

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET



Sanja G. Dragašević

**Intestinalna tkivna ekspresija *IL17A*, *IL17F*,  
*IL23A* i *TLR9* gena u zapaljenskim bolestima  
creva**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE



Sanja G.Dragašević

**Intestinal gene expression of *IL17A*, *IL17F*,  
*IL23A* and *TLR9* in inflammatory bowel  
diseases**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

Mentori:

**Dr Dragan Popović**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Dr Sonja Pavlović**, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
Univerzitet u Beogradu

Komisija:

**Dr Srđan Đuranović**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Dr Miodrag Krstić**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Dr Aleksandra Sokić-Milutinović**, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Dr Tamara Milovanović**, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Dr Snežana Pajović**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_ 2020. godine

*Ova doktorska disertacija je realizovana zahvaljujući saradnji tima Klinike za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog centra Srbije i Laboratorije za molekularnu biomedicinu Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.*

*Želim da izrazim posebnu zahvalnost dr Biljani Stanković, naučnom saradniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, pod čijim neposrednim rukovođenjem su urađeni eksperimenti analize molekularno-genetičkih markera inflamacije u inflamatornim bolestima creva. Takođe, hvala dr Nikoli Koturu na saradnji u ostvarivanju ovog projekta.*

*Zahvaljujem se prvenstveno profesoru dr Draganu Popoviću, mentoru ove disertacije, koji me je naučio da je želja početna tačka svakog uspeha, da isti nije konačan, a neuspeh fatalan, a da je hrabrost i upornost presudna.*

*Zahvaljujem se dr Sonji Pavlović, komentoru ove disertacije, na nadahnuću da se istražuje i otkriva molekularni svet medicine, na savetima, energiji i istrajnom radu na ovoj tezi.*

*Posebnu zahvalnost dugujem profesoru dr Srđanu Đuranoviću, na savetima, podršci i motivaciji za stalnim usavršavanjem, profesorki dr Aleksandri Sokić Milutinović koja me je naučila da se znanje množi deljenjem i osobito profesorki dr Tamari Milovanović na izvanrednim sugestijama i ukazanom poverenju, podršci, beskrajnoj energiji i stalnoj inspiraciji u naučno-istraživačkom radu.*

*Veliko hvala svim mojim kolegama Klinike za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog Centra Srbije, na ohrabrenju, strpljenju i produktivnim razgovorima, kao i medicinskim sestrama na pomoći u pripremi materijala za ovaj rad.*

*Hvala mojoj porodici i bliskim prijateljima jer jedino u ljubavi nema nemogućeg.*

*"Svaki je čovek citat svojih predaka." R. V. Emerson*

*Ovu tezu posvećujem Gordani, Gradimiru, Radomiru i Ljiljani*

## **Intestinalna tkivna ekspresija *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* gena u zapaljenskim bolestima creva**

### SAŽETAK

Zapaljenske bolesti creva (ZBC) su hronične, idiopatske bolesti u koje spadaju Kronova bolest (KB) i ulcerozni kolitis (UK). Nastanak ZBC je posledica poremećenog imunološkog odgovora na intestinalnu mikrofloru kod genetički predisponiranog domaćina. Signalna interakcija Toll-like receptora 9 (TLR9), interleukina (IL)-23 i IL-17 u patogenezi ZBC nije u potpunosti razjašnjena.

Cilj ove studije bio je ispitivanje razlika u ekspresiji gena *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* između inflamirane i neinflamirane mukoze intestinuma kod pacijenata sa endoskopski aktivnom ZBC. Dodatni cilj bila je asocijacija nivoa ekspresije ovih gena sa kliničkim parametrima ZBC. S obzirom da je odnos *IL17A* i *IL17F* važan za regulaciju zapaljenskog procesa, još jedan od ciljeva bila je procena međusobnog odnosa ekspresije navedenih gena u inflamiranoj i neinflamiranoj mukozi ZBC.

U studiju je bilo uključeno 104 novodijagnostikovana pacijenata sa ZBC (50 KB, 54 UK). Ispitivanje nivoa ekspresije odabranih gena u uparenim uzorcima inflamirane i neinflamirane mukoze intestinuma izvršeno je primenom metode real-time PCR.

Rezultati ekspresione analize pokazali su značajno više nivoe ekspresije *IL17A* i *IL17F* u inflamiranoj mukozi intestinuma ZBC. Inflamirana mukoza ileuma u KB i mukoza kod UK pokazale su povišenu ekspresiju *IL23A*, dok su inflamirani uzorci ileuma kod KB imali povišen nivo *TLR9*. Nivo ekspresije ispitivanih gena bio je povezan sa fenotipom i težinom ZBC. Uočena je značajna razlika u nivou odnosa ekspresije *IL17A/IL17F* između bolesne i zdrave mukoze kod UK.

Pokazano je da su *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* značajni za nastanak i kliničku sliku ZBC. Međutim, ekspresioni profili ovih gena nisu isti kod različitih fenotipova KB i UK što može uticati na precizniju, molekularnu klasifikaciju ZBC i primenu personalizovanog pristupa u terapiji ovih bolesti.

**Ključne reči (do 10):** zapaljenske bolesi creva, Kronova bolest, ulcerozni kