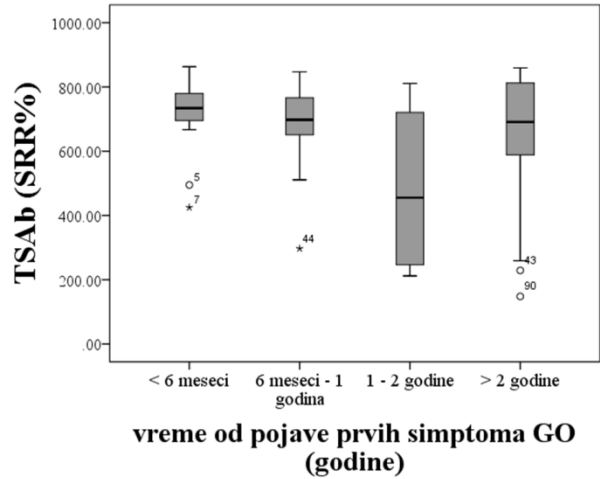
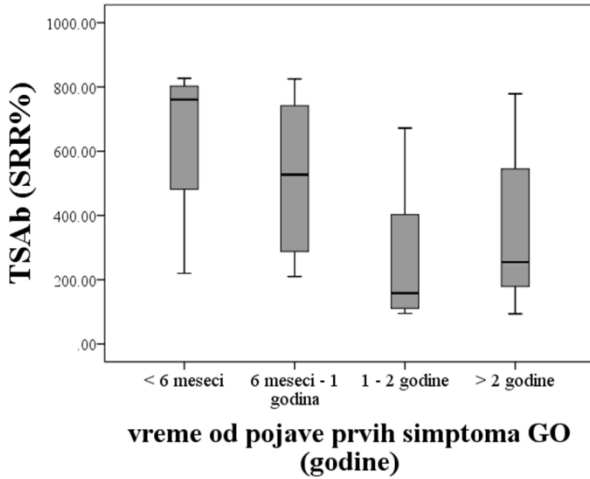
Prediktor	p	OR	95% CI	
			donji	gornji
<i>Univarijantna binarna logistička regresija</i>				
Medijana TSAb	0,001	4,773	1,935	11,769
Medijana TBII	0,020	2,831	1,174	6,826
<i>Multivarijantna binarna logistička regresija</i>				
Model A				
Medijana TSAb	0,001	6,363	2,217	18,257
Model B				
Medijana TBII	0,016	3,642	1,274	10,418

95% CI-95% interval pouzdanosti odnosa šansi; OR-odnos šansi; Medijana TSAb i TBII se odnosi na vrednosti iznad vrednosti medijane, odnosno treći i četvrti kvartil vrednosti TSAb i TBII; Model A: Vrednosti TSAb su podešene za godine starosti, pol, ITM i trajanje simptoma GO. Model B: Izvršeno je podešavanje vrednosti TBII za godine starosti, pol, ITM i trajanje simptoma GO. Podaci su analizirani binarnom logističkom regresijom. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom.

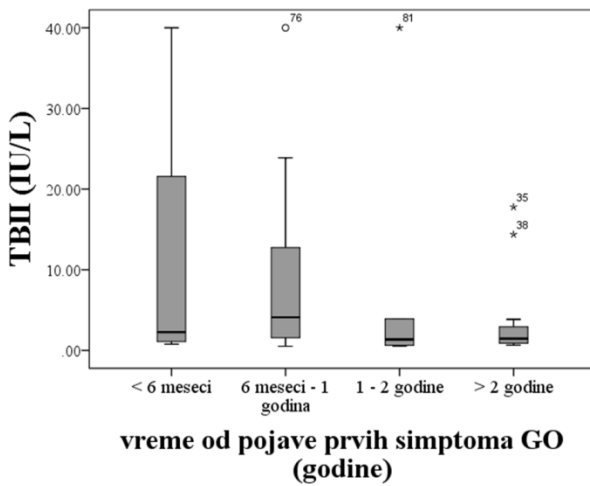
Što se tiče težine GO, i TSAb i TBII su identifikovani kao statistički značajni prediktivni markeri razvoja umerene do teške ili teške GO koja ugrožava vid. Međutim, vrednosti TSAb iznad medijane predviđaju razvoj teže forme GO sa znatno većem šansom u odnosu na vrednosti iznad medijane serumske koncentracije TBII (4,8 puta i 2,8 puta, redom). U multivarijantnoj binarnoj logističkoj analizi i TSAb i TBII su zadržali svoj prediktivni potencijal, čak i nakon uvođenja starosne dobi, pola, ITM i dužine trajanja simptoma GO. Osobe sa vrednošću TSAb iznad medijane su imale 6,4 puta veću šansu za razvoj težih oblika GO, u odnosu na osobe kod kojih je određena aktivnost TSAb ispod vrednosti medijane. Dobijeni odnos šansi za razvoj teže forme GO bio je značajno niži za vrednosti TBII iznad medijane. Muški pol je pokazao značajnu prediktivnu vrednost i u odnosu na težinu GO (3,2 puta i 3 puta u modelu A i B, redom).

4.3.3. Raspodela TSAb i TBII u zavisnosti od trajanja simptoma i težine GO

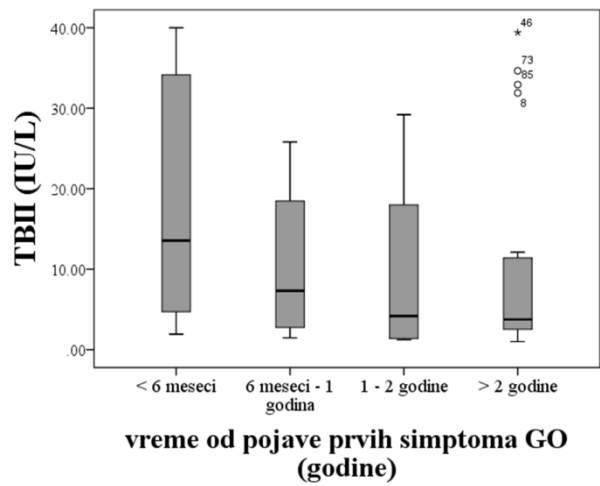
U cilju sagledavanja raspodele aktivnosti i koncentracije TSHRA_t u odnosu na vreme proteklo od pojave simptoma GO, pacijenti su klasifikovani na 4 grupe: pacijenti kod kojih su se simptomi prvi put javili pre ≤ 6 meseci, 6 meseci do godinu dana, 1 do 2 godine i pacijenti kod kojih simptomi traju preko 2 godine (*Slika 17*). Cilj je bio da se utvrdi kako se nivo aktivnosti i koncentracije TSHRA_t menja kroz vreme u odnosu na težinu GO, kao i da li postoji značajna razlika u stopi pozitivnih rezultata TSAb i TBII između blagih i težih oblika orbitopatije (umerena do teška i ugrožavajuća po vid) u različitim vremenskim intervalima.



a)



b)



c)

d)

Slika 17. Poređenje TSAb u odnosu na vreme proteklo od pojave prvih simptoma GO u grupi pacijenata sa a) blagom GO i b) u grupi pacijenata sa umerenom do teškom i GO koja ugrožava vid, i poređenje TBII u odnosu na vreme proteklo od pojave prvih simptoma GO u grupi pacijenata sa c) blagom GO i d) u grupi pacijenata sa umerenom do teškom i GO koja ugrožava vid.

Ako posmatramo distribuciju TSAb u odnosu na vreme proteklo od pojave prvih simptoma GO primećuje se da nema statistički značajne razlike u aktivnosti TSAb između pacijenata sa blagim (medijana: 760,5 SRR%; interkvartilni opseg: 350,75-814,75 SRR%) i težim oblikom GO (734 SRR% i interkvartilni opseg: 681,25-780,25 SRR%), u grupi pacijenata kod kojih su simptomi trajali ≤ 6 meseci ($p = 0,761$). Statistički značajne razlike u vrednostima medijana TSAb, između blagog (medijana: 527 SRR%; interkvartilni opseg: 283-750 SRR%) i težeg oblika GO

(medijana: 698 SRR%; interkvartilni opseg: 644-772 SRR%), nije bilo ni u grupi pacijenata kod kojih su se simptomi GO pojavili između 6 meseci i godinu dana ranije u odnosu na datum uzorkovanja krvi ($p = 0,079$). Sa porastom dužine trajanja simptoma došlo je do znatnog pada u nivou aktivnosti TSAb, koji je višestruko izraženiji u grupi pacijenata sa blagom formom orbitopatije. Kod pacijenata kod kojih su simptomi trajali između 1 do 2 godine medijana TSAb je bila niža u slučaju blage GO (medijana: 158 SRR%; interkvartilni opseg: 96-631 SRR%) u odnosu na umerenu do tešku i tešku GO koja ugrožava vid (medijana: 455,5 SRR%; interkvartilni opseg: 229,25-765,75 SRR%), međutim statistička značajnost nije postignuta, potencijalno zbog malog broja pacijenata u ovoj grupi ($p = 0,131$). U grupi pacijenata kod kojih su simptomi trajali preko 2 godine bila je najuočljivija razlika u medijani aktivnosti TSAb između pacijenata sa blagom (medijana: 255 SRR%; interkvartilni opseg: 139,5-608,5 SRR%) i pacijenata sa umerenom do teškom ili ugrožavajućom po vid GO (medijana: 691 SRR%; interkvartilni opseg: 584,75-816,25 SRR%) ($p = 0,002$) (*Slika 17a i 17b*).

Slična situacija je bila i sa ukupnom koncentracijom TBII u odnosu na vreme trajanja simptoma i težinu GO. U grupi pacijenata kod kojih su simptomi trajali ≤ 6 meseci i onih kod kojih su trajali od 6 meseci do godinu dana nije bilo statistički značajne razlike u medijani TBII između ispitanika sa blagom (medijana: 2,27 IU/L; interkvartilni opseg: 0,93-30,78 IU/L i medijana: 4,11 IU/L; interkvartilni opseg: 1,46-14,65 IU/L, za ≤ 6 meseci i 6 meseci do 1 godine, redom) i onih sa umerenom do teškom ili GO koja ugrožava vid (medijana: 13,57 IU/L; interkvartilni opseg: 4,21-35,50 IU/L i medijana: 7,31 IU/L; interkvartilni opseg: 2,64-21,81 IU/L, za ≤ 6 meseci i 6 meseci do 1 godine, redom) ($p = 0,203$, $p = 0,223$, za ≤ 6 meseci i 6 meseci do 1 godine, redom). Ukupna koncentracija TBII takođe ispoljava pad sa dužim trajanjem GO. U grupi pacijenata sa dužinom trajanja simptoma GO od 1 do 2 godine nije bilo statistički značajne razlike u medijani TBII između pacijenata sa blagom (medijana: 1,35 IU/L; interkvartilni opseg: 0,60-12,93 IU/L) i pacijenata sa umerenom do teškom ili po vid ugrožavajućom formom GO (medijana: 4,18 IU/L; interkvartilni opseg: 1,31-23,60 IU/L) ($p = 0,394$). Jedina grupa u kojoj je detektovana statistički značajna razlika u koncentraciji TBII između pacijenata sa blagom GO (medijana: 1,45 IU/L; interkvartilni opseg: 0,85-3,38 IU/L) i onih sa težim oblikom GO (medijana: 3,76 IU/L; interkvartilni opseg: 2,48-12,11 IU/L), su bili pacijenti sa dužinom trajanja simptoma GO preko 2 godine ($p = 0,013$) (*Slika 17c i 17d*).

Ispitivanje povezanosti pozitivnosti TSAb i TBII sa težinom GO, u zavisnosti od trajanja simptoma GO, je pokazalo da se rezultati u određenoj meri razlikuju u odnosu na sirove vrednosti aktivnosti i koncentracije TSHRA_t. Distribucija pozitivnosti TSAb u zavisnosti od trajanja simptoma GO, u grupi pacijenata sa blagim oblikom GO i grupi sa umerenom do teškom ili GO koja je ugrožavajuća po vid, pratila je distribuciju aktivnosti TSAb u serumu pacijenata (Tabela 22).

Tabela 22. Povezanost pozitivnosti TSAb/TBII i težine GO, u zavisnosti od dužine trajanja simptoma GO

Trajanje simptoma GO	Blaga GO		Umerena do teška/po vid ugrožavajuća GO		Blaga GO		Umerena do teška/po vid ugrožavajuća GO	
	TSAb ≥ 140 (SRR%) (%)	TSAb ≥ 140 (SRR%) (%)	p	TBII ≥ 1,75 (IU/L) (%)	TBII ≥ 1,75 (IU/L) (%)	p		
≤ 6 meseci	100	100	/	60	100	0,020		
6 meseci do 1 godine	100	100	/	64,7	93,3	0,051		
> 1 godine	78,6	100	0,016	59,3	78,3	0,151		

TSAb = 140 SRR% je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; TBII = 1,75 IU/L je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; Podaci su prikazani kao udeo pacijenata (%). P vrednost ≤ 0,05 se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom χ^2 testa.

Kod pacijenata sa skorijim početkom simptoma bolesti (≤ 6 meseci i 6 meseci do 1 godina) pozitivnost rezultata TSAb je bila 100% u obe grupe pacijenata prema težini simptoma orbitopatije. Sa porastom trajanja GO (> 1 godine), primećuje se izražen pad pozitivnosti TSAb u grupi pacijenata sa blagom formom GO, dok je kod težih oblika bolesti pozitivnost TSAb ostala 100% (p = 0,016). Kada je u pitanju pozitivnost rezultata TBII, situacija se razlikovala u odnosu na TSAb. Kod pacijenata kod kojih su simptomi GO trajali ≤ 6 meseci, pozitivnost TBII u grupi pacijenata sa blagim oblikom GO bila je značajno niža u odnosu na grupu pacijenata sa umerenim do teškim ili ugrožavajućim po vid oblikom GO (p = 0,020). U grupi ispitanika kod kojih je GO trajala između 6 meseci i 1 godine uočava se granična statistička značajnost (p = 0,051) razlike u pozitivnosti TBII u odnosu na težinu GO. Za razliku od pozitivnosti rezultata TSAb čiji se značajan pad uočava sa porastom dužine trajanja GO samo u grupi pacijenata sa blagom GO, pozitivnost rezultata TBII se održava kod pacijenata sa blagim simptomima GO, dok se značajno smanjenje pozitivnosti sa porastom dužine trajanja GO primećuje kod pacijenata

sa težim oblicima GO. Dakle, u grupi ispitanika kod kojih simptomi traju iznad 1 godine, nije bilo statistički značajne razlike u pozitivnosti TBII između pacijenata sa blagom i onih sa umerenom do teškom ili GO koja ugrožava vid ($p = 0,151$).

Dodatno je analizirana razlika u pozitivnosti rezultata TSAb i TBII u zavisnosti od trajanja simptoma GO, u grupi ispitanika sa blagom GO i grupi sa umerenom do teškom, odnosno GO koja ugrožava vid. Kako bismo brojčano ujednačili ispitivane grupe pacijenata i samim tim povećali relevantnost dobijenih rezultata, u ovu svrhu smo sve pacijente klasifikovali kao one kod kojih su simptomi trajali ≤ 1 godine i one kod kojih su trajali > 1 godine (*Tabela 23*).

Tabela 23. Razlika pozitivnosti TSAb i TBII u zavisnosti od dužine trajanja simptoma GO

Trajanje simptoma GO	Blaga GO			Umerena do teška/po vid ugrožavajuća GO		
	TSAb ≥ 140 (SRR%) (%)	TBII ≥ 1.75 (IU/L) (%)	p	TSAb ≥ 140 (SRR%) (%)	TBII ≥ 1.75 (IU/L) (%)	p
≤ 1 godine	100	63,6	0,008	100	96,2	/
> 1 godine	78,6	57,2	0,082	100	78,3	0,063

TSAb = 140 SRR% je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; TBII = 1,75 IU/L je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; Podaci su prikazani kao udeo pacijenata (%). P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *McNemar* testa.

Pozitivnost rezultata dobijenih različitim vrstom testova (tehnika bioeseja i kompetitivnog imunoeseja) se značajno razlikovala samo u grupi pacijenata sa blagim oblikom orbitopatije čiji su simptomi trajali ≤ 1 godine ($p = 0,008$). U grupi pacijenata sa težim oblicima GO, pozitivnost TSAb je bila primetno viša u odnosu na TBII kod ispitanika sa dužim trajanjem simptoma (> 1 godine), međutim nije postignuta statistička značajnost ($p = 0,063$). U grupi pacijenata sa kraćim trajanjem i težim oblicima GO (≤ 1 godine) obe vrste testova su imale visoku stopu pozitivnosti. Analiza distribucije i razlike u pozitivnosti TSAb i TBII, u zavisnosti od dužine trajanja i težine GO, potvrdila je opšti trend značajno više stope pozitivnih rezultata TSAb u odnosu na TBII i superiornije osetljivosti određivanja TSAb koja je naročito uočljiva kod blažih oblika bolesti.

4.3.4. Analiza pojedinačnih oftalmoloških parametara i njihove povezanosti sa TSHRA_t

U cilju sagledavanja značajnosti upotrebe analiziranih seroloških biomarkera (aktivnosti i koncentracije TSHRA_t) u postavljanju dijagnoze i praćenju GO, analizirana je njihova povezanost sa pojedinačnim oftalmološkim parametrima od interesa. Vrednosti ovih parametara ulaze u bodovni sistem za klasifikaciju GO prema aktivnosti i težini, međutim bilo je od interesa da se ispita u kakvoj je vezi svaki od ovih parametara pojedinačno sa TSHRA_t, kao i da li se neki od njih izdvaja u tom smislu. Namera ovog istraživanja je bila da li, i u kojoj meri, određivanje nivoa aktivnosti i koncentracije TSHRA_t u serumu pacijenata pridodaje postojećim kliničkim kriterijumima, uzimajući u obzir visok stepen subjektivnosti kliničke procene pojedinih oftalmoloških parametara.

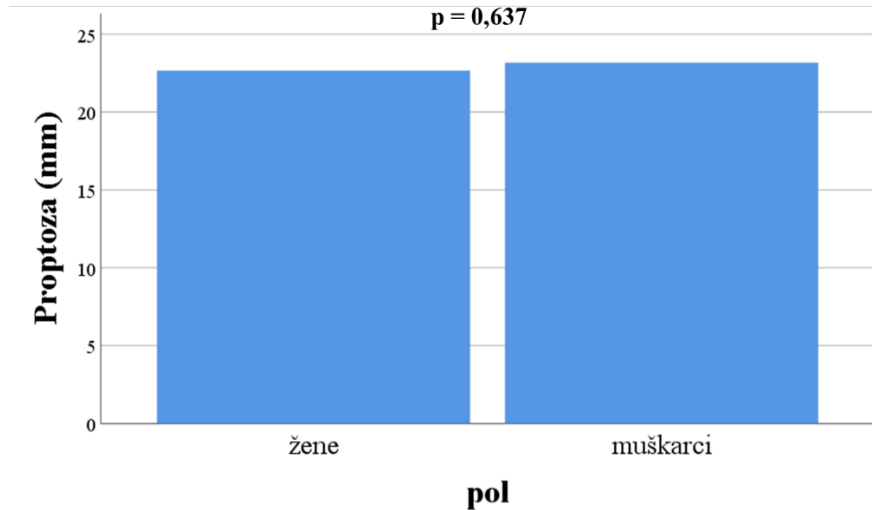
U *Tabeli 24* dat je detaljan prikaz određenih oftalmoloških parametara pacijenata sa GO. Analizirani uzorak je reprezentativan u smislu slaganja sa epidemiološkim podacima GO. Posebno su analizirani parametri koji ukazuju na stepen zahvaćenosti mekih tkiva orbite koji ulaze u skor kliničke aktivnosti (CAS), a posebno parametri koji definišu težinu orbitopatije (ograničenje motiliteta očiju, diplopije, proptoza, zadebljanje ili fibroza ekstraokularnih mišića, vizus).

Tabela 24. Oftalmološki parametri pacijenata

Parametar	n (%)
Retrakcija kapaka	33/46 (71,74)
Fotofobija	27/78 (34,61)
Iritabilni simptomi (grebanje, suzenje, peckanje, osećaj stranog tela)	60/77 (77,92)
Zahvaćenost mekih tkiva	
edem kapaka	63/80 (78,75)
crvenilo kapaka	30/79 (37,97)
crvenilo konjuktiva	41/80 (51,25)
inflamacija plike i karunkule	13/90 (14,44)
hemoza	17/90 (18,89)
Bolovi (spontani ili stalni retroorbitalni bol)	26/90 (28,89)
Lagoftalmus	27/66 (40,91)
Zahvaćenost EOM	
Poremećaj motiliteta	45/77 (58,44)
ograničenje motiliteta	42/45 (93,33)
fiksacija bulbusa	3/45 (6,67)
Diplopije	57/83 (68,7%)
povremene pri umoru oka	16/57 (28,07)
nestalne pri ekstremnim pogledima	22/57 (38,60)
konstantne u osnovnom/svim pravcima pogleda	19/57 (33,33)
Ultrazvučni parametri	
Fibroza ekstraokularnih mišića	14/60 (23,33)
Zadebljanje ekstraokularnih mišića	42/60 (70)
Proptoza	74/79 (93,67)
blaga	2/74 (2,70)
umerena	15/74 (20,27)
teška	25/74 (33,78)
Poremećaj funkcije vida (DON, keratopatija, ulkus rožnjače)	5/91 (5,5)

EOM-ekstraokularni mišići, DON-distiroidna optička neuropatija; Podaci su prikazani kao udeo pacijenata (%).

Uzimajući u obzir zavisnost fizioloških vrednosti proptoze od pola i godina starosti, analizirali smo povezanost izmerene vrednosti proptoze sa polom i starosnom dobi pacijenata (*Slika 18*).



Slika 18. Razlika u vrednostima proptoze između muškaraca i žena

U analiziranom uzorku pacijenata nije detektovana statistički značajna razlika u vrednostima proptoze između muškaraca ($23,17 \pm 2,82$ mm) i žena ($22,66 \pm 3,29$ mm) (Slika 18). Vrednost proptoze takođe nije značajno korelirala sa godinama starosti ispitanika ($r = -0,004$, $p = 0,979$).

Sledeća je analizirana povezanost aktivnosti i koncentracije TSHRA_t sa pojedinačnim oftalmološkim parametrima. U Tabeli 25 je prikazana distribucija nivoa TSA_b i TBII u zavisnosti od prisustva različitih oftalmoloških parametara. Za svaki od analiziranih parametara, prikazana je razlika u vrednostima medijana TSA_b i TBII između pacijenata kod kojih su prisutni i onih kod koji nisu detektovani pomenuti oftalmološki znakovi i simptomi GO.

Tabela 25. Analiza TSAb i TBII u zavisnosti od prisustva različitih oftalmoloških parametara

Oftalmološki parametri	TSAb (SRR%)	p	TBII (IU/L)	p
	prisutan/odsutan		prisutan/odsutan	
Retrakcija kapaka	495 (202-735)/658 (290-775)	0,257	2,30 (1,15-9,12)/4,28 (1,70-23,42)	0,168
Fotofobija	684 (444-761)/698 (322-791)	0,453	4,28 (1,54-16,64)/3,59 (1,62-17,33)	0,827
Iritabilni simptomi	463 (204-670)/700 (545-779)	0,023	3,90 (1,11-14,32)/3,98 (1,82-17,65)	0,414
Zahvaćenost mekih tkiva				
edem kapaka	506 (276-779)/698 (550-770)	0,251	3,90 (2,31-10,16)/3,49 (1,47-17,65)	0,887
crvenilo kapaka	665 (256-778)/698 (638-781)	0,038	3,01 (1,41-11,17)/6,12 (2,51-22,81)	0,056
crvenilo konjunktiva	631 (255-778)/707 (576-796)	0,012	2,70 (1,42-9,38)/5,73 (2,59-21,92)	0,032
inflamacija plike i karunkule	670 (310-756)/758 (681-828)	0,009	3,13 (1,46-12,38)/15,15 (4,39-31,68)	0,009
hemoza	662 (323-769)/734 (687-795)	0,015	3,13 (1,47-12,38)/15,15 (3,30-27,47)	0,030
Spontani ili stalni retrobulbarni bol	613 (279-741)/719 (527-781)	0,066	3,13 (1,46-11,93)/5,62 (2,44-32,59)	0,059
Lagofthalmus	658 (259-743)/724 (425-820)	0,051	2,92 (1,45-14,38)/7,04 (2,89-25,73)	0,028
Zahvaćenost EOM				
Poremećaj motiliteta	571 (283-779)/683 (528-760)	0,441	3,77 (1,97-11,77)/4,64 (1,52-21,92)	0,642
Diplopije	528 (204-758)/675 (393-765)	0,200	3,80 (1,23-14,45)/3,49 (1,82-16,64)	0,358
Ultrazvučni parametri				
Fibroza	667 (330-764)/503 (203-763)	0,332	2,60 (1,57-3,70)/2,58 (0,68-18,18)	0,054
Zadebljanje EOM	454 (182-673)/679 (293-773)	0,204	2,76 (2,02-4,08)/2,13 (0,71-6,11)	0,576
Proptoza	255 (168-751)/673 (416-773)	0,219	1,41 (0,54-21,46)/4,55 (2,29-15,98)	0,121
Poremećaj funkcije vida (DON, keratopatija, ulkus rožnjače)	667 (298-759)/761 (677-828)	0,089	3,87 (1,81-15,03)/7,04 (4,39-16,52)	0,400

EOM-ekstraokularni mišići; DON-distiroidna optička neuropatija; Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni opseg). Analizirana je razlika TSAb i TBII između grupa pacijenata koji su imali prisutne navedene simptome i onih bez datih oftalmoloških simptoma. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *Mann-Whitney* testa.

Aktivnost TSAb bila je značajno niža u grupi pacijenata kod kojih nije detektovano prisustvo: blagih iritabilnih simptoma GO (suzenje, iritacija, svrab, grebanje, osećaj starnog tela u oku)

crvenila kapaka, crvenila konjunktiva, inflamacije plike i karunkule i hemoze, dok je razlika u zavisnosti od prisustva lagoftalmusa bila statistički granično značajna. Ukupna serumska koncentracija TBII bila je značajno viša u grupi pacijenata sa crvenilom konjunktiva, inflamacijom plike i karunkule i hemozom. Pacijenti sa prisutnim lagoftalmusom su imali značajno više serumske koncentracije TBII u odnosu na pacijente bez lagoftalmusa. Što se tiče ostalih prikazanih oftalmoloških parametara (retrakcija kapaka, fotofobija, edem kapaka, spontani ili stalni retrobulbarni bolovi, restrikcija motiliteta očiju, diplopije, fibroza, zadebljanje ekstraokularnih mišića, proptoza, poremećaj funkcije vida), nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima TSA b, ni TBII između pacijenata kod kojih je detektovano prisustvo ovih znakova i simptoma GO.

Osim distribucije aktivnosti i koncentracije TSHRA t u odnosu na pojedinačne oftalmološke parametre, analizirana je i razlika u pozitivnosti rezultata TSA b i TBII u odnosu na svaki od ovih parametara. U *Tabeli 26* predstavljen je udeo pozitivnih rezultata TSA b i TBII i značajnost razlike njihove pozitivnosti kod pacijenata sa ispoljenim navedenim oftalmološkim znacima i simptomima GO.

Tabela 26. Distribucija pozitivnosti TSAb i TBII u zavisnosti od prisustva pojedinačnih oftalmoloških znakova i simptoma GO

Parametar	TSAb ≥ 140 (SRR%) %	TBII $\geq 1,75$ (IU/L) %	p
Retrakcija kapaka	93,9	77,4	0,016
Lagofthalmus	100	85,2	0,125
Poremećaj funkcije vida	100	100	/
Diplopije	98,2	76,4	<0,001
Proptoza	97,3	79,5	<0,001
Ograničenje motiliteta očiju	95,6	73,3	0,002
Iritabilni simptomi	98,3	76,3	<0,001
Fotofobija	96,3	70,4	0,016
Hemoza	100	82,4	0,250
Inflamacija plike i karunkule	100	92,3	1,000
Edem kapaka	96,8	74,2	<0,001
Crvenilo kapaka	100	86,7	0,125
Crvenilo konjuktiva	95,1	85,4	0,125
Retrobulbarni bol	92,3	84,6	0,500
Zadebljanje EOM	95,2	71,4	0,002
Fibroza EOM	92,9	71,4	0,250

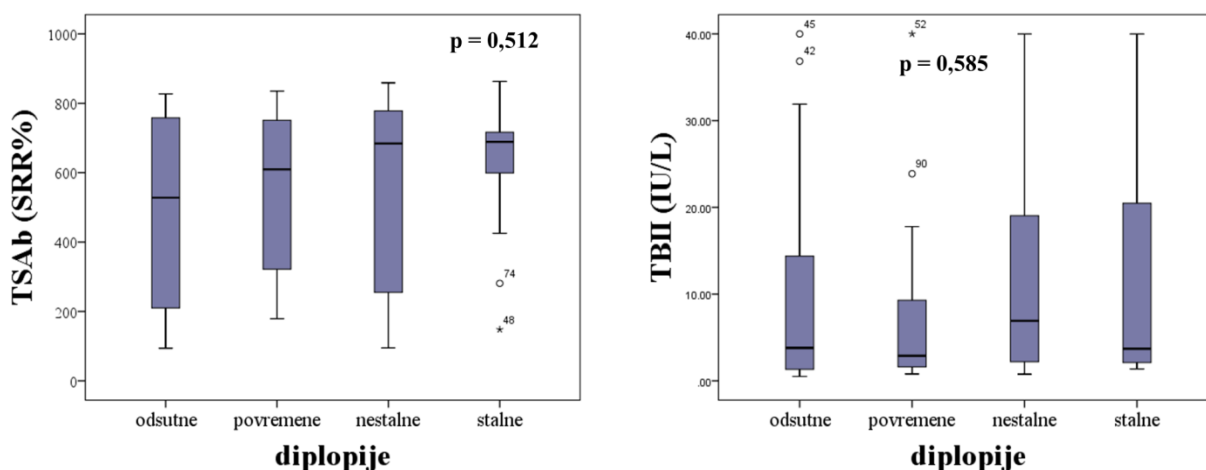
TSAb = 140 SRR% je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; TBII = 1,75 IU/L je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; Podaci su prikazani kao udeo pacijenata (%). P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom McNemar testa.

Uočava se statistički značajno veća stopa pozitivnosti rezultata TSAb u odnosu na prisustvo: retrakcije kapaka, diplopija, proptoze, ograničenje motiliteta očiju, iritabilnih simptoma oka (peckanje, svrab, suzenje, osećaj stranog tela u oku), fotofobije, edema kapaka i zadebljanja ekstraokularnih mišića. Za druge analizirane parametre, nije detektovana statistički značajna razlika u pozitivnosti rezultata TSAb i TBII (lagofthalmus, značajan pad oštrine vida, hemoza, inflamacija plike i karunkule, crvenilo kapaka, crvenilo konjuktiva, retrobulbarni bol i fibroza ekstraokularnih mišića orbite).

Kako bi se detaljnije ispitala asocijacija TSHRA t sa pojedinim oftalmološkim parametrima, pacijenti su stratifikovani prema klasama sledećih parametara: diplopije, stepen proptoze, zahvaćenost ekstraokularnih mišića i poremećaj motiliteta očiju. Cilj je bio da se analizira raspodela nivoa TSAb i TBII u pojedinačnim klasama kako bi se detektovale eventualne suptilne razlike u kliničkoj i serološkoj prezentaciji bolesti.

U tom smislu je prvo ispitana povezanost TSAb i TBII sa stepenom diplopija, pri čemu su diplopije klasifikovane prema radu Bahn i Gorman na četiri kategorije: odsutne, povremene koje se javljaju pri umoru oka, nestalne koje se javljaju pri ekstremnim položajima oka i stalne koje su prisutne u osnovnom položaju oka.

Na *Slici 19* predstavljena je a) aktivnost TSAb i b) ukupna serumska koncentracija TBII kod pacijenata bez prisutnih diplopija, kod pacijenata sa prisutnim povremenim diplopijama, nestalnim diplopijama i stalnim diplopijama.



a)

b)

Slika 19. Razlika a) TSAb i b) TBII u odnosu na klasu diplopije

Ispitivanjem distribucije TSAb utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između ispitivanih grupa pacijenata prema stepenu diplopije. Medijana aktivnosti TSAb kod pacijenata bez ispoljenih diplopija (medijana: 528 SRR%; interkvartilni opseg: 204-759 SRR%) nije se značajno razlikovala u odnosu na pacijente sa povremenim diplopijama (medijana: 610 SRR%; interkvartilni opseg: 310-755 SRR%), nestalnim diplopijama (medijana: 684 SRR%;

interkvartilni opseg: 246-780 SRR%), niti u odnosu na pacijente stalnim diplopijama ispoljenim u osnovnom ili svim položajima oka (medijana: 689 SRR%; interkvartilni opseg: 554-733 SRR%). Statistički značajna razlika u vrednostima TSAb nije detektovana ni između pojedinačnih klasa diplopije (*Slika 19a*).

Ukupna serumska koncentracija TBII se takođe nije razlikovala kod pacijenata bez diplopija (medijana: 3,80 IU/L; interkvartilni opseg: 1,23-14,45 IU/L) u odnosu na pacijente sa povremenim diplopijama (medijana: 2,89 IU/L; interkvartilni opseg: 1,41-13,00 IU/L), u odnosu na pacijente sa nestalnim diplopijama (medijana: 6,91 IU/L; interkvartilni opseg: 2,00-20,42 IU/L), kao i u odnosu na pacijente sa stalnim diplopijama (medijana: 3,70 IU/L; interkvartilni opseg: 1,93-25,81 IU/L). Vrednosti TBII se nisu značajno razlikovale ni između pojedinačnih klasa diplopije (*Slika 19b*).

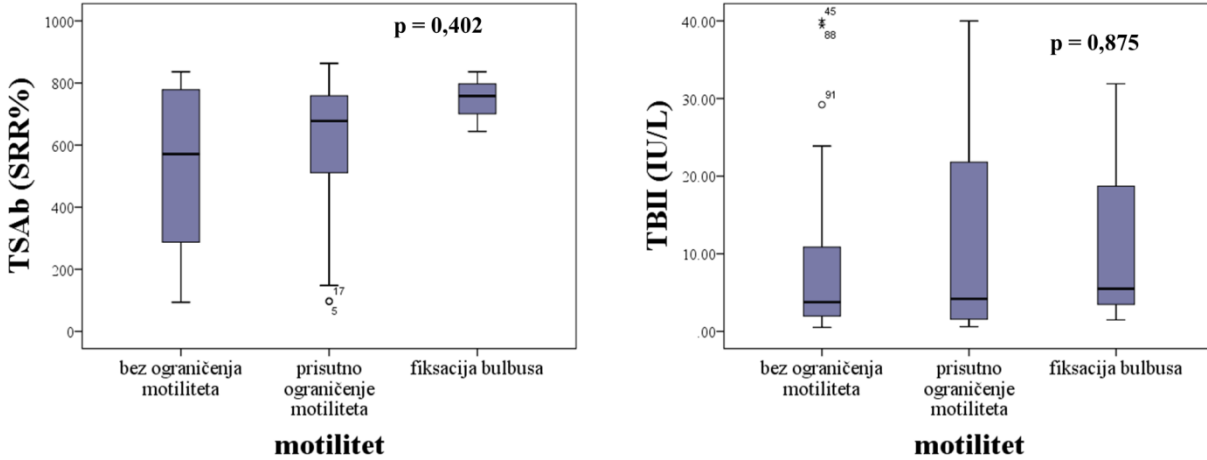
Kada se posmatra pozitivnost rezultata TSAb i TBII u pojedinačnim klasama diplopije, uočava se veća stopa pozitivnosti rezultata TSAb u svim analiziranim grupama pacijenata prema stepenu diplopije, međutim statistička značajnost razlike nije postignuta (*Tabela 27*).

Tabela 27. Distribucija pozitivnosti TSAb i TBII u odnosu na klasu diplopije

Parametar	TSAb ≥ 140 (SRR%) %	TBII $\geq 1,75$ (IU/L) %	p
odsutne diplopije (n = 26)	84,6	65,4	0,063
povremene diplopije (n = 16)	100	68,8	0,063
nestalne diplopije (n = 22)	95	84,2	0,250
stalne diplopije (n = 19)	100	78,9	0,125

TSAb = 140 SRR% je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; TBII = 1,75 IU/L je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; Podaci su prikazani kao udeo pacijenata (%). P vrednost $\leq 0,05$ se smatra statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *McNemar* testa.

Sledeća je analizirana raspodela TSAb i TBII u različitim grupama pacijenata klasifikovanih na osnovu restrikcije motiliteta očiju. Pacijenti su podeljeni u tri grupe: pacijenti bez ograničenja motiliteta, pacijenti sa evidentnim ograničenjem motiliteta različitog stepena i pacijenti kod kojih je u potpunosti fiksiran bulbus, odnosno onemogućeni su bilo kakvi pokreti oka. Na *Slici 20* prikazane su a) aktivnost TSAb i b) ukupna serumska koncentracija TBII u pomenutim grupama pacijenata.



a)

b)

Slika 20. Razlika a) TSAb i b) TBII u odnosu na ograničenje motiliteta očiju

Uočava se da serumski nivoi TSAb proporcionalno rastu sa stepenom povećanja restrikcije motiliteta, ali da se ne dostiže statistički značajna razlika u nivou TSAb između pacijenata bez ograničenja motiliteta (medijana: 571 SRR%; interkvartilni opseg: 283-779 SRR%), pacijenata sa delimičnom restrikcijom pokreta očiju (medijana: 678 SRR%; interkvartilni opseg 474-760 SRR%) i pacijenata sa potpunim ograničenjem pokreta, odnosno fiksacijom bulbusa (medijana: 758 SRR%; interkvartilni opseg: 644- / SRR%) (*Slika 20a*).

Serumska koncentracija TBII se takođe nije značajno razlikovala između pacijenata bez ograničenja motiliteta očiju (medijana: 3,77 IU/L; interkvartilni opseg: 1,97-11,77 IU/L), pacijenata sa evidentnim ograničenjem (medijana: 4,20 IU/L; interkvartilni opseg: 1,54-21,86 IU/L) i pacijenata sa fiksiranim bulbusom (medijana: 5,50 IU/L; interkvartilni opseg: 1,47- / IU/L) (*Slika 20b*).

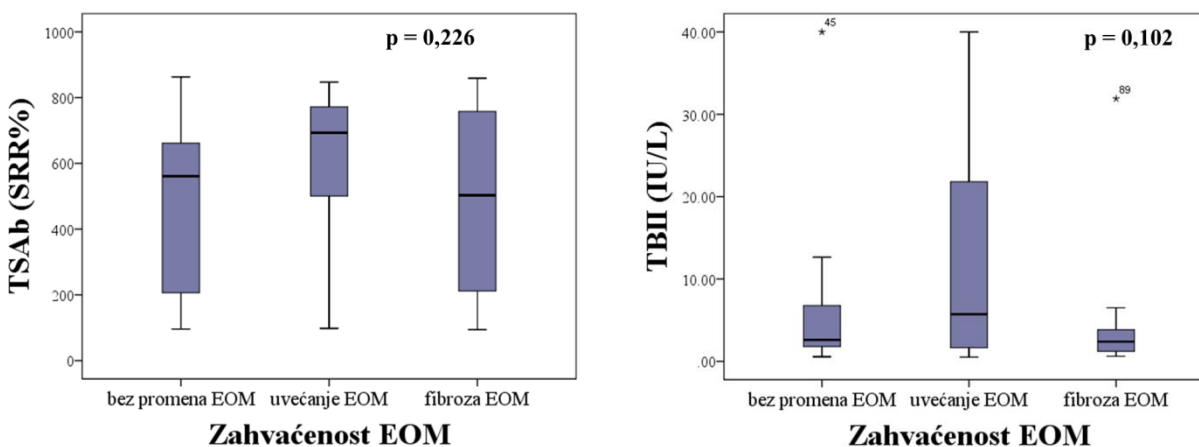
Vezano za stopu pozitivnosti rezultata TSAb i TBII, uočava se statistički značajno viša pozitivnost TSAb u odnosu na TBII kod pacijenata sa prisutnom restrikcijom pokreta očiju. U grupi pacijenata sa fiksacijom bulbusa, TSAb je bio pozitivan kod svih pacijenata, za razliku od TBII, međutim mali broj ispitanika u ovoj grupi onemogućava adekvatnu statističku analizu (*Tabela 28*).

Tabela 28. Distribucija pozitivnosti TSAb i TBII u odnosu na ograničenje motiliteta očiju

Parametar	TSAb ≥ 140 (SRR%) %	TBII $\geq 1,75$ (IU/L) %	p
bez ograničenja motiliteta (n = 32)	93,5	77,4	0,063
prisutno ograničenje motiliteta (n = 42)	95,2	75,8	0,004
fiksacija bulbosa (n = 3)	100	66,7	/

TSAb = 140 SRR% je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; TBII = 1,75 IU/L je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; Podaci su prikazani kao udeo pacijenata (%). P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *McNemar* testa.

Dalje je analizirana razlika u distribuciji aktivnosti i ukupne koncentracije TSHRA_t u odnosu na zahvaćenost ekstraokularnih mišića, na osnovu rezultata ultrazvučnog ili CT pregleda. Pacijente smo u tom smislu stratifikovali u tri grupe: pacijenti kod kojih nisu bili zahvaćeni ekstraokularni mišići, pacijenti kod kojih je detektovano zadebljanje jednog ili više ekstraokularnog mišića i pacijenti kod kojih je detektovana fibroza jednog ili više ekstraokularnih mišića orbite (*Slika 21*).



a)

b)

Slika 21. Razlika a) TSAb i b) TBII u odnosu na stepen zahvaćenosti EOM; EOM-ekstraokularni mišići

Poređenjem medijana serumske aktivnosti TSAb u navedenim grupama pacijenata, utvrđeno je da nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih grupa. Interesantno je da je nivo TSAb najveći bio u grupi pacijenata sa detektovanim zadebljanjem ekstraokularnih mišića (medijana: 693 SRR%; interkvartilni opseg: 463-775 SRR%), u odnosu na grupu pacijenata bez fizičkih

promena ekstraokularnih mišića (medijana: 561 SRR%; interkvartilni opseg: 158-685 SRR%), kao i u odnosu na grupu pacijenata sa uznapredovalim, fibroznim promenama ekstraokularnih mišića (medijana: 503 SRR%; interkvartilni opseg: 203-763 SRR%) (*Slika 21a*).

Na *Slici 21b* predstavljena je distribucija koncentracije TBII u različitim grupama ispitanika prema stepenu promena ekstraokularnih mišića. Kruskal-Wallis testom nije detektovana statistički značajna ukupna razlika u vrednostima TBII između ispitivanih pacijenata, a nivo TBII je takođe bio najveći u grupi ispitanika sa uvećanjem ekstraokularnih mišića (medijana: 5,73 IU/L; interkvartilni opseg: 1,62-21,92 IU/L) u odnosu na grupu bez promena ekstraokularnih mišića (medijana: 2,61 IU/L; interkvartilni opseg: 1,57-8,25 IU/L), kao i u odnosu na grupu sa fibroznim promenama orbitalnih mišića (medijana: 2,40 IU/L; interkvartilni opseg: 1,17-3,99 IU/L).

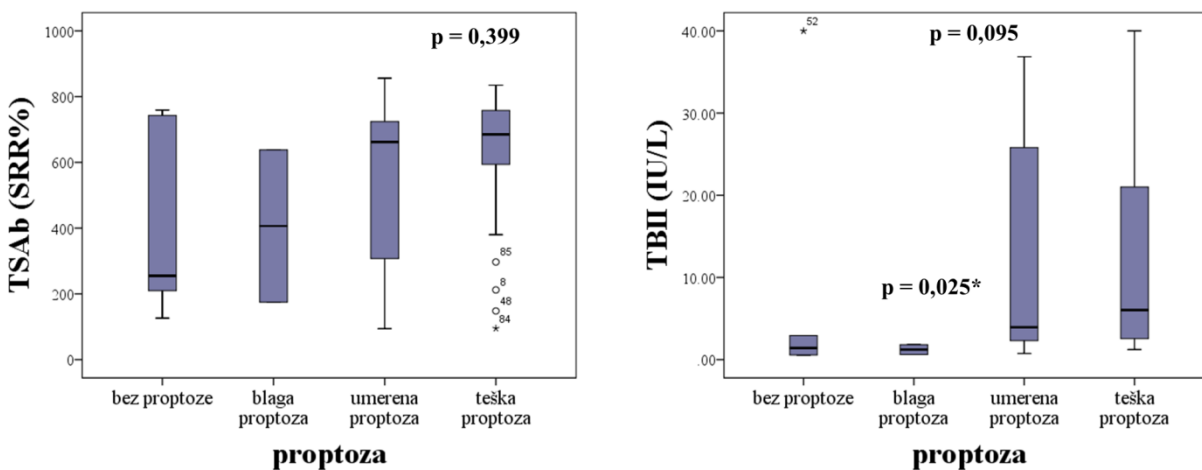
Stopa pozitivnosti rezultata TSAb bila je statistički značajno veća u odnosu na TBII u grupi ispitanika sa detektovanim uvećanjem ekstraokularnih mišića, dok značajne razlike u drugim grupama nije bilo (*Tabela 29*).

Tabela 29. Distribucija pozitivnosti TSAb i TBII u odnosu na zahvaćenost ekstraokularnih mišića

Parametar	TSAb ≥ 140 (SRR%) %	TBII $\geq 1,75$ (IU/L) %	p
bez promena EOM (n = 11)	81,8	72,7	/
uvećanje EOM (n = 29)	96,6	72,4	0,016
fibroza EOM (n = 40)	92,9	71,4	0,250

TSAb = 140 SRR% je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; TBII = 1,75 IU/L je cut-off vrednost definisana od strane proizvođača; EOM-ekstraokularni mišići; Podaci su prikazani kao udeo pacijenata (%). P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *McNemar* testa.

Naredni oftalmološki parametar koji je zasebno analiziran je stepen proptoze. Primarno je ispitan nivo korelacije proptoze sa aktivnošću i koncentracijom TSHRA_t u serumu pacijenata. Utvrđeno je da TSAb i TBII nisu u korelaciji sa stepenom proptoze pacijenata sa GO ($\rho = 0,259$, $p = 0,090$ i $\rho = 0,254$, $p = 0,104$, za TSAb i TBII, redom). Pacijenti su u odnosu na proptozu podeljeni u četiri kategorije: pacijenti bez proptoze, pacijenti sa blagom proptozom, pacijenti sa umerenom proptozom i pacijenti sa teškim oblikom proptoze (126). Na *Slici 22* je prikazana distribucija serumskog nivoa a) TSAb i b) TBII u različitim kategorijama pacijenata prema stepenu proptoze.



a)

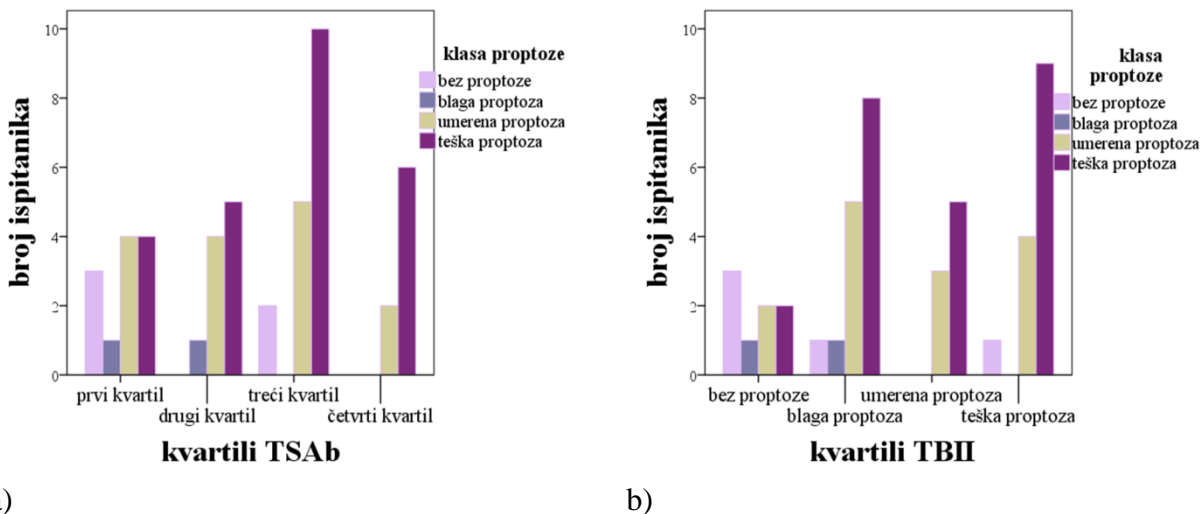
b)

Slika 22. Razlika a) TSAb i b) TBII u odnosu na stepen proptoze; *statistički značajna razlika u koncentraciji TBII između pacijenata sa blagom i onih sa teškom proptozom

Aktivnost TSAb u serumu pacijenata je proporcionalno rasla sa porastom stepena proptoze. Medijana TSAb u grupi pacijenata bez proptoze (medijana: 255 SRR%; interkvartilni opseg: 168-751 SRR%) bila je niža u odnosu na grupu pacijenata sa blagim stepenom proptoze (medijana: 406 SRR%; interkvartilni opseg: 175-751 SRR%), u odnosu na grupu pacijenata sa umerenim stepenom proptoze (medijana: 662 SRR%; interkvartilni opseg: 268-724 SRR%), kao i odnosu na pacijente sa teškim oblikom proptoze (medijana: 685 SRR%; interkvartilni opseg: 492-760 SRR%), međutim razlika nije dostigla stepen statističke značajnosti (*Slika 22a*). Prilikom tumačenja dobijenih rezultata treba uzeti u obzir neravnomernu distribuciju ispitanika u grupama i naročito mali broj ispitanika u grupi pacijenata bez detektovane proptoze i grupi sa blagom proptozom, što znatno utiče na adekvatnu statističku analizu.

Medijana ukupne serumske koncentracije TBII je bila najniža u grupi pacijenata sa blagom proptozom (medijana: 1,22 IU/L; interkvartilni opseg: 0,61-1,41 IU/L), u odnosu na grupu pacijenata bez proptoze (medijana: 1,41 IU/L; interkvartilni opseg: 0,54-21,46 IU/L), u odnosu pacijente sa umerenim stepenom proptoze (medijana: 3,94 IU/L; interkvartilni opseg: 2,14-27,59 IU/L), kao i u odnosu na pacijente sa teškom proptozom (medijana: 6,03 IU/L; interkvartilni opseg: 2,51-23,36 IU/L). Ukupna razlika u medijanama koncentracije TBII nije dostigla statističku značajnost u našem uzorku pacijenata. Značajno su se razlikovale jedino vrednosti TBII između grupe pacijenata sa blagom i teškom proptozom (*Slika 22b*).

Dalje je ispitana asocijacija stepena proptoze i nivoa TSAb i TBII tako što su dobijene vrednosti TSAb i TBII podeljene na kvartile i analiziran je udeo pacijenata koji ispoljavaju određen stepen proptoze u pojedinačnim kvartilima vrednosti TSAb i TBII (*Slika 23*).



Slika 23. Distribucija ispitanika prema stepenu proptoze i kvartilima a) TSAb i b) TBII

Za TSAb, uočava se linearni trend rasta stepena proptoze od prvog ka četvrtom kvartilu, sa najvećim udelom pacijenata bez znakova proptoze u prvom kvartilu i najvećim udelom pacijenata sa teškim oblikom proptoze u trećem kvartilu. Primetno je da se pacijenti bez i oni sa blagom proptozom nalaze samo u prvom i drugom kvartilu TSAb, dok su u četvrtom kvartilu samo pacijenti sa umerenom i teškom proptozom (*Slika 23a*). Nešto je drugačija situacija sa koncentracijom TBII u serumu pacijenata. Na *Slici 23b* primećuje se da se udeo pacijenata sa teškim oblikom proptoze ne povećava proporcionalno, od prvog, ka četvrtom kvartilu, već je udeo pacijenata sa umerenim i onih sa teškim stepenom proptoze u drugom kvartilu približan onom u četvrtom, dok u trećem značajno opada.

Na kraju smo analizirali prediktivni potencijal aktivnosti i koncentracije TSHRA_t za razvoj pojedinačnih znakova i simptoma GO. U *Tabeli 30* su prikazani rezultati univarijantne binarne logističke regresije.

Tabela 30. Procena značaja TSAb i TBII kao prediktora pojedinačnih znakova i simptoma GO

Prediktorska varijabla	Medijana TSAb			Medijana TBII		
	p vrednost	95% CI	OR	p vrednost	95% CI	OR
Hemoza	0,009*	1,542-2,073	5,833	0,081	0,883-8,725	2,775
Inflamacija plike i karunkule	0,020*	1,337-31,052	6,443	0,055	0,972-15,043	3,824
Crvenilo konjuktiva	0,016*	1,238-7,741	3,096	0,093	0,878-5,448	2,187
Simptomi iritacije očiju	0,045*	1,028-9,752	3,167	0,930	0,323-2,812	0,952
Retrobulbarni bol	0,032*	1,099-7,618	2,893	0,099	0,859-5,768	2,226

Podaci su analizirani primenom univarijantne logističke binarne regresione analize posebno za TSAb i posebno za TBII. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom.

Aktivnost TSAb se izdvojila kao značajan prediktivni marker sledećih oftalmoloških parametara: hemoze, inflamacije plike i karunkule, crvenila konjuktiva, simptoma iritacije očiju i retrobulbarnog bola, dok ukupna serumska koncentracija TBII nije pokazala značajne prediktivne karakteristike. Dokazano je da je vrednost TSAb iznad medijane za ispitivanu populaciju ekvivalentna 2,9 puta većoj šansi da će pacijenti ispoljiti retrobulbarni bol, 5,8 puta većoj šansi da će se ispoljiti hemoza kod pacijenata, 6,4 puta većoj šansi da će se razviti inflamacija plike i karunkule i 3,1 puta većoj šansi za crvenilo konjuktiva. Vrednosti TSAb iznad medijane za ispitivanu populaciju značajno povećavaju i šansu (3,2 puta) za razvoj nespecifičnih simptoma iritacije očiju, što dodatno ukazuje na visoku osetljivost i specifičnost određivanja aktivnosti TSHRA_t.

4.4. Evaluacija analitičkih i dijagnostičkih karakteristika imunohemijske CLIA metode (IMMULITE[®] 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA_t

IMMULITE[®] 2000 TSI je imunohemijska CLIA metoda koja je skoro razvijena i uvedena u upotrebu. Zasniva se na principu vezivanja antitela iz uzorka i detekcionog antitela za rekombinantni receptor, po sistemu „sendvič“ interakcije. Kao i svaka nova analitička metoda

koja se uvodi u upotrebu u kliničko-biohemijskoj laboratoriji, neophodno je izvršiti njenu verifikaciju, odnosno evaluaciju njenih analitičkih karakteristika. Verifikacija analitičkih metoda je od izuzetnog značaja kako bi se utvrdilo da li se performanse koje je definisao proizvođač date metode mogu reprodukovati u specifičnim laboratorijskim uslovima gde će se metoda koristiti. Klinička evaluacija metode, odnosno ispitivanje njenih kliničkih karakteristika, takođe je veoma važan korak prilikom uvođenja novih laboratorijskih testova i metoda u upotrebu. Ovaj korak se sprovodi kako bi se utvrdilo kakva je klinička upotrebljivost metoda, odnosno kakva je njihova najadekvatnija klinička primena (postavljanje dijagnoze, diferencijalna dijagnoza, prognoza, skrining, monitoring, isključivanje dijagnoze).

4.4.1. Verifikacija imunohemijske CLIA metode (IMMULITE® 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA_t

4.4.1.1. Nepreciznost u seriji

Rezultati određivanja nepreciznosti u seriji, za dva nivoa komercijalnih kontrolnih uzoraka, predstavljeni su u *Tabeli 31*.

Tabela 31. Statistički parametri za nepreciznost u seriji za dva komercijalna kontrolna uzorka za IMMULITE®2000 TSI metodu

Kontrolni nivo	Koncentracija TSHRA _t (IU/L)	
	$\bar{x} \pm Sd$	Kv %
Kontrolni nivo 1 (niska koncentracija analita)	0,91 ± 0,05	4,9
Kontrolni nivo 2 (visoka koncentracija analita)	18,53 ± 0,56	3,0

\bar{x} -srednja vrednost, Sd-standardna varijacija; Kv-koeficijent varijacije

Raspodela vrednosti za oba nivoa kontrole je pratila normalnu Gausovu raspodelu ($p = 0,579$ i $p = 0,753$, za kontrolni nivo 1 i kontrolni nivo 2, redom). Koeficijent varijacije u seriji je za oba kontrolna uzorka bio ispod vrednosti 5%, što zadovoljava opšti minimum analitičkih performansi laboratorijskih metoda. Varijacija unutar serije je bila prihvatljiva u skladu sa smernicama FDA ($Kv\% < 20\%$).

4.4.1.2. Nepreciznost između serija

Rezultati određivanja nepreciznosti između serija, za ista dva nivoa komercijalnih kontrolnih uzoraka, predstavljeni su u *Tabeli 32*.

Tabela 32. Statistički parametri za nepreciznost između serija za dva komercijalna kontrolna uzorka za IMMULITE®2000 TSI metodu

Kontrolni nivo	Koncentracija TSHRA _t (IU/L)	
	$\bar{x} \pm Sd$	K _v %
Kontrolni nivo 1 (niska koncentracija analita)	0,920 ± 0,042	4,6
Kontrolni nivo 2 (visoka koncentracija analita)	18,50 ± 0,53	2,7

\bar{x} -srednja vrednost, Sd-standardna varijacija; K_v-koeficijent varijacije

Raspodela koncentracija oba nivoa kontrole je pratila normalnu Gausovu raspodelu za prvu seriju ($p = 0,315$ i $p = 0,988$, za kontrolni nivo 1 i kontrolni nivo 2, redom), ako i za drugu seriju ($p = 0,269$ i $p = 0,807$, za kontrolni nivo 1 i kontrolni nivo 2, redom). Koeficijent varijacije između serija je za oba kontrolna uzorka bio ispod vrednosti 5%, što zadovoljava opšti minimum analitičkih performansi laboratorijskih metoda. Varijacija unutar serije bila je prihvatljiva u skladu sa smernicama FDA ($K_v < 20\%$).

Nepreciznost u seriji se može izraziti i kao ponovljivost (*repeatability*) merenja, čime se opisuje kolika je sposobnost metode za dobijanje istog rezultata ponovljenim merenjima. Ponovljivost merenja IMMULITE®2000 TSI metode izračunata je prema CLSI EP15-A2 vodiču (294).

Izračunata ponovljivost za kontrolni nivo 1 i 2 bila je manja od navedenih, definisanih vrednosti proizvođača (*Tabela 33*), zbog čega se može izvesti zaključak da je metoda zadovoljavajuće preciznosti.

Tabela 33. Statistički parametri za ponovljivost dva komercijalna kontrolna uzorka za IMMULITE®2000 TSI metodu

Kontrolni nivo	Izračunati statistički parametri			Statistički parametri proizvođača		
	\bar{x} (IU/L)	Sd (IU/L)	Kv (%)	r (IU/L)	Sd (IU/L)	Kv (%)
Kontrolni nivo 1 (niska koncentracija analita)	0,87	0,027	3,15	0,69	0,03	4,1
Kontrolni nivo 2 (visoka koncentracija analita)	18,36	0,637	3,50	18,44	1,09	5,05

\bar{x} -srednja vrednost, Sd- standardna varijacija; Kv-koeficijent varijacije

4.4.1.3. Nepreciznost iz dana u dan

Nepreciznost iz dana u dan predstavlja reproducibilnost merenja ispitivane metode i definiše kolika je nepreciznost merenja u dužem vremenskom periodu, prilikom koga dolazi do promene laboratorijskih uslova merenja. Rezultati određivanja nepreciznosti iz dana u dan, dva nivoa komercijalnih kontrolnih uzoraka, prikazani su u *Tabeli 34*.

Tabela 34. Statistički parametri za nepreciznost iz dana u dan dva komercijalna kontrolna uzorka za IMMULITE®2000 TSI metodu

Kontrolni nivo	Koncentracija TSHRA _t (IU/L)	
	$\bar{x} \pm Sd$	Kv %
Kontrolni nivo 1 (niska koncentracija analita)	0,873 ± 0,019	2,2
Kontrolni nivo 2 (visoka koncentracija analita)	18,36±0,47	2,6

\bar{x} -srednja vrednost, Sd-standardna varijacija; Kv-koeficijent varijacije

Raspodela prosečnih koncentracija TSHRA_t za svaki od pet dana u nizu je pratila normalnu raspodelu za kontrolni nivo 1 ($p = 0,714$), kao i za kontrolni nivo 2 ($p = 0,855$). Koeficijent varijacije iz dana u dan je za oba kontrolna uzorka bio ispod vrednosti 5%, što zadovoljava opšti minimum analitičkih performansi laboratorijskih metoda.

4.4.1.4. Nepreciznost unutar laboratorije

Izračunate merna nepreciznost unutar laboratorije (Sdul) i ukupna nepreciznost unutar laboratorije (Kvul) za IMMULITE®2000 TSI metodu, za dva klinički značajna kontrolna nivoa, prikazani su u *Tabeli 35*.

Tabela 35. Izračunati statistički parametri za mernu nepreciznost unutar laboratorije i mernu nesigurnost rezultata, za dva komercijalna kontrolna uzorka za IMMULITE®2000 TSI metodu

Kontrolni nivo	Nivo značajnosti	Merna nepreciznost unutar laboratorije (Sdul)	Ukupna nepreciznost unutar laboratorije (Kvul (%))	Proširena nesigurnost merenja rezultata (U)*
Kontrolni nivo 1	0,873 IU/L	0,0282	3,23	6,46
Kontrolni nivo 2	18,36 IU/L	0,699	3,81	7,61

Sdul-standardna varijacija unutar laboratorije; Kv-koeficijent varijacije unutar laboratorije; *Proširena nesigurnost merenja rezultata $U=2*Kvul$; Ukupna nepreciznost unutar laboratorije-ukupna nesigurnost merenja rezultata.

Statistički parametri za mernu nepreciznost unutar laboratorije, odnosno nesigurnost merenja rezultata, koje je definisao proizvođač prikazani su u *Tabeli 36*.

Tabela 36. Statistički parametri za mernu nepreciznost unutar laboratorije i mernu nesigurnost rezultata, za dva komercijalna kontrolna uzorka za IMMULITE®2000 TSI metodu, definisani od strane proizvođača

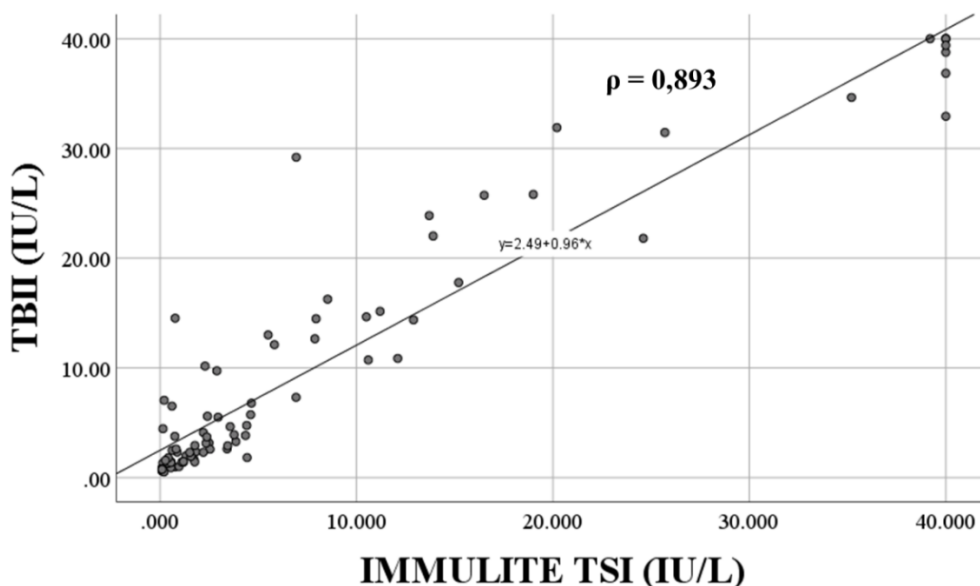
Kontrolni nivo	Nivo značajnosti	Merna nepreciznost unutar laboratorije (Sdul)	Ukupna nepreciznost unutar laboratorije (Kvul (%))	Proširena nesigurnost merenja rezultata (U)*
Kontrolni nivo 1	0,69	0,03	5	10
Kontrolni nivo 2	18,44	1,265	6,35	12,7

Sdul-standardna varijacija unutar laboratorije; Kv-koeficijent varijacije unutar laboratorije; *Proširena nesigurnost merenja rezultata $U=2*Kvul$; Ukupna nepreciznost unutar laboratorije-ukupna nesigurnost merenja rezultata.

Uočava se da su izračunati statistički parametri, prvenstveno Kvul, manji od onih koje je definisao proizvođač ispitivane metode, te se može zaključiti da metoda zadovoljava unapred definisane zahteve proizvođača, odnosno performanse koje su određene prilikom validacije date metode.

4.4.1.5. Tačnost

Tačnost IMMULITE®2000 TSI CLIA metode je određena poređenjem rezultata dobijenih ovom metodom sa rezultatima dobijenim rutinskom, kompetitivnom imunohemijskom ECLIA metodom za određivanje ukupne koncentracije TSHRA_t (Elecsys Anti-TSHR), uporedno na dva različita imunoanalizatora. Ukupno 86 uzoraka u kojima su koncentracije TSHRA_t pokrivale klinički značajan opseg merenja uporedno je analizirano sa obe metode. Primarno je ispitan stepen korelacije dobijenih rezultata ($\rho = 0,893$, $p < 0,001$), pri čemu je izračunat statistički značajan koeficijent korelacije što ukazuje na to da su analizirane metode u značajnom linearnom odnosu (Slika 24).



Slika 24. Korelaciona analiza IMMULITE®2000 TSI CLIA i Elecsys Anti-TSHR ECLIA metode

Nakon toga je ispitana i statistička značajnost dobijene razlike između rezultata dobijenih sa dve ispitivane metode, primenom *Wilcoxon* testom ekvivalentnih parova. Dobijena je statistički značajna razlika medijana dve grupe podataka koja se značajno razlikuje od 0 ($p < 0,001$).

Ovakav rezultat ukazuje na to da ne postoji statistički značajno slaganje rezultata dobijenih sa dve analizirane metode i da nije moguće uporedno ih koristiti. Za 14 ispitivanih uzoraka dobijena je negativna razlika, odnosno vrednost dobijena rutinskom metodom (TBII) je bila niža od vrednosti dobijene IMMULITE®2000 TSI metodom, za 64 uzoraka je dobijena pozitivna razlika i za 3 uzorka je dobijena jednaka vrednost sa obe ispitivane metode.

Ispitivanjem odstupanja metoda u ovoj studiji, izračunati bias bio je 2,32 IU/L, a relativni bias bio je 24,5 %.

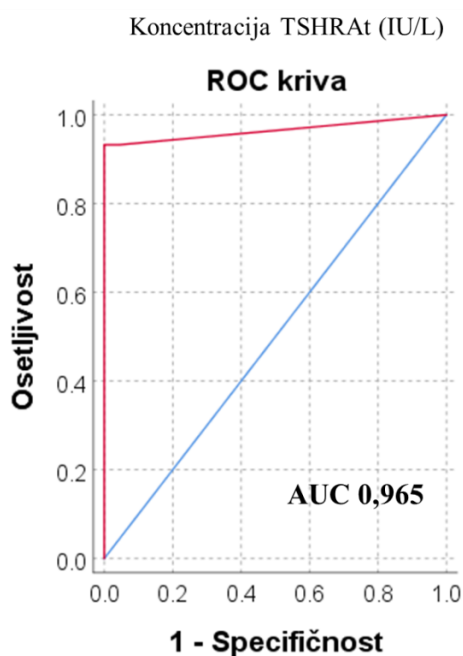
Na kraju su metode upoređene primenom *Passing and Bablok* regresione analize. Dobijena je sledeća regresiona jednačina: $y = 0,63 + 1,11x$, sa 95% intervalom granica pouzdanosti od 0,43 do 0,80 i 0,99 do 1,30, za odsečak i nagib prave, redom. Vrednost odsečka predstavlja konstantno, a vrednost nagiba proporcionalno odstupanje u merenjima između dve ispitivane metode. Kako dobijene vrednosti granica pouzdanosti od 95% za odsečak prave ne uključuju vrednost 0, možemo zaključiti da postoji statistički značajna razlika između vrednosti odsečka i vrednosti 0, odnosno da postoji konstantno odstupanje između metoda. Dobijeni interval pouzdanosti od 95% za nagib prave uključuje vrednost 1, iz čega se zaključuje da ne postoji statistički značajno odstupanje između vrednosti nagiba i vrednost 1, što upućuje na zaključak da nema proporcionalnog odstupanja u merenju između ispitivanih metoda.

4.4.2. Dijagnostička tačnost imunohemijske CLIA metode (IMMULITE® 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA_t

Nakon evaluacije analitičkih karakteristika IMMULITE®2000 TSI CLIA metode, ispitana je njena dijagnostička tačnost, pre svega osetljivost, specifičnost i prediktivne vrednosti. Za evaluaciju parametara dijagnostičke tačnosti IMMULITE®2000 TSI CLIA metode, uporedno sa uzorcima pacijenata sa GO, analizirani su i uzorci kontrolnih ispitanika. Pozitivan rezultat merenja, definisan kao vrednost iznad definisane *cut-off* vrednosti proizvođača (0,55 IU/L), dobijen je kod 72 od 89 pacijenata, što ukazuje na to da je osetljivost analizirane metode, odnosno sposobnost testa da detektuje stvarno bolesne osobe, bila 80,9 %. Negativan rezultat merenja, definisan kao vrednost ispod definisane *cut-off* vrednosti proizvođača (0,55 IU/L) je

dobijen kod sva 23 zdrava ispitanika. Ovakav rezultat upućuje na zaključak da je specifičnost ispitivane metode, definisana kao sposobnost testa da pravilno detektuje zdrave osobe, bila 100%. Izračunata je takođe i pozitivna prediktivna vrednost merenja (100%) što znači da postoji 100% verovatnoće da će osoba kod koje je dobijen pozitivan rezultat merenja zaista imati ciljano stanje (GO u ovom slučaju), odnosno da je pozitivan rezultat stvarno pozitivan. Izračunata negativna prediktivna vrednost bila je 57,5% što upućuje na zaključak da je verovatnoća 57,5% da će osoba kod koje je dobijen negativan rezultat merenja zaista biti zdrava, odnosno 57,5% verovatnoće da je negativan rezultat zaista negativan.

Dijagnostička tačnost IMMULITE®2000 TSI metode dalje je analizirana primenom ROC analize, odnosno kombinovanom analizom osetljivosti i specifičnosti metode pri različitim nivoima detekcije. ROC kriva evaluirane metode prikazana je na *Slici 25*.



Slika 25. ROC kriva IMMULITE®2000 TSI metode

Vrednost AUC ROC krive bila je 0,965 ($p < 0,001$, za 95% CI 0,932-0,997), što ukazuje na odličnu dijagnostičku tačnost ispitivane metode, odnosno odličnu diskriminatornu sposobnost ove metode za razlikovanje bolesne od zdrave populacije. Najbolji odnos osetljivosti i specifičnosti dobijen ROC analizom (93,3% i 100%, za osetljivost i specifičnost, redom) bio je

za *cut-off* vrednost od 0,1215 IU/L, što je niža vrednost u odnosu na *cut-off* vrednost koji je definisao proizvođač (0,55 IU/L).

4.5. Komparativna analiza dijagnostičkih karakteristika tri metode za određivanje TSHRA_t (bioesej, rutinska kompetitivna imunohemijska ECLIA metoda i imunohemijska CLIA metoda)

U cilju komparativne analize tri različite upotrebljene analitičke metode za određivanje TSHRA_t, paralelno je analizirano 87 uzoraka dobijenih od 87 različitih pacijenata sa dijagnozom GO. Cilj je bio ispitivanje i upoređivanje dijagnostičkih karakteristika različitih laboratorijskih testova za određivanje TSHRA_t, kao i procena da li testovi koji mere specifičnu aktivnost antitela poseduju zadovoljavajuće karakteristike za uvođenje u rutinsku praksu i zamenu postojećih, rutinskih testova. U ovu svrhu primenjen je rutinski (Elecsys Anti-TSHR, Roche) kompetitivni imunohemijski test, zasnovan na ECLIA principu merenja, koji je tradicionalno u upotrebi u rutinskoj laboratorijskoj i kliničkoj praksi. U odnosu na njega su analizirane karakteristike tehnike bioeseja (Thyretain TSA_b i TBA_b, Quidel) kojom je specifično određena funkcionalna aktivnost TSHRA_t i relativno novog, IMMULITE®2000 TSI (Siemens) imunohemijskog CLIA testa vezivanja, koji navodno može specifično da izmeri koncentraciju stimulatornih antitela. U daljem tekstu će u upotrebi biti sledeća nomenklatura za primenjene laboratorijske testove: kompetitivni ECLIA imunoesej (TBII), bioesej (TSA_b/TBA_b), CLIA imunohemijski „sendvič“ test (TSI).

Od 87 pacijenata sa GO, pozitivnost na TSHRA_t utvrđena je kod 82 (94,3%), 71 (81,6%) i 63 (72,4%) pacijenata primenom TSA_b bioeseja, CLIA imunohemijskog „sendvič“ testa i kompetitivnog ECLIA imunoeseja, redom (*Tabela 37*).

Tabela 37. Tabele kontigencije za pozitivnost tri različite grupe laboratorijskih testova za određivanje TSHRA_t

	Thyretain TSAb bioesej			IMMULITE®2000 TSI CLIA imunohemijski „sendvič“ test		
	pozitivni	negativni	Ukupno	pozitivni	negativni	ukupno
<i>Svi pacijenti sa GO</i>						
Elecsys Anti-TSHR ECLIA kompetitivni imunoesej						
Pozitivni	63	0	63	60	3	63
Negativni	19	5	24	11	13	24
Ukupno	82	5	87	71	16	87
Aktivnost GO						
<i>Aktivna GO</i>						
Elecsys Anti-TSHR ECLIA kompetitivni imunoesej						
Pozitivni	32	0	32	32	0	32
Negativni	7	0	7	3	4	7
Ukupno	39	0	39	35	4	39
<i>Neaktivna GO</i>						
Elecsys Anti-TSHR ECLIA kompetitivni imunoesej						
Pozitivni	31	0	31	28	3	31
Negativni	12	5	17	8	9	17
Ukupno	43	5	48	36	12	48
Težina GO						
<i>Umerena do teška GO</i>						
Elecsys Anti-TSHR ECLIA kompetitivni imunoesej						
Pozitivni	44	0	44	43	1	44
Negativni	7	0	7	3	4	7
Ukupno	51	0	51	46	5	51
<i>Blaga GO</i>						
Elecsys Anti-TSHR ECLIA kompetitivni imunoesej						
Pozitivni	19	0	19	17	2	19
Negativni	12	5	17	8	9	17
Ukupno	31	5	36	25	11	36

Podaci su prikazani kao broj rezultata određivanja (n). Podaci su analizirani u odnosu na rutinski kompetitivni imunohemijski test, kao metodu koja je trenutno u upotrebi u rutinskoj laboratorijskoj praksi.

TSAb bioesej je pokazao najveću stopu osetljivosti za detekciju GO kod pacijenata, što znači da ispoljava najjaču sposobnost uključivanja dijagnoze kod pacijenata sa GO.

Utvrđeno je postojanje značajnog odstupanja rezultata između TSAb bioeseja i ECLIA kompetitivnog imunoeseja ($p < 0,001$), i između TSAb bioeseja i CLIA imunohemijskog „sendvič“ testa ($p = 0,003$). Nije bilo značajne razlike u rezultatima između dva analizirana imunohemijska testa ($p = 0,057$) (Tabela 38). Ukupna podudarnost rezultata bila je 85,1% za bioesej i CLIA imunohemijski „sendvič“ test, 83,9% za CLIA i ECLIA imunohemijski test, i 78,2 % za bioesej i kompetitivni ECLIA imunoesej.

Tabela 38. Poređenje stope osetljivosti tri laboratorijska testa za određivanje TSHRA_t

Grupa pacijenata	Broj ispitanika (n)	Thyretain TSAb bioesej	IMMULITE®2000 TSI CLIA imunohemijski „sendvič“ test	Elecsys Anti-TSHR ECLIA kompetitivni imunoesej	p
		osetljivost (%)	osetljivost (%)	osetljivost (%)	
Svi pacijenti sa GO	87	94,3	81,6	72,4	0,003^a , <0,001^b , 0,057 ^c
Aktivna GO	39	100	89,7	82,1	0,125 ^a , 0,016^b , 0,250 ^c
Umerena/teška GO	51	100	90,2	86,3	0,063 ^a , 0,016^b , 0,625 ^c
Neaktivna GO	48	89,6	75	64,6	0,039^a , <0,001^b , 0,227 ^c
Blaga GO	36	86,1	69,4	52,8	0,070 ^a , <0,001^b , 0,109 ^c
Trajanje simptoma GO					
< 1 godina	42	100	90,5	81	0,125 ^a , 0,008^b , 0,219 ^c
> 1 godina	42	88,1	71,4	64,3	0,039^a , 0,002^b , 0,453 ^c
Nisko pozitivan TSAb nivo	17	100	47,1	41,2	0,004^a , 0,002^b , 1,000 ^c
Srednje pozitivan TSAb nivo	44	100	93,2	81,8	0,250 ^a , 0,008^b , 0,125 ^c
Visoko pozitivan TSAb nivo	21	100	100	95,2	1,000 ^a , 1,000 ^b , 1,000 ^c

Nisko pozitivan TSAb nivo-nivo TSAb ≤ 25 . percentil (140-298 SRR%); Srednje pozitivan nivo TSAb-nivo TSAb 25-75. percentil (299-761 SRR%), Visoko pozitivan nivo TSAb-nivo TSAb > 75 . percentil (> 762 SRR%); Vrednosti su predstavljene kao broj ispitanika i procenat pozitivnih rezultata; ^ap-statistička značajnost razlike u stopi osetljivosti između funkcionalnog bioeseja TSAb i CLIA imunohemijskog „sendvič“ testa u različitim grupama pacijenata, vrednost ^bp-statistička značajnost razlike u stopi osetljivosti između funkcionalnog bioeseja TSAb i ECLIA kompetitivnog imunoeseja, ^cp-statistička značajnost razlike u stopi osetljivosti između CLIA imunohemijskog „sendvič“ testa i Roche ECLIA testova vezivanja i ECLIA kompetitivnog imunoeseja.

U 12 uzoraka u kojima je dobijen pozitivan rezultat tehnikom TSAb bioeseja, dobijen je negativan rezultat primenom CLIA imunohemijskog „sendvič“ testa, dok je u jednom uzorku u kome je TSAb bioesej dao negativan rezultat, imunohemijski „sendvič“ test bio granično pozitivan. Ovakvi rezultati ukazuju na tendenciju imunohemijskog „sendvič“ testa ka višoj stopi lažno-negativnih rezultata. Bilo je zanimljivo da je kod pacijenta kod kog je dobijena istovremena stimulatorna i blokirajuća aktivnost TSHRA_t (istovremeno pozitivan rezultat TSAb i TBA_b bioeseja), u isto vreme dobijen negativan rezultat imunohemijskog „sendvič“ testa.

Što se tiče podudarnosti rezultata dobijenih primenom bioeseja i ECLIA kompetitivnog imunoeeseja, kod svih 19 uzoraka sa nepodudarnim rezultatima merenja TSAb bioesej je dao pozitivan rezultat, a ECLIA kompetitivni imunoeesej je bio negativan. Nije bilo bioesej negativnih rezultata koji su bili pozitivni primenom ECLIA kompetitivnog imunoeeseja.

11 pozitivnih rezultata CLIA imunohemijskog „sendvič“ testa bilo je negativno primenom ECLIA kompetitivnog testa, dok je 3 negativna rezultata bilo pozitivno u ECLIA kompetitivnom testu vezivanja.

Svih pet pacijenata kod kojih je rezultat TSAb bioeseja bio negativan imalo je blagi, neaktivni blik GO. Od 16 negativnih rezultata dobijenih imunohemijskim „sendvič“ testom, kod 4 pacijenata detektovana je aktivna GO, a kod 5 pacijenata umerena do teška GO. Od 24 negativna rezultata dobijena primenom ECLIA kompetitivnog imunoeeseja, 7 pacijenata je imalo aktivnu GO i 7 pacijenata umerenu do tešku GO.

Zatim je analizirana klinička osetljivost testova u odnosu na aktivnost i težinu GO (*Tabela 38*).

Distribucija pozitivnosti rezultata različitih testova u odnosu na aktivnost GO predstavljena je u *Tabeli 38*. Kod svih pacijenata sa aktivnom GO rezultati TSAb bioeseja su bili pozitivni, što znači da osetljivost TSAb bioeseja za detekciju aktivnog oblika GO iznosi 100%, a pozitivna (PPV) i negativna prediktivna vrednost (NPV) 47,6% i 100%, redom. U ovom slučaju PPV predstavlja verovatnoću da je pacijent kod koga je dobijen pozitivan rezultat merenja zaista ima aktivnu GO, a NPV ukazuje na verovatnoću da će pacijent sa negativnim rezultatom merenja zaista imati neaktivnu GO. Značajna razlika u pogledu osetljivosti, odnosno diskriminatorne sposobnosti za otkrivanje pacijenata sa aktivnom GO, uočena je između TSAb bioeseja i rutinskog ECLIA kompetitivnog imunoeeseja, ali ne i između dva tipa imunohemijskih testova.

Izračunate PPV i NPV CLIA imunohemijskog „sendvič“ i ECLIA kompetitivnog imunoeseja bile su 49,3% i 50,8% (PPV), 75% i 70,8% (NPV), redom. Razlika u frakciji stvarno pozitivnih rezultata (dTPF) dobijenih tehnikom TSA b bioeseja i ECLIA kompetitivnog imunoeseja bila je 17,9%, dok je relativni odnos frakcije stvarno pozitivnih rezultata (rTPF) bio 1,22. Kada smo testirali jednakost udela stvarno pozitivnih rezultata, dobili smo statistički značajnu razliku ($p=0,016$). Razlika u frakciji stvarno pozitivnih rezultata (dTPF) između CLIA imunohemijskog „sendvič“ testa i ECLIA kompetitivnog testa vezivanja bila je 7,7%, a rTPF je bio 1,1, pri čemu dobijena razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,250$).

Kada se posmatra grupa pacijenata sa neaktivnom GO, TSA b bioesej je bio značajno osjetljiviji u odnosu na obe ispitivane imunohemijske metode, dok značajna razlika između dva tipa imunoeseja nije uočena (*Tabela 38*).

U cilju poređenja dijagnostičkih karakteristika testova u odnosu na težinu GO, uporedno je analizirana dijagnostička tačnost testova kod pacijenata sa blagim oblikom GO i pacijenata sa umerenom do teškom/teškom GO koja ugrožava vid. Kod svih pacijenata sa umerenom ili teškom GO rezultati TSA b bioeseja bili su pozitivni, što znači da je osjetljivost bioeseja za prepoznavanje umerenih i teških oblika GO bila 100%, dok su PPV i NPV bile 62,6% i 100%, redom. Izračunate vrednosti PPV i NPV za detekciju umerene ili teške GO za CLIA imunohemijski „sendvič“ i ECLIA kompetitivni imunotest bili su 64,8% i 69,8% (PPV), odnosno 86,3% i 70,8% (NPV), redom. U odnosu na CLIA imunohemijski „sendvič“ test, TSA b bioesej nije bio značajno osjetljiviji u ovoj grupi pacijenata, ali u poređenju sa rutinskim ECLIA testom vezivanja ispoljio je statistički značajno veću stopu osjetljivosti (*Tabela 38*). Razlika u frakciji stvarno pozitivnih rezultata (dTPF) i relativnim udela stvarno pozitivnih rezultata (rTPF) iznosila je 13,72% i 1,16 za TSA b bioesej i ECLIA kompetitivni test vezivanja ($p = 0,016$), i 3,9% i 1,05 za CLIA imunohemijski „sendvič“ test i ECLIA kompetitivni imunoesej, redom ($p = 0,625$).

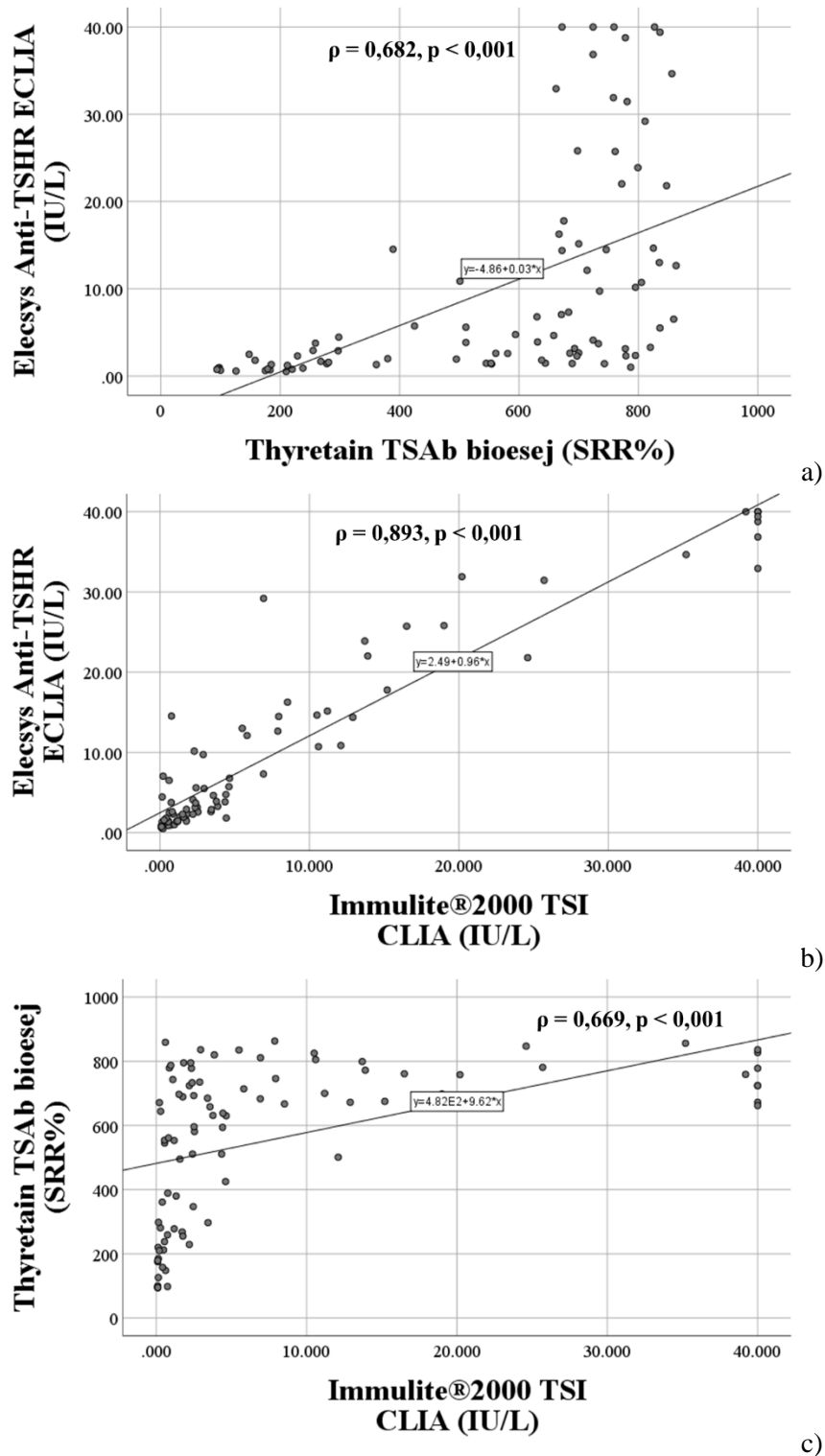
U grupi pacijenata sa blagom GO nije detektovana statistički značajna razlika u osjetljivosti CLIA imunohemijskog „sendvič“ testa u poređenju sa TSA b bioesejom, ni sa ECLIA kompetitivnim imunoesejom. Međutim, tehnika TSA b bioeseja bila je značajno osjetljivija u odnosu na rutinski ECLIA test kompetitivnog vezivanja (*Tabela 38*).

Zatim, kada smo klasifikovali nivo TSAb, određen metodom TSAb bioeseja, na niske, srednje i visoko pozitivne vrednosti, primetili smo najveće odstupanje rezultata u grupi pacijenata sa niskim pozitivnim serumskim nivoom TSAb aktivnosti (*Tabela 38*). U ovoj grupi pacijenata, TSAb bioesej je jedini pokazao značajnu stopu osetljivosti sa medijanom TSAb iznad definisane granične vrednosti proizvođača (medijana: 229 SRR%; interkvartilni opseg: 182-273 SRR%), u odnosu na CLIA imunohemijski „sendvič“ test (medijana: 0,48 IU/L; interkvartilni opseg: 0,14-1,45 IU/L) i ECLIA kompetitivni imunoesej (medijana: 1,57 IU/L; interkvartilni opseg: 0,85-2,68 IU/L) (*Tabela 38*).

Razlika u kliničkim karakteristikama analiziranih laboratorijskih testova bila je posebno evidentna kod pacijenata sa ET GO, kod kojih je tehnika TSAb bioeseja uspešno detektovala 7 od 8 (87,5%) ET GO pacijenata, CLIA imunohemijski „sendvič“ test 5 od 8 (62,5%), dok je ECLIA kompetitivni imunoesej dostigao granicu pozitivnosti kod samo 1 od 8 (12,5%) pacijenata sa ET oblikom GO.

Što se tiče trajanja simptoma GO, superiorna osetljivost TSAb bioeseja je bila najizraženija kod pacijenata kod kojih su simptomi GO trajali više od godinu dana (*Tabela 34*). Ovakav rezultat je u skladu sa prirodnim tokom GO, gde je aktivnost GO obrnuto proporcionalna dužini trajanja bolesti.

Korelacija rezultata merenja sve tri analizirane metode prikazana je na *Slici 26*.



Slika 26. Korelaciona analiza rezultata a) Thyretain TSAb bioesej-ECLIA kompetitivni imunoesej, b) CLIA imunohemijski „sendvič“ test-ECLIA kompetitivni imunoesej, c) CLIA imunohemijski „sendvič“ test-Thyretain TSAb bioesej.

Sve tri metode pokazale su statistički značajan stepen korelacije rezultata. Tehnika bioeseja je slično korelirala sa oba imunohemijska testa vezivanja, dok je najveći stepen korelacije detektovan između CLIA imunohemijskog „sendvič“ testa i rutinskog ECLIA kompetitivnog testa vezivanja.

Zbirne karakteristike sve tri analizirane metode za određivanje TSHRA_t, sa posebnim osvrtom na praktične aspekte, navedene su u *Tabeli 39*.

Tabela 39. Komparativni prikaz karakteristika tri laboratorijske metode za određivanje TSHRA_t

Karakteristike testa	Metoda za određivanje TSHRA _t		
	Thyretain TSAb bioesej	IMMULITE®2000 TSI CLIA imunohemijski „sendvič“ test	Elecsys Anti-TSHR ECLIA kompetitivni imunoesej
Dijagnostička tačnost	Visoka	srednja do visoka	srednja do visoka
Invazivnost	Neinvazivna	Neinvazivna	neinvazivna
TAT	24h	nekoliko sati	nekoliko sati
Tehnička zahtevnost metode	Umerena	Niska	niska
Tip uzorka	Serum	serum, plazma	serum, plazma
Priprema uzorka	nema pretretmana	nema pretretmana	nema pretretmana
Interpretacija rezultata	laka interpretacija	laka interpretacija	laka interpretacija
Cena	Umerena	Umerena	niska
Izvodljivost	umerena*	Visoka	visoka
Automatizacija	poluautomatski test	poluautomatski test	poluautomatski test

TAT-obrtno vreme (*engl. turnaround time*); *Umerena izvodljivost tehnike TSAb bioeseja odnosi se relativno ograničene mogućnosti izvođenja ove tehnike u rutinskim kliničko-biohemijskim laboratorijama. Danas se ova metoda izvodi jedino u velikim referentnim centrima i u naučnim ustanovama.

4.6. Analiza kliničkog značaja određivanja IL-6, IL-1RA, IL-1β i IL-8 kao i njihove povezanosti sa TSHRA_t kod pacijenata sa GO

U ispitivanom uzorku pacijenata, izmerene masene koncentracije analiziranih interleukina u serumu ispitanika bile su: medijana: 2,00 pg/mL, interkvartilni opseg: 1,01-2,96 pg/mL; medijana: 554 pg/mL, interkvartilni opseg: 340-767 pg/mL; medijana: 4,41 pg/mL, interkvartilni

opseg: 3,24-5,38 pg/mL, i medijana: 9,58 pg/mL, interkvartilni opseg: 7,41-14,68 pg/mL, za IL-6, IL-1RA, IL-1 β i IL-8, redom. U cilju sagledavanja značaja određivanja serumske koncentracije ispitivanih interleukina (IL-6, IL-1RA, IL-1 β i IL-8), primarno je analizirana njihova raspodela u odnosu na antropometrijske i demografske karakteristike pacijenata (*Tabela 40*).

Tabela 40. Povezanost IL-6, IL-1RA, IL-1 β , IL-8 i demografskih karakteristika pacijenata

Parametar	IL-6 (pg/mL)	p	IL-1RA (pg/mL)	p	IL-1 β (pg/mL)	p	IL-8 (pg/mL)	p
Pol								
Žene	1,96 (0,90-2,95)	0,470	598 (395-824)	0,106	4,18 (3,09-5,10)	0,136	10,91 (8,04-15,85)	0,040
muškarci	2,25 (1,34-3,09)		455 (289-691)		5,11 (3,51-5,78)		8,74 (6,07-10,59)	
Status pušenja								
Pušači	2,16 (1,32-3,04)	0,292	622 (359-812)	0,426	4,23 (3,14-5,34)	0,460	11,50 (7,33-14,86)	0,486
nepušači	1,91 (0,85-2,95)		501 (299-712)		4,63 (3,50-5,38)		8,89 (7,79-14,01)	
Porodična istorija AITB								
negativna	2,28 (1,07-3,06)	0,062	536 (329-789)	0,870	4,44 (3,12-5,39)	0,964	9,58 (6,70-14,80)	0,579
pozitivna	1,45 (0,85-2,35)		588 (415-716)		4,41 (3,47-4,91)		9,83 (8,04-13,72)	
Komorbidity								
prisutni	2,06 (0,94-3,05)	0,750	619 (365-819)	0,690	4,51 (3,54-6,35)	0,260	12,46 (7,76-18,05)	0,138
odsutni	2,00 (1,04-2,96)		535 (314-716)		4,41 (3,09-5,11)		9,16 (7,23-12,51)	

Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *Mann Whitney* testa.

Serumska koncentracija IL-8 bila je značajno veća u ispitivanoj populaciji žena u odnosu na muškarce. Serumske koncentracije IL-6, IL-1 β i IL-1RA nisu se značajno razlikovala u odnosu na pol, status pušenja, porodičnu istoriju AITB i udružene komorbidity. Godine starosti pacijenata su bile u značajnoj, pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom IL-6 ($\rho = 0,266$, $p = 0,011$) i IL-1 β ($\rho = 0,266$, $p = 0,032$), dok ITM nije pokazivao statistički značajnu korelaciju sa IL-6 ($\rho = 0,104$, $p = 0,327$), niti sa IL-1 β ($\rho = 0,039$, $p = 0,760$). Serumski nivo IL-1RA, ni IL-8 nije

značajno korelirao sa godinama ($\rho = 0,064$, $p = 0,571$ i $\rho = 0,021$, $p = 0,858$, za IL-1RA i IL-8, redom), ni sa ITM ($\rho = 0,181$, $p = 0,105$ i $\rho = -0,005$, $p = 0,964$, za IL-1RA i IL-8, redom).

Nakon ispitivanja distribucije interleukina u odnosu na demografski profil pacijenata, analizirana je povezanost ovih parametara inflamacije sa kliničkim karakteristikama pacijenata (Tabela 41).

Tabela 41. Povezanost IL-6, IL-1RA, IL-1 β , IL-8 i kliničkih karakteristika pacijenata

Parametar	IL-6 (pg/mL)	p	IL-1RA (pg/mL)	p	IL-1 β (pg/mL)	p	IL-8 (pg/mL)	p
Aktivnost GO								
neaktivna GO	2,15 (0,90-3,02)	0,609	618 (359-812)	0,059*	3,83 (2,96-4,83)	0,027	11,50 (7,80-15,77)	0,177
aktivna GO	2,00 (1,34-2,96)		487 (285-694)		4,86 (4,25-5,66)		8,59 (6,94-12,89)	
Težina GO								
blaga GO	1,04 (0,61-2,76)	0,003	622 (424-1024)	0,058*	3,88 (3,14-4,91)	0,231	11,50 (7,61-15,68)	0,527
umerena do teška/ugrožavajuća po vid GO	2,32 (1,58-3,07)		487 (321-691)		4,63 (3,33-5,53)		9,34 (7,15-14,34)	
AITB								
GB + GO	2,35 (1,43-3,58)	0,010	527 (323-695)	0,435	4,60 (3,44-5,47)	0,249	9,16 (7,11-14,86)	0,746
HT + GO	1,54 (0,87-2,49)	0,072 ^a , 0,152 ^b	556 (456-1611)		3,34 (2,54-4,45)		12,03 (7,61-14,21)	
ET + GO	0,84 (0,56-2,12)	0,009 ^c	568 (259-835)		3,67 (3,41-4,95)		11,67 (8,17-19,22)	
Trajanje GO								
<6 meseci	2,56 (1,87-3,71)	0,086	349 (200-589)	0,021	3,76 (2,72-5,34)	0,365	8,89 (7,23-10,53)	0,484
>6 meseci	1,96 (0,90-2,95)		691 (351-812)		4,52 (3,38-5,37)		9,58 (7,41-14,68)	
Suplementacija selenom								
bez selena	1,89 (0,83-2,95)	0,125	536 (326-696)	0,097	4,55 (3,37-5,38)	0,978	9,39 (7,26-14,91)	0,457
Selen	2,38 (1,41-3,04)		628 (442-1046)		4,28 (3,06-5,38)		11,00 (7,80-15,04)	
Terapija								
bez terapije	1,01 (0,61-2,82)	0,054	658 (375-835)	0,232	4,28 (3,38-5,32)	0,957	11,59 (6,27-18,80)	0,895
primena tiroksina	2,15 (1,23-2,95)		554 (407-791)		4,34 (3,53-5,24)		9,34 (7,33-14,86)	
antitiroidni lekovi	2,38 (1,45-3,71)		487 (285-698)		4,57 (2,95-5,93)		9,91 (8,01-14,07)	

a-statistička značajnost razlike između pacijenata sa HT i GB; b-statistička značajnost razlike između pacijenata sa HT i ET GO; c - statistička značajnost razlike između pacijenata sa GB i ET GO; Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom *Mann Whitney* testa.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima IL-6, ni IL-8 između ispitanika sa aktivnom i onih sa neaktivnom GO. Dodatno nije detektovana značajna korelacija između vrednosti CAS i serumskih koncentracija IL-6 ($\rho = 0,177$, $p = 0,093$), kao ni između CAS i serumskih nivoa IL-8 ($\rho = -0,159$, $p = 0,164$). Serumski koncentracija IL-1RA takođe nije bila u značajnoj korelaciji sa vrednostima CAS skora ($\rho = -0,197$, $p = 0,078$), međutim primetno su niže koncentracije ovog parametra detektovane u grupi pacijenata sa aktivnom GO, u odnosu na pacijente sa neaktivnom GO, pri čemu je statistička značajnost razlike bila granična ($p = 0,059$). Serumski nivoi IL-1 β su bili statistički značajno veći u grupi pacijenata sa aktivnim oblikom GO u odnosu na pacijente sa neaktivnom GO. Takođe je uočeno da su u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima CAS skora ($\rho = 0,261$, $p = 0,036$).

Težina GO bila je značajno povezana sa koncentracijom IL-6 u serumu ispitanika. Naime, kod pacijenata sa umerenom do teškom ili GO koja ugrožava vid detektovane su statistički značajno više vrednosti IL-6 u odnosu na pacijente sa blagom GO ($p = 0,003$). Serumski koncentracija IL-1RA bila je niža u grupi ispitanika sa umerenom ili teškom GO, a statistička značajnost ove razlike je bila granična ($p = 0,058$). Nije bilo statistički značajne razlike u izmerenim vrednostima IL-1 β i IL-8 u odnosu na težinu i vrstu AITB. Statistički značajna razlika u serumskom nivou IL-6 uočena je i između pacijenata sa primarnom dijagnozom GB, HT ili ET GO. Koncentracija IL-6 bila je najveća kod pacijenata sa GB (medijana: 2,35; interkvartilni opseg: 1,43-3,58 pg/mL), a najniža kod pacijenata sa ET GO (medijana: 0,84; interkvartilni opseg: 0,56-2,12 pg/mL). Izmerene vrednosti IL-1RA, IL-1 β i IL-8 nisu bile značajno povezane sa vrstom AITB. Trajanje simptoma GO nije bilo u značajnom odnosu sa IL-6 ($p = 0,086$), IL-1 β i IL-8 ($p = 0,484$), dok su nivoi IL-1RA bili značajno niži u grupi ispitanika kod kojih su simptomi trajali ≤ 6 meseci ($p = 0,021$). Vrsta terapije i suplementacija selenom nisu bili u statistički značajnoj relaciji sa koncentracijom IL-6, IL-1RA, IL-1 β , ni IL-8 (*Tabela 41*). Dodatno je analizirana povezanost sa pojedinačnim oftalmološkim parametrima (diplopije, poremećaj vida, ograničenje motiliteta, proptoza, fibroza ekstraokularnih mišića) i utvrđeno je da IL-6, IL-8 i IL-1RA nisu bili u značajnoj asocijaciji ni sa jednim od analiziranih parametara ($p > 0,05$), dok je nivo IL-1 β bio granično viši u grupi pacijenata sa diplopijama ($p = 0,055$).

Nije postojala statistički značajna korelacija serumskog nivoa IL-6 sa TSH i FT4 ($\rho = -0,077$, $p = 0,468$ i $\rho = 0,135$, $p = 0,201$, za TSH i FT4, redom), kao ni sa TPOAt i TGAt ($\rho = -0,122$, $0,249$ i

$\rho = -0,144$, $p = 0,172$, za antiTPO i antiTG antitela, redom). IL-1RA takođe nije značajno korelirao sa TSH i FT4 ($\rho = 0,079$, $p = 0,485$ i $\rho = -0,023$, $p = 0,838$, za TSH i FT4, redom), niti sa TPOAt i TGAt antitelima ($\rho = 0,158$, $p = 0,159$ i $\rho = 0,080$, $p = 0,480$, za TPOAt i TGAt, redom). Značajne korelacije nije bilo ni između IL-1 β i TSH, FT4, TGAt i TPOAt ($\rho = 0,012$, $p = 0,922$; $\rho = -0,041$, $p = 0,743$; $\rho = -0,119$, $p = 0,343$; $\rho = -0,046$, $p = 0,718$, za TSH, FT4, TGAt i TPOAt, redom), kao ni između IL-8 i ispitivanih tiroidnih parametara ($\rho = -0,039$, $p = 0,736$; $\rho = -0,126$, $p = 0,271$; $\rho = 0,040$, $p = 0,726$; $\rho = 0,112$, $p = 0,330$, za TSH, FT4, TGAt i TPOAt, redom).

Serumska aktivnost i koncentracija TSHRA t bile su u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa IL-6, dok sa IL-1RA, IL-1 β i IL-8 nisu značajno korelirale (Tabela 42).

Tabela 42. Korelacija IL-6, IL-1RA, IL-1 β i IL-8 sa TSAb, TBII i TSI

Parametar	Korelacioni koeficijent (ρ)				p
	IL-6 (pg/mL)	IL-1RA (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	
TSAb (SRR%)	0,315	-0,088	0,184	-0,200	0,002^a , 0,433 ^b , 0,143 ^c , 0,079 ^d
TBII (IU/L)	0,315	-0,074	0,198	-0,041	0,003^a , 0,520 ^b , 0,114 ^c , 0,724 ^d
TSI (IU/L)	0,238	-0,102	0,143	-0,032	0,025^a , 0,373 ^b , 0,264 ^c , 0,784 ^d

TSAb-stimulatorna aktivnost određena metodom bioeseja, TBII-ukupna koncentracija određena rutinskim kompetitivnim imunoesejom, TSI-koncentracija TSHRA t određena metodom „sendvič“ imunohe mijske metode; a-korelacija TSAb, TBII i TSI sa IL-6, b-korelacija TSAb, TBII i TSI sa IL-1RA, c-korelacija TSAb, TBII i TSI sa IL-1 β , d-korelacija TSAb, TBII, TSI sa IL-8; Korelacija ispitivanih parametara je ispitana računanjem *Spearmanovog* korelacionog koeficijenta. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom.

U *Tabeli 43* prikazani su korelacioni koeficijenti ispitivanih interleukina sa parametrima oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite.

Tabela 43. Korelacija IL-6, IL-1RA, IL-1 β i IL-8 sa TAS, TOS, OSI i 8-OHdG

Parametar	Korelacioni koeficijent (ρ)				P
	IL-6 (pg/mL)	IL-1RA (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	
TAS (mmol/L)	0,257	-0,152	0,062	0,133	0,014^a , 0,175 ^b , 0,624 ^c , 0,246 ^d
TOS (μ mol/L)	0,052	0,091	0,020	-0,143	0,656 ^a , 0,456 ^b , 0,886 ^c , 0,240 ^d
OSI	-0,017	0,160	0,072	-0,216	0,877 ^a , 0,177 ^b , 0,590 ^c , 0,066 ^d
8-OHdG (ng/mL)	-0,099	0,179	-0,181	-0,181	0,449 ^a , 0,147 ^b , 0,148 ^c , 0,366 ^d

a-korelacija TAS, TOS, OSI i 8-OHdG sa IL-6, b-korelacija TAS, TOS, OSI i 8-OHdG sa IL-1RA, c-korelacija TAS, TOS, OSI i 8-OHdG sa IL-1 β , d-korelacija TAS, TOS, OSI i 8-OHdG sa IL-8; Korelacija ispitivanih parametara je ispitana računanjem *Spearmanovog* korelacionog koeficijenta. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom.

Detektovana je značajna pozitivna korelacija između serumske koncentracije IL-6 i nivoa TAS u serumu pacijenata. Statistički značajna korelacija nije detektovana između IL-6 i TOS, OSI i 8-OHdG. Serumske koncentracije IL-1RA, IL-1 β i IL-8 nisu bile u značajnoj korelaciji ni sa jednim od parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.

4.7. Analiza kliničkog značaja određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i njihove povezanosti sa TSHRA_t kod pacijenata sa GO

4.7.1. Totalni antioksidativni status (TAS), totalni oksidativni stres (TOS) i indeks oksidativnog stresa (OSI) pacijenata sa GO

Prosečne izmerene vrednosti TOS i TAS u serumu ispitivane populacije pacijenata bile su: medijana: 4,40 mmol/L, interkvartilni opseg: 3,23-5,71 μ mol/L i $2,04 \pm 0,51$ mmol/L, za TOS i TAS, redom. Izračunata vrednost OSI bila je medijana: 2,09, interkvartilni opseg: 1,46-3,34. Asocijacija serumskog nivoa TAS, TOS i OSI sa demografskim karakteristikama pacijenata prikazana je u *Tabeli 44*.

Tabela 44. Povezanost TAS, TOS, OSI i demografskih karakteristika pacijenata

Parametar	TAS (mmol/L)	TOS (μ mol/L)	OSI	p
Pol				
žene	$1,93 \pm 0,47$	4,16 (3,01-,07)	2,18 (1,45-,70)	0,016 ^a , 0,619 ^b , 0,984 ^c
muškarci	$2,20 \pm 0,54$	4,52 (3,51-,59)	1,89 (1,53-,11)	
Status pušenja				
pušači	$1,99 \pm 0,47$	3,69 (2,98-,47)	1,81 (1,39-,86)	0,372 ^a , 0,066 ^b , 0,161 ^c
nepušači	$2,09 \pm 0,52$	4,76 (3,93-,26)	2,33 (1,53-,98)	
Porodična istorija AITB				
negativna	$1,98 \pm 0,50$	4,16 (3,11-,35)	2,10 (1,44-33)	0,276 ^a , 0,257 ^b , 0,569 ^c
pozitivna	$2,11 \pm 0,51$	4,95 (3,30-,83)	2,10 (1,63-,37)	
Komorbiditeti				
prisutni	$2,00 \pm 0,49$	4,76 (2,86-6,07)	2,28 (1,24-3,98)	0,803 ^a , 0,767 ^b , 0,321 ^c
odsutni	$2,03 \pm 0,52$	4,16 (3,30-5,59)	2,05 (1,56-3,30)	

TAS-totalni antioksidantni status, TOS-totalni oksidativni stres; a-značajnost razlike TAS, b-značajnost razlike TOS, c-značajnost razlike OSI; Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom Studentovog t testa, a korelacija ispitivanih parametara je ispitana računanjem *Pearsonovog* korelacionog koeficijenta.

U ispitivanom uzorku pacijenata, statistički značajno više koncentracije TAS izmerene su u serumu muškaraca u odnosu na žene. Serumske koncentracije TOS i OSI nisu se značajno razlikovale u odnosu na pol pacijenata. Serumski nivo TAS je bio u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa godinama starosti ($\rho = 0,308$, $p = 0,003$) i indeksom telesne mase ($\rho = 0,209$, $p = 0,047$) pacijenata. Starosna dob ispitanika nije značajno korelirala sa serumskim koncentracijama TOS ($\rho = 0,152$, $p = 0,190$), niti sa vrednostima OSI ($\rho = -0,032$, $p = 0,775$). Indeks telesne mase takođe nije bio u značajnoj korelaciji sa serumskom koncentracijom TOS ($\rho = 0,054$, $p = 0,646$), ni sa OSI ($\rho = -0,043$, $p = 0,705$). Što se tiče statusa pušenja, nije detektovana značajna razlika u nivou TAS, TOS, ni OSI između pušača i nepušača. Serumske koncentracije TAS, TOS, niti vrednost njihovog odnosa OSI nisu bile značajno povezane sa porodičnom istorijom AITB, ni sa prisutnim komorbiditetima pacijenata.

Povezanost serumskog nivoa TAS i kliničkih karakteristika pacijenata predstavljena je u *Tabeli 45*.

Tabela 45. Povezanost TAS, TOS, OSI i kliničkih karakteristika pacijenata

Parametar	TAS (mmol/L)	TOS (μ mol/L)	OSI	p
Aktivnost GO				
neaktivna GO	1,92 \pm 0,43	3,99 (3,15-5,89)	2,15 (1,48-3,23)	0,090 ^a , 0,483 ^b , 0,564 ^c
aktivna GO	2,12 \pm 0,58	4,70 (3,41-5,71)	1,98 (1,44-3,42)	
Težina GO				
blaga GO	1,91 \pm 0,45	3,93 (3,21-7,50)	2,28 (1,63-3,98)	0,029^a , 0,784 ^b , 0,476 ^c
umerena do teška GO	2,05 \pm 0,49	4,52 (2,99-5,24)	2,09 (1,38-2,83)	
ugrožavajuća po vid GO	2,47 \pm 0,63	5,24 (3,57-5,59)	1,67 (1,45-2,84)	0,026^d
AITB				
GB + GO	2,06 \pm 0,51	4,52 (3,30-5,41)	2,10 (1,44-3,36)	0,268 ^a , 0,794 ^b , 0,793 ^c
HT + GO	1,82 \pm 0,37	4,11 (3,21-7,54)	2,02 (1,59-4,14)	
ET + GO	1,98 \pm 0,64	3,99 (2,25-6,19)	2,05 (1,54-2,77)	
Trajanje GO				
<6 meseci	2,03 \pm 0,54	4,28 (3,61-4,94)	2,05 (1,63-2,58)	0,881 ^a , 0,948 ^b , 0,533 ^c
>6 meseci	2,01 \pm 0,50	4,11 (3,06-5,71)	2,08 (1,44-3,37)	
Suplementacija selenom				
selen	2,03 \pm 0,53	3,99 (3,12-7,53)	1,79 (1,45-3,60)	0,904 ^a , 0,955 ^b , 0,479 ^c
bez selena	2,04 \pm 0,42	4,52 (3,30-5,23)	2,31 (1,45-3,20)	
Terapija				
bez terapije	2,01 \pm 0,48	4,05 (3,21-6,19)	2,33 (1,63-3,37)	0,424 ^a , 0,833 ^b , 0,903 ^c
primena levotiroksina	1,95 \pm 0,53	4,76 (3,51-5,77)	2,10 (1,51-3,28)	
antitiroidni lekovi	2,11 \pm 0,48	4,16 (2,97-5,24)	1,89 (1,39-2,86)	

a-značajnost razlike TAS, b-značajnost razlike TOS, c-značajnost razlike OSI, d-značajnost razlike TAS između pacijenata sa blagom i teškom GO koja ugrožava vid; Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. P vrednost \leq 0,05 se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom Studentovog t testa.

Serumski nivo TAS nije se statistički značajno razlikovao kod pacijenata sa aktivnom i neaktivnom GO i nije bio u značajnoj korelaciji sa vrednošću CAS ($\rho = 0,186$, $p = 0,078$). Serumске koncentracije TAS nisu bile značajno povezane sa dužinom trajanja simptoma GO, što doprinosi zaključku da nivo TAS u organizmu nije značajno povezan sa aktivnošću GO. Serumski nivoi TOS i OSI nisu se takođe značajno razlikovali u odnosu na aktivnost GO, niti su bili u značajnoj korelaciji sa vrednostima CAS skora ($\rho = 0,057$, $p = 0,624$ i $\rho = 0,028$, $p = 0,803$, za TOS i OSI, redom). Dužina trajanja simptoma GO takođe nije bila značajno povezana sa vrednostima TOS i OSI. Za razliku od aktivnosti GO, težina orbitopatije je bila značajno

povezana sa koncentracijom TAS u serumu pacijenata. Statistički značajna razlika u vrednostima TAS je detektovana između pacijenata sa blagom GO i pacijenata sa teškom GO koja ugrožava vid. Značajne razlike nije bilo između pacijenata sa blagom i onih sa umerenom do teškom GO, kao ni između pacijenata sa umerenom do teškom i onih sa GO koja ugrožava vid. Što se tiče vrednosti TOS i OSI, nije uočena značajna razlika u odnosu na težinu GO. Serumski nivoi TAS, TOS i OSI nisu bili značajno povezani sa vrstom AITB, terapijom GO, ni sa primenom selena.

Nakon što je utvrđeno da su serumske koncentracije bile u značajnoj relaciji sa težinom GO, sledeća je analizirana povezanost ovog parametra sa pojedinačnim oftalmološkim parametrima koji definišu težinu GO (Tabela 46).

Tabela 46. Povezanost serumskog nivoa TAS sa pojedinačnim oftalmološkim parametrima težine GO

Parametar	TAS (mmol/L)	p
Diplopije		
bez diplopija	2,01 ± 0,57	0,941
sa diplopijama	2,01 ± 0,49	
Ograničenje motiliteta očiju		
bez ograničenja	1,86 ± 0,48	0,018
sa ograničenjem	2,13 ± 0,48	
Fibroza EOM		
bez fibroze	2,12 ± 0,50	0,032
sa fibrozom	1,80 ± 0,44	
Proptoza		
bez proptoze	1,99 ± 0,32	0,917
sa proptozom	2,02 ± 0,53	
Retrakcija kapaka		
bez retrakcije kapaka	2,02 ± 0,60	0,945
sa retrakcijom kapaka	2,01 ± 0,42	
Poremećaj funkcije vida		
bez poremećaja funkcije vida	2,00 ± 0,51	0,016
poremećaj funkcije vida	2,64 ± 0,55	

EOM-ekstraokularni mišići; DON-distiroidna optička neuropatija; poremećaj funkcije vida-DON, keratopatija, ulkus rožnjače; Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. P vrednost ≤ 0,05 se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom Studentovog t testa.

Vezano za pojedinačne oftalmološke parametare od značaja, vrednosti TAS su bile značajno povezane sa fibrozom ekstraokularnih mišića, ograničenjem motiliteta očiju i poremećajem funkcije vida. Statistički značajno viša koncentracija TAS izmerena je u grupi pacijenata sa prisutnom restrikcijom motiliteta očiju i poremećajem funkcije vida (prisutna distiroidna optička neuropatija, keratitis ili ulkus rožnjače), dok je u grupi pacijenata sa fibrozom ekstraokularnih mišića koncentracija TAS bila značajno niža u odnosu na pacijente bez znakova fibroze ekstraokularnih mišića. Ostali ispitivani parametri (proptoza, retrakcija kapaka, diplopije) nisu pokazali značajnu asocijaciju sa serumskim nivoom TAS (*Tabela 46*).

Kada smo ispitali povezanost TAS sa tiroidnim statusom pacijenata, utvrđeno je da serumski nivo TAS nije značajno korelirao sa serumskom koncentracijom TSH i FT4 ($\rho = -0,106$, $p = 0,319$ i $\rho = -0,100$, $p = 0,344$, za TSH i FT4, redom), kao ni sa serumskom koncentracijom antiTPO antitela ($\rho = -0,164$, $p = 0,119$), dok je bio u slaboj, ali značajnoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom antiTG antitela u serumu pacijenata ($\rho = -0,224$, $p = 0,033$). Nije bilo značajne korelacije između serumskih nivoa TOS i TSH, FT4, TGAt i TPOAt ($\rho = -0,062$, $p = 0,593$; $\rho = 0,165$, $p = 0,154$; $\rho = 0,048$, $p = 0,683$; $\rho = 0,003$, $p = 0,977$, za TSH, FT4, TGAt, TPOAt, redom), kao ni između izračunatih vrednosti OSI i TSH, FT4, TGAt i TPOAt ($\rho = -0,075$, $p = 0,503$; $\rho = 0,160$, $p = 0,152$; $\rho = 0,062$, $p = 0,585$; $\rho = 0,005$, $p = 0,968$, za TSH, FT4, TGAt, TPOAt, redom).

Serumski nivo TAS je bio u značajnoj pozitivnoj korelaciji samo sa serumskom aktivnošću TSHRAAt izmerenom tehnikom bioeseja, dok značajne korelacije sa koncentracijom ovih antitela, izmerenom primenom imunohemijskih tehnika, nije bilo. Serumske vrednosti TOS i OSI nisu značajno korelirale sa aktivnošću, niti koncentracijom TSHRAAt (*Tabela 47*).

Tabela 47. Korelacija serumskih nivoa TAS, TOS i OSI sa TSAb, TBII i TSI

Parametar	Korelacioni koeficijent (ρ)			P
	TAS	TOS	OSI	
TSAb (SRR%)	0,234	-0,057	-0,069	0,025^a , 0,627 ^b , 0,543 ^c
TBII (IU/L)	0,071	0,080	0,125	0,511 ^a , 0,496 ^b , 0,271 ^c
TSI (IU/L)	0,062	-0,093	0,013	0,562 ^a , 0,427 ^b , 0,906 ^c

TSAb-stimulatorna aktivnost određena metodom bioeseja, TBII-ukupna koncentracija određena rutinskim kompetitivnim imunoesejom, TSI-koncentracija TSHRA_t određena metodom „sendvič“ imunohemijske metode; a-korelacija TSAb, TBII i TSI sa TAS, b-korelacija TSAb, TBII i TSI sa TOS, c-korelacija TSAb, TBII i TSI sa OSI; Korelacija ispitivanih parametara je ispitana računanjem *Spearmanovog* korelacionog koeficijenta. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom.

4.7.2. 8-OHdG kod pacijenata sa GO

Srednja vrednost koncentracije 8-OHdG u plazmi, u ispitivanoj grupi pacijenata bila je $39,07 \pm 17,43$ ng/mL. Povezanost masene koncentracije 8-OHdG i demografskih karakteristika pacijenata je prikazana u *Tabeli 48*.

Tabela 48. Povezanost koncentracije 8-OHdG i demografskih karakteristika pacijenata

Parametar	8-OHdG (ng/mL)	Korelacioni koeficijent (r)	p
Pol			
žene	$38,24 \pm 16,39$		0,383
muškarci	$34,24 \pm 15,73$		
Godine starosti		-0,011	0,933
ITM (kg/m ²)		0,188	0,148
Status pušenja			
pušači	$39,04 \pm 15,68$		0,271
nepušači	$34,40 \pm 16,75$		
Broj cigareta na dan		-0,016	0,928
Porodična istorija AITB			
negativna	$35,83 \pm 16,53$		0,301
pozitivna	$40,84 \pm 14,90$		
Komorbidity			
prisutni	$33,90 \pm 17,24$		0,175
odsutni	$39,57 \pm 15,05$		

ITM-indeks telesne mase; AITB-autoimune tiroidne bolesti; Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom Studentovog t testa, a korelacija ispitivanih parametara je ispitana računanjem *Pearsonovog* korelacionog koeficijenta.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da koncentracija 8-OHdG u plazmi nije bila značajno povezana ni sa jednom od ispitivanih demografskih karakteristika pacijenata sa GO. Takođe, nijedna od ispitivanih kliničkih karakteristika od značaja, pre svega aktivnost i težina GO, nije bila u značajnoj asocijaciji sa plazmatskim nivoima 8-OHdG (*Tabela 49*).

Tabela 49. Povezanost koncentracije 8-OHdG i kliničkih karakteristika pacijenata

Parametar	8-OHdG (ng/mL)	p
Aktivnost GO		
neaktivna GO	41,49 ± 15,41	0,215
aktivna GO	36,19 ± 19,45	
Težina GO		
blaga GO	40,28 ± 15,32	0,866
umerena do teška GO	37,96 ± 18,14	
ugrožavajuća po vid GO	40,18 ± 24,45	
AITB		
GB + GO	37,66 ± 17,90	0,327
HT + GO	47,04 ± 13,65	
ET + GO	40,54 ± 17,13	
Trajanje GO		
<6 meseci	30,68 ± 14,33	0,134
>6 meseci	39,16 ± 16,34	
Suplementacija selenom		
bez selena	35,32 ± 16,16	0,249
Selen	40,38 ± 16,06	
Terapija		
bez terapije	35,80 ± 17,99	0,247
primena tiroksina	42,15 ± 16,91	
antitiroidni lekovi	34,23 ± 14,39	

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Vrednosti su međusobno upoređene primenom Studentovog t testa.

Kada je u pitanju tiroidni status pacijenata, nije dokazano postojanje značajne korelacije koncentracije 8-OHdG i TSH sa FT4 ($\rho = 0,044$, $p = 0,736$ i $\rho = 0,120$, $p = 0,357$, za TSH i FT4, redom), kao ni sa TPOAt i TGAt u plazmi pacijenata ($\rho = 0,089$, $p = 0,493$ i $\rho = 0,163$, $p = 0,208$, za TPOAt i TGAt, redom).

Plazmatski nivo 8-OHdG nije značajno korelirao sa aktivnošću, niti sa koncentracijom TSHRAAt, što doprinosi zaključku da koncentracija ovog parametra nije bila u značajnoj vezi sa tokom GO u ispitivanoj populaciji pacijenata (Tabela 50).

Tabela 50. Korelacija koncentracije 8-OHdG sa TSAb, TBII i TSI

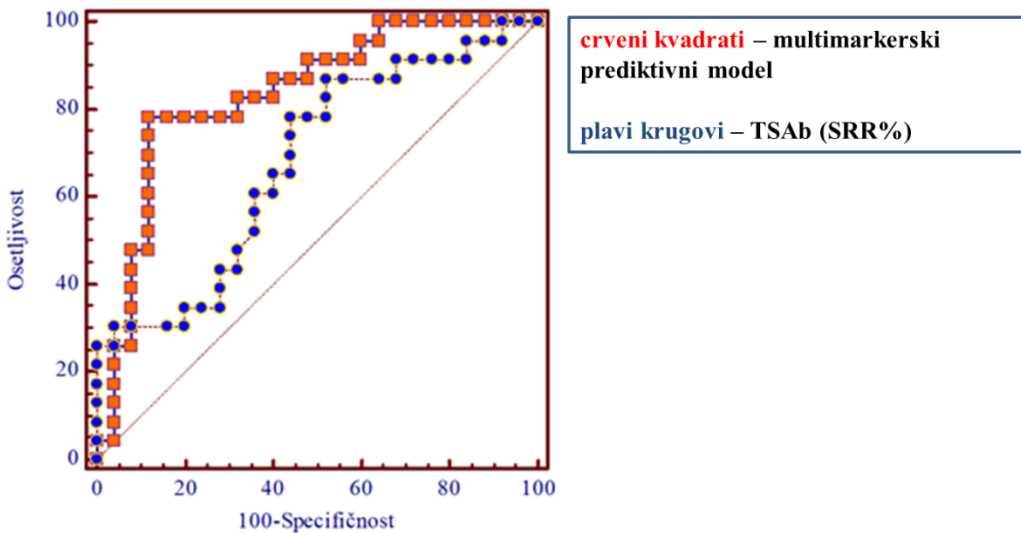
Parametar	Korelacioni koeficijent (ρ)	p
TSAb (SRR%)	0,027	0,827
TBII (IU/L)	-0,229	0,060
TSI (IU/L)	-0,168	0,185

Korelacija ispitivanih parametara je ispitana računanjem *Spearmanovog* korelacionog koeficijenta. P vrednost $\leq 0,05$ se smatrala statistički značajnom.

4.8. Dijagnostički potencijal multiparametarskih modela

Na kraju ovog rada je ispitano dijagnostički potencijal multiparametarskih modela za predviđanje razvoja teže kliničke slike bolesti. S tim u vezi je urađena ROC analiza kojom je ispitana klinička tačnost stimulatorne aktivnosti TSAb za diferencijaciju aktivnosti i težine GO i klinička tačnost multimarker modela za predikciju aktivnosti i težine GO. Ideja ove analize kliničkih karakteristika biomarkera GO bila je upoređivanje dijagnostičke tačnosti TSHRA_t i modela koji obuhvata sve biomarkere prethodno analizirane u ovom radu. U tu svrhu je vršeno poređenje ROC kriva prediktivnih vrednosti TSAb i multiparametarskih modela, posebno za aktivnost, a posebno za težinu GO.

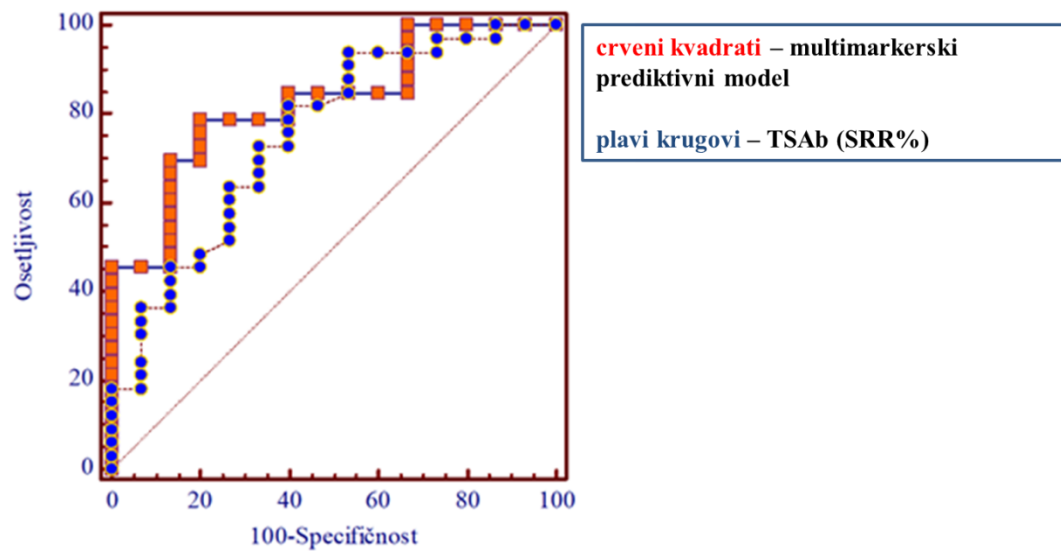
Za TSAb, za ukupno 48 uzoraka za koje su uporedno analizirani svi parametri prikazani u ovom radu (TSAb, TAS, TOS, OSI, 8-OHdG, IL-6, IL-1 β , IL-1RA, IL-8) vrednost AUC je bila 0,679, dok je za multiparametarski model vrednost AUC bila 0,831. Međusobnim poređenjem ove dve ROC krive dobijena je statistički značajna razlika ($p = 0,033$) (*Slika 27*).



Slika 27. ROC krive za TSAb i multiparametarski prediktivni model za razvoj aktivne GO

Dobijeni rezultati ukazuju na to da se dodavanjem šireg panela parametara autoimunosti, inflamacije, oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, značajno povećava sposobnost predviđanja razvoja aktivnog oblika GO.

U cilju predviđanja težine GO, paralelno je određena ROC analiza TSAb i multiparametarskih modela GO, i izvršeno poređenje dobijenih ROC kriva. Vrednost AUC za multiparametarski model je bila 0,824, a za 0,752 za TSAb. Razlika dobijenih AUC vrednosti nije dostigla granicu statističke značajnosti ($p = 0,189$) (Slika 28).



Slika 28. ROC krive za TSAb i multiparametarski prediktivni model za razvoj teške GO

5. DISKUSIJA

Veliki broj bazičnih naučnih istraživanja sprovedenih na polju AITB i GO prevashodno su obuhvatala studije animalnih modela i ćelijskih linija i bila su prekretnica u razumevanju patogenetske osnove i razvoja potencijalnih kandidat biomarkera ovih poremećaja (80, 114, 78). Rezultati ovih inicijalnih istraživanja doveli su do značajnih dostignuća i omogućili su translaciju ovih saznanja u polje primenjenih nauka (24, 78).

Iako noviji epidemiološki podaci ukazuju na smanjenje prevalencije GO u opštoj populaciji (4, 36, 37, 296), ona i dalje predstavlja jedan svojevrsan zdravstveni i estetski problem. Ovo specifično kliničko stanje značajno remeti funkciju vida i, ukoliko se adekvatno i blagovremeno ne tretira, može dovesti do trajnih posledica, a u najgorem slučaju do potpunog gubitka vida (296). Blaži oblici bolesti takođe mogu imati značajan negativan uticaj na svakodnevni život i radnu sposobnost pacijenata, zbog čega se prema aktuelnim vodičima kliničke prakse preporučuje primena glukokortikoida čak i u slučaju neaktivnih i blagih oblika GO, ukoliko oni subjektivno u dovoljnoj meri narušavaju normalno funkcionisanje obolelog (67). Posebnu problematiku ove patologije čini podatak da veliki broj pacijenata, naročito onih sa blagim kliničkim tokom ili nespecifičnim simptomima GO prolazi neopaženo godinama, pri čemu su pogrešno lečeni od konjuktivitisa i niza drugih inflamatornih stanja (27, 208, 297). Za postavljanje tačne diferencijalne dijagnoze GO neophodni su visoko specijalizovani kliničari zbog čega se pacijenti uglavnom upućuju u referentne ustanove tercijarne zdravstvene zaštite. Kako je dostupnost ovakvih centara uglavnom ograničena, potreban je dugi niz godina do postavljanja tačne dijagnoze kod nekih od pacijenata, a naročito je komplikovano njihovo dugotrajno praćenje. Iz ovih razloga, od izuzetne važnosti je uvođenje neinvazivnih i dostupnih seroloških markera GO, visoke osetljivosti i specifičnosti, koji bi bili adekvatna skrining ili adjuvantna dijagnostička sredstva za kontinuirano praćenje pacijenata.

Prema važećim smernicama EUGOGO radne grupe za GO (56), oftamološki i endokrinološki specijalistički pregled predstavljaju „zlatni standard“ za postavljanje dijagnoze GO, diferencijalnu dijagnozu, kao i određivanje aktivnosti i težine bolesti i primenu odgovarajuće terapije (67). Adekvatno predviđanje kliničkog toka GO predstavlja svojevrsan klinički

problem, s obzirom da nije moguće predvideti kod kojih će se pacijenata sa AITB sa sigurnošću razviti simptomi GO i u kom trenutku, niti kod kojih pacijenata će doći do reaktivacije bolesti. Osim česte pojave relapsa, problematika ove patologije se ogleda i u izrazito komplikovanoj diferencijalnoj dijagnostici atipičnih oblika GO (unilateralna GO i GO bez karakterističnih znakova inflamacije) i GO bez tiroidnih abnormalnosti. Precizna diferencijalna dijagnostika je klinički veoma zahtevna s obzirom na to da većina pojedinačnih simptoma GO mogu biti posledica drugih inflamatornih i neinflamatornih stanja (34, 208). Jedan od glavnih kliničkih problema ove patologije je subjektivnost kliničke procene GO. Uvođenjem atlasa sa fotografijama u boji u širu kliničku upotrebu, donekle je unapređena procena parametara koji se deskriptivno opisuju i ulaze u kliničke skorove aktivnosti i težine GO (56). Ovakav pristup je daleko od savršenog i zahteva veoma dobro obučene kliničare. Što se tiče parametara koji se objektivno procenjuju, danas su u upotrebi različite, nestandardizovane aparature koje se koriste za merenje pojedinih oftalmoloških parametara, a postoji i problem njihove interindividualne varijacije i nedostatak populaciono specifičnih referentnih intervala (34, 105). Kako bi se ovi problemi prevazišli, postoji velika potreba za standardizacijom kliničkih procedura i uvođenjem međunarodnih konsenzusa. I pored značajnog napretka u radu međunarodnih organizacija zaduženih za unapređenje kliničkog menadžmenta AITB i GO, i dalje postoji velika diskrepanca u izvođenju kliničkih procedura (68).

Takođe, karakteristično je da kod otprilike jedne trećine pacijenata izostaje adekvatan odgovor na terapiju (208). Kako je GO jedno hronično stanje, neophodno je dugotrajno, kontinuirano i multidisciplinarno praćenje pacijenata, u specijalizovanim ustanovama tercijarne zdravstvene zaštite. Prilikom postavljanja dijagnoze, lečenja i praćenja ovih pacijenata, obično je neophodna višednevna hospitalizacija i primena mnogobrojnih dijagnostičkih metoda. Problematika u lečenju hipertireoze kod pacijenata sa GO se ogleda i u povezanosti upotrebe radioaktivnog joda i razvoja i/ili progresije orbitopatije. Primena radioaktivnog joda u diferencijalnoj dijagnostici tireotoksikoze bi takođe bila smanjena uvođenjem visokoosetljivih seroloških markera GO u upotrebu. Iz svih navedenih razloga neophodno je uvođenje u praksu dovoljno osetljivog i specifičnog biomarkera kao značajne podrške dijagnostici, optimizaciji terapije, monitoringu i prognozi toka bolesti.

Trenutno dostupne terapijske mogućnosti lečenja GO su daleko od savršenih i usmerene su ka uklanjanju posledica, a ne uzroka orbitalne inflamacije (83). Takođe, nedostatak dovoljno robustnih prekliničkih animalnih modela i konsenzusa za protokol praćenja terapijskog odgovora predstavljaju ograničenja za razvoj novih terapijskih (298). Iz ovih razloga neophodna su dalja istraživanja u ovoj oblasti u cilju boljeg razumevanja patofizioloških mehanizama i prirode tiroidno-orbitalne veze u GO. Postavlja se pitanje o potencijalnoj ulozi još uvek neidentifikovanih antigena specifičnih za orbitalno tkivo u nastanku i progresiji GO (83).

Otkriće familije autoreaktivnih TSHRA_t otvorilo je nove perspektive u izučavanju etiologije AITB i njihovih ekstratiroidnih manifestacija. Utvrđeno je da serum pacijenata sa GB, HT i GO sadrži heterogenu smešu autoreaktivnih antitela, varijabilnog funkcionalnog karaktera (124). Danas je opšte prihvaćeno da su TSHRA_t glavni akteri u etiologiji GB i GO, odnosno da su njihova ekskluzivna biohemijska karakteristika i direktni uzročnik hormonskih i orbitalnih promena (76). I pored mnogobrojnih dokaza koji govore u prilog ovakvoj tvrdnji, neke studije dovode u pitanje samostalnu ulogu TSHRA_t kao pokretača imunoloških procesa kako u orbiti, tako i u štitnoj žlezdi. Važan fokus budućih istraživanja jeste da li ova autoreaktivna antitela imaju dodatne uloge osim hiperstimulacije ćelija štitne žlezde i orbitalnih fibroblasta (u GB i GO) i inhibicije sinteze tiroidnih hormona u HT. Jedna od potencijalnih hipoteza je da ovi imunoglobulini mogu delovati i kao antigen-prezentujuće ćelije tiroidnih ili orbitalnih antigena T-limfocitima, bilo na nivou sekretovanih molekula ili B-limfocita (83). Ono što je navelo istraživače da dovedu u pitanje samostalno delovanje ove grupe antitela u nastanku patoloških promena GO jeste činjenica da kod hipertiroidnih novorođenčadi GO nije bila prisutna. Ova opservacija upućuje na značaj drugih potencijalnih antigenskih kandidata u orbitalnom tkivu kao i njihovu ukrštenu reakciju sa antigenima na nivou tiroidnih ćelija (91). Jedna od mogućih hipoteza koje bi mogle objasniti pojavu GO i ostalih ekstratiroidnih manifestacija GB jeste konstitutivna, ekstratiroidna ekspresija TSHR i blaga, sistemska inflamacija vezivnog tkiva u GB. Smatra se da je postojanje ove subkliničke inflamacije neophodan preduslov, ali da predstavlja samo jedan od etioloških faktora koji ne može samostalno dovesti do razvoja GO. Takođe, pretpostavlja se da je stepen ekstratiroidne inflamacije u direktnoj korelaciji sa autoimunitetom na TSHR (83, 299). Dodatno se tiroidno-orbitalna veza objašnjava na nivou progenitorskih ćelija koštane srži gde se smatra da TSHR započinje imunološku reakciju pre nego što cirkulišući leukociti stignu do orbite (102). Naime, utvrđeno je da su ćelije cirkulišućih

fibrocita, koje vode poreklo od monocitne linije koštane srži, daleko učestalije kod pacijenata sa GB i GO, u odnosu na zdravu populaciju (282). Brojni dokazi ističu ulogu specifičnog fenotipa orbitalnih fibroblasta u nastanku i progresiji GO, čineći je podložnom za razvoj orbitalne inflamacije, međutim tačni mehanizmi gubitka periferne imunske tolerancije i dalje nisu poznati (282). Poznato je da na orbitalnim fibroblastima dolazi do ushodne regulacije TSHR, ali nisu poznati svi faktori koji uzrokuju pojačanu ekspresiju receptora, niti da li je ona uzrok nastanka GO ili posledica lokalnih imunoloških procesa u orbiti (83, 88). Opšti problem svih autoimunih bolesti predstavlja teško uklanjanje autoreaktivnih antigena, što uzrokuje kontinuiranu i neregulisanu stimulaciju T-limfocita i pojačavanje autoimune reakcije (90).

Uzimajući u obzir kompleksnu ulogu TSHRA_t u patogenezi GO, kao i složenu mrežu patofizioloških procesa njihovog delovanja, cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi klinički značaj određivanja ovog parametra primenom različitih metoda, sa fokusom na analizu dijagnostičke tačnosti metoda, kao i prirode asocijacije TSHRA_t sa drugim parametrima od značaja za ovu patologiju. Krajnja tendencija ovakvog pristupa je bila unapređenje laboratorijske dijagnostike kao najznačajnijeg pomoćnog ili potencijalnog surogat sredstva u medicinskoj dijagnostici GO. Uvođenje novih analitičkih metoda u rutinsku praksu otvorilo bi novo poglavlje u kliničkom pristupu menadžmentu AITB i njihovih ekstratiroidnih manifestacija.

5.1. Analiza demografskih i kliničkih karakteristika populacije i njihove povezanosti sa TSHRA_t

5.1.1. Demografski podaci ispitivanih pacijenata i njihova povezanost sa serumskim nivoom TSHRA_t

U ispitivanoj populaciji pacijenata analizirani su demografski podaci u odnosu na grupu AITB (*Tabela 10*) i kliničku prezentaciju GO, odnosno težinu i aktivnost GO (*Tabela 9*), sa ciljem analize potencijalnih faktora rizika nastanka i progresije GO. Nakon toga, ispitano je slaganje

demografskih parametara sa serumskim nivoom stimulatorne aktivnosti i ukupnom koncentracijom TSHRA_t (*Tabela 15, Tabela 16*).

Duplo više žena nego muškaraca bilo je uključeno u istraživanje. Ovakav odnos polova bio je očekivan, s obzirom na značajno veću prevalenciju AITB i GO u ženskoj populaciji (*Tabela 8*). Muški pol je bio povezan sa lošijim ishodom bolesti u smislu aktivnosti i težine GO (*Tabela 9*). Verovatnoća za razvoj aktivnog oblika GO bila je značajno veća za muškarce nego za žene. Upotrebom logističke binarne regresije muški pol je prepoznat kao samostalan prediktivni marker aktivne GO. Prethodne studije su sugerisale da su muški pacijenti GO podložniji razvoju teške GO (10). Serumski nivo TSA_b (*Tabela 15*) i TBII (*Tabela 16*) nije bio značajno povezan sa polom, što ukazuje samostalni uticaj ovih faktora na razvoj određenog kliničkog fenotipa GO. Pacijenti uključeni u istraživanje su većinom bili srednje životne dobi, što je u skladu sa aktuelnim epidemiološkim podacima GO (4, 39). Godine starosti nisu prepoznate kao značajan faktor koji bi odredio nivo aktivnosti ili težine GO (*Tabela 9*), niti su se značajno razlikovale u odnosu na primarnu dijagnozu AITB (*Tabela 10*). Prethodno je objavljeno da je starija životna dob značajan faktor koji povećava verovatnoću za nastanak teških oblika GO koja je ugrožavajuća po vid (39). Potencijalan razlog za odsustvo statistički značajne razlike u godinama u odnosu na težinu GO je mali broj pacijenata sa teškim oblikom orbitopatije, kao i mali broj pacijenata iznad 60. godine života i pacijenata ispod 30. godina života. Najveći broj ispitivanih pacijenata je pripadao grupi srednje životne dobi.

Pušačke navike (raspodela pušača i nepušača, broj konzumiranih cigareta na dan i pušački staž) nisu imale uticaj na nivo TSHRA_t (*Tabela 15, Tabela 16*), niti na kliničku prezentaciju GO (*Tabela 9*). Izloženost duvanskom dimu obično se dovodi u vezu sa kliničkim karakteristikama GO i prijavljena je kao dozno-zavistan faktor rizika za razvoj GO (211). Osim toga, prestanak pušenja je jedina mera prevencije, prema aktuelnim kliničkim vodičima GO (67, 105). Međutim, u prethodnim istraživanjima sprovedenim u našoj populaciji nije dokazana značajna asocijacija pušačkog statusa i kliničkog oblika GO što je u skladu sa dobijenim rezultatima ove studije (300).

Nijedan od drugih ispitivanih demografskih parametara (ITM, porodična istorija AITB, udružene autoimune bolesti i komorbiditeti) nije bio u značajnoj vezi sa kliničkim tokom GO, niti sa tipom AITB (*Tabela 9, Tabela 10*). Istovremeno prisustvo drugih autoimunih bolesti se često

susreće kod pacijenata sa AITB i dovedeno je u vezu sa njihovom zajedničkom genetskom predispozicijom (42, 274, 275). U ispitivanom uzorku pacijenata detektovano je samo 4 ispitanika koji su imali pridružene autoimmune bolesti (celijačna bolest, Kronova bolest, *diabetes mellitus* tip 1) (Tabela 8). Pozitivna porodična istorija AITB bila je značajno povezana sa višim serumskim nivoom TSAb (Tabela 15), dok se serumska koncentracija TBII nije značajno razlikovala u odnosu na ovaj parametar (Tabela 16). Ostali demografski parametri nisu bili značajno povezani sa TSAb (Tabela 15), ni sa TBII (Tabela 16).

5.1.2. Klinički podaci ispitivanih pacijenata i njihova povezanost sa serumskim nivoom TSHRA_t

Aktivnost i težina GO predstavljaju glavne odrednice kliničke prezentacije i progresije bolesti čija je detaljna evaluacija neophodan korak prilikom postavljanja precizne dijagnoze i praćenja kliničkog toka GO. Na osnovu ova dva klinička parametra definiše se terapijski pristup i donosi se odluka o trenutku započinjanja terapije. Iz ovih razloga, uloženi su veliki napor u razvoj sistema kliničke procene aktivnosti i težine GO koji se zasnivaju na bodovanju pojedinačnih kliničkih parametara (69). Iako je detaljno opisana razlika između aktivnosti i težine GO, a njihova procena se vrši zasebno na osnovu različitih sistema bodovanja, i dalje postoji veliki stepen preklapanja, s obzirom da pojedini parametri (zahvaćenost mekih tkiva, stepen proptoze, itd.) ulaze u skorove i težine i aktivnosti. Ovim se objašnjava značajna asocijacija CAS skora i težine GO dobijena u ovom istraživanju (Slika 11).

U skladu sa ranijim istraživanjima, trajanje simptoma bilo je obrnuto proporcionalno aktivnosti GO (Slika 12a). Dodatno su stimulatorna aktivnost i ukupna koncentracija TSHRA_t bile značajno veće u serumu pacijenata kod kojih su kraće trajali simptomi GO (≤ 6 meseci) (Tabela 15, Tabela 16). Ovakvi rezultati podržavaju tvrdnju da aktivnost GO progresivno raste nakon prvobitne pojave simptoma, a zatim postepeno jenjava. Sa druge strane, težina GO nije bila značajno povezana sa trajanjem GO u ovoj studiji (Slika 12b). Dobijeni rezultati su u skladu sa prirodnim tokom GO u kome inflamatorna faza prethodi hroničnoj fazi bolesti koju karakterišu znakovi i simptomi koji definišu težinu GO (4, 75).

5.2. Analiza koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRA_t u serumu različitih grupa pacijenata sa GO

Veliki broj dokaza ukazuje na višestruki značaj određivanja TSHRA_t u cilju unapređenja diferencijalne dijagnoze AITB i lečenja pacijenata. Analizom ukupne koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRA_t u serumu pacijenata sa GO sa primarnom dijagnozom GB, HT ili ET oblika orbitopatije, utvrđeno je postojanje značajne razlike u serumskom nivou TSA_b, TBA_b i TBII kod ispitivanih grupa pacijenata. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja u kojima je prevalencija TSHRA_t bila najizraženija kod pacijenata sa GB (11, 148). U analiziranoj populaciji pacijenata, vrednosti ukupne koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRA_t bile su najveće u grupi ispitanika sa primarnom dijagnozom GB u odnosu na ispitanike sa HT i ET GO (*Tabela 13, Slika 14*).

U ispitivanoj grupi pacijenata detaljno je analizirana prevalencija TSA_b i TBII. Ukupno slaganje rezultata stimulatorne aktivnosti i ukupne koncentracije TSHRA_t, dobijenih primenom tehnike bioeseja (TSA_b) i kompetitivnog imunoeseja (TBII) bilo je 77%. Ukupna stopa pozitivnosti TSA_b bila je značajno veća u celokupnom uzorku pacijenata. 93,5% rezultata TSA_b bioeseja bilo je pozitivno, u odnosu na 70,3% pozitivnih rezultata TBII, određenih tehnikom kompetitivnog imunoeseja. Ovakav odnos pozitivnosti bio je u skladu sa prethodnim izveštajima (301). Dobijeni rezultati ukazuju na to da povišena funkcionalna aktivnost TSA_b u serumu ima daleko bolju diskriminatornu sposobnost otkrivanja individualne predispozicije za razvoj orbitalnih simptoma bolesti (87, 206, 302). Noh i saradnici (303) ukazali su na blisku povezanost TSA_b i orbitalnih manifestacija AITB i naveli da je koncentracija TBII u dobroj korelaciji sa funkcijom štitne žlezde. Khoo i saradnici (304) su pokazali da je GO u direktno proporcionalnom odnosu sa prevalencijom TSA_b, ali ne i sa TBII.

Poređenjem prevalencije TSA_b i TBII u grupama pacijenata sa različitim AITB, značajna razlika u pozitivnosti primenjenih testova je detektovana u grupi ispitanika sa GB i ET oblikom GO. U obe grupe ispitanika, tehnikom bioeseja dobijeno je značajno više pozitivnih rezultata. Iako je stopa pozitivnosti TSA_b bila višestruko veća i u grupi ispitanika sa dijagnozom HT, dobijena razlika nije dostigla granicu nivoa značajnosti. Jedan od mogućih razloga ovakvog rezultata bio je mali broj pacijenata u grupi pacijenata sa HT. Superiorna osetljivost je bila posebno izražena

kod pacijenata sa ET formom GO (*Tabela 14*). Uobičajeno je da eutiroidni i hipotiroidni pacijenti sa simptomima GO imaju nizak titar TSHRA_t koja se teško detektuju tradicionalnim laboratorijskim testovima. Eutiroidna GO predstavlja specifičan klinički izazov zato što, za razliku od hipertiroidnih pacijenata sa GB ili hipotiroidnih pacijenata sa HT gde se poremećaji na nivou orbite dovode u vezu sa tiroidnom patologijom, ovde nije jasno poreklo oftamoloških simptoma. Brojni inflamatorni poremećaji mogu oponašati simptome GO zbog čega je diferencijalna dijagnoza uveliko otežana (297). Kod ovih pacijenata, dijagnoza GO se u potpunosti oslanja na serološke analize, zbog čega je ključno koristiti analitičke metode visoke osetljivosti. Pitanje koje se nameće tiče se mehanizma koji je u osnovi pojave TSA_b kod pacijenata sa ET GO, bez posledične promene tiroidnog statusa. Jedno od mogućih objašnjenja ovog fenomena je neutralizacija stimulatorne aktivnosti TSHRA_t, kao potencijalna posledica delovanja neutralne klase TSHRA_t. Neutralna antitela su najmanje istražena klasa TSHRA_t za koje se smatra da svoje efekte ispoljavaju kroz alternativne puteve signalizacije koji rezultiraju povećanim oksidativnim stresom, zapaljenskom reakcijom i apoptozom ćelija štitne žlezde. Do danas nije razvijen komercijalno dostupan test za njihovo određivanje u uzorcima pacijenata (133, 152). Stoga se može pretpostaviti da neutralna TSHRA_t ometaju stimulatorno dejstvo TSA_b u štitnoj žlezdi. Još jedan od predloženih mehanizama dejstva neutralnih TSHRA_t je inhibicija intramolekularnog cepanja i posledična pojačana ekspresija TSH receptora. Pretpostavlja se da se na ovaj način postiže održavanje ili egzacerbacija autoimunih procesa (305). Atger i saradnici (306) su potvrdili prisustvo neutralnih TSHRA_t u iznenađujuće velikom broju eutiroidnih ispitanika što je moguće objašnjenje biohemijskog, pa čak i autoimunog eutiroidizma.

Literaturni podaci ukazuju na višestruku prednost funkcionalne aktivnosti u odnosu na ukupnu koncentraciju TSHRA_t u detekciji i predviđanju nastanka orbitopatije. Naročito je ograničena sposobnost tradicionalnih imunohemijskih testova da prepoznaju i klasifikuju pacijente sa nespecifičnim ili eutiroidnim oblikom GO, kao i pacijente sa nestabilnim tiroidnim hormonskim statusom, kod kojih dolazi do prelaska iz jednog u drugo autoimuno stanje (GB u HT i obrnuto) (307).

Dodatni značaj bioeseja dolazi do izražaja i kod pacijenata sa subkliničkom hiperfunkcijom ili hipofunkcijom štitne žlezde, kao i kod pacijenata kod kojih je uklonjena štitna žlezda ili

primenjena ablacija radioaktivnim jodom. Kod ovih pacijenata i dalje su prisutna TSHRA_t, a neretko se dešava da ne oslikavaju adekvatno tiroidni status zbog čega je neophodno kontinuirano pratiti njihov titar u serumu pacijenata (135).

Iako skorašnji vodiči uveliko prepoznaju značaj specifičnih TSHRA_t (46), upotreba bioeseja još uvek nije ušla u rutinsku upotrebu i uglavnom se koristi u istraživačke svrhe, pa je samim tim i onemogućeno određivanje funkcionalnog karaktera ovih antitela. Upotreba novih analitičkih tehnika u istraživanju je uveliko proširila razumevanje GO i AITB i omogućila novi pristup njihovom proučavanju.

Od ukupnog analiziranog broja pacijenata u našem istraživanju, samo je kod jedne pacijentkinje detektovana pozitivna blokirajuća aktivnost TSHRA_t (TBAb). Ovakav rezultat potvrđuje rezultate prethodnih istraživanja koji ukazuju na to da je aktivnost TBAb retko prisutna kod pacijenata sa klinički manifestnom GO (148, 308). Ono što je bilo interesantno je da je kod ove pacijentkinje detektovana dvostruka pozitivnost TSA_b i TBAb. Pacijentkinja je imala primarnu dijagnozu GB i neaktivan, blagi oblik orbitopatije. Bila je na terapijskom režimu antitiroidnim lekovima i levotiroksinom (blok supstitucija). Iz medicinske istorije bolesti utvrđeno je da je pacijentkinja imala epizode relapsa hipertiroidizma i neadekvatno regulisan tiroidni status. Prethodno je potvrđeno da dvostruka funkcionalna aktivnost TSHRA_t može biti prisutna istovremeno u uzorku istog pacijenta (150). Stimulatorna antitela su dominantna kod pacijenata sa GB i GO, i smatra se da su direktno odgovorna za patogenetsku osnovu ovih poremećaja. Incidencija TBAb kod AITB je manje uobičajena i obično je povezana sa autoimunim hipotiroidizmom i povremeno sa eutiroidizmom, iako se ova antitela susreću i u serumu pacijenata sa GB, posebno tokom antitiroidne terapije ili posle tretmana radioaktivnim jodom. Prelazak iz predominantno stimulirajućeg do predominantno blokirajućeg profila TSHRA_t smatra se odgovornim za postizanje hormonskog balansa ili hipotiroidnog stanja (148). Istovremena pozitivnost TSA_b i TBAb bi mogla biti odgovorna za iznenadne promene u kliničkoj manifestaciji AITB (149). Moguće objašnjenje za dvostruku aktivnost TSHRA_t je fluktuacija tiroidnog statusa i promenljiva aktivnost GO. Nestabilnost tiroidnog statusa je praćena promenljivim statusom autoimunosti u organizmu koji uslovljava epizode prelaska iz stanja hipertiroidizma u hipotiroidizam i obrnuto. Smatra se da je smena stimulatorne i blokirajuće aktivnosti TSHRA_t uzrokovana različitim odnosom TSA_b i TBAb koji je posledica

varijabilnih svojstava TSHRA_t u smislu njihovog afiniteta, potentnosti i koncentracije (309, 310).

Stoga je neophodno pažljivo praćenje pacijenata (ispitivanje fluktuacije tiroidnog statusa, karakteristika orbitopatije, seroloških i kliničkih markera bolesti) i prilagođavanje terapije u skladu sa tim. Iako je promena aktivnosti TSHRA_t obično povezana sa promenama u tiroidnom statusu pacijenta, naši rezultati dodatno ukazuju i na njenu moguću vezu sa kliničkom slikom orbitopatije (153, 309).

Sledeći su ispitani uticaj konzumacije selena i medikamentozne terapije na prezentaciju GO i nivo TSHRA_t. Šestomesečna suplementacija preparatima selena, uz primenu lokalnih oftalmoloških preparata je zvanična preporuka aktuelnog EUGOGO vodiča, za tretiranje blage forme GO (67). Administracija selena imala je blagotvorno dejstvo kod ove grupe pacijenata, što se ogledalo u smanjenju očnih simptoma i progresije bolesti, kao i poboljšanju ukupnog kvaliteta života (267). Hipoteza o pozitivnom dejstvu selena bazirana je na njegovom imunomodulatornom i antioksidativnom efektu (268). Na osnovu istraživanja koje je sproveo Evropsko tiroidno udruženje, utvrđeno je da najveći broj kliničara preporučuje primenu selena kod većine pacijenata sa AITB i GO, s tim što još uvek nije poznata korist od njegove upotrebe u područjima sa nedostatkom selena (311). U ovoj studiji suplementacija selenom nije bila značajno povezana sa serumskim vrednostima TSHRA_t (*Tabela 15, Tabela 16*). Uprkos ustanovljenim preporukama vodiča, rezultati kliničkih studija koje su ispitivale efekte administracije selena u GB i GO su oprečni. U randomizovanoj kliničkoj studiji Kahaly i saradnika (312) nije bilo značajne razlike u odgovoru pacijenata na selen, niti u stopi recidiva GB između pacijenata i ispitanika koji su primali *placebo*.

Vezano za uticaj medikamentozne terapije, nivo TSHRA_t je bio značajno viši kod pacijenata koji su, u zavisnosti od tiroidnog statusa, primali antitiroidne lekove ili L-tiroksin u poređenju sa pacijentima koji nisu primali nikakvu tiroidnu terapiju. Ovo je kontradiktorno prethodnim tvrdnjama da je nivo ovih antitela značajno smanjen nakon primene antitiroidnih lekova zbog njihovog nezavisnog imunomodulatornog dejstva i postizanja ravnoteže tiroidnih hormona (313). Međutim, serumski nivo TSHRA_t je negativno korelirao sa trajanjem antitiroidne terapije, što je posledica pozitivnih imunomodulatornih efekata ovih lekova i prirodnog toka bolesti. Kao što je ranije pokazano u radu Ponto i saradnika (314), vrsta primenjene medikamentozne terapije

(antitiroidni lekovi/L-tiroksin) nije bila u značajnoj vezi sa serumskim nivoom TSHRAAt u ovoj studiji (*Tabela 15, Tabela 16*). Ovakav podatak ističe značajnost uspostavljanja biohemijskog eutiroidizma kod pacijenata sa GO, bilo da je u pitanju GB ili HT. U oba slučaja, disbalans tiroidnih hormona se dovodi u vezu sa progresijom simptoma orbitopatije (43). Jatrogeni hipotiroidizam koji nastaje kao posledica primene radiaktivnog joda ili neadekvatno dozirane antitiroidne terapije je prepoznat kao značajan okidač koji može dovesti do pojave ili egzacerbacije simptoma GO (91, 315). Kako bi se ovo izbeglo, preporuka EUGOGO vodiča kliničke prakse je da se radioaktivni jod primenjuje isključivo uz profilaktičnu primenu prednizona i da se što ranije uspostavi biohemijski eutiroidizam (67). Osim toga, rezultati nedavne multicentrične kohortne studije ukazuju na to da se biohemijski eutiroidizam značajno brže postiže u slučaju titracijskog terapijskog režima u odnosu na „blok supstituciju“ (316). Vezano za uticaj hipertiroidizma na orbitalnu inflamaciju, dugoročna primena antitiroidne terapije u cilju normalizacije tiroidnog statusa dovedena je u vezu sa značajnim padom titra TSHRAAt (317). Uzročno-posledična veza tiroidnih hormona i TSHRAAt je relativno složena. Sa jedne strane stimulacija štitne žlezde delovanjem TSAAb dovodi do hipertiroidizma, dok se sa druge strane smatra da povišeni tiroidni hormoni pospešuju dalje stvaranje ovih antitela i autoimuni odgovor organizma. Pretpostavlja se da tiroidni hormoni ispoljavaju imunomodulatorne efekte i da hipertiroidizam dovodi do aktivacije antigen-prezentujućih ćelija (dendritskih ćelija, makrofaga) i modulacije T-regulatornih limfocita, usled čega nastaje jedan začarani krug imunoloških reakcija (309).

Kako bi se uspešno sagledala asocijacija TSHRAAt sa tiroidnim statusom organizma, ispitana je korelacija serumskog nivoa njihove aktivnosti i koncentracije sa rezultatima tiroidnih funkcionalnih testova (*Tabela 17*), kao i raspodela pozitivnosti TSAAb i TBII u odnosu na tiroidni status (*Tabela 18*). Serumski nivoi TSAAb i TBII su bili u značajnoj, negativnoj korelaciji sa nivoom TSH, dok je nivo TBAAb negativno korelirao sa TSH. Dobijeni nivo korelacije TSHRAAt sa TSH bio je očekivan s obzirom na to da je TSH najosetljiviji parametar tiroidnog statusa koji najduže ostaje izmenjen. Određivanje serumskih vrednosti TSH je prva linija u laboratorijskoj dijagnostici prilikom sumnje na tiroidnu disfunkciju, dok se određivanje slobodne frakcije tiroksina (FT4) koristi za razlikovanje subkliničkih od klinički manifestovanih oblika tiroidnih poremećaja (278). Nije pronađena korelacija nivoa TSHRAAt sa vrednostima ostalih tiroidnih funkcionalnih testova (FT4, TGAt i TPOAt) (*Tabela 17*).

Zanimljivo je da je kod jednog dela pacijenata detektovana istovremena pozitivnost TSHRA_t, TGAt i TPOAt antitela. Kod 26 pacijenata je detektovano istovremeno prisustvo TPOAt i TSAb, a kod 13 pacijenata je detektovano istovremeno prisustvo TGAt i TSAb. Ovakav podatak ide u prilog hipotezi o ukrštanju patogenetskih mehanizama GB i HT i pojavi intermolekularnog širenja epitopa ključnih antigena uključenih u autoimune procese. Fenomen „širenja epitopa“ objašnjava mehanizam širenja imunskog odgovora TSHRA_t u GB na ostale endogene tiroidne antigene (TG i TPO) i smatra se da je u osnovi progresije GB u autoimuni hipotiroidizam, odnosno HT (83, 136). Klinička srodnost GB i HT dobro je poznata, a dugoročni prirodni tok GB uključuje spontani prelaz autoimunog hipertiroidizma u hipotiroidizam kod jednog dela pacijenata. Jedna od mogućih hipoteza koja objašnjava fluktuaciju autoimunog tiroidnog statusa uključuje nishodnu regulaciju T-regulatornih limfocita koji normalno imaju ulogu kao jedni od glavnih supervizora ovih intermolekularnih imunskih procesa. Pojačana limfocitna infiltracija kod ovih pacijenata je dovedena u vezu sa posledičnom destrukcijom tiroidnog tkiva i razvojem hipotiroidizma (85). Dodatno se smatra da TSHRA_t mogu da vrše modifikaciju ili ushodnu regulaciju različitih antigena, efektorskih molekula ili kostimulatornih proteina (318) koji su uključeni u procese uključene u AITB i GO. Pretpostavka je da TSHRA_t ispoljavaju efekte slične TSH za koji je dokazano da direktno utiče na glikozilaciju tireoglobulina i regulaciju njegove funkcije (319). Širenje antigenskih epitopa je izučavano kod različitih vrsta autoimunih poremećaja, sa tendencijama za primenu ovog fenomena u cilju razvoja novih vidova imunoterapije (320).

Kada je posmatrana razlika u pozitivnosti primenjenih testova u odnosu na tiroidni status pacijenata, uočeno je da je tehnika bioeseja bila značajno osetljivija samo u grupi eutiroidnih ispitanika (*Tabela 18*). Grupa eutiroidnih pacijenata se odnosila na one ispitanike kod kojih je biohemijski eutiroidizam postignut primenom medikamentozne terapije. Potrebno je napraviti razliku između biohemijskog eutiroidizma, koji se odnosi samo na serumske koncentracije tiroidnih hormona, i eutiroidnog oblika GO koji predstavlja karakterističan inflamatorni poremećaj orbite u odsustvu tiroidnih abnormalnosti (klinički manifestovanih ili subkliničkih oblika). Adekvatno kontrolisan tiroidni status obično korelira sa povoljnijim kliničkim tokom GO, tako da je kod eutiroidnih pacijenata očekivana GO niže aktivnosti i/ili težine (43). Izražena osetljivost bioeseja u ovoj grupi pacijenata ukazuje na povećanu sposobnost ove metodologije da prepozna blaže slučajeve orbitopatije, bez evidentnih tiroidnih abnormalnosti.

5.3. Analiza povezanosti TSHRA_t sa kliničkim fenotipom GO

5.3.1. Analiza povezanosti TSHRA_t sa aktivnošću i težinom GO

Uzimajući u obzir visoko varijabilan klinički fenotip GO, kao i problem objektivizacije kliničke evaluacije, sledeći cilj je bio da se ispita potencijalna uloga TSHRA_t kao biomarkera aktivnosti i težine GO. Svrha ovakve analize bila je da se odredi dijagnostički potencijal ovog parametra da detektuje podložnost osobe za razvoj aktivnog i/ili umerenog ili teškog oblika GO. Serumski nivo stimulatorne aktivnosti TSA_b i ukupne koncentracije TBII bio je značajno povezan sa aktivnošću (*Slika 15*) i težinom GO (*Slika 16*). U oba slučaja (TSA_b i TBII), izmerene vrednosti u serumu su bile najmanje u grupi ispitanika sa neaktivnom formom GO (*Slika 15*), kao i u grupi ispitanika sa blagim oblikom GO (*Slika 16*). U ispitivanom uzorku pacijenata, serumski nivoi TSA_b i TBII bili su značajno veći kod aktivne (*Slika 15*) i kod umerene i teške GO koja ugrožava vid (*Slika 16*). Nije detektovana značajna razlika u vrednostima TSHRA_t između ispitanika sa umerenom do teškom i GO koja je ugrožavajuća po vid (*Slika 16*).

Naročit fokus istraživanja je bio na tome da se analizira razlika u karakteristikama različitih testova za određivanje TSHRA_t, odnosno njihove funkcionalne aktivnosti i ukupne koncentracije kao zasebnih parametara za praćenje kliničkog profila GO. Više studija je ukazalo na pozitivnu korelaciju stimulatorne aktivnosti TSA_b sa kliničkim manifestacijama bolesti (137). Grupa istraživača iz Japana je ukazala na blisku povezanost TSA_b, ali ne i TBII, sa glavnim parametrima GO (uvećanje mišića oka, orbitalna adipogeneza i oticanje kapaka) (303). Sa tim u vezi, analizirana je raspodela pozitivnosti rezultata TSA_b i TBII, određenih tehnikom bioeseja i kompetitivnog imunoeseja, redom (*Tabela 19*). Iako je raspodela nivoa TSA_b i TBII u serumu u odnosu na aktivnost i težinu GO bila slična, uočena je značajna razlika u stopi pozitivnosti rezultata TSA_b i TBII. Za razliku od serumske koncentracije TBII, funkcionalna aktivnost TSA_b nije pokazala preklapanje pozitivnih i negativnih rezultata kod pacijenata sa aktivnom GO, kao i kod pacijenata sa umerenim do teškim oblikom GO. Drugim rečima, tehnika bioeseja je dala pozitivan rezultat merenja kod svih pacijenata sa aktivnim oblikom GO (100%), kao i kod svih pacijenata sa umerenom do teškom ili GO koja ugrožava vid. Serumski nivoi TBII su pokazali slabiju sposobnost razlikovanja aktivne i neaktivne GO, kao i blage i umerene do teške/teške

GO. Iako se stopa pozitivnosti značajno razlikovala u svim analiziranim grupama ispitanika u odnosu na aktivnost i težinu orbitopatije (osim u grupi pacijenata sa teškim oblikom GO koja ugrožava vid gde su obe metode dale 100% pozitivnih rezultata), najizraženija razlika u pozitivnosti se uočava u grupi ispitanika sa blagom i aktivnom formom GO. Ovakvi rezultati navode na zaključak da tehnika bioeseja ima naročito veću osetljivost u grupi pacijenata sa blažom kliničkom slikom orbitopatije, što doprinosi superiornosti kliničkih karakteristika tehnike bioeseja i određivanja stimulatorne aktivnosti TSHRA_t u odnosu na rutinsko određivanje ukupne koncentracije ovih antitela (*Tabela 19*). Značajna diskriminatorska sposobnost TSA_b za razlikovanje aktivne i neaktivne GO, kao i blage i umerene ili teške GO je od izuzetne važnosti za praćenje pacijenata i donošenje odluke o započinjanju ili modifikaciji terapije. Imajući ovo na umu, identifikacija TSHRA_t i njihova tačna diferencijacija predstavljaju važan klinički cilj.

5.3.2. Analiza prediktivnog potencijala TSHRA_t

Trenutno ne postoji dostupan prediktivni marker ishoda GO koji bi lekarima olakšao donošenje kliničkih odluka i optimizaciju terapije. Verovatnoću za progresijom kliničkog toka GO povećavaju konzumacija cigareta, nestabilan tiroidni status i tretman radioaktivnim jodom, međutim nijedan od ovih faktora rizika nije se pokazao kao definitivni marker koji bi mogao da se koristi kao marker prognoze toka GO (126). Iz ovih razloga bilo bi značajno uvesti u kliničku praksu serološki parametar, adekvatnog prediktivnog i prognostičkog potencijala, čime bi se olakšala stratifikacija pacijenata, njihovo kontinuirano praćenje i donošenje terapijskih odluka. Dodatna prednost seroloških parametara je neinvazivnost određivanja čime bi se značajno olakšalo praćenje pacijenata, bez česte potrebe za hospitalizacijom. Kako bi se sagledao značaj TSHRA_t kao markera prognoze kliničkog toka i oblika GO, analizirana je prediktivna sposobnost TSA_b u poređenju sa TBII u odnosu na aktivnost i težinu GO. Prediktivna vrednost ovih parametara je ispitana u sklopu univarijantne i multivarijantne binarne logističke analize. Serumski nivo TSA_b značajno je predviđao razvoj aktivnog oblika GO, za razliku od TBII koji nije bio marker rizika aktivnosti GO (*Tabela 20*). Nekoliko istraživačkih grupa ranije je objavilo slične rezultate dobijenim u ovoj studiji. Khoo i saradnici (304) su detektovali značajan prognostički odnos između oftalmopatije i nivoa TSA_b, ali ne i TBII.

Serumski nivoi TSAb i TBII iznad medijane vrednosti za datu populaciju su višestruko povećavale verovatnoću za nastanak umerene ili teške forme GO, pri čemu, iako bez statistički značajne razlike, TSAb je ispoljio bolju prediktivnu sposobnost (*Tabela 21*). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima studije Eckstein i saradnika (126) u kojoj se koncentracija TSHRA_t izdvojila kao nezavisan faktor rizika za razvoj teškog oblika GO.

5.3.3. Raspodela TSAb i TBII u zavisnosti od trajanja simptoma i težine GO

U cilju daljeg sagledavanja prediktivnog potencijala TSHRA_t za razvoj umerenih i teških oblika GO, ispitana je raspodela njihove stimulatorne aktivnosti i ukupne koncentracije u odnosu na trajanje simptoma GO. Zasebno je prvo analizirana raspodela serumskih nivoa TSAb i TBII u različitim vremenskim odrednicama (≤ 6 meseci, 6 meseci do 1 godine, 1 do 2 godine, > 2 godine od prve pojave simptoma GO) (*Slika 17*). Zanimljivo je da su medijane vrednosti TSAb i TBII bile visoke i u grupi pacijenata sa blagom i u grupi pacijenata sa umerenom do teškom/teškom GO koja ugrožava vid, u slučaju kraćeg trajanja simptoma bolesti (≤ 6 meseci). Sa porastom dužine trajanja bolesti postepeno se smanjivao titar TSHRA_t u grupi pacijenata sa blagom GO, dok se u serumu pacijenata sa umerenim i teškim oblikom GO odražavao u relativno visokom opsegu aktivnosti/koncentracija. Najizraženija i statistički značajna razlika u vrednostima medijana TSAb i TBII se uočava kod pacijenata kod kojih je GO trajala preko 2 godine. U ovoj grupi ispitanika, TSAb i TBII pokazuju značajan pad vrednosti kod pacijenata sa blagom GO, dok ostaju značajno veće u serumu pacijenata sa težim oblicima bolesti (*Slika 17*). Održavanje visokog titra TSHRA_t u ranim fazama bolesti, bez obzira na nizak stepen težine GO, potencijalno ukazuje na prognostički karakter ovog biomarkera. Naime, moguće je da visoke vrednosti TSHRA_t, iako se u toj fazi još uvek nije razvila teška GO, ukazuju na tendenciju težine bolesti ka progresiji. Nasuprot tome, nakon 2 godine trajanja GO, jasno se uočava razlika u titru TSHRA_t između pacijenata sa blagom i umerenom do teškom ili teškom orbitopatijom. Nakon 2 godine, bolest preuzima hroničan tok, pa u slučaju blage GO titar TSHRA_t evidentno opada s obzirom da bolest više nije aktivna i karakteriše je blagi stepen težine, dok se visok titar TSHRA_t održava samo u slučaju teških oblika bolesti. Održavanje nivoa TSHRA_t u toku dužeg

vremenskog perioda, u slučaju težih oblika bolesti, ukazuje na značajnu ulogu TSHRA_t u patogenezi GO i održavanju hroničnog stanja autoimunosti u orbiti. Dobijeni rezultati su slični rezultatima Eckstein i saradnika (126), s tim što se u pomenutoj studiji titar TSHRA_t značajno razlikovao u svim vremenskim tačkama, dok je u ovom istraživanju statistički značajna razlika detektovana samo u slučaju dužeg trajanja simptoma (preko 2 godine). Potencijalno objašnjenje ove razlike je različita klasifikacija pacijenata u odnosu na vreme trajanja GO, kao i činjenica da je pomenuta grupa istraživača poredila titar i prevalenciju TSHRA_t između blage i teške forme GO, dok su u ovoj studiji bili uključeni i pacijenti sa umerenim oblikom GO. Samim tim je i očekivano da se dobije mnogo izraženija razlika u titru antitela kod pacijenata sa blagim i pacijenata sa teškim oblikom bolesti. Eckstein i saradnici (126) su dodatno analizirali prognostički potencijal TSHRA_t upotrebom ROC analize, pri čemu su utvrdili da je prognoza težine GO bila moguća kod otprilike polovine pacijenata, u skoro svim ispitivanim vremenskim tačkama.

Osim titra TSHRA_t, analizirana je i raspodela pozitivnosti TSA_b i TBII u odnosu na težinu i dužinu trajanja GO. Što se tiče pozitivnosti rezultata TSA_b, dobijena raspodela odgovara trendu raspodele serumskog nivoa aktivnosti TSA_b. Kod pacijenata sa skorijim početkom simptoma bolesti pozitivnost rezultata TSA_b je bila 100%, bez obzira na težinu orbitopatije. Stopa pozitivnosti rezultata TSA_b značajno opada u grupi ispitanika sa blagom GO u odnosu na visoku stopu pozitivnosti koja se održava kod težih oblika bolesti, sa dužim trajanjem simptoma (> 1 godine). Kod raspodele pozitivnosti rezultata TBII uočava se drugačija situacija. Stopa pozitivnosti rezultata TBII bila je značajno niža u grupi pacijenata sa blagim u odnosu na one sa težim oblikom GO u ranim fazama bolesti, dok se kod pacijenata kod kojih su simptomi trajali preko 1 godine stopa pozitivnosti TBII nije značajno razlikovala u odnosu na težinu bolesti (*Tabela 22*). Ovakav rezultat ukazuje na napredniju osetljivost tehnike bioeseja, kao i prediktivni potencijal u ranim fazama bolesti, u poređenju sa kompetitivnim imunohemijskim metodama. Takođe, ovo ukazuje na bolju sposobnost tehnike bioeseja da detektuje fine razlike u težini GO koje se uočavaju u toku dužeg vremenskog perioda.

Dodatno je detektovana značajna veća stopa pozitivnosti tehnike bioeseja u odnosu na kompetitivni imunoesej kod blagih oblika GO koja je trajala kraće od 1 godine (*Tabela 23*) što

doprinosi tvrdnji o superiornoj osetljivosti ove metode koja je naročito uočljiva kod blage forme GO.

5.3.4. Analiza pojedinačnih oftalmoloških parametara i njihove povezanosti sa TSHRA_t

Kako bi se produbila analiza kliničkog značaja aktivnosti i koncentracije TSHRA_t kod pacijenata sa GO, ispitana je njihova povezanost sa pojedinačnim oftalmološkim parametrima koji ulaze u bodovne sisteme aktivnosti i težine bolesti. Iako se GO prvenstveno karakteriše na osnovu aktivnosti i težine koje predstavljaju skup pojedinačnih znakova i simptoma bolesti, njena klinička prezentacija je veoma heterogena, sa dominantnim različitim simptomima bolesti (34, 321). Pri tome, uočava se da dva različita pacijenta mogu imati isti skor aktivnosti ili težine GO, a različit klinički fenotip bolesti. Kod jednog dela pacijenata su dominantni simptomi poremećaja ekstraokularnih mišića, dok kod drugih dominira ekspanzija adipoznog tkiva. Trenutni epidemiološki podaci ukazuju na veću učestalost poremećaja motiliteta, zadebljanja i fibroze mišića u starijoj populaciji, dok se *de novo* adipogeneza i proliferacija adipocita češće uočava kod mlađih osoba. Kod starijih pacijenata se češće susreću asimetrični i unilateralni oblici GO, a takođe je i češća pojava GO u sklopu HT ili ET (322). Fenotipske razlike GO mogu se barem jednim delom pripisati interindividualnim varijacijama u anatomskoj građi orbite (34). Mnogobrojni dokazi ukazuju na to da fenotipske varijacije orbitalnih fibroblasta usmeravaju ćelijske procese u orbiti. Fibroblasti predstavljaju izrazito heterogenu grupu ćelija koje se razlikuju na osnovu proteinskih, ugljenohidratnih i drugih markera na njihovoj površini. Visoka heterogenost ovih ćelija se ispoljava i u okviru istog tkiva (88). U kulturama orbitalnih fibroblasta starijih pacijenata uočene su jasne histološke razlike u odnosu na fibroblaste mlađih pacijenata, visoke koncentracije prostaglandina i izmena citokinskog miljea ka profibrotskom profilu koji se susreće u hroničnoj inflamaciji (90). Tačni multifaktorski mehanizmi koji uzrokuju ćelijsku divergenciju ovih ćelija još uvek nisu u potpunosti poznati. Predispozicija ovih ćelija za dominantnu adipogenu diferencijaciju ili fibrozu uslovljava razvoj određenog patofiziološkog fenotipa i heterogene prezentacije GO (225, 323). Jedan od fokusa budućih

studija mogao bi biti da se utvrdi na koji način TSHRA_t koreliraju sa različitim klasama orbitalnih fibroblasta i kakvu aktivnost ispoljavaju na njima.

U ovom istraživanju je bilo od interesa da se ispita pojedinačna priroda veze svakog od ovih parametara sa TSHRA_t, kao i da li se neki od njih izdvaja i na koji način. Cilj ovakvog pristupa je bio da se proveriti da li postoje fine, individualne razlike u odnosu TSHRA_t i pojedinačnih oftalmoloških parametara od interesa.

Drugi razlog ove analize bila je visoka stopa subjektivnosti kliničke procene bolesti, kao i subjektivnosti pacijenata kada je u pitanju percepcija bolesti. Često se susreće velika diskrepanca u tome kako pacijenti percipiraju i opisuju pojedinačne simptome GO i kliničke evaluacije istih simptoma. Takođe, postoje velike razlike u subjektivom doživljaju bolesti, odnosno u kojoj meri ona utiče na fizički izgled, radnu, socijalnu sposobnost i opšti kvalitet života pacijenata. Zato se danas insistira na popunjavanju upitnika koji ocenjuju stepen kvaliteta života pacijenata i kontinuiranom praćenju eventualnih promena (8, 9).

Što se tiče parametara koji definišu aktivnost GO, ukupno 5 znakova inflamacije mekih tkiva i 2 simptoma GO ulaze u klinički skor aktivnosti GO (CAS). Osim toga, svaka značajna promena težine GO se pridodaje ukupnom skoru (69). Iako je ovakav klinički pristup trenutno najnapredniji način evaluacije aktivnosti ove kompleksne patologije, postavlja se pitanje koliko je subjektivno ocenjivanje svakog od ovih parametara na osnovu standardnog atlasa sa prikazom fotografija u boji i koliko su reproducibilni rezultati, čak i kada kliničku procenu vrši isti kliničar. Procena pojedinih znakova inflamacije mekih tkiva je naročito komplikovana u nekim situacijama. Crvenilo kapaka često može biti posledica brojnih drugih poremećaja (alergijske reakcije, dermatitis, infekcije, rosacea, itd.) zbog čega ga je neophodno posmatrati u sklopu ostalih simptoma (34, 324, 325). Periorbitalni edemi kapaka mogu se javiti kao normalna posledica starenja, a u velikoj meri zavise od fizionomije i telesne mase čoveka. Najbolji način za pravilnu procenu ovog parametra je poređenje sa prethodnim stanjem (34). Takođe, otoci kapaka susreću se često i u drugim stanjima (infekcija, alergijske reakcije, uticaj toksina, nefrotski sindrom, itd.) (325). Mana ovakvog sistema ocenjivanja se ogleda i u tome što prisustvo svih znakova/simptoma koji se određuju nosi jednak broj poena u ukupnom skoru (po 1 poen), a što nije adekvatan pristup. Drugi problem je nemogućnost kvalitetnog određivanja skora u slučaju delimičnog poboljšanja ili pogoršanja nekog od znakova ili simptoma GO, s obzirom

da CAS uključuje binarni sistem ocenjivanja, odnosno svakom parametru je moguće dodeliti samo 0 ili 1 poen (56). Bilo bi od interesa u budućim istraživanjima da se prate pacijenti kod kojih je došlo do delimičnog poboljšanja nekog od znakova/simptoma aktivnosti GO, te da se kod njih ispita da li se uočava promena u titru ili prevalenciji TSA_b i TBII. Ukoliko bi se detektovala značajna promena u nivou TSHRA_t, dalje bi se moglo pristupiti određivanju specifičnih *cut-off* vrednosti TSHRA_t koje bi odgovarale ovakvim promenama.

Što se tiče evaluacije težine GO, prema preporučenoj EUGOGO klasifikaciji (67) parametri koji se posmatraju su: stepen inflamacije mekih tkiva orbite, stepen proptoze, retrakcija kapaka, prisustvo i karaktera diplopija i vizus, odnosno stepen izloženosti rožnjače i pad oštine vida usled distiroidne optičke neuropatije, keratitisa ili ulcera rožnjače. Zahvaćenost ekstraokularnih mišića se, osim prisustva i klase diplopija, procenjuje i na osnovu stepena restrikcije motiliteta oka, kao i objektivnim merenjem debljine mišića tehnikama ultrazvuka ili CT (34, 56). Diferencijalna dijagnostika pojedinačnih znakova i simptoma koji karakterišu težinu GO može biti veoma kompleksna, s obzirom na to da mnogi od njih mogu biti posledica drugih bolesti. Iako je retrakcija kapaka najčešći simptom GO, on može da bude i fiziološka pojava prisutna kod izvesnog broja novorođenčadi, a u izvesnom stepenu i kod odraslih osoba. Takođe, ona može biti posledica Parkinsonove bolesti i tireotoksikoze. Restrikcija ekstraokularnih mišića može da se javi usled miozitisa i mijastenije gravis, dok se proptoza javlja kao posledica tumora, vaskularnih lezija i inflamatornih bolesti (325). Normalno je da pokretljivost oka opada sa starenjem (56). Smanjenje oštine vida je neophodno posmatrati u širem kontekstu, nakon isključenja svih drugih mogućih uzroka i uključivanja distiroidne optičke neuropatije, keratitisa ili ulcera rožnjače.

Najpre je analizirana povezanost aktivnosti i koncentracije TSHRA_t sa pojedinačnim oftalmoloških parametrima GO. Značajno veća aktivnost TSA_b uočava se u serumu pacijenata kod kojih su bili prisutni sledeći znakovi i simptomi GO: blagi iritabilni simptomi, crvenilo kapaka, crvenilo konjunktiva, inflamacija plike i karunkule, hemoza i lagofthalmus. Povećane vrednosti TBII koncentracije su bile prisutne kod pacijenata sa crvenilom konjunktiva, inflamacijom plike i karunkule i hemozom (*Tabela 25*). Dobijeni rezultati odgovaraju zaključcima prethodnih studija, u kojima su znaci inflamacije mekih tkiva orbite dovedeni u vezu sa značajno višim vrednostima TSA_b i TBII (125, 326).

Sledeća je ispitana razlika u pozitivnosti rezultata TSAb i TBII u odnosu na svaki od navedenih parametara. Zanimljivo je da je razlika u pozitivnosti, odnosno osetljivosti primenjenih testova, bila naročito uočljiva za početne i blaže znakove i simptome GO (retrakcija kapaka, iritabilni simptomi, fotofobija), dok je u slučaju prisutnih znakova i simptoma karakterističnih za veći stepen aktivnosti GO (spontani ili stalni retrobulbarni bol, hemoza, inflamacija plike i karunkule, izraženo crvenilo konjunktiva i kapaka) ili uznapredovalu bolest (fibroza ekstraokularnih mišića, pad funkcije vida, lagofthalmus) pozitivnost rezultata obe primenjene metode bila visoka. Stopa pozitivnosti rezultata TSAb bila je značajno veća i u slučaju ispoljenih diplopija, znakova ograničene pokretljivosti i uvećanja ekstraokularnih mišića i proptoze (*Tabela 26*).

Dodatno je TSAb prepoznat kao prediktivni marker za pojavu iritabilnih simptoma, hemoze, inflamacije plike i karunkule, crvenila konjunktiva i retrobulbarnog bola, dok nivo TBII nije imao prediktivne karakteristike (*Tabela 30*). Slični rezultati dobijeni su u studiji Goh i saradnika (318) gde je TSAb bio nezavisan prediktivni marker kliničkih karakteristika GO, dok TBII nije imao prediktivnu sposobnost. Oni su opisali najveću prediktivnu sposobnost TSAb za razvoj znakova i simptoma težine GO (retrakcija kapaka, proptoza, poremećaj motiliteta oka), dok je u našem istraživanju TSAb prvenstveno bio prediktor aktivnosti GO.

Proptoza predstavlja parametar koji je izrazito varijabilan u pogledu načina merenja i interindividualnih razlika pacijenata. Stepent proptoze se direktno meri najčešće pomoću Hertelovog egzoftalmometra, a rezultati merenja zavise od pola, starosti, rase i anatomije lobanje. Zato se kao značajan stepent proptoze navodi vrednost koja je za ≥ 3 mm iznad prosečne za rasu i pol, a ne kao vrednost iznad granične (62, 63). Problem je u tome što su podaci o populacionim referentnim intervalima ovog parametra retki i razlikuju se vrednosti dobijene u različitim studijama, zbog čega je onemogućeno adekvatno poređenje bazalnih vrednosti. U studiji sprovedenoj na holandskoj populaciji (327), gornja granica referentnog intervala za žene je bila 16 mm, a za muškarce 20 mm. Od značaja bi bilo da se u svakoj zemlji odrede referentni intervali ovog parametra, specifični za tu populaciju, zavisni od pola i godina starosti. U ovom istraživanju nije detektovana statistički značajna razlika u vrednostima egzoftalmosa između muškaraca i žena (*Slika 18*), niti je postojala značajna korelacija ovog parametra sa godinama starosti. Ograničenje ovog rezultata je nedostatak bazalnih vrednosti egzoftalmusa za svakog od pacijenata, pre razvoja simptoma orbitopatije. Takođe, kod nekih osoba se bazalna vrednost

egzoftalmusa značajno razlikuje od referentnih zbog specifičnosti građe lobanje i orbita. Upravo iz ovog razloga, važno je praćenje ovog parametra i detekcija bilo kakve promene. Drugi uzrok varijabilnosti rezultata egzoftalmometrije je upotreba neuniformisanih i nestandardizovanih aparata (Hertelovih egzoftalmometra), kao i interindividualna varijabilnost kliničara (34).

Nivo serumske aktivnosti i koncentracije TSHRA_t u serumu nije značajno korelirao sa vrednostima proptoze ispitivanih pacijenata u ovoj studiji. Kao što je već navedeno, stopa pozitivnosti rezultata TSA_b bila je značajno veća u odnosu na TBII kod pacijenata sa ispoljenom proptozom (*Tabela 26*). Dodatno su upoređene vrednosti TSA_b i TBII između pacijenata kod kojih nije bila prisutna proptoza, kod pacijenata sa blagim, umerenim i teškim stepenom proptoze (126). Iako se uočava jasan trend proporcionalnog porasta TSA_b (*Slika 22a*) i TBII (*Slika 22b*) sa povećanjem stepena proptoze, dobijene razlike nisu dostigle granicu statističke značajnosti. Prilikom tumačenja dobijenih rezultata treba uzeti u obzir neravnomernu distribuciju ispitanika u grupama i naročito mali broj ispitanika kod kojih nije detektovana proptoza i onih sa blagom proptozom, što može značajno da utiče na adekvatnu statističku analizu.

Poređenjem zastupljenosti različitih klasa proptoze (odsutna, blaga, umerena, teška) u kvartilima TSA_b aktivnosti, uočava se linearan trend porasta, pri čemu TSA_b vrednosti rastu uporedno sa težinom proptoze (*Slika 23a*). Zavisnost koncentracije TBII i stepena proptoze nije bila linearnog karaktera, već je udeo pacijenata sa teškim oblikom proptoze bio sličan u drugom i četvrtom kvartilu koncentracija TBII (*Slika 23b*). Dobijeni rezultati su slični zapažanjima Goh i saradnika (318) koji su sličnu diskrepancu uočili u odnosu TSA_b i TBII sa retrakcijom kapaka, stepenom proptoze i otokom kapaka. Jedan od potencijalnih razloga ovakvog neočekivanog odnosa kvartila TBII koncentracija i stepena proptoze je analitičke prirode. Kako je imunohemijska metoda za određivanje ukupne koncentracije TSHRA_t dizajnirana tako da detektuje vezivanje heterogene grupe TSHRA_t za TSHR, ne može se u potpunosti odbaciti mogućnost ukrštene reaktivnosti sa drugim antitelima prisutnim u AITB i GO. U ispitivanom uzorku pacijenata, najveća prevalencija antiTGA_t detektovana je kod pacijenata čije su koncentracije TBII upadale u drugi kvartil vrednosti, u kome je uočena najveća diskrepanca u trendu stepena proptoze u odnosu na vrednosti TSA_b. Hipotetički bi bilo moguće da antiTGA_t okupiraju deo vezujućih mesta na receptorima reagensa čime uzrokuje sniženu koncentraciju TBII dok je stimulatorna aktivnost

ovih antitela ostala neizmenjena, usled drugačijeg principa merenja funkcionalne aktivnosti TSHRA t koji se ne oslanja na fizičko vezivanje za receptor.

Pošto proptoza predstavlja jedan kompenzatorni mehanizam koji za cilj ima smanjenje intraokularnog pritiska, veoma je važno uočiti pojavu i značajnu promenu stepena proptoze. Od posebnog je značaja prepoznati pacijente kod kojih izostaje merljiva proptoza, a koji imaju znakove zadebljanja ekstraokularnih mišića. Smatra se da su ovi pacijenti u posebnoj opasnosti od razvoja distiroidne optičke neuropatije (34).

Poremećaj ekstraokularnih mišića se može detektovati primenom objektivnih načina kvantifikacije pokretljivosti oka (ograničenje pokretljivosti se izražava u stepenima, pri čemu se prate pokreti elevacije, abdukcije, addukcije i depresije oka) (328) ili subjektivnog diplopija skora (69). Različite metode kvantifikacije dismotiliteta očiju su u upotrebi, a detekcija suptilnih razlika između gradusa je ponekad izuzetno zahtevna (56). Upotreba diplopija skora ima nekoliko ograničenja. Kao prvo, moguće je propustiti značajne promene u restrikciji motiliteta oka ukoliko se samo na ovaj način ispituje stepen disfunkcije ekstraokularnih mišića (34). Drugim rečima, odsustvo diplopija ne isključuje disfunkciju ekstraokularnih mišića (56). Kao drugo, diplopija skor je subjektivan i ponekad nije u potpunosti jasna razlika između pojedinih klasa, odnosno gradusa diplopije (intermitentne koje se javljaju pri umoru oka, nestalne koje se javljaju u ekstremnim položajima oka, konstantne koje su prisutne u osnovnom položaju oka i mogu se korigovati upotrebom prizmi i konstantne koje se ne mogu korigovati pomoću prizmi). Stepenn individualne percepcije diplopija se značajno razlikuje i zavisi od profesije koju pacijent obavlja i životnih navika. Na primer, osoba može dobro da toleriše značajno ograničenje pokretljivosti mišića oka tokom dana i da tek usled umora počne da percipira duple slike (gradus I). Sa druge strane, osoba koja stalno koristi periferni vid (zbog profesije, npr. taksista, pilot) lošije će tolerisati manji stepen ograničenja motiliteta oka i povremeno će percipirati duple slike prilikom ekstremnih pogleda (gradus II) (34, 56). Iz ovih razloga je izuzetno važno primeniti i objektivne tehnike vizualizacije za procenu zahvaćenosti ekstraokularnih mišića (CT, ultrazvuk).

U ovoj studiji je ispitana povezanost serumskih nivoa TSHRA t i zahvaćenosti ekstraokularnih mišića, procenjene na osnovu sve tri pomenute metode (skor diplopija, stepen ograničenja pokretljivosti oka i CT/ultrazvučno merenje debljine i fibroznih promena ekstraokularnih mišića).

Prvo je analizirana raspodela aktivnosti i ukupne serumske koncentracije TSHRA_t u odnosu na skor diplopija (odsutne diplopije, povremene diplopije koje se javljaju pri umoru oka, nestalne diplopije koje se javljaju u ekstremnim pozicijama oka i stalne diplopije). Datom analizom nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u vrednostima TSA_b (*Slika 19a*) i TBII (*Slika 19b*) između ispitivanih grupa pacijenata. Iako je stopa pozitivnosti rezultata TSA_b u odnosu na TBII bila značajno veća u celokupnom uzorku pacijenata sa manifestnim diplopijama (*Tabela 26*), nije detektovana značajna razlika u pozitivnosti testova u zasebnim klasama diplopija (*Tabela 27*). Potencijalna objašnjenja ovakvog rezultata su: neravnomerna distribucija pacijenata, mali broj pacijenata u pojedinim grupama, kao i veoma suptilne razlike između pojedinih klasa diplopija (npr. povremene i nestalne diplopije) sa mogućim preklapanjem. U prethodnim studijama je uglavnom opisana značajna povezanost prisustva diplopija i vrednosti ili prevalencije TSHRA_t (300), međutim nije analizirana njihova asocijacija u zasebnim klasama diplopija.

Što se tiče restrikcije motiliteta očiju, nije zapažena značajna razlika u medijani vrednosti TSA_b (*Slika 20a*) i TBII (*Slika 20b*) kod pacijenata sa normalnim motilitetom, pacijenata sa ograničenim motilitetom i pacijenata sa potpuno onemogućenim pokretima oka (fiksacija bulbusa). Stopa pozitivnosti rezultata TSA_b je bila značajno veća u odnosu na stopu pozitivnosti TBII, kod pacijenata sa detektovanom restrikcijom pokretljivosti oka (*Tabela 28*).

Daljom analizom raspodele serumskih nivoa i prevalencije TSHRA_t u odnosu na fizičke promene ekstraokularnih mišića (zadebljanje, fibroza), nije detektovana značajna razlika medijana TSA_b (*Slika 21a*) i TBII (*Slika 21b*) kod pacijenata bez registrovanih promena, kod pacijenata sa izmerenim zadebljanjem i pacijenata sa fibroznim promenama ekstraokularnih mišića. Zanimljivo je bilo da su dobijene vrednosti i TSA_b i TBII bile najveće u grupi pacijenata kod kojih je detektovano zadebljanje mišića. Najverovatnije objašnjenje ovakvog rezultata je mali broj pacijenata kod kojih su registrovane fibrozne promene, kao i nepotpuni klinički podaci (nedostatak rezultata CT i ultrazvučnog pregleda orbite). Paralelno je i stopa pozitivnosti rezultata TSA_b bila značajno veća u odnosu na TBII kod istih pacijenata, odnosno u grupi ispitanika sa različitim stepenom zadebljanja mišića (*Tabela 29*). Donekle je i očekivano da osetljiviji testovi pokazuju veću stopu pozitivnosti u grupi pacijenata sa registrovanim

zadebljanjem ekstraokularnih mišića. Ova morfološka karakteristika GO prethodi fibrozi, a suptilne promene ekstraokularnih mišića su karakteristika početnih faza bolesti.

5.4. Evaluacija analitičkih i dijagnostičkih karakteristika imunohemijske CLIA metode (IMMULITE[®] 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA_t

U ovom istraživanju je, pored kompetitivnog imunohemijskog testa za određivanje ukupne koncentracije TSHRA_t koji se uobičajeno koristi u rutinskoj laboratorijskoj praksi i tehnike bioeseja kojom je kvantifikovana funkcionalna aktivnost ovih antitela, upotrebljena i relativno nova metoda (IMMULITE[®] 2000 TSI) koja se zasniva na „sendvič“ imunohemijskom principu vezivanja receptora. Data metoda koristi CLIA princip merenja koncentracije TSHRA_t, odnosno detekcije hemiluminescentnog signala proporcionalnog prisutnoj koncentraciji analita u uzorku (202). Proizvođač primenjenog testa navodi stimulatorna TSHRA_t kao analit čije se prisustvo detektuje i koncentracija kvantifikuje u uzorku, što je postignuto primenom rekombinantnog humanog TSHR, odnosno epitopa za vezivanje TSHRA_t stimulatorne biološke aktivnosti (202). Međutim, dosadašnji literaturni podaci dovode u pitanje specifičnu detekciju stimulišuće klase antitela, s obzirom na to da metoda primenjuje isti princip merenja kao i rutinski imunohemijski testovi, odnosno meri stepen vezivanja antitela za TSHR (191, 329, 330). U cilju detaljne komparativne analize primenjenih laboratorijskih testova u ovom istraživanju, neophodno je bilo da se prvo pristupi verifikaciji IMMULITE[®] 2000 TSI metode, s obzirom da se prvi put koristila u našim laboratorijskim uslovima. Dodatno je neophodno napomenuti da je ova metoda nova na našem tržištu i nije do sada korišćena u rutinskoj praksi.

Svaki put kada se analitička metoda prvi put primenjuje u novim laboratorijskim uslovima neophodno je pristupiti njenoj verifikaciji kako bi se obezbedili dokazi da se analitičke karakteristike koje je definisao proizvođač mogu reprodukovati u lokalnim laboratorijskim uslovima, odnosno u laboratoriji gde će se ta metoda rutinski koristiti. Time se proverava da li su ispunjeni minimalni kriterijumi definisani validacijom metode u realnim uslovima u kojima se metoda izvodi (331). Verifikacija analitičkih performansi metoda podrazumeva pre svega

proveru preciznosti metode i proveru tačnosti, odnosno *biasa* metode. Provera preciznosti, odnosno nepreciznosti metode obuhvata određivanje nepreciznosti u seriji, između serija, iz dana u dan i ukupne nepreciznosti unutar laboratorije. Nepreciznost metode opisuje slučajnu grešku merenja koja se uvek u manjoj ili većoj meri javlja u laboratorijskom radu, kao posledica varijabilnih reakcionih uslova, pripreme i pipetiranja uzoraka, interindividualne i intraindividualne varijacije operatera, itd. Nepreciznost metode se proverava uzastopnim merenjima istog uzorka i analizom stepena varijabilnosti dobijenih rezultata (294, 331, 332). Tačnost metode se odnosi na proveru odstupanja rezultata od pravih vrednosti, što se postiže poređenjem izmerenih vrednosti uzoraka sa vrednostima dobijenim drugom metodom, idealno referentnom (323). Osim evaluacije preciznosti i tačnosti analitičkih metoda, verifikacija može podrazumevati i proveru linearnosti i verifikaciju referentnog intervala u lokalnim laboratorijskim uslovima (331).

Prvobitno je ispitivana nepreciznost IMMULITE®2000 TSI imunohemijske metode upotrebom dva nivoa komercijalnih kontrolnih uzoraka tačno definisanih srednjih vrednosti i dozvoljenog opsega merenja. U radu su ispitivani nepreciznost u seriji, između serija, ponovljivost metode, nepreciznost iz dana u dan i nepreciznost unutar laboratorije, odnosno nesigurnost merenja rezultata. Dobijene vrednosti K_v za ponovljivost merenja (3,15% i 3,50%, za kontrolni nivo 1 i 2, redom) i nepreciznost unutar laboratorije (2,2% i 2,6%, za kontrolni nivo 1 i 2, redom) su zatim upoređene sa vrednostima koje je naveo proizvođač, na osnovu čega je zaključeno da su značajno niže što ukazuje na to da je metoda uspešno reprodukovana u laboratorijskim uslovima u kojima je izvedena. Izračunati K_v za nepreciznost u seriji (4,9% i 3%, za kontrolni nivo 1 i 2, redom) i između serija (4,6% i 2,7%, za kontrolni nivo 1 i 2, redom) su bile značajno niže od maksimalnih dozvoljenih varijacija prema preporukama FDA vodiča za validaciju i verifikaciju analitičkih metoda (295). Za sada nema zvaničnih podataka o biološkoj varijabilnosti za TSI, zbog čega je moguće samo upoređivanje dobijenih vrednosti ukupne merne nesigurnosti (3,23% i 3,81%, za kontrolni nivo 1 i 2, redom) i proširene nesigurnosti merenja rezultata (6,46% i 7,61%, za kontrolni nivo 1 i 2, redom), sa vrednostima koje je definisao proizvođač ispitivane metode, a ostaje na budućim istraživanjima da ispituju odstupanje i ukupnu grešku metode.

Sledeća je ispitana tačnost IMMULITE®2000 TSI metode, poređenjem sa rutinskom imunohemijskom metodom kojom se određuje ukupna koncentracija TSHRA_t (Elecsys Anti-

TSHR) proizvođača Roche. Ova rutinska metoda je izabrana kao standardna metoda koja je u širokoj rutinskoj upotrebi u većini kliničko-biohemijskih laboratorija. Drugi razlog je taj što se rezultati obe metode izražavaju u istim jedinicama SI sistema (IU/L), pa se kao takvi mogu međusobno porediti, kako bi se kvantifikovala sistematska greška merenja u našim laboratorijskim uslovima. Uprkos postojanju statistički značajne korelacije uporedno dobijenih rezultata sa dve analizirane metode, utvrđeno je da postoji značajno odstupanje u njihovim vrednostima, sa relativnim biasom od 24,5%. Dodatno je regresionom analizom utvrđeno postojanje konstantnog odstupanja rezultata dobijenih ispitivanim metodama, što potvrđuje da se ove dve metode ne mogu uporedno koristiti, odnosno da ne mogu zameniti jedna drugu. Dobijeno odstupanje se može objasniti različitim principima detekcije ispitivanih metoda, kao i različitim epitopa TSHR koje one koriste.

Nakon evaluacije analitičkih karakteristika IMMULITE®2000 TSI metode, ispitane su njene dijagnostičke karakteristike, odnosno njena klinička upotrebljivost za pravilno postavljanje i isključivanje dijagnoze GO. U cilju kliničke evaluacije, uporedno sa uzorcima pacijenata sa GO, su analizirani uzorci kontrolnih ispitanika. Na ovaj način je utvrđeno kakva je diskriminaciona sposobnost ispitivane metode za detekciju pacijenata (dijagnostička osetljivost metode), kao i za detekciju zdravih ispitanika (dijagnostička specifičnost metode), odnosno kolika je njena dodatna vrednost kliničkoj dijagnostici. Pozitivan rezultat određivanja je dobijen kod 80,9% analiziranih pacijenata, što ukazuje na sposobnost metode da se pravilno uključi dijagnoza kod 80,9% ispitanika koji imaju GO. Drugim rečima, na ispitivanoj populaciji pacijenata IMMULITE®2000 TSI metoda je ispoljila dijagnostičku osetljivost od 80,9%. Ni kod jednog od kontrolnih uzoraka nije dobijen pozitivan rezultat određivanja, što ukazuje na dijagnostičku specifičnost od 100%, odnosno sposobnost testa da isključi dijagnozu kod 100% zdravih ispitanika. Uporedno sa visokom specifičnošću date metode je dobijena i NPV od 100%, što ukazuje na to da se sa visokom sigurnošću može isključiti dijagnoza GO u slučaju negativnog rezultata. Sa druge strane, dobijena je relativno niska PPV (57,5%), odnosno verovatnoća da je pozitivan rezultat dobijen kod osobe sa GO. Daljom ROC analizom je utvrđeno da se snižavanjem cut-off vrednosti u odnosu na onu koju je deklarirao proizvođač, na analiziranom uzorku pacijenata, odnos osetljivosti i specifičnosti poboljšavaju (93% i 100%, osetljivost i specifičnost, redom), sa odličnom vrednošću AUC koja ukazuje na visoku kliničku vrednost ispitivane metode.

5.5. Komparativna analiza dijagnostičkih karakteristika tri metode za određivanje TSHRA_t (bioesej, rutinska kompetitivna imunohemijska ECLIA metoda i imunohemijska CLIA metoda)

Nakon detaljne analize kliničkog značaja funkcionalne aktivnosti i koncentracije TSHRA_t kod pacijenata sa GO, dalji fokus ovog istraživanja je bio da se izvrši komparativna analiza dijagnostičkih karakteristika ovih biomarkera, odnosno različitih analitičkih metoda za njihovo određivanje. U tu svrhu su ispitivane dijagnostičke karakteristike tehnike bioeseja (Thyretain TSAb bioassay), nove „sendvič“ CLIA metode (IMMULITE®2000 TSI) i rutinske, kompetitivne ECLIA metode (Elecsys Anti-TSHR), u celokupnom uzorku pacijenata i u odnosu na klinički fenotip GO.

Preduslov za kliničku upotrebu svakog dijagnostičkog sredstva je analiza njegove dijagnostičke tačnosti u specifičnoj populaciji u kojoj će se koristiti (334, 335). Kada je u pitanju evaluacija dijagnostičke tačnosti, prethodno su definisane tri glavne uloge novog dijagnostičkog testa: zamena (novi test zamenjuje postojeću, standardnu metodu), trijaža (novi test se koristi pre postojećeg, kao skrining metoda visoke specifičnosti u cilju smanjenja broja lažno pozitivnih rezultata) i dodatak (novi test se koristi nakon postojećeg, standardnog testa, pri čemu je povećana osetljivost i stopa detekcije). Procena dijagnostičke tačnosti predstavlja glavni korak u uvođenju novih biomarkera i laboratorijskih testova u rutinsku kliničku praksu. Predviđeni klinički cilj biomarkera (rana i tačna dijagnoza, skrining, predikcija, prognoza, monitoring, itd.) je jasno uputstvo za to kako će se test koristiti, odnosno koju će kliničku ulogu imati. Klinička uloga novog kandidat testa definiše korake u procesu evaluacije njegove kliničke tačnosti i statističke metode koje će se koristiti (334).

Fokus ove studije je na ispitivanju kliničke vrednosti kandidat metode koja bi zamenila postojeću, standardnu metodu za detekciju TSHRA_t (tradicionalni kompetitivni immunoeseji). U tu svrhu su ispitane dijagnostičke karakteristike TSAb bioeseja i „sendvič“ CLIA metode u odnosu na standardnu kompetitivnu ECLIA metodu koja je u rutinskoj upotrebi. Varijabilnost njihovih performansi je analizirana kod svih pacijenata, kao i u odnosu na aktivnost, težinu i trajanje GO. Potrebno je obrazložiti zašto je predloženo da novi kandidat test za analizu TSHRA_t ima ulogu zamenske metode, a ne trijažnog ili dodatnog testa koji se koriste u kombinaciji sa

rutinskom metodom. Cilj uvođenja trijažnog testa je skrining određenog stanja, odnosno smanjenje upotrebe postojeće metode koja je invazivna. Samo u slučaju pozitivnog rezultata skrining metode pristupa se izvođenju postojeće metode (334, 335). Klinički fokus u slučaju dijagnostike GO i AITB je povećanje dijagnostičke osjetljivosti testova, što je cilj uvođenja dodatnog testa koji po pravilu predstavlja metodu veće osjetljivosti u odnosu na postojeću. Međutim, pravilo po kojem se koristi dodatni dijagnostički test podrazumeva njegovu upotrebu samo u slučaju negativnog rezultata postojeće, rutinske metode, kako bi se smanjila stopa lažno negativnih rezultata (334). Iako bi se problem osjetljivosti na ovaj način rešio, i dalje bi u slučaju pozitivnog rezultata tradicionalnog kompetitivnog imunoeseja ostalo nepoznato da li je detektovano TSHRA_t stimulirajuće ili blokirajuće aktivnosti. Upravo iz ovog razloga, jedina moguća klinička uloga predloženog, novog testa za detekciju TSHRA_t je uloga zamenske metode.

Zadovoljavajuće dijagnostičke karakteristike, pre svega visoka osjetljivost seroloških metoda za detekciju TSHRA_t su imperativ za tačnu i blagovremenu diferencijalnu dijagnozu GO. Veoma osjetljive metode su neophodne za adekvatno prepoznavanje različitih kliničkih fenotipa ove bolesti. Za kliničare, ova karakteristika je od najveće važnosti, jer definiše dalje korake u kliničkom menadžmentu GO. 100% osjetljivost i 100% NPV za detekciju aktivne i umerene ili teške GO znači da nijedan takav pacijent neće ostati nedetektovan i da će negativan rezultat testa svakako isključiti progresivan oblik bolesti. Za ove pacijente je neophodno da dobiju odgovarajuću terapiju i veća je verovatnoća da će razviti GO koji ugrožava vid i zahteva hitno lečenje (67). Dodatno, pouzdan i neinvazivan serološki test je izvodljivo rešenje prve linije, posebno ako detaljna klinička procena u jedinicama tercijarne nege nije lako dostupna za pacijenta. Visoka osjetljivost metoda koje kvantifikuju TSHRA_t ima naročitu kliničku vrednost u slučaju eutireoidnog oblika GO, specifičnog kliničkog stanja čija je diferencijalna dijagnoza posebno komplikovana i u potpunosti zavisi od serološke potvrde GO (297).

U ovom radu je prethodno objašnjena superiornost kliničkih performansi tehnike ćelijskog bioeseja u odnosu na rutinski test kompetitivnog imunovezivanja. Bioesej je ispoljio značajno veću osjetljivost (100%) za razlikovanje aktivne i neaktivne, kao i blage i umerene ili teške forme u odnosu na kompetitivni imunoesej (*Tabela 19*). Razlika u kliničkim performansama ovih testova bila je naročito izražena u grupi pacijenata sa ET oblikom GO.

Dobijeni rezultati ovog istraživanja ukazuju na nešto bolje dijagnostičke performanse „sendvič“ CLIA metode u poređenju sa tradicionalno korišćenim ECLIA kompetitivnim testom, ali očigledno značajno lošije u poređenju sa tehnikom bioeseja. Samo kod pacijenata sa aktivnom GO, karakteristike „sendvič“ imunoeseja nisu se značajno razlikovale u odnosu na TSAAb bioesej, iako je bio uključen mali broj pacijenata. Zanimljivo je da ni u jednoj od analiziranih grupa pacijenata, „sendvič“ imunoesej nije bio značajno osetljiviji od tradicionalnog imunoeseja. Nasuprot tome, funkcionalni biološki test je pokazao značajno veću stopu dijagnostičke osetljivosti u odnosu na rutinski imunohemijski test u svim ispitivanim grupama pacijenata. Značajno veća dijagnostička osetljivost bioeseja u odnosu na oba vezujuća imunoeseja bila je najistaknutija kod pacijenata sa blažom kliničkom prezentacijom GO (neaktivna GO, blaga GO, niska stimulatorna aktivnost TSAAb) (*Tabela 38*). Ovo sugeriše da bi bioesej bio najbolji izbor u dijagnostici i tretmanu atipičnih oblika GO, bez znakova zapaljenja i abnormalnosti štitne žlezde (208). U skladu sa ovim, varijabilnost kliničkih karakteristika bila je posebno primetna u grupi pacijenata sa ET GO, gde je tehnika bioeseja jedina ispoljila zadovoljavajuću stopu pozitivnosti.

Visoka stopa kliničke osetljivosti tehnike bioeseja praćena je i visokom analitičkom osetljivošću ove metode, kako je prethodno zaključeno u studijama serijskih razblaženja. U ovim studijama je ova tehnika pokazala pozitivnost pri mnogo većem razblaženju seruma u poređenju sa imunohemijskim testovima vezivanja (87).

Dvostruka stimulirajuća i blokirajuća aktivnost TSHRAAt uočena je kod jedne pacijentkinje sa GB. Interesantno je da je primenom „sendvič“ imunoeseja dobijen negativan rezultat kod ove pacijentkinje. Potencijalna objašnjenja ovakvog rezultata mogu biti promenljiv afinitet i koncentracija TSAAb i TBAb (170), moguća međusobna neutralizacija antitela, kao i problem analitičke specifičnosti upotrebljenog himernog TSHR. Epitopi TSAAb i TBAb nisu u potpunosti različiti entiteti, već pokazuju visok nivo preklapanja. Na nativnom TSHR, mesta vezivanja TSAAb i TBAb su smeštena fizički blizu jedna drugom. Blokirajuće antitelo (TBAb) se vezuje za epitop B koji je odvojen od mesta vezivanja TSAAb (epitop A1), kao i za epitop A2 koji je blizak epitopu A1 (336, 112). Iz ovih razloga je sposobnost imunoeseja da specifično meri koncentraciju stimulišućih antitela i precizno ih razlikuje od onih sa blokirajućom aktivnosti upitna kada su istovremeno prisutni u uzorku pacijenta (308). U prilog tome, prethodno je objavljeno da „sendvič“ imunoesej nije mogao da napravi razliku između TBAb i TSAAb (330).

Kako bi se detektovale fine promene u funkcionalnom karakteru TSHRA_t za koje se smatra da su odgovorne za postizanje remisije ili relapsa hipertiroidizma i promene kliničke prezentacije GO, neophodna je upotreba preciznih metoda, visoke specifičnosti i osetljivosti.

Rutinski kompetitivni imunoeseji mere ukupnu koncentraciju TSHRA_t, odnosno neto zbir stimulirajućih, blokirajućih, pa čak i neutralnih antitela. Bioesej direktno meri stvaranje cAMP-a i time funkcionalnu aktivnost TSHRA_t koja uzrokuje određeni klinički tok GB i GO. Nasuprot tome, sve imunohemijske tehnike koje su danas u upotrebi mere nivo vezivanja antitela za receptor koji u velikoj meri zavisi od epitopa, afiniteta i koncentracije antitela (308). Prema tvrdnjama proizvođača, „sendvič“ imunoesej koristi rekombinantni humani TSHR (MC4), navodno specifičan za TSA_b (202). Međutim, pokazalo se da se ćelijske linije koje eksprimiraju MC4 mogu koristiti i za kvantifikaciju TBA_b (383, 149). Dodatno, analitička specifičnost ove tehnologije nikada nije dokazana, a nespecifična detekcija TBA_b je prijavljena u nekoliko studija (191, 329, 330). U animalnom modelu GB, razvijenom imunizacijama sa ekstracelularnim domenom TSHR, „sendvič“ imunoesej nije razlikovao funkcionalnost TSHR, već je dao pozitivne rezultate i u TSA_b i TBA_b pozitivnim uzorcima (337). Na osnovu navedenog može se izvesti zaključak da ova metoda predstavlja standardni test vezivanja antitela za receptor, nesposoban da odredi funkcionalni efekat TSHRA_t, što znači da biološki testovi pružaju širu informaciju o tačnom inflamatornom statusu kod pacijenata sa GO.

Dodatna analitička prednost metode bioeseja je odsustvo analitičkih interferencija karakterističnih za imunohemijske testove gde se vrši fizičko vezivanje antitela za receptor (uticaj biotina kod ECLIA metode, uticaj heterofilnih antitela, efekat prozona, ukrštena reaktivnost antitela/antigena reagensa sa drugim analitima prisutnim u uzorku, itd.).

Međutim, praktični aspekti se moraju imati na umu tokom kliničke validacije testa, prvenstveno odnos troškova i koristi implementacije novih tehnologija u svakodnevnu praksu (335, 182). Superiorna klinička svojstva u poređenju sa postojećom metodologijom moraju biti izbalansirana sa: invazivnošću, cenom, izvodljivošću, dostupnosti metode, vremenom potrebnim za dobijanje rezultata, kompleksnošću izvođenja itd. (335). Uprkos značajnom tehnološkom napretku u metodologiji bioeseja, izvodljivost njihove rutinske upotrebe je i dalje upitna, posebno u manjim zemljama u razvoju. Za sada se ova tehnika primenjuje samo u nekoliko velikih, referentnih laboratorija i naučnoistraživačkim ustanovama. Nova imunohemijska „sendvič“ tehnika ima

prednost u odnosu na bioesej, u pogledu robusnosti, jednostavnosti upotrebe i skraćenog vremena potrebnog za analizu i obradu rezultata na automatizovanim platformama. Međutim, za sada je upotreba ove metode ograničena na Siemens imunohemijske analizatore što u velikoj meri smanjuje mogućnost šire upotrebe ovog testa.

Dugoročna korist uvođenja funkcionalnih biomarkera u rutinsku kliničku praksu ogledala bi se i u smanjenoj potrebi za čestim hospitalizacijama pacijenata i korišćenju skupih dijagnostičkih procedura (113, 338). Ovo bi moglo značajno da ublaži opterećenje zdravstvenog sistema.

5.6. Analiza kliničkog značaja određivanja IL-6, IL-1RA, IL-1 β i IL-8 kao i njihove povezanosti sa TSHRA_t kod pacijenata sa GO

Dugi niz godina su citokini predmet istraživanja koja se bave tiroidnom patologijom i GO. Ova grupa potentnih medijatora imunoloških procesa u organizmu atraktivna je ne samo sa stanovišta bazičnih proučavanja patogenetskih procesa, već i kao značajna terapijska meta (224, 339). Dokazano je da pojedini citokini stimulišu metabolizam i proliferaciju orbitalnih fibroblasta, što rezultuje prekomernim stvaranjem GAG i ostalih histoloških determinanti GO (223, 224). Kao takvi, citokini su proučavani i kao potencijalni biomarkeri GO, pri čemu su analizirane njihove koncentracije u biološkim tečnostima ili genski polimorfizmi koji koreliraju sa individualnom predispozicijom za razvoj ove bolesti.

U ovom istraživanju, proučavane su serumske koncentracije sledećih interleukina: IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-1RA i njihova asocijacija sa demografskim podacima pacijenata, kliničkim parametrima GO i serumskim nivoima TSHRA_t.

Trenutni literaturni podaci ukazuju na značajne razlike u fenotipu GO kod muškaraca i žena, kao i kod starijih i mlađih pacijenata (4, 31). Nije utvrđeno da li pol i godine starosti utiču i u kojoj meri na specifičan citokinski profil prisutan kod različitih patoloških stanja, o čemu svedoči velika varijabilnost rezultata primarnih istraživanja. Iz ovih razloga, u ovom istraživanju je ispitana asocijacija analiziranih citokina sa polom i godinama starosti pacijenata, pri čemu se samo koncentracija IL-8 značajno razlikovala u odnosu na pol. Serumske koncentracije ovog

interleukina bile su značajno veće kod žena u odnosu na muškarce (*Tabela 40*). Uzimajući u obzir brojne dokaze o povećanoj koncentraciji proinflamatornih citokina kod osoba sa prekomernom telesnom masom (340), kao i činjenicu da se gojaznost danas posmatra kao hronično inflamatorno stanje niskog stepena, sledeća je ispitana korelacija analiziranih citokina sa ITM. Kod pacijenata sa GO nije uočena značajna korelacija sa ITM ni sa jednim od ispitivanih interleukina (*Tabela 40*). Dodatno su analizirane njihove koncentracije u odnosu na status pušenja, prisutne komorbiditete i porodičnu istoriju AITB, međutim nijedan od njih nije pokazao značajnu asocijaciju sa ispitivanim demografskim parametrima (*Tabela 40*).

Serumska koncentracija IL-6 se u ovom istraživanju značajno razlikovala u odnosu na vrstu AITB, pri čemu su najviše koncentracije detektovane u grupi pacijenata sa GB i GO (*Tabela 41*). Dodatno je primećeno da su vrednosti ovog interleukina bile značajno veće kod pacijenata sa umerenim ili teškim oblikom GO u odnosu na one sa blažim tokom bolesti (*Tabela 41*). Prethodna istraživanja ukazuju na potencijalnu mogućnost upotrebe IL-6 u proceni aktivnosti GO (341). U ovom istraživanju, IL-6 je bio u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću i koncentracijom TSHRA što ukazuje na značajnu ulogu ovog citokina u autoimunim procesima u GO (*Tabela 42*). Na osnovu dosadašnjih saznanja, IL-6 igra višestruku ulogu u patogenetskim procesima GO. Pre svega, dokazano je da IL-6 predstavlja ključnu sponu između urođenog i stečenog imuniteta. Utvrđeno je da on podstiče stvaranje regulatornih i citotoksičnih T-limfocita, zbog čega ispoljava i proinflamatornu i regulatornu ulogu (342). Dodatno IL-6 deluje kao hemoatraktant T-limfocita, a putem ekspresije na orbitalnim fibroblastima smatra se da pospešuje i lokalno stvaranja B-limfocita i imunoglobulina u orbiti i na taj način određuje koje će imune ćelije infiltrirati orbitu (248). Već je prethodno IL-6 prepoznat kao važna determinanta metabolizma lipida, zbog čega se pretpostavlja da stimuliše adipogenezu u orbitalnom tkivu. Potvrda ovoj hipotezi jeste i zapažanje pozitivne korelacije koncentracije ovog interleukina i volumena orbitalnog tkiva (248). Smatra se da je lokalna ekspresija IL-6 ushodno regulisana dejstvom TSH, što je dokazano povećanom aktivnošću IL-6 promotera gena i iRNK (343).

U serumu pacijenata sa aktivnim oblikom GO uočene su statistički značajno više koncentracije IL-1 β i granično niže koncentracije IL-1RA (*Tabela 41*), u odnosu na grupu pacijenata sa neaktivnom GO. Dodatno je koncentracija IL-1 β bila u pozitivnoj korelaciji sa vrednošću CAS skora. Serumska koncentracija IL-1RA je takođe bila značajno niža kod pacijenata kod kojih su

simptomi trajali manje od 6 meseci, što korelira sa aktivnom fazom inflamacije GO, a granično niže vrednosti ovog interleukina su detektovane i u grupi pacijenata sa umerenim i teškim oblikom bolesti (*Tabela 41*). U prethodnim studijama je dokazano da orbitalni fibroblasti ispoljavaju prekomeran odgovor na dejstvo IL-1 β , zajedno sa smanjenom sposobnošću stvaranja njegovog prirodnog anagoniste, IL-1RA. Smatra se da ovaj mehanizam doprinosi prekomernom stvaranju hijaluronske kiseline i prostaglandina, kao i modulatora aktivnosti metaloproteinaza matriksa što rezultuje intenzivnim remodelovanjem vezivnog tkiva orbite (115). Analiza citokinskog profila predstavlja dobar surogat marker određivanja nivoa glikozaminoglikana, s obzirom da trenutno nema široko dostupnih metoda za analizu ove familije ugljenih hidrata koji su u osnovi histomorfoloških promena u GO (90). Osim na nivou orbitalnih fibroblasta, povećan nivo IL-1 β i smanjen nivo IL-1RA su detektovani i u uzorcima seruma, plazme i suza pacijenata sa GO (344, 345). Nekoliko polimorfizama gena za IL-1 β je dovedeno u vezu sa povećanom ekspresijom ovog citokina, međutim tačan mehanizam i uloga ovih promena u razvoju GO i dalje je kontroverzna (237, 345). Interleukin-1 predstavlja i potentnu terapeutsku metu, uzimajući u obzir centralno mesto koje zauzima u proinformatornom citokinskom miljeu. Za sada su inhibitori IL-1 proučavani u sklopu drugih autoimunih bolesti (npr. reumatoidni artritis), dok u populaciji pacijenata sa GO još uvek nisu upotrebljeni (346).

U ispitivanoj populaciji pacijenata, serumske koncentracije IL-8 nisu se značajno razlikovale u odnosu na aktivnost i težinu GO, kao ni u odnosu na ostale ispitivane kliničke parametre (*Tabela 41*). Literaturni podaci ukazuju na potencijalno značajnu ulogu ovog potentnog proinformatornog medijatora u patogenezi GB i GO (253, 255, 256). Polimorfizam gena za IL-8 je prepoznat kao jedan od faktora koji definišu individualnu predispoziciju za nastanak ovih bolesti (253). Međutim, i dalje nije razjašnjeno da li su povećani serumski nivoi IL-8 posledica hipertiroidizma ili autoimunih procesa u štitnoj žlezdi i orbiti. Siddiqi i saradnici (347) impliciraju na to da nivo IL-8 nije uslovljen autoimunom inflamacijom na šta ukazuju bliske vrednosti ovog citokina kod pacijenata sa GB i toksičnom nodularnom strumom, kao i normalizacija serumskih nivoa IL-8 nakon uspostavljanja biohemijskog eutiroidizma. Dodatno, iako je povećana ekspresija IL-8 dokazana na nivou orbitalnih fibroblasta osoba sa GO (247), podaci o serumskim nivoima ovog citokina kod pacijenata sa GO su oprečni zbog čega je potrebno sprovesti dalja istraživanja na većoj populaciji ispitanika (253, 348).

5.7. Analiza kliničkog značaja određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i njihove povezanosti sa TSHRAt kod pacijenata sa GO

5.7.1. Totalni antioksidativni status (TAS), totalni oksidativni stres (TOS) i indeks oksidativnog stresa (OSI) pacijenata sa GO

Oksidativni stres i autoimunost predstavljaju dva međusobno srodna procesa koja podrazumevaju specifične interakcije molekularnih puteva i prekomernu inflamaciju kada popuste prirodne kočnice organizma. Osim uloge oksidativnog stresa kao jednog od aktera u patofiziološkim procesima iniciranim delovanjem autoreaktivnih antitela i T-limfocita u GO, on se izdvaja i kao potencijalni faktor rizika za nastanak ove patologije (51). Kliničkim studijama je dokazano da GO pokazuje lokalne orbitalne mehanizme koji su nezavisni od oksidativnog stresa na nivou štitne žlezde (263). Takođe, parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite su i relevantni kandidat biomarkeri ove patologije, a dalji napor u istraživanju markera orbitalne i tiroidne autoimunosti, kako oksidativnih, tako i ostalih, dovode se u fokus budućih istraživanja. Oksidativni stres predstavlja u tom smislu veoma plodno tlo, s obzirom na potencijal kao terapijske i preventivne mete, a ujedno i biomarkera od eventualnog značaja. Sa analitičke tačke gledišta, procena oksidativnog statusa organizma je jednostavna i neinvazivna, ima relativno nisku cenu i kompatibilna je sa radom na automatizovanim platformama (349). Takođe, prednost predstavlja i dostupnosti opštih biomarkera (TAS, TOS, OSI), kao i biomarkera koji su specifični (paramteri lipidne peroksidacije, oksidativne modifikacije DNK i oksidativne modifikacije proteina).

Do sada se većina studija koje su ispitivale klinički značaj parametara oksidativnog statusa organizma bavila analizom efekta oksidativnog stresa ili antioksidativne zaštite na nivou orbitalnih fibroblasta (266, 268, 350). Lu i saradnici (268) su dokazali da SOD i katalaza ispoljavaju pozitivan efekat na nivou orbitalnih fibroblasta blokiranjem akumulacije GAG koja je stimulirana delovanjem IL-1 β .

Malo je studija pratilo nivo ovih parametara u serumu i plazmi pacijenata (351) i uglavnom su ispitivale njihov značaj kod AITB (257, 352, 353). Rezultati ovih studija su poprilično kontradiktorni i uglavnom su uključivale pojedinačne parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. Naročita diskrepanca je uočljiva kada su u pitanju nivoi enzima sistema antioksidativne zaštite organizma. Većina dokaza ukazuje na kompenzatorno povećanje vrednosti ovih enzima (SOD, katalaza, glutation-peroksidaza) kao fiziološki odgovor na oksidativni stres, međutim u nekoliko studija je uočen značajan pad ovih vrednosti usled potrošnje antioksidantnih rezervi organizma (258).

Rezultati ovog istraživanja ukazali su na značajnu povezanost povišenih vrednosti TAS u serumu ispitivanih pacijenata sa težinom GO (*Tabela 45*). Značajan porast serumskih nivoa TAS detektovan je kod pacijenata sa ograničenjem motiliteta očiju i poremećajem funkcije vida, dok su fibrozne promene ekstraokularnih mišića bile usko povezane sa padom vrednosti TAS (*Tabela 46*). Blago ograničenje motiliteta obično prethodi početku fibroze ekstraokularnih mišića čime se može objasniti inicijalan porast parametara antioksidativne zaštite koji postepeno opadaju usled njihove povećane i dugotrajne potrošnje. Zanimljivo bi bilo dalje ispitati povezanost specifičnih oksidativnih procesa (parametara lipidne peroksidacije, oksidativne modifikacije DNK, modifikacije proteina) sa kliničkim i histološkim profilom GO (adipogeneza/zahvaćenost ekstraokularnih mišića) u cilju unapređenja predikcije i diferencijalne dijagnostike.

Serumski nivo TOS i vrednost OSI nisu bili značajno povezani sa težinom, niti sa aktivnošću GO u ispitivanoj populaciji pacijenata. Primena tiroidne terapije (levotiroksin/antitiroidni lekovi) nije bila značajno povezana ni sa jednim od ispitivanih parametara (TAS, TOS, OSI) u ispitivanom uzorku pacijenata (*Tabela 45*). Ovakav rezultat odgovara zapažanjima prethodnih studija o odsustvu pozitivnog efekta antitiroidne terapije na stanje oksidativnog statusa organizma kod pacijenata sa orbitalnim manifestacijama (263). Interesantno je da suplementacija selenom nije imala značajan uticaj na vrednosti TAS, TOS i OSI u ispitivanoj populaciji pacijenata. Dobijeni rezultat je, međutim, u skladu sa prethodnim rezultatima dobijenim u našoj populaciji (300), kao i sa rezultatima nedavne prospektivne studije Kahaly i saradnika (312).

U ovoj studiji je detektovana značajna pozitivna korelacija serumskog nivoa TAS i stimulatorne aktivnosti TSA_b (*Tabela 47*), što može ukazati na njihovu eventualnu povezanost. Buduća istraživanja su neophodna kako bi se detaljnije ispitala priroda ove veze.

5.7.2. 8-OHdG kod pacijenata sa GO

U ovom istraživanju, plazmatske koncentracije 8-OHdG nisu bile značajno povezane ni sa jednim od ispitivanih demografskih (*Tabela 48*) i kliničkih parametara (*Tabela 49*) u analiziranoj populaciji pacijenata. Dodatno, dobijene vrednosti 8-OHdG nisu značajno korelirale sa rezultatima tiroidnih funkcionalnih testova, niti sa aktivnošću i koncentracijom TSHRA_t (*Tabela 50*). Dobijeni rezultati su donekle kontradiktorni u odnosu na izveštaje prethodnih studija koji ukazuju na značajnu kliničku vrednost ovog parametra oksidativnog oštećenja DNK kod pacijenata sa GB i GO (266, 268, 354). Međutim, treba uzeti u obzir da su prethodna istraživanja obuhvatala uglavnom određivanje 8-OHdG u kulturama orbitalnih fibroblasta (262) ili u 24h urinu (273). Na nivou orbitalnih fibroblasta, 8-OHdG je pokazao značajan stepen korelacije sa nivoom TSHRA_t (266), dok su urinarne koncentracije korelirale sa aktivnošću i težinom GO (273). Međutim, prediktivna sposobnost ovog parametra za razvoj teške forme GO je u studiji Tsai i saradnika (273) povezana sa uticajem duvanskog dima na oksidativni status pacijenata, čime je dovedena u pitanje samostalna uloga 8-OHdG u patogenezi GO.

U ovom istraživanju se vrednosti 8-OHdG nisu značajno razlikovale kod aktivnih pušača u odnosu na nepušače (*Tabela 40*), što nije u skladu sa prethodnim tvrdnjama o povezanosti ovog parametra sa statusom pušenja (334). Međutim, utvrđeno je da se značajno povišene koncentracije 8-OHdG susreću i kod bivših pušača (355), dok se sekundarno izlaganje duvanskom dimu takođe dovodi u vezu sa indukcijom oksidativnog stresa (356). Ispitivana populacija pacijenata je obuhvatala veliki procenat bivših pušača, dok udeo pasivnih pušača nije bilo moguće odrediti.

Uzorak izbora za određivanje 8-OHdG je 24h urin, a najčešće korišćene metode kvantitativne analize su tačna hromatografija visokih performansi sa elektrohemijском detekcijom (HPLC/EC), gasna i tačna hromatografija visokih performansi spregnute sa masenom spektrometrijom (GC/MS i HPLC/MS) (357). Referentni intervali za 8-OHdG u urinu su prethodno određeni u zdravoj populaciji Srbije, primenom HPLC/MS metode (358). U upotrebi je i veliki broj ELISA tehnika koje koriste antitela različite specifičnosti, međutim postoji problem uporedivosti dobijenih rezultata sa rezultatima hromatografskih tehnika. Koncentracije 8-OHdG izmerene ELISA metodama su uglavnom značajno više, a kao potencijalni razlozi ovakve diskrepance navode se nemogućnost fracionisanja pojedinačnih analita, nedovoljna

specifičnost antitela i odsustvo prethodne pripreme uzorka (359). Prethodno je dokazano da antitela na 8-OHdG stupaju u ukrštene reakcije sa različitim komponentama prisutnim u urinu (urea, drugi metaboliti purina, drugi oksidacioni proizvodi nukleinskih kiselina, itd.) (360).

U ovom istraživanju merena je koncentracija ukupnog 8-OHdG u plazmi primenom komercijalne ELISA metode. Uzorci plazme, ćelija i tkiva sadrže kompleks slobodnog 8-OHdG i fragmenata DNK, odnosno 8-OHdG inkorporiranog u DNK molekul. Slobodan 8-OHdG se koncentriše u bubrezima i izlučuje urinom, zbog čega se u urinu kvantifikuje samo slobodna forma ovog analita (360). Vreme poluživota slobodnog 8-OHdG u cirkulaciji je nekoliko sati (361). Takođe, utvrđeno je da se u plazmi detektuju višestruko niže koncentracije 8-OHdG nego u urinu, zbog čega je za kvantifikaciju ovog analita u plazmi neophodna primena visokoosetljivih tehnika (360). Upravo iz ovih razloga, kao i zbog velikog uticaja matriksa uzorka seruma i plazme, uzorak izbora je urin. Na koncentraciju 8-OHdG u plazmi utiče i funkcija bubrega zbog čega je bilo neophodno isključiti ispitanike sa bubrežnom insuficijencijom iz studije. Literaturni podaci o koncentraciji 8-OHdG u plazmi su ograničeni i nema dostupnih podataka za populaciju pacijenata sa GO. Takođe, konvencionalne hromatografske tehnike nisu dovoljno osjetljive da detektuju jako niske koncentracije 8-OHdG prisutne u plazmi koje je moguće izmeriti primenom novijih sofisticiranih metoda, kao što je UHPLC/MS (361).

5.8. Prediktivni potencijal multiparametarskih modela

U cilju sumiranja dobijenih rezultata i zaključaka ovog rada, na kraju je ispitana klinička vrednost multiparametarskih modela za detekciju i predviđanje razvoja težine kliničkog fenotipa GO. S tim u vezi, upoređena je dijagnostička tačnost stimulatorne aktivnosti TSHRA_t sa multiparametarskim prediktivnim modelom za diferencijaciju aktivnosti i težine GO. Multiparametarski model je, osim TSA_b, obuhvatao sve analizirane biomarkere u ovom radu. Cilj analize kombinovanih modela biomarkera je ispitivanje njihove kliničke korisnosti i mogućnosti uspostavljanja panela biomarkera i algoritama za postavljanje dijagnoze i stratifikaciju GO, kao i predviđanje njenog kliničkog toka. Dobijeni rezultati ukazuju na to da se upotrebom kombinovanog, šireg panela biomarkera značajno povećava sposobnost detekcije razvoja aktivnog oblika GO (AUC = 0,679 i AUC = 0,831, p = 0,033, za TSA_b i multimarker

model, redom). Što se tiče diferencijacije pacijenata prema težini GO, kombinacija biomarkera nije pokazala značajnu prednost u odnosu na pojedinačnu upotrebu TSAb (AUC = 0,752 i AUC = 0,824, $p = 0,189$, za TSAb i multimarker model, redom).

Jedna od glavnih tendencija moderne medicine je uvođenje multidisciplinarnog pristupa u lečenju i dijagnostici različitih bolesti, kao i razvoj i implementacija algoritama koji obuhvataju kliničke, molekularne, radiološke i serološke parametre. Ovakav pristup predstavlja najbliži put ka uspostavljanju personalizovane terapije pacijenata. U skladu sa ovakvim težnjama, u fokusu budućih studija u oblasti AITB i GO trebalo bi biti istraživanje novih biomarkera i njihovog odnosa sa TSHRA_t, kao i mogućnost njihove implementacije u multidisciplinarni pristup lečenja ovih bolesti.

5.9. Snaga i ograničenja studije

Koliko nam je poznato, ovo je prva studija u našoj zemlji koja je ispitivala funkcionalni profil TSHRA_t i koja se bavila pitanjem kliničke vrednosti funkcionalne aktivnosti i koncentracije ovih parametara kod pacijenata sa GO. Osim aktuelnosti naučnih pitanja na lokalnom nivou, snagu ove studije predstavlja i činjenica da je sprovedena u referentnoj univerzitetskoj klinici tercijarnog nivoa zdravstvene zaštite, zbog čega nam je bio dostupan značajan broj pacijenata sa teškim oblikom GO koji se kontinuirano prate. Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije je referentna ustanova za ovu vrstu patologije u Srbiji u koju se upućuju pacijenti iz cele zemlje. Uzmajući u obzir relativno nisku prevalenciju GO u opštoj populaciji, može se zaključiti da je u studiju bio uključen relevantan broj pacijenata. Posebno je značajan podatak da je studija sprovedena samo u jednom nacionalnom centru.

Ova studija je imala nekoliko ograničenja. Kao prvo, iz tehničkih razloga nije bilo moguće analizirati sve ispitivane parametre uporedno, kod svih pacijenata. Takođe, od eventualnog značaja bi bilo ispitati afinitet i dinamiku TSHRA_t svakim od primenjenih testova, s obzirom na širu sliku koju bi sticanje uvida u dinamiku ovih autoreaktivnih antitela moglo da pruži. Ovakva analiza može biti izuzetno značajna, naročito u slučajevima fluktuacije hormonskog i

inflamatornog statusa koji se često uočava kod ovih pacijenata. U našem slučaju, bilo bi interesantno ispitati dinamiku TSA_b i TBA_b kod pacijentkinje kod koje je utvrđeno istovremene prisustvo ove dve klase antitela. Jedno od glavnih ograničenja ove studije bio je neperspektivni dizajn. Relevantno bi bilo izmeriti aktivnost TSHRA_t u nekoliko vremenskih tačaka kako bi se pratila njihova aktivnost u dužem vremenskom periodu, kao i korelacija i slaganje sa kliničkim ishodom bolesti.

6. ZAKLJUČCI

- ❖ Analizom koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRA_t u serumu različitih grupa pacijenata zaključeno je da:
 - Izmerena koncentracija i stimulatorna funkcionalna aktivnost TSHRA_t bile su značajno veće, a blokirajuća funkcionalna aktivnost TSHRA_t značajno niža kod pacijenata sa GB u odnosu na pacijente sa HT i ET GO što upućuje na zaključak da je TSHRA_t specifičan biomarker GB i njenih ekstratiroidnih manifestacija.
 - Stimulatorna frakcija TSHRA_t bila je najprevalentnija u ispitivanoj grupi pacijenata sa GO što ukazuje na prednost funkcionalne aktivnosti TSHRA_t u postavljanju dijagnoze GO.
 - U uzorku jedne pacijentkinje je zabeležena istovremena dvostruka funkcionalna aktivnost TSHRA_t što upućuje na to da je ovaj fenomen, osim sa fluktuacijama tiroidnog statusa, potencijalno povezan i sa kliničkom slikom orbitopatije.
 - Najistaknutija razlika u stopi pozitivnosti tehnike bioeseja i kompetitivnog immunoeseja se primećuje u grupi pacijenata sa eutiroidnom GO, u kojoj su tehnikom bioeseja detektovani gotovo svi pacijenti. Ovaj rezultat je od izuzetnog kliničkog značaja, s obzirom na to da se diferencijalna dijagnoza GO u ovoj grupi pacijenata u potpunosti oslanja na laboratorijsku dijagnostiku bolesti.
- ❖ Demografske karakteristike pacijenata nisu se značajno razlikovale u odnosu na vrstu AITB. Teži oblik GO bio je značajno učestaliji kod muškaraca. Stimulatorna aktivnost TSHRA_t je bila značajno povezana sa pozitivnom porodičnom istorijom AITB, što bi moglo da ukaže na potencijalnu prognostičku vrednost ovog parametra.
- ❖ Skorija pojava simptoma bolesti bila je značajno povezana sa većom aktivnošću GO i višim serumskim nivoima TSHRA_t, što odgovara prirodnom toku bolesti. Dodatno, serumski nivoi TSHRA_t bili su u značajnoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom TSH. Dobijeni rezultati ukazuju na klinički značaj TSHRA_t u praćenju kliničkog toka bolesti i tiroidnog statusa pacijenata.
- ❖ Serumski nivo TSHRA_t bio je značajno povezan sa kliničkim profilom GO.
 - Utvrđena je superiorna osetljivost funkcionalnog profila TSHRA_t u praćenju kliničkog toka GO i mogućnost njegove upotrebe kao specifičnog biomarkera

- aktivnosti i težine GO. Značajno veće vrednosti TSAb i TBII izmerene su kod pacijenata sa aktivnom, kao i onih sa umerenom i teškom GO. Nivo aktivnosti TSAb bio je iznad granice pozitivnosti kod svih pacijenata sa aktivnom i umerenom do teškom GO što ukazuje na sposobnost metode bioeseja da pravilno identifikuje sve pacijente kod kojih je neophodna primena terapije ili hirurških procedura.
- Serumski nivo TSAb značajno je predviđao razvoj aktivnog oblika GO, za razliku od TBII koji nije imao prediktivni potencijal u ovoj studiji što ukazuje na klinički značaj funkcionalnog karaktera TSHRAAt u predviđanju kliničkog toka GO.
 - Tehnika bioeseja je pokazala bolju sposobnost da detektuje fine razlike u težini GO koje se uočavaju u toku dužeg vremenskog perioda i eventualnu mogućnost njene upotrebe za predviđanje razvoja težih oblika bolesti.
 - Serumske vrednosti TSHRAAt bile su značajno povezane i sa pojedinačnim oftalmološkim parametrima. Stimulatorna aktivnost TSAb prepoznata je i kao prediktivni marker za pojavu iritabilnih simptoma očiju, hemoze, inflamacije plike i karunkule, crvenila konjunktiva i retrobulbarnog bola, za razliku od nivoa TBII koji nije ispoljavao nikakve prediktivne karakteristike.
- ❖ Rezultati komparativne analize primenjenih analitičkih metoda za određivanje TSHRAAt demonstrirali su superiornu kliničku osetljivost tehnike bioeseja u odnosu na obe vrste imunohemijskih metoda, naročito kod pacijenata sa blagim manifestacijama bolesti. Na osnovu ovih rezultata i kliničkih ciljeva studije, može se izvesti zaključak da jedino tehnika bioeseja pokazuje optimalne dijagnostičke karakteristike da zameni postojeće rutinske testove kompetitivnog vezivanja i da bi integracija ove metode u rutinske dijagnostičke algoritme mogla značajno unaprediti dijagnostiku, optimizaciju terapije i prognozu ove bolesti.
 - ❖ Verifikacijom imunohemijske IMMULITE 2000 TSI CLIA metode za određivanje koncentracije TSHRAAt potvrđene su zadovoljavajuće analitičke i dijagnostičke karakteristike ove metode.
 - ❖ Citokinski profil ispitivanih pacijenata bio je značajno povezan sa kliničkom slikom GO. Težina GO bila je značajno povezana sa serumskom koncentracijom IL-6, dok su značajno više koncentracije IL-1 β i granično niže koncentracije IL-1RA izmerene kod pacijenata sa aktivnom GO. Pacijenti sa GB su imali najveće koncentracije IL-6, a

uočena je značajna pozitivna korelacija serumskih nivoa TSHRA_t i IL-6, što ukazuje na potencijalan značaj zajedničke primene ovih parametara.

- ❖ Serumski nivo TAS bio je značajno povezan sa težinom GO i pozitivno je korelirao sa serumskim nivoima TSA_b u ispitivanoj grupi pacijenata. Serumske vrednosti TOS, OSI i 8-OHdG nisu bile u značajnom odnosu sa kliničkom slikom GO, niti sa TSHRA_t. Ovi rezultati ukazuju na to da se narušavanje oksidoredukcionog balansa odražava na kliničku prezentaciju GO, što bi se u budućnosti moglo iskoristiti u cilju unapređenja laboratorijske dijagnostike i dizajna novih vidova terapije i prevencije ove bolesti.
- ❖ Ispitivanjem dijagnostičke tačnosti multiparametarskog modela koji obuhvata sve analizirane parametre u ovoj studiji, utvrđeno je da se značajno povećava sposobnost predviđanja kliničkog oblika GO. Ovakav rezultat ukazuje na potrebu za uspostavljanjem novih panela biomarkera i dijagnostičkih algoritama GO u cilju poboljšanja laboratorijske dijagnostike i celokupnog menadžmenta ove bolesti.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na zaključak da je TSHRA_t biomarker od izuzetnog kliničkog značaja za dijagnostiku GO, predikciju njenog kliničkog toka i adekvatnu klasifikaciju pacijenata. Poseban dijagnostički potencijal pokazuje funkcionalni karakter TSHRA_t koji predstavlja jedan specifičan autoimuni fenomen čijom bi se upotrebom značajno unapredila rutinska klinička praksa i otvorio put ka personalizovanom pristupu terapiji pacijenta.

7. LITERATURA

1. Iyer S, Bahn R. Immunopathogenesis of Graves' ophthalmopathy: the role of the TSH receptor. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26:281–9.
2. Wiersinga WM, Smit T, van der Gaag R, Koornneef L. Temporal relationship between onset of Graves' ophthalmopathy and onset of thyroidal Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 1988;11:615–9.
3. Bahn RS. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 2010;362:726–38.
4. Bartalena L, Piantanida E, Gallo D, Lai A, Tanda ML. Epidemiology, natural history, Risk factors, and prevention of Graves' orbitopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:615993.
5. Selva D, Chen C, King G. Late reactivation of thyroid orbitopathy. *Clin Exp Ophthalmol* 2004;32:46–50.
6. Weetman AP, Wiersinga WM. Current management of thyroid-associated ophthalmopathy in Europe. Results of an international survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49:21–8.
7. Fox TJ, Anastasopoulou C. Graves Orbitopathy. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2022.
8. Kahaly GJ, Petrak F, Hardt J, Pitz S, Egle UT. Psychosocial morbidity of Graves' orbitopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:395–402.
9. Bruscolini A, Sacchetti M, La Cava M, Nebbioso M, Iannitelli A, Quartini A, et al. Quality of life and neuropsychiatric disorders in patients with Graves' Orbitopathy: Current concepts. *Autoimmun Rev* 2018;17:639–43.
10. Marcocci C, Bartalena L, Bogazzi F, Panicucci M, Pinchera A: Studies on the occurrence of ophthalmopathy in Graves' disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989;120:473–8.
11. Ponto KA, Binder H, Diana T, Matheis N, Otto AF, Pitz S, et al. Prevalence, phenotype, and psychosocial well-being in euthyroid/hypothyroid thyroid-associated orbitopathy. *Thyroid* 2015;25:942–8.
12. Kahaly GJ, Diana T, Glang J, Kanitz M, Pitz S, König J. Thyroid stimulating antibodies are highly prevalent in Hashimoto's thyroiditis and associated orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:1998–2004.

13. Eckstein AK, Lösch C, Glowacka D, Schott M, Mann K, Esser J, et al. Euthyroid and primarily hypothyroid patients develop milder and significantly more asymmetrical Graves' ophthalmopathy. *Br J Ophthalmol* 2009;93:1052–6.
14. Bartalena L, Tanda ML. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 2009; 360: 994-1001.
15. Villadolid MC, Yokoyama N, Izumi M, et al. Untreated Graves' disease patients without clinical ophthalmopathy demonstrate a high frequency of extraocular muscle (EOM) enlargement by magnetic resonance. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2830–3.
16. Nabipour I, Burger A, Moharreri MR, Azizi F. Avicenna, the first to describe thyroid-related orbitopathy. *Thyroid* 2009;19:7–8.
17. Parry C. Diseases of the heart. *Elements Pathol Ther* 1825;2:111–28.
18. Graves RJ: Clinical lectures. *Lond Med Surg J* 1835;7:513–20.
19. Bartley GB. The epidemiologic characteristics and clinical course of ophthalmopathy associated with autoimmune thyroid disease in Olmsted County, Minnesota. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1994;92:477–588.
20. Hennemann G. Historical aspects about the development of our knowledge of morbus Basedow. *J Endocrinol Invest* 1991;14:617–24.
21. Wiersinga WM, Kahaly GJ (eds). *Graves' Orbitopathy: A Multidisciplinary Approach – Questions and Answers*. Karger, Basel, 2010;271–9.
22. Adams DD. Long-acting thyroid stimulator: how receptor autoimmunity was discovered. *Autoimmunity* 1988;1:3–9.
23. Adams DD, Purves HD. Abnormal responses in the assay of thyrotropin. *Proc Univ Otago Med School* 1956;34:11–5.
24. Adams DD. The presence of an abnormal thyroid stimulating hormone in the serum of some thyrotoxic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1958;18:699.
25. Manley SW, Bourke JR, Hawker RW. The thyrotrophin receptor in guinea pig thyroid homogenate: interaction with the long-acting thyroid stimulator. *J Endocrinol* 1974;61:437.
26. Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J. Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocr Rev* 1988;9:106–21.

27. Perros P, Hegedus L, Bartalena L, Marcocci C, Kahaly GJ, Baldeschi L, et al. Graves' orbitopathy as a rare disease in Europe: a European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) position statement. *Orphanet J Rare Dis* 2017;12:72.
28. Abraham-Nordling M, Bystrom K, Topping O, Lantz M, Berg G, Calissendorf J, et al. Incidence of hyperthyroidism in Sweden. *Eur J Endocrinol* 2011;165:899–905.
29. Laurberg P, Berman DC, Bulow Pedersen I, Andersen S, Carlé A. Incidence and clinical presentation of moderate to severe Graves' orbitopathy in a Danish population before and after iodine fortification of salt. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2325–32.
30. Zaletel K, Gaberscek S, Pirnat E. Ten-year follow-up of thyroid epidemiology in Slovenia after increase in salt iodization. *Croat Med J* 2011;52:615–21.
31. Perros P, Crombie AL, Matthews JN, Kendall-Taylor P. Age and gender influence the severity of thyroid-associated ophthalmopathy: a study of 101 patients attending a combined thyroid-eye clinic. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;38:367–72.
32. Tanda ML, Piantanida E, Liparulo L, Veronesi G, Lai A, Sassi L, et al. Prevalence and natural history of Graves' orbitopathy in a large series of patients with newly diagnosed Graves' hyperthyroidism seen at a single center. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:1443–9.
33. Lazarus JH. Epidemiology of Graves' orbitopathy (GO) and relationship with thyroid disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26:273–9.
34. Dickinson AJ. Clinical Manifestations. Wiersinga WM, Kahaly GJ (eds). *Graves' Orbitopathy: A Multidisciplinary Approach*. Karger, Basel, 2007;1–26.
35. Tellez M, Cooper J, Edmonds C. Graves' ophthalmopathy in relation to cigarette smoking and ethnic origin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992;36:291–4.
36. Ippolito S, Cusini C, Lasalvia P, Gianfagna F, Veronesi G, Gallo D, et al. Change in newly diagnosed Graves' disease phenotype between the twentieth and the twenty-first centuries: meta-analysis and meta-regression. *J Endocrinol Invest* 2021;44:1707–18.
37. Perros P, Zarkovic M, Azzolini C, Ayvaz G, Baldeschi L, Bartalena L, et al. PREGO (presentation of Graves' orbitopathy) study: changes in referral patterns to European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) centres over the period from 2000 to 2012. *Br J Ophthalmol* 2015;99:1531–5.

38. Pinto W, Romaldini JH, Perini N, Santos RB, Villagelin D. The change in the clinical presentation of Graves' disease: a 30 years retrospective survey in an academic Brazilian tertiary center. *Arch Endocrinol Metab* 2021;64:514–20.
39. Daumerie C, Kalmann R. *Epidemiology*. Wiersinga WM, Kahaly GJ. (eds): Graves' orbitopathy: A multidisciplinary approach. Basel, Karger 2007;34–40.
40. Cao J, Su Y, Chen Z, Ma C, Xiong W. The risk factors for Graves' ophthalmopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2022;260:1043–54.
41. Ban Y, Davies TF, Greenberg DA, Concepcion ES, Osman R, Oashi T, et al. Arginine at position 74 of the HLA-DR beta1 chain is associated with Graves' disease. *Genes Immun* 2004;5:203–8.
42. Tomer Y. Mechanisms of autoimmune thyroid diseases: from genetics to epigenetics. *Annu Rev Pathol* 2014;9:147–56.
43. Prummel MF, Wiersinga WM, Mourits MP, Koornneef L, Berghout A, Van der Gaag R. Effect of abnormal thyroid function on the severity of Graves' ophthalmopathy. *Arch Intern Med* 1990;150:1098–101.
44. Wiersinga WM, Bartalena L. Epidemiology and prevention of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 2002;12:855–60.
45. Prummel MF, Bakker A, Wiersinga WM, Baldeschi L, Mourits MP, Kendall-Taylor P, et al. Multi-center study on the characteristics and treatment strategies of patients with Graves' orbitopathy: the first European Group on Graves' Orbitopathy experience. *Eur J Endocrinol* 2003;148:491–5.
46. Ross DS, Burch HB, Cooper DS, Greenlee MC, Laurberg P, Maia AL, et al. 2016 American thyroid association guidelines for diagnosis and management of hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis. *Thyroid* 2016;26:1343–421.
47. Marcocci C, Bartalena L, Bogazzi F, Bruno-Bossio G, Pinchera A. Relationship between Graves' ophthalmopathy and type of treatment of Graves' hyperthyroidism. *Thyroid* 1992;2:171–8.
48. Vannucchi G, Covelli D, Campi I, Currò N, Dazzi D, Rodari M, et al. Prevention of orbitopathy by oral or intravenous steroid prophylaxis in short duration Graves' disease undergoing radioiodine ablation: a prospective randomized control trial study. *Thyroid* 2019;29:1828–33.

49. Byrne AP, Delaney WJ. Regression of thyrotoxic ophthalmopathy following lithium withdrawal. *Can J Psychiatry* 1993;38:635–7.
50. Villanueva RB, Brau N. Graves' orbitopathy associated with interferon-alpha treatment for hepatitis C. *Thyroid* 2002;12:737–8.
51. Bartalena L, Tanda ML, Piantanida E, Lai A. Oxidative stress and Graves' ophthalmopathy: in vitro studies and therapeutic implications. *Biofactors* 2003;19:155–63.
52. Topcu CB, Celik O, Tasan E. Effect of stressful life events on the initiation of Graves' disease. *Int J Psychiat Clin* 2012;16:307–11.
53. Moshkelgosha S, Verhasselt HL, Masetti G, Covelli D, Biscarini F, Horstmann M, et al; INDIGO consortium. Modulating gut microbiota in a mouse model of Graves' orbitopathy and its impact on induced disease. *Microbiome* 2021;16:9:45.
54. Masetti G, Moshkelgosha S, Kohling HL, Covelli D, Banga JP, Berchner-Pfannschmidt U, et al. Gut microbiota in experimental murine model of Graves' orbitopathy established in different environments may modulate clinical presentation of disease. *Microbiome* 2018;6:97.
55. Bartalena L, Fatourech V. Extrathyroidal manifestations of Graves' disease: a 2014 update. *J Endocrinol Invest* 2014;37:691–700.
56. Dickinson AJ, Perros P. Controversies in the clinical evaluation of active thyroid-associated orbitopathy: use of a detailed protocol with comparative photographs for objective assessment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;55:283–303.
57. Rubin PA, Watkins LM, Rumelt S, Sutula FC, Dallow RL. Orbital computed tomographic characteristics of globe subluxation in thyroid orbitopathy. *Ophthalmology* 1998;105:2061–4.
58. Bartley GB, Fatourech V, Kadrmas EF, Jacobsen SJ, Ilstrup DM, Garrity JA, et al. Clinical features of Graves' ophthalmopathy in an incidence cohort. *Am J Ophthalmol* 1996;121:284–90.
59. Gilbard JP, Farris RL. Ocular surface drying and tear film osmolarity in thyroid eye disease. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1983;61:108–16.
60. Frueh BR, Musch DC, Garber FW. Lid retraction and levator aponeurosis defects in Graves' eye disease. *Ophthalmic Surg* 1986;17:216–20.

61. Wright JE. Proptosis. *Ann R Coll Surg Engl* 1970;47:323–34.
62. Karti O, Selver OB, Karahan E, Zengin MO, Uyar M. The effect of age, gender, refractive status and axial length on the measurements of hertel exophthalmometry. *Open Ophthalmol J* 2015;29:113–5.
63. De Juan E, Hurley DP, Sapira JD. Racial differences in normal values of proptosis. *Arch Intern Med* 1980;140:1230–1.
64. Doumit G, Abouhassan W, Yaremchuk MJ. Aesthetic refinements in the treatment of Graves' ophthalmopathy. *Plast Reconstr Surger* 2014;134:519–26.
65. Bahn RS, Gorman CA. Choice of therapy and criteria for assessing treatment outcome in thyroid-associated ophthalmopathy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987;16:397–407.
66. Campi I, Vannucchi G, Salvi M. Therapy of endocrine disease: endocrine dilemma: management of Graves' orbitopathy. *Eur J Endocrinol* 2016;175:117–33.
67. Bartalena L, Kahaly GJ, Baldeschi L, Dayan CM, Eckstein A, Marcocci C. The 2021 European group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) clinical practice guidelines for the medical management of Graves' orbitopathy. *Eur J Endocrinol* 2021;185:G43–67.
68. Mourits MP, Koornneef L, Wiersinga WM, Prummel MF, Berghout A, van der Gaag R. Clinical criteria for the assessment of disease activity in Graves' ophthalmopathy: a novel approach. *Br J Ophthalmol* 1989;73:639–44.
69. Anderton LC, Neoh C, Walshaw D, Dickinson AJ. Reproducibility of clinical assessment in thyroid eye disease. Abstract of the European Society of the Ophthalmic, Plastic, and Reconstructive Surgery, Paris 2000;107.
70. Dolman PJ, Rootman J. VISA classification for Graves' orbitopathy. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2006;22:319–24.
71. Werner SC. Modification of the classification of the eye changes of Graves' disease. *Am J Ophthalmol* 1977;83:725–27.
72. Wiersinga WM, Prummel MF, Mourits MP, Koornneef L, Buller HR. Classification of the eye changes of Graves' disease. *Thyroid* 1991;1:357–60.
73. Barrio-Barrio J, Sabater AL, Bonet-Farriol E, Velázquez-Villoria Á, Galofré JC. Graves' ophthalmopathy: VISA versus EUGOGO classification, assessment, and management. *J Ophthalmol* 2015;2015:249125.

74. Rundle FF. Management of exophthalmos and related ocular changes in Graves' disease. *Metabolism* 1957;6:36–47.
75. Kendall-Taylor P. Natural history. Wiersinga WM, Kahaly GJ. Graves' orbitopathy (eds): A multidisciplinary approach. Karger, Basel 2007;78–87.
76. Diana T, Ponto KA, Kahaly GJ, Thyrotropin receptor antibodies and Graves' orbitopathy. *J Endocrinol Invest* 2021;44:703–12.
77. Bahn RS. TSH receptor expression in orbital tissue and its role in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *J Endocrinol Invest* 2004;27:216–20.
78. Moshkelgosha S, So PW, Deasy N, Diaz-Cano S, Banga JP. Cutting edge: retrobulbar inflammation, adipogenesis, and acute orbital congestion in a preclinical female mouse model of Graves' orbitopathy induced by thyrotropin receptor plasmid-in vivo electroporation. *Endocrinol* 2013;154:3008–15.
79. Heufelder AE, Dutton CM, Sarkar G, Donovan KA, Bahn RS. Detection of TSH receptor RNA in cultured fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy and pretibial dermopathy. *Thyroid* 1993;3:297–300.
80. Feliciello A, Porcellini A, Ciullo I, Bonavolonta G, Avvedimento EV, Fenzi G. Expression of thyrotropin-receptor mRNA in healthy and Graves' retro-orbital tissue. *Lancet* 1993;342:337–8.
81. Michalek K, Morshed SA, Latif R, Davies TF. TSH receptor autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2009;9:113–6.
82. Williams GR. Extrathyroidal expression of TSH receptor. *Ann Endocrinol (Paris)* 2011;72:68–73.
83. Rapoport B, McLachlan SM. Thyroid autoimmunity. *J Clin Invest* 2001;108:1253–9.
84. Chazenbalk GD, Pichurin P, Chen CR, Latrofa F, Johnstone AP, McLachlan SM, et al. Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin holoreceptor. *J Clin Invest* 2002;110:209–17.
85. McLachlan SM, Nagayama Y, Pichurin PN, Mizutori Y, Chen CR, Misharin A, et al. The link between Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis: a role for regulatory T cells. *Endocrinology* 2007;148:5724–33.
86. Tomer Y, Ban Y, Concepcion E, Barbesino G, Villanueva R, Greenberg DA, et al. Common and unique susceptibility loci in Graves and Hashimoto diseases: results of

- whole-genome screening in a data set of 102 multiplex families. *Am J Hum Genet* 2003;73:736–47
87. Kahaly GJ, Wüster C, Olivo PD, Diana T. High titers of thyrotropin receptor antibodies are associated with orbitopathy in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;104:2561–8.
 88. Bahn RS. Clinical review 157: Pathophysiology of Graves' ophthalmopathy: the cycle of disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1939–46.
 89. Kvetny J, Puhakka KB, Røhl L. Magnetic resonance imaging determination of extraocular eye muscle volume in patients with thyroid-associated ophthalmopathy and proptosis. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84:419–23.
 90. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev* 2003;24:802–35.
 91. Orgiazzi J. Pathogenesis. Wiersinga WM, Kahaly GJ (eds): *Graves' Orbitopathy: A Multidisciplinary Approach*. Karger, Basel 2007;41–56.
 92. Douglas RS, Afifiyan NF, Hwang CJ, Chong K, Haider U, Richards P, et al. Increased generation of fibrocytes in thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:430–8.
 93. Bahn RS, Heufelder AE. Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 1993;329:1468–75.
 94. Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA. Connective tissue, glycosaminoglycans, and diseases of the thyroid. *Endocr Rev* 1989;10:366–91.
 95. Kahaly G, Forster G, Hansen C. Glycosaminoglycans in thyroid eye disease. *Thyroid* 1998;8:429–32.
 96. Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA, Cheavens M. Stimulation of glycosaminoglycan accumulation by interferon γ in cultured human retroocular fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1169–71.
 97. Dorkhan M, Lantz M, Frid A, Groop L, Hallengren B. Treatment with a thiazolidinedione increases eye protrusion in a subgroup of patients with type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:35–9.
 98. Bahn RS. Current Insights into the pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy. *Horm Metab Res* 2015;47:773–8.

99. Grubeck-Loebenstein B, Trieb K, Sztankay A, Holter W, Anderl H, Wick G, et al. Retrobulbar T cells from patients with Graves' ophthalmopathy are CD8+ and specifically recognize autologous fibroblasts. *J Clin Invest* 1994;93:2738–43.
100. Pappa A, Lawson JM, Calder V, et al. T cells and fibroblasts in affected extraocular muscles in early and late thyroid associated ophthalmopathy. *B J Ophthalmol* 2000; 84:517–22.
101. Smith TJ, Wang HS, Evans CH. Leukoregulin is a potent inducer of hyaluronan synthesis in cultured human orbital fibroblasts. *Am J Physiol* 1995;268:C382–8.
102. Kahaly GJ. The thyrocyte-fibrocyte link: closing the loop in the pathogenesis of Graves' disease? *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:62–5.
103. Kahaly GJ, Shimony O, Gellman YN, Lytton SD, Eshkar-Sebban L, Rosenblum N, et al. Regulatory T-cells in Graves' orbitopathy: baseline findings and immunomodulation by anti-T lymphocyte globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:422–9.
104. Hai YP, Lee ACH, Frommer L, Diana T, Kahaly GJ. Immunohistochemical analysis of human orbital tissue in Graves' orbitopathy. *J Endocrinol Invest* 2020;43:123–37.
105. Bartalena L, Wiersinga WM, Pinchera A. Graves' ophthalmopathy: state of the art and perspectives. *J Endocrinol Invest* 2004;27:295–301.
106. Mizokami T, Salvi M, Wall JR. Eye muscle antibodies in Graves' ophthalmopathy: pathogenic or secondary epiphenomenon? *J Endocrinol Invest* 2004;27:221–9.
107. Kubota S, Gunji K, Stolarski C, Kennerdell JS, Wall JR. Role of eye muscle antibody measurement in diagnosis of thyroid-associated ophthalmopathy: a laboratory update. *Endocr Pract* 1998;4:127–32.
108. Wiersinga WM. Autoimmunity in Graves' ophthalmopathy: the result of an unfortunate marriage between TSH receptors and IGF-1 receptors? *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2386–94.
109. Tramontano D, Cushing GW, Moses AC, Ingbar SH. Insulin-like growth factor-I stimulates the growth of rat thyroid cells in culture and synergizes the stimulation of DNA synthesis induced by TSH and Graves'-Ig G. *Endocrinology* 1986;119:940–2.
110. Tsui S, Naik V, Hoa N, Hwang CJ, Afifiyan NF, Sinha Hikim A, et al. Evidence for an association between thyroid stimulating hormone and insulin-like growth factor 1

- receptors: A tale of two antigens implicated in Graves' disease. *J Immunol* 2008;181:4397–405.
111. Kriss JP, Pleshakov V, Rosenblum AL, Holderness M, Sharp G, Utiger R. Studies on the pathogenesis of the ophthalmopathy of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1967;27:582–93.
 112. Davies TF, Ando T, Lin RY, Tomer Y, Latif R. Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J Clin Invest* 2005;115:1972–83.
 113. Kahaly GJ, Diana T, Olivo PD. TSH receptor antibodies: relevance & utility. *Endocr Pract* 2020;26:97–106.
 114. Shimojo N, Kohno Y, Yamaguchi K, Kikuoka S, Hoshioka A, Niimi H, et al. Induction of Graves-like disease in mice by immunization with fibroblasts transfected with the thyrotropin receptor and a class II molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11074–9.
 115. Drexhage HA. Are there more than antibodies to the thyroid-stimulating hormone receptor that meet the eye in Graves' disease? *Endocrinology* 2006;147:9–12.
 116. Rotella CM, Alvarez F, Kohn LD, Toccafondi R. Graves' autoantibodies to extrathyroidal TSH receptor: their role in ophthalmopathy and pretibial myxedema. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1987;281:344–7.
 117. Smith TJ, Hoa N. Immunoglobulins from patients with Graves' disease induce hyaluronan synthesis in their orbital fibroblasts through the self-antigen, insulin-like growth factor-I receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5076–80.
 118. Zhang L, Bowen T, Grennan-Jones F, Paddon C, Giles P, Webber J, et al. Thyrotropin receptor activation increases hyaluronan production in preadipocyte fibroblasts: contributory role in hyaluronan accumulation in thyroid dysfunction. *J Biol Chem* 2009;284:26447–55.
 119. Kumar S, Iyer S, Bauer H, Coenen M, Bahn RS. A stimulatory thyrotropin receptor antibody enhances hyaluronic acid synthesis in Graves' orbital fibroblasts: Inhibition by an IGF-1 receptor blocking antibody. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:1681–7.
 120. Kumar S, Nadeem S, Stan MS, Coenen MJ, Bahn RS. A stimulatory thyrotropin receptor antibody enhances adipogenesis via phosphoinositide 3-kinase activation in

- orbital preadipocytes from patients with Graves' ophthalmopathy. *J Mol Endocrinol* 2011;46:155–63.
121. Chiovato L, Vitti P, Santini F, Lopez G, Mammoli C, Bassi P, et al. Incidence of antibodies blocking thyrotropin effect in vitro in patients with euthyroid or hypothyroid autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:40–5.
 122. Ehlers M, Schott M, Allelein S. Graves' disease in clinical perspective. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2019;24:35–47.
 123. Morgenthaler NG, Minich WB, Willnich M, Bogusch T, Hollidt JM, Weglöhner W et al. Affinity purification and diagnostic use of TSH receptor autoantibodies from human serum. *Mol Cell Endocrinol* 2003;212:73–9.
 124. Schott M, Scherbaum WA, Morgenthaler NG. Thyrotropin receptor autoantibodies in Graves' disease. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:243–8.
 125. Gerding MN, Van der Meer JW, Broenink M, Bakker O, Wiersinga WM, Prummel MF. Association of thyrotrophin receptor antibodies with the clinical features of Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;52:267–71.
 126. Eckstein AK, Plicht M, Lax H, Neuhäuser M, Mann K, Lederbogen S, et al. Thyrotropin receptor autoantibodies are independent risk factors for Graves' ophthalmopathy and help to predict severity and outcome of the disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3464–70.
 127. Ando T, Latif R, Davies TF. Thyrotropin receptor antibodies: new insights into their actions and clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005;19:33–52.
 128. Gleicher N, Barad D, Weghofen A. Functional autoantibodies, a new paradigm in autoimmunity? *Autoimmun Rev* 2007;7:42–5.
 129. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, et al. Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354:2667–76.
 130. Miguel N, Sanders J, Chirgadze DY, Furmanisak J, Smith RB. Thyroid stimulating autoantibody M22 mimics TSH binding to the TSH receptor leucine rich domain: a comparative structural study of protein–protein interactions. *J Mol Endocrinol* 2008;42:361–95.

131. Lytton SD, Kahaly GJ. Bioassays for TSH-receptor autoantibodies: an update. *Autoimmun Rev* 2010;10:116–22.
132. Kahaly GJ, Diana T. TSH Receptor antibody functionality and nomenclature. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:28.
133. Morshed SA, Ando T, Latif R, Davies TF. Neutral antibodies to the TSH receptor are present in Graves' disease and regulate selective signaling cascades. *Endocrinology* 2010;151:5537–49.
134. Botero D, Brown RS. Bioassay of thyrotropin receptor antibodies with Chinese hamster ovary cells transfected with recombinant human thyrotropin receptor: clinical utility in children and adolescents with Graves disease. *J Pediatr* 1998;132:612–8.
135. Barbesino G, Tomer Y. Clinical review: Clinical utility of TSH receptor antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:2247–55.
136. Smith TJ, Hegedüs L, Douglas RS. Role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway in the pathogenesis of Graves' orbitopathy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26:291–302.
137. Lytton SD, Ponto KA, Kanitz M, Matheis N, Kohn LD, Kahaly GJ. A novel thyroid stimulating immunoglobulin bioassay is a functional indicator of activity and severity of Graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2123–31.
138. Endo K, Kasagi K, Konishi J, Ikekubo K, Okuno T, Takeda Y, et al. Detection and properties of TSH-binding inhibitor immunoglobulins in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;46:734–9.
139. Konishi J, Iida Y, Endo K, Misaki T, Nohara Y, Matsuura N, et al. Inhibition of thyrotropin-induced adenosine 3'5'-monophosphate increase by immunoglobulins from patients with primary myxedema. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:544–9.
140. Matsuura N, Yamada Y, Nohara Y, Konishi J, Kasagi K, Endo K, et al. Familial neonatal transient hypothyroidism due to maternal TSH-binding inhibitor immunoglobulins. *N Engl J Med* 1980;303:738–41.
141. Brown RS, Keating P, Mitchell E. Maternal thyroid-blocking immunoglobulins in congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1341–6.

142. Iseki M, Shimizu M, Oikawa T, Hojo H, Arikawa K, Ichikawa Y, et al. Sequential serum measurements of thyrotropin binding inhibitor immunoglobulin G in transient familial neonatal hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:384–7.
143. Kung AW, Jones BM. A change from stimulatory to blocking antibody activity in Graves' disease during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:514–8.
144. Alexander EK, Pearce EN, Brent GA, Brown RS, Chen H, Dosiou C, et al. 2017 guidelines of the American thyroid association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and the postpartum. *Thyroid* 2017;27:315–89.
145. Abeillon-du Payrat J, Chikh K, Bossard N, Bretones P, Gaucherand P, Claris O, et al. Predictive value of maternal second-generation thyroid-binding inhibitory immunoglobulin assay for neonatal autoimmune hyperthyroidism. *Eur J Endocrinol* 2014;171:451–60.
146. Wallaschofski H, Paschke R. Detection of thyroid stimulating (TSAB)- and thyrotropin stimulation blocking (TSBAB) antibodies with CHO cell lines expressing different TSH-receptor numbers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;50:365–72.
147. Tada H, Izumi Y, Watanabe Y, Takano T, Fukata S, Kuma K, et al. Blocking type anti-TSH receptor antibodies detected by radioreceptor assay in Graves' disease. *Endocr J* 2001;48:703–10.
148. Diana T, Krause J, Olivo PD, Konig J, Kanitz M, Decallonne B, et al. Prevalence and clinical relevance of thyroid stimulating hormone receptor-blocking antibodies in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 2017;189:304–9.
149. Diana T, Olivo PD, Kahaly GJ. Thyrotropin receptor blocking antibodies. *Horm Metab Res* 2018;50:853–62.
150. Evans M, Sanders J, Tagami T, Sanders P, Young S, Roberts E et al. Monoclonal autoantibodies to the TSH receptor, one with stimulating activity and one with blocking activity, obtained from the same blood sample. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010;73:404–12.
151. Takasu N, Matsushita M. Changes of TSH-stimulation blocking antibody (TSBAbs) and thyroid stimulating antibody (TSAbs) Over 10 Years in 34 TSBAbs-positive patients with hypothyroidism and in 98 TSAbs-positive Graves' patients with hyperthyroidism:

- reevaluation of TSBAAb and TSAAb in TSH-receptor antibody (TRAb)-positive patients. *J Thyroid Res* 2012;2012:182176.
152. Morshed SA, Ma R, Latif R, Davies TF. How one TSH receptor anti-body induces thyrocyte proliferation while another induces apoptosis. *J Autoimmun* 2013;47:17–24.
 153. Kraiem Z, Baron E, Kahana L, Sadeh O, Sheinfeld M. Changes in stimulating and blocking TSH receptor antibodies in a patient undergoing three cycles of transition from hypo to hyper-thyroidism and back to hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992;36:211–4.
 154. Tada H, Mizuta I, Takano T, Tatsumi KI, Izumi Y, Hidaka Y, et al. Blocking-type anti-TSH receptor antibodies and relation to responsiveness to antithyroid drug therapy and remission in Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;58:403–8.
 155. Kraiem Z, Cho BY, Sadeh O, Shong MH, Pickerill P, Weetman AP. The IgG subclass distribution of TSH receptor blocking antibodies in primary hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992;37:135–40.
 156. Smith BR, Sanders J, Furmaniak J. TSH receptor antibodies. *Thyroid* 2007;17:923–38.
 157. Furmaniak J, Sanders J, Rees Smith B. Blocking type TSH receptor antibodies. *Auto Immun Highlights* 2012;4:11–26.
 158. Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Richards T, Evans M, Kiddie A, et al. Thyroid-stimulating monoclonal antibodies. *Thyroid* 2002;12:1043–50.
 159. Frazier-Seabrook L, Robbins LS, Segaloff DL, Seeburg PH, Cone RD. Isolation of a thyroid-specific cDNA with over 80% amino acid homology with the luteinizing hormone receptor. 64th Meeting of the American Thyroid Association, 1989;T–51.
 160. Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort A, Gerard C, Perret J, et al. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* 1989;246:1620–2.
 161. Morgenthaler, N.G. et al. Human immunoglobulin G autoantibodies to the thyrotropin receptor from Epstein–Barr virus-transformed B lymphocytes: characterization by immunoprecipitation with recombinant antigen and biological activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3155–61.
 162. Sanders J, Evans M, Premawardhana LDKE, Depraetere H, Jeffreys J, Richards T, et al. Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody. *Lancet* 2003;362:126–8.

163. Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Evans M, Richards T, Kiddie A, et al. Characteristics of a human monoclonal autoantibody to the thyrotropin receptor: sequence structure and function. *Thyroid* 2004;14:560–70.
164. Rees Smith B, Bolton J, Young S, Collyer A, Weeden A, Bradbury J, et al. A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies. *Thyroid* 2004;14:830–5.
165. Sanders J, Evans M, Betterle C, Sanders P, Bhardwaja A, Young S, et al. A human monoclonal autoantibody to the thyrotropin receptor with thyroid-stimulating blocking activity. *Thyroid* 2008;18:735–46.
166. Furmaniak J, Sanders J, Young S, Kabelis K, Sanders P, Evans M, et al. In vivo effects of a human thyroid-stimulating monoclonal autoantibody (M22) and a human thyroid-blocking autoantibody (K1-70). *Auto Immun Highlights* 2012;3:19–25.
167. Latrofa F, Chazenbalk GD, Pichurin P, Chen CR, McLachlan SM, Rapoport B. Affinity-enrichment of thyrotropin receptor autoantibodies from Graves' patients and normal individuals provides insight into their properties and possible origin from natural antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4734–45.
168. Costagliola S, Bonomi M, Morgenthaler NG, Van Durme J, Panneels V, Refetoff S, et al. Delineation of the discontinuous conformational epitope of a monoclonal antibody displaying full in vitro and in vivo thyrotropin activity. *Mol Endocrinol* 2004;18:3020–34.
169. Grasso YZ, Kim MR, Faiman C, Kohn LD, Tahara K, Gupta MK. Epitope heterogeneity of thyrotropin receptor-blocking antibodies in Graves' patients as detected with wild-type versus chimeric thyrotropin receptors. *Thyroid* 1999;9:531–7.
170. Nakatake N, Sanders J, Richards T, Burne P, Barrett C, Dalpra C, et al. Estimation of serum TSH receptor autoantibody concentration and affinity. *Thyroid* 2006;16:1077–84.
171. Morgenthaler NG, Ho SC, Minich WB. Stimulating and blocking thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor autoantibodies from patients with Graves' disease and autoimmune hypothyroidism have very similar concentration, TSH receptor affinity, and binding sites. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1058–65.
172. Furmaniak J, Sanders J, Núñez Miguel R, Rees Smith B. Mechanisms of action of TSHR autoantibodies. *Horm Metab Res* 2015;47:735–52.

173. Sanders J, Chirgadze DY, Sanders P, Baker S, Sullivan A, Bhardwaja A, et al. Crystal structure of the TSH receptor in complex with a thyroid-stimulating autoantibody. *Thyroid* 2007;17:395–410.
174. Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor in Graves' disease. *Thyroid* 2007;17:911–22.
175. Chen CR, Pichurin P, Nagayama Y, Latrofa F, Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor autoantigen in Graves disease is the culprit as well as the victim. *J Clin Invest* 2003;111:1897–904.
176. Schwarz-Lauer L, Pichurin PN, Chen CR, Nagayama Y, Paras C, Morris JC, et al. The cysteine-rich amino terminus of the thyrotropin receptor is the immunodominant linear antibody epitope in mice immunized using naked deoxyribonucleic acid or adenovirus vectors. *Endocrinology* 2003;144:1718–25.
177. Rapoport B, Aliesky HA, Chen CR, McLachlan SM. Evidence that TSH receptor A-subunit multimers, not monomers, drive antibody affinity maturation in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E871–5.
178. Smits G, Campillo M, Govaerts C, Janssens V, Richter C, Vassart G, et al. Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand specificity. *EMBO J* 2003;22:2692–703.
179. Morshed SA, Latif R, Davies TF. Characterization of thyrotropin receptor antibody-induced signaling cascades. *Endocrinology* 2009;150:519–29.
180. Ando T, Latif R, Daniel S, Eguchi K, Davies TF. Dissecting linear and conformational epitopes on the native thyrotropin receptor. *Endocrinology* 2004;145:5185–93.
181. Tozzoli R, Bagnasco M, Giavarina D, Bizzaro N. TSH receptor autoantibody immunoassay in patients with Graves' disease: improvement of diagnostic accuracy over 10 different generations of methods. systematic review and meta-analysis *Autoimmun Rev* 2012;12:107–13.
182. McKee A, Peyerl F. TSI assay utilization: impact on costs of Graves' hyperthyroidism diagnosis. *Am J Manag Care* 2012;18:e1–14.
183. Rees Smith B, Hall R. Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease. *Lancet* 1974;2:427–31.

184. Shewring G, Rees Smith B. An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1982;17:409–17.
185. Kakinuma A, Morimoto I, Kuroda T, Fujihira T, Eto S, McLachlan SM, et al. Comparison of recombinant human thyrotropin receptors versus porcine thyrotropin receptors in the thyrotropin binding inhibition assay for thyrotropin receptor autoantibodies. *Thyroid* 1999;9:849–55.
186. Costagliola S, Morgenthaler NG, Hoermann R, Badenhop K, Struck J, Freitag D, et al. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:90–7.
187. Bolton J, Sanders J, Oda Y, Chapman C, Konno R, Furmaniak J, et al. Measurement of thyroid-stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA. *Clin Chem* 1999;45:2285–7.
188. Zöphel K, Roggenbuck D, Schott M. Clinical review about TRAb assay's history. *Autoimmun Rev* 2010;9:695–700.
189. Gassner D, Stock W, Golla R, Roth HJ. First automated assay for thyrotropin receptor autoantibodies. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1091–5.
190. Hermsen D, Broecker-Preuss M, Casati M, Mas JC, Eckstein A, Gassner D, et al. Technical evaluation of the first fully automated assay for the detection of TSH receptor autoantibodies. *Clin Chim Acta* 2009;401:84–9.
191. Diana T, Wüster C, Olivo PD, Unterrainer A, König J, Kanitz M, et al. Performance and specificity of 6 immunoassays for tsh receptor antibodies: A multicenter study. *Eur Thyroid J* 2017;6:243–9.
192. McKenzie JM. The bioassay of thyrotropin in serum. *Endocrinology* 1958;63:372–82.
193. Diana T, Kahaly GJ. Thyroid stimulating hormone receptor antibodies in thyroid eye disease-methodology and clinical applications. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2018;34:S13–19.
194. Hinds WE, Takai N, Rapoport B, Filetti S, Clark OH. Thyroid-stimulating immunoglobulin bioassay using cultured human thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:1204–10.
195. Vitti P, Rotella CM, Valente WA, Cohen J, Aloj SM, Laccetti P, et al. Characterization of the optimal stimulatory effects of graves' monoclonal and serum immunoglobulin G

- on adenosine 3',5'-monophosphate production in FRTL-5 thyroid cells: a potential clinical assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:782–91.
196. Perret J, Ludgate M, Libert F, Gerard C, Dumont JE, Vassart G, et al. Stable expression of the human TSH receptor in CHO cells and characterization of differentially expressing clones. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;171:1044–50.
 197. Watson PF, Ajjan RA, Phipps J, et al. A new chemiluminescent assay for the rapid detection of thyroid stimulating antibodies in Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49:577–81.
 198. Lytton SD, Li Y, Olivo PD, Kohn LD, Kahaly GJ. Novel chimeric thyroid-stimulating hormone-receptor bioassay for thyroid-stimulating immunoglobulins. *Clin Exp Immunol* 2010;162:438–46.
 199. Diana T, Kanitz M, Lehmann M, Li Y, Olivo PD, Kahaly GJ. Standardization of a bioassay for thyrotropin receptor stimulating autoantibodies. *Thyroid* 2015;25:169–75.
 200. Kamijo K, Murayama H, Uzu T, Togashi K, Kahaly GJ. A novel bioreporter assay for thyrotropin receptor antibodies using a chimeric thyrotropin receptor (mc4) is more useful in differentiation of Graves' disease from painless thyroiditis than conventional thyrotropin-stimulating antibody assay using porcine thyroid cells. *Thyroid* 2010;20:851–6.
 201. Diana T, Li Y, Olivo PD, Lackner KJ, Kim H, Kanitz M, et al. Analytical performance and validation of a bioassay for thyroid-blocking antibodies. *Thyroid* 2016;26:734–40.
 202. Frank CU, Braeth S, Dietrich JW, Wanjura D, Loos U. Bridge Technology with TSH receptor chimera for sensitive direct detection of TSH receptor antibodies causing Graves' disease: analytical and clinical evaluation. *Horm Metab Res* 2015;47:880–8.
 203. Metcalfe R, Jordan N, Watson P, Gullu S, Wiltshire M, Crisp M, et al. Demonstration of immunoglobulin G, A, and E autoantibodies to the human thyrotropin receptor using flow cytometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1754–61.
 204. Orgiazzi J. Anti-TSH receptor antibodies in clinical practice. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000;29:339–55.
 205. Struja T, Jutzi R, Imahorn N, Kaeslin M, Boesiger F, Kutz A, et al. Comparison of five TSH-receptor antibody assays in Graves' disease: results from an observational pilot study. *BMC Endocr Disord* 2019;25:19:38.

206. Diana T, Brown RS, Bossowski A, Segni M, Niedziela M, König J, et al. Clinical relevance of thyroid-stimulating autoantibodies in pediatric Graves' disease—a multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:1648–55.
207. Schott M, Morgenthaler NG, Fritzen R, Feldkamp J, Willenberg HS, Scherbaum WA, et al. Levels of autoantibodies against human TSH receptor predict relapse of hyperthyroidism in Graves' disease. *Horm Metab Res* 2004;36:92–6.
208. Kotwal A, Stan M. Thyrotropin receptor antibodies—an overview. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2018;34:S20–7.
209. Khoo DH, Eng PH, Ho SC, Tai ES, Morgenthaler NG, Seah LL, et al. Graves' ophthalmopathy in the absence of elevated free thyroxine and triiodothyronine levels: prevalence, natural history, and thyrotropin receptor antibody levels. *Thyroid* 2000;10:1093–100.
210. Bartalena L, Marcocci C, Bogazzi F, Manetti L, Tanda ML, Dell'Unto E, et al. Relation between therapy for hyperthyroidism and the course of Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 1998;338:73–8.
211. Wiersinga W, Žarković M, Bartalena L, Donati S, Perros P, Okosieme O, et al; EUGOGO (European Group on Graves' Orbitopathy). Predictive score for the development or progression of Graves' orbitopathy in patients with newly diagnosed Graves' hyperthyroidism. *Eur J Endocrinol* 2018;178:635–43.
212. Saravanan P, Dayan CM. Thyroid autoantibodies. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:315–37.
213. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:489–99.
214. Takasu N, Yamada T, Takasu M, Komiya I, Nagasawa Y, Asawa T, et al. Disappearance of thyrotropin-blocking antibodies and spontaneous recovery from hypothyroidism in autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med* 1992;326:513.
215. Lazarus JH, Hall R, Othman S, et al: The clinical spectrum of postpartum thyroid disease. *Q J Med* 1996;89:429.
216. Zimmerman D. Fetal and neonatal hyperthyroidism. *Thyroid* 1999;9:727–33.

217. Laurberg P, Nygaard B, Glinoe D, Grussendorf M, Orgiazzi J. Guidelines for TSH-receptor antibody measurements in pregnancy: Results of an evidence-based symposium organized by the European Thyroid Association. *Eur J Endocrinol* 1998;139:584.
218. Wallaschofski H, Orda C, Georgi P, Miehle K, Paschke R. Distinction between autoimmune and non-autoimmune hyperthyroidism by determination of TSH-receptor antibodies in patients with initial diagnosis of toxic multinodular goiter. *Horm Metab Res* 2001;33:504–7.
219. Wallaschofski H, Kuwert T, Lohmann T. TSH-receptor autoantibodies - differentiation of hyperthyroidism between Graves' disease and toxic multinodular goitre. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004;112:171–4.
220. Pedersen IB, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Laurberg P. TSH-receptor antibody measurement for differentiation of hyperthyroidism into Graves' disease and multinodular toxic goitre: a comparison of two competitive binding assays. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;55:381–90.
221. Chiovato L, Santini F, Vitti P, Bendinelli G, Pinchera A. Appearance of thyroid stimulating antibody and Graves' disease after radioiodine therapy for toxic nodular goitre. *Clin Endocrinol* 1994;40:803.
222. McGregor AM, McLachlan SM, Smith BR, Hall R. Effect of irradiation on thyroid-autoantibody production. *Lancet* 1979;2:442–4.
223. Heufelder AE, Bahn RS. Detection and localization of cytokine immunoreactivity in retro-ocular connective tissue in Graves' ophthalmopathy. *Eur J Clin Invest* 1993;23:10–17.
224. Bahn RS. Cytokines in thyroid eye disease: potential for anticytokine therapy. *Thyroid* 1998;8:415–8.
225. Smith TJ. TSH-receptor-expressing fibrocytes and thyroid-associated ophthalmopathy. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11:171–81.
226. Łacheta D, Miśkiewicz P, Głuszko A, Nowicka G, Struga M, Kantor I, et al. Immunological aspects of Graves' ophthalmopathy. *Biomed Res Int* 2019;7453260.

227. Xia N, Zhou S, Liang Y, Xiao C, Shen H, Pan H, et al. CD4+ T cells and the Th1/Th2 imbalance are implicated in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Int J Mol Med* 2006;17:911–6.
228. Mysliwiec J, Kretowski A, Szelachowska M, et al. “Serum L-selectin and ICAM-1 in patients with Graves’ ophthalmopathy during treatment with corticosteroids,” *Immunology Letters* 2001;78:123–6.
229. Longo CM, Higgins PJ. Molecular biomarkers of Graves' ophthalmopathy. *Exp Mol Pathol* 2019;106:1–6.
230. Higgins PJ, Smith TJ. Pleiotropic action of interferon gamma in human orbital fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1993;1181:23–30.
231. Flevaris P, Vaughan D. The role of plasminogen activator inhibitor Type-1 in fibrosis. *Semin Thromb Hemost* 2017;43:169–77.
232. Taylor PN, Zhang L, Lee RWJ, Muller I, Ezra DG, Dayan CM, et al. New insights into the pathogenesis and nonsurgical management of Graves orbitopathy. *Nat Rev Endocrinol* 2020;16:104–16.
233. Paridaens D, van den Bosch WA, van der Loos TL, Krenning EP, van Hagen PM. The effect of etanercept on Graves’ ophthalmopathy: a pilot study. *Eye* 2005;19:1286–9.
234. Ayabe R, Rootman DB, Hwang CJ, Ben-Artzi A, Goldberg R. Adalimumab as steroid-sparing treatment of inflammatory-stage thyroid eye disease. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2014;30:415–9.
235. Migliorini P, Italiani P, Pratesi F, Puxeddu I, Boraschi D. The IL-1 family cytokines and receptors in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2020;19:102617.
236. Li B, Smith TJ. Divergent expression of IL-1 receptor antagonists in CD34+ fibrocytes and orbital fibroblasts in thyroid-associated ophthalmopathy: contribution of fibrocytes to orbital inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:2783–90.
237. Khalilzadeh O, Anvari M, Esteghamati A, Mahmoudi M, Tahvildari M, Rashidi A, et al. Graves' ophthalmopathy and gene polymorphisms in interleukin-1alpha, interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor, and interleukin-1 receptor antagonist. *Clin Exp Ophthalmol* 2009;37:614–9.
238. Korducki JM, Loftus SJ, Bahn RS. Stimulation of glycosaminoglycan production in cultured human retroocular fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:2037–42.

239. Han R, Tsui S, Smith TJ. Up-regulation of prostaglandin E2 synthesis by interleukin-1 β in human orbital fibroblasts involves coordinate induction of prostaglandin-endoperoxide H synthase-2 and glutathione-dependent PGE 2 synthase expression. *J Biol Chem* 2002;277:16355–64.
240. Lantz M, Vondrichova T, Parikh H, Frenander C, Ridderstråle M, Asman P, et al. Overexpression of immediate early genes in active Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4784–91.
241. Han R, Smith TJ. Induction by IL-1 β of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human orbital fibroblasts: modulation of gene promoter activity by IL-4 and interferon γ . *J Immunol* 2005;174:3072–9.
242. Cawood TJ, Moriarty P, O'Farrelly C, O'Shea D. The effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin1 on an in vitro model of thyroid-associated ophthalmopathy; contrasting effects on adipogenesis. *Eur J Endocrinol* 2006;155:395–403.
243. Murakami M, Kamimura D, Hirano T. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity* 2019;50:812–31.
244. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 2015;16:448–57.
245. Molnar I, Balazs C. High circulating IL-6 level in Graves' ophthalmopathy. *Autoimmunity* 1997;25:91–6.
246. Hiromatsu Y, Yang D, Bednarczuk T, Miyake I, Nonaka K, Inoue Y. Cytokine profiles in eye muscle tissue and orbital fat tissue from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1194–9.
247. Hwang CJ, Afifiyan N, Sand D, et al. Orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy overexpress CD40: CD154 hyperinduces IL-6, IL-8, and MCP-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2262–8.
248. Chen B, Tsui S, Smith TJ. IL-1 beta induces IL-6 expression in human orbital fibroblasts: identification of an anatomic-site specific phenotypic attribute relevant to thyroid-associated ophthalmopathy. *J Immunol* 2005;175:1310–9.
249. Khong JJ, McNab AA, Ebeling PR, Craig JE, Selva D. Pathogenesis of thyroid eye disease: review and update on molecular mechanisms. *Br J Ophthalmol* 2016;100:142–50.

250. Jyonouchi SC, Valyasevi RW, Harteneck DA, Dutton CM, Bahn RS. Interleukin-6 stimulates thyrotropin receptor expression in human orbital preadipocyte fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 2001;11:929–34.
251. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1–20.
252. Perez-Moreiras JV, Gomez-Reino JJ, Maneiro JR, Perez-Pampin E, Romo Lopez A, Rodríguez Alvarez FM, et al. Tocilizumab in Graves Orbitopathy Study Group. Efficacy of tocilizumab in patients with moderate-to-severe corticosteroid-resistant graves orbitopathy: a randomized clinical trial. *Am J Ophthalmol* 2018;195:181–90.
253. Gu LQ, Jia HY, Zhao YJ, Liu N, Wang S, Cui B, et al. Association studies of interleukin-8 gene in Graves' disease and Graves' ophthalmopathy. *Endocrine* 2009;36:452–6.
254. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 1997;151:317–22.
255. Weetman AP, Bennett GL, Wong WL. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:328–30.
256. Akahane M, Watanabe M, Inoue N, Miyahara Y, Arakawa Y, Inoue Y, et al. Association of the polymorphisms of chemokine genes (IL8, RANTES, MIG, IP10, MCP1 and IL16) with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* 2016;49:312–9.
257. Diana T, Daiber A, Oelze M, Neumann S, Olivo PD, Kanitz M, et al. Stimulatory TSH-receptor antibodies and oxidative stress in Graves disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:3668–77.
258. Marcocci C, Leo M, Altea MA. Oxidative stress in Graves' disease. *Eur Thyroid J* 2012;1:80–7.
259. Zarković M. The role of oxidative stress on the pathogenesis of Graves' disease. *J Thyroid Res* 2012;2012:302537.
260. Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. (eds): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, sixth edition. Elsevier, St. Louis, Missouri, 2018;67:1576–7.

261. Fukayama H, Nasu M, Murakami S, Sugawara M. Examination of antithyroid effects of smoking products in cultured thyroid follicles: only thiocyanate is a potent antithyroid agent. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992;127:520–5.
262. Guerra LN, Moiguer S, Karner M, de Molina MC, Sreider CM, Burdman JA. Antioxidants in the treatment of Graves disease. *IUBMB Life* 2001;51:105–9.
263. Bednarek J, Wysocki H, Sowinski J. Oxidative stress peripheral parameters in Graves' disease: the effect of methimazole treatment in patients with and without infiltrative ophthalmopathy. *Clin Biochem* 2005;38:13–8.
264. Burch HB, Lahiri S, Bahn RS, Barnes S. Superoxide radical production stimulates retroocular fibroblast proliferation in Graves' ophthalmopathy. *Exp Eye Res* 1997;65:311–6.
265. Heufelder AE, Wenzel BE, Bahn RS. Methimazole and propylthiouracil inhibit the oxygen free radical-induced expression of a 72 kilodalton heat shock protein in Graves' retroocular fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:737–42.
266. Tsai CC, Wu SB, Cheng CY, Kao SC, Kau HC, Chiou SH, et al. Increased oxidative DNA damage, lipid peroxidation, and reactive oxygen species in cultured orbital fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy: evidence that oxidative stress has a role in this disorder. *Eye (Lond)* 2010;24:1520–5.
267. Lanzolla G, Marcocci C, Marinò M. Oxidative stress in Graves disease and Graves orbitopathy. *Eur Thyroid J* 2020;9:40–50.
268. Lu R, Wang P, Wartofsky L, Sutton BD, Zweier JL, Bahn RS, et al. Oxygen free radicals in interleukin-1beta-induced glycosaminoglycan production by retro-ocular fibroblasts from normal subjects and Graves' ophthalmopathy patients. *Thyroid* 1999;9:297–303.
269. Bouzas EA, Karadimas P, Mastorakos G, Koutras DA. Antioxidant agents in the treatment of Graves' ophthalmopathy. *Am J Ophthalmol* 2000;129:618–22.
270. Balazs C, Kiss E, Vamos A, Molnar I, Farid NR. Beneficial effect of pentoxifylline on thyroid associated ophthalmopathy (TAO): a pilot study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1999–2002.

271. Marcocci C, Kahaly GJ, Krassas GE, Bartalena L, Prummel M, Stahl M, et al; European Group on Graves' Orbitopathy. Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *N Engl J Med* 2011;19;364:1920–31.
272. Lanzolla G, Marinò M, Marcocci C. Selenium in the treatment of Graves' hyperthyroidism and eye disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;11:608428.
273. Tsai CC, Cheng CY, Liu CY, Kao SC, Kau HC, Hsu WM, et al. Oxidative stress in patients with Graves' ophthalmopathy: relationship between oxidative DNA damage and clinical evolution. *Eye (Lond)* 2009;23:1725–30.
274. Tanrikulu S, Dođru-Abbasođlu S, Ozderya A, Ademođlu E, Karadađ B, Erbil Y, et al. The 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (hOGG1) Ser326Cys variant affects the susceptibility to Graves' disease. *Cell Biochem Funct* 2011;29:244–8.
275. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103–11.
276. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37:277–85.
277. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse. Poremećaj rada štitaste žlezde. Klinički vodič 3/11. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije 2011.
278. Kahaly GJ, Bartalena L, Hegedüs L, Leenhardt L, Poppe K, Pearce SH. 2018 European thyroid association guideline for the management of Graves' hyperthyroidism. *Eur Thyroid J* 2018;7:167–86.
279. Nedeljković Beleslin B. Klinička procena pacijenata sa Graves-ovom orbitopatijom. *Medicinski glasnik Specijalne bolnice za bolesti štitaste žlezde i bolesti metabolizma 'Zlatibor'* 2011;16:40–8.
280. https://www.quidel.com/sites/default/files/product/documents/PI3171001EN00_10_20_Thyretain_TSI_Reporter_BioAssay_Pkg_Insert.pdf
281. Leschik JJ, Diana T, Olivo PD, König J, Krahn U, Li Y et al. Analytical performance and clinical utility of a bioassay for thyroid-stimulating immunoglobulins. *Am J Clin Pathol* 2013;139:192–200.

282. https://www.quidel.com/sites/default/files/product/documents/PI4035011EN00_10_20_Thyretain_TSI_Blocking_Reporter_BioAssay_Pkg_Insert.pdf
283. Li Y, Kim J, Diana T, Klasen R, Olivo PD, Kahaly GJ. A novel bioassay for anti-thyrotrophin receptor autoantibodies detects both thyroid-blocking and stimulating activity. *Clin Exp Immunol* 2013;173:390–7.
284. Opšte uputstvo za test. Elecsys Anti-TSHR (3-e8-201709)
285. Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. (eds): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, sixth edition. Elsevier, St. Louis, Missouri, 2018;13:219–20.
286. <https://www.siemens-healthineers.com/ba/clinical-specialities/thyroid/tsi-assay>
287. https://www.rndsystems.com/products/human-il-6-quantikine-elisa-kit_d6050
288. https://www.rndsystems.com/products/human-il-1ra-il-1f3-quantikine-elisa-kit_dra00b
289. https://www.rndsystems.com/products/human-il-1-beta-il-1f2-quantikine-elisa-kit_dlb50
290. https://www.rndsystems.com/products/human-il-8-cxcl8-quantikine-hs-elisa-kit_hs800
291. <https://www.relassay.com/uploads/TOSinsert.pdf>
292. <https://www.relassay.com/uploads/TASinsert.pdf>
293. <https://www.bosterbio.com/datasheet?sku=EK7114>
294. Clinical Laboratory Standard Institute. User verification of performance for precision and trueness; approved guideline - Third corrected edition. CLSI document EP15-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2017.
295. Food US Drugs Administration. Guidance for industry-bioanalytical method validation. 2018.
296. Piantanida E, Tanda ML, Lai A, Sassi L, Bartalena L. Prevalence and natural history of Graves' orbitopathy in the XXI century. *J Endocrinol Invest* 2013; 36:444–9.
297. Marinò M, Ionni I, Lanzolla G, Sframeli A, Latrofa F, Rocchi R, et al. Orbital diseases mimicking Graves' orbitopathy: a long-standing challenge in differential diagnosis. *J Endocrinol Invest* 2020;43:401–11.
298. Smith TJ. Pathogenesis of Graves' orbitopathy: a 2010 update. *J Endocrinol Invest* 2010;33:414–21.

299. Rapoport B, Alsabeh R, Aftergood D, McLachlan SM. Elephantiasic pretibial myxedema: insight into and a hypothesis regarding the pathogenesis of the extrathyroidal manifestations of Graves' disease. *Thyroid* 2000;10:685–92.
300. Nedeljkovic Beleslin B, Ciric J, Stojkovic M, Savic S, Lalic T, Stojanovic M, et al. Comparison of efficacy and safety of parenteral versus parenteral and oral glucocorticoid therapy in Graves' orbitopathy. *Int J Clin Pract* 2020;74:e13608.
301. Ponto KA, Kanitz M, Olivo PD, Pitz S, Pfeiffer N, Kahaly GJ. Clinical relevance of thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' ophthalmopathy. *Ophthalmology* 2011;118:2279–85.
302. Stöhr M, Oeverhaus M, Lytton SD, Horstmann M, Zwanziger D, Möller L, et al. Predicting the course of Graves' orbitopathy using serially measured TSH-receptor autoantibodies by automated binding immunoassays and the functional bioassay. *Horm Metab Res* 2021;53:435–43.
303. Noh JY, Hamada N, Inoue Y, Abe Y, Ito K, Ito K. Thyroid-stimulating antibody is related to Graves' ophthalmopathy, but thyrotropin-binding inhibitor immunoglobulin is related to hyperthyroidism in patients with Graves' disease. *Thyroid* 2000;10:809–13.
304. Khoo DH, Ho SC, Seah LL, Fong KS, Tai ES, Chee SP, et al. The combination of absent thyroid peroxidase antibodies and high thyroid-stimulating immunoglobulin levels in Graves' disease identifies a group at markedly increased risk of ophthalmopathy. *Thyroid* 1999;9:1175–80.
305. Ando T, Latif R, Davies TF. Antibody-induced modulation of TSH receptor post-translational processing. *J Endocrinol* 2007;195:179–86.
306. Atger M, Misrahi M, Young J, Jolivet A, Orgiazzi J, Schaison G, et al. Autoantibodies interacting with purified native thyrotropin receptor. *Eur J Biochem* 1999;265:1022–31.
307. George A, Diana T, Längericht J, Kahaly GJ. Stimulatory thyrotropin receptor antibodies are a biomarker for Graves' orbitopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;11:629925.

308. Kampmann E, Diana T, Kanitz M, Hoppe D, Kahaly GJ. Thyroid stimulating but not blocking autoantibodies are highly prevalent in severe and active Graves' orbitopathy: a prospective study. *Int J Endocrinol* 2015;67819.
309. McLachlan SM, Rapoport B. Thyrotropin-blocking autoantibodies and thyroid-stimulating autoantibodies: potential mechanisms involved in the pendulum swinging from hypothyroidism to hyperthyroidism or vice versa. *Thyroid* 2013;23:14–24.
310. Cho BY, Shong YK, Lee HK, Koh C-S, Min HK. Graves' hyperthyroidism following primary hypothyroidism: sequential changes in various activities of thyrotropin receptor antibodies. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989;120:447–50
311. Negro R, Hegedus L, Attanasio R, Papini E, Winther KH. A 2018 European Thyroid Association survey on the use of selenium supplementation in Graves' hyperthyroidism and Graves' orbitopathy. *Eur Thyroid J* 2018;8:7–15.
312. Kahaly GJ, Riedl M, König J, Diana T, Schomburg L. Double-blind, placebo-controlled, randomized trial of selenium in Graves hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102:4333–41.
313. Volpe R. Evidence that the immunosuppressive effects of antithyroid drugs are mediated through actions on the thyroid cell, modulating thyrocyte-immunocyte signaling: a review. *Thyroid* 1994;4:217–23.
314. Ponto KA, Kanitz M, Olivo PD, Pitz S, Pfeiffer N, Kahaly GJ. Clinical relevance of thyroid stimulating immunoglobulins in Graves' ophthalmopathy. *Ophthalmology* 2011;118:2279–85.
315. Träisk F, Tallstedt L, Abraham-Nordling M, Andersson T, Berg G, Calissendorff J, et al. Thyroid Study Group of TT 96. Thyroid-associated ophthalmopathy after treatment for Graves' hyperthyroidism with antithyroid drugs or iodine-131. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3700–7.
316. Žarkovic M, Wiersinga W, Perros P, Bartalena L, Donati S, Okosieme O, et al. Antithyroid drugs in Graves' hyperthyroidism: differences between 'block and replace' and 'titration' regimes in frequency of euthyroidism and Graves' orbitopathy during treatment. *J Endocrinol Invest* 2021;44:371–8.
317. Laurberg P, Wallin G, Tallstedt L, Abraham-Nordling M, Lundell G, Topping O. TSH-receptor autoimmunity in Graves' disease after therapy with anti-thyroid drugs,

- surgery, or radioiodine: a 5-year prospective randomized study. *Eur J Endocrinol* 2008;158:69–75.
318. Goh SY, Ho SC, Seah LL, Fong KS, Khoo DH. Thyroid autoantibody profiles in ophthalmic dominant and thyroid dominant Graves' disease differ and suggest ophthalmopathy is a multiantigenic disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:600–7.
319. Mallet B, Lejeune PJ, Baudry N, Niccoli P, Carayon P, Franc JL. N-glycans modulate in vivo and in vitro thyroid hormone synthesis. Study at the N-terminal domain of thyroglobulin. *J Biol Chem* 1995;270:29881–8.
320. Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:85–95.
321. Wiersinga WM, Smit T, van der Gaag R, Mourits M, Koornneef L. Clinical presentation of Graves' ophthalmopathy. *Ophthalmic Res* 1989;21:73–82.
322. Kendler DL, Lippa J, Rootman J. The initial clinical characteristics of Graves' orbitopathy vary with age and sex. *Arch Ophthalmol* 1993;111:197–201.
323. Smith TJ, Koumas L, Gagnon A, Bell A, Sempowski GD, Phipps RP, et al. Orbital fibroblast heterogeneity may determine the clinical presentation of thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:385–92.
324. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/blepharitis/symptoms-causes/syc-20370141>
325. Mourits MP. Diagnosis and differential diagnosis of Graves' orbitopathy. Wiersinga WM, Kahaly GJ (eds): *Graves' Orbitopathy: A Multidisciplinary Approach*. Karger, Basel, 2007;66–76.
326. Jang SY, Shin DY, Lee EJ, Choi YJ, Lee SY, Yoon JS. Correlation between TSH receptor antibody assays and clinical manifestations of Graves' orbitopathy. *Yonsei Med J* 2013;54:1033–9.
327. Mourits MP, Lombardo SH, van der Sluijs FA, Fenton S. Reliability of exophthalmos measurement and the exophthalmometry value distribution in a healthy Dutch population and in Graves' patients. An exploratory study. *Orbit* 2004;23:161–8.
328. <https://www.eugogo.eu/media/xjjjg33y/eugogo-initial-assessment-proforma.pdf>

329. Diana T, Wuster C, Kanitz M, Kahaly GJ. Highly variable sensitivity of five binding and two bio-assays for TSH-receptor antibodies. *J Endocrinol Invest* 2016;39:1159–65.
330. Allelein S, Diana T, Ehlers M, Kanitz M, Hermsen D, Schott M, et al. Comparison of a bridge immunoassay with two bioassays for thyrotropin receptor antibody detection and differentiation. *Horm Metab Res* 2019;51:341–46.
331. Theodorsson E. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. *Bioanalysis* 2012;4:305–20.
332. Chesher D. Evaluating assay precision. *Clin Biochem Rev* 2008;Suppl 1:S23–6.
333. Theodorsson E, Magnusson B, Leito I. Bias in clinical chemistry. *Bioanalysis* 2014;6:2855–75.
334. Bossuyt PM, Irwig L, Craig J, Glasziou P. Comparative accuracy: assessing new tests against existing diagnostic pathways. *BMJ* 2006;332:1089–92.
335. Hayen A, Macaskill P, Irwig L, Bossuyt P. Appropriate statistical methods are required to assess diagnostic tests for replacement, add-on, and triage. *J Clin Epidemiol* 2010;63:883–91.
336. Tahara K, Ishikawa N, Yamamoto K, Hirai A, Ito K, Tamura Y, et al. Epitopes for thyroid stimulating and blocking autoantibodies on the extracellular domain of the human thyrotropin receptor. *Thyroid* 1997;7:867–77.
337. Diana T, Holthoff HP, Fassbender J, Wüster C, Kanitz M, Kahaly GJ, et al. A novel long-term Graves' disease animal model confirmed by functional thyrotropin receptor antibodies. *Eur Thyroid J* 2020;9:51–8.
338. Kahaly GJ, Diana T, Kanitz M, Frommer L, Olivo PD. Prospective trial of functional thyrotropin receptor antibodies in Graves disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;105:e1006–14.
339. Fallahi P, Ferrari SM, Elia G, Ragusa F, Paparo SR, Patrizio A, et al. Cytokines as targets of novel therapies for Graves' ophthalmopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:654473.
340. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:911–19.

341. Stoyanova MA, Shinkov AD, Georgiev GK, Kovatcheva RD. Association between clinical activity score and serum interleukin-6, interleukin-8 and interleukin-10 during systemic glucocorticoid treatment for active moderate-to-severe Graves' orbitopathy. *Curr Eye Res* 2021;46:1503–8.
342. Rajaii F, McCoy AN, Smith TJ. Cytokines are both villains and potential therapeutic targets in thyroid-associated ophthalmopathy: From bench to bedside. *Expert Rev Ophthalmol* 2014;9:227–34.
343. Raychaudhuri N, Roshini F, Smith TJ. Thyrotropin regulates IL-6 expression in CD34+ fibrocytes: clear delineation of its cAMP-independent actions. *PLoS One* 2013;25;8:e75100.
344. Song RH, Wang B, Yao QM, Li Q, Jia X, Zhang JA. Proteomics screening of differentially expressed cytokines in tears of patients with Graves' ophthalmopathy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2020;20:87–95.
345. Liu YH, Chen RH, Wu HH, Liao WL, Chen WC, Tsai Y, et al. Association of interleukin-1beta (IL1B) polymorphisms with Graves' ophthalmopathy in Taiwan Chinese patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:6238–46.
346. Douglas RS, Gupta S. The pathophysiology of thyroid eye disease: implications for immunotherapy. *Curr Opin Ophthalmol* 2011;22:385–90.
347. Siddiqi A, Monson JP, Wood DF, Besser GM, Burrin JM. Serum cytokines in thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:435–9.
348. Nowak M, Siemińska L, Karpe J, Marek B, Kos-Kudła B, Kajdaniuk D. Serum concentrations of HGF and IL-8 in patients with active Graves' orbitopathy before and after methylprednisolone therapy. *J Endocrinol Invest* 2016;39:63–72.
349. Aslan M, Cosar N, Celik H, Aksoy N, Dulger AC, Begenik H, et al. Evaluation of oxidative status in patients with hyperthyroidism. *Endocrine* 2011;40:285–9.
350. Lisi S, Botta R, Lemmi M, Sellari-Franceschini S, Altea MA, Sisti E, et al. Quercetin decreases proliferation of orbital fibroblasts and their release of hyaluronic acid. *J Endocrinol Invest* 2011;34:521–7.
351. Akarsu E, Buyukhatipoglu H, Aktaran S, Kurtul N. Effects of pulse methylprednisolone and oral methylprednisolone treatments on serum levels of oxidative stress markers in Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;74:118–24.

352. Agan V, Celik H, Eren MA, Agan FZ, Erel O, Neselioglu S, et al. An investigation of oxidative stress and thiol/disulphide homeostasis in Graves' disease. *Medicina (Kaunas)* 2019;14;55:275.
353. Korkmaz H, Tabur S, Ozkaya M, Oguz E, Aksoy N, Akarsu E. Serum prolidase levels in Graves' disease without ophthalmopathy and its association with oxidative status. *J Endocrinol Invest* 2015;38:1167–73.
354. Larsen CB, Riis KR, Winther KH, Larsen EL, Ellervik C, Hegedüs L, et al. Treatment of hyperthyroidism reduces systemic oxidative stress, as measured by markers of RNA and DNA damage. *J Clin Endocrinol Metab* 2021;106:e2512–20.
355. Malic Z, Topic A, Francuski D, Stankovic M, Nagorni-Obradovic L, Markovic B, et al. Oxidative stress and genetic variants of xenobiotic-metabolising enzymes associated with COPD development and severity in Serbian adults. *COPD* 2017;14:95–104.
356. Raupach T, Schäfer K, Konstantinides S, Andreas S. Secondhand smoke as an acute threat for the cardiovascular system: a change in paradigm. *Eur Heart J* 2006;27:386–92.
357. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2009;27:120–39.
358. Topic A, Francuski D, Markovic B, Stankovic M, Dobrivojevic S, Drca S, et al. Gender-related reference intervals of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in Serbian population. *Clin Biochem* 2013;46:321–6.
359. Evans MD, Olinski R, Loft S, Cooke MS. European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis. Toward consensus in the analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a noninvasive biomarker of oxidative stress. *FASEB J* 2010;24:1249–60.
360. Park EM, Shigenaga MK, Degan P, Korn TS, Kitzler JW, Wehr CM, et al. Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3375–9.

361. Poulsen HE, Nadal LL, Broedbaek K, Nielsen PE, Weimann A. Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:801–8.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Sarić Matutinović je rođena 08.03.1987. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Treću beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu. Studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer magistar farmacije – medicinski biohemičar, upisala je 2006., a diplomirala 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,18. Diplomski rad pod nazivom „Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod dece sa akutnim pijelonefritisom kao pokazatelji funkcije bubrega i trajanja infekcije“ odbranila je na Katedri za medicinsku biohemiju, sa ocenom 10 (deset). Po završetku studija, obavila je obavezni pripravnički staž u Službi za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku, Centra za medicinsku biohemiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Stručni ispit za magistre farmacije – medicinske biohemičare položila je 2013. godine pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravlja, Republike Srbije. Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, modul Medicinska biohemija, upisala je školske 2014/15. godine.

Od marta 2015. godine zaposlena je kao istraživač na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Biomarkeri oštećenja i disfunkcije organa“, čiji je rukovodilac Prof. dr Svetlana Ignjatović. Od školske 2015/2016. godine angažovana je u izvođenju praktične nastave na Integrisanim akademskim studijama, na studijskom programu Farmacija – medicinska biohemija. Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta održanoj 21.10.2021. godine izabrana je u zvanje asistenta, a na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta održanoj 25.11.2021. godine izabrana je u zvanje istraživač-saradnik. Bila je član Komisija za odbranu završnih radova i komentor studentskih naučno-istraživačkih radova.

Autor je 9 radova objavljenih u međunarodnim časopisima (3 rada u časopisima kategorije M22, 5 radova u časopisima kategorije M23 i jedan rad u časopisu kategorije M52) i 16 saopštenja sa kojima je učestvovala na domaćim i međunarodnim naučnim stručnim skupovima. Recezent je nekoliko međunarodnih časopisa. Član je Društva medicinskih biohemičara Srbije, Komore biohemičara Srbije i EFLM Akademije (Akademija Evropske federacije za laboratorijsku medicinu).

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Сарић Матутиновић

Број индекса 24/14

Студијски програм Медицинска биохемија

Наслов рада Клиничка вредност антитела на ТСХ рецепторе код пацијената са
Грејвсовом орбитопатијом/офталмопатијом

Ментор проф. др Светлана Игњатовић, проф. др Биљана Недељковић Белеслин

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 13.06.2022.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија Сарић Матутиновић

Број индекса 24/14

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Клиничка вредност антитела на ТСХ рецепторе код пацијената са Грејвсовом орбитопатијом/офталмопатијом

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 13.06.2022.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Клиничка вредност антитела на ТСХ рецепторе код пацијената са Грејвсовом орбитопатијом/офталмопатијом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 13.06.2022.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.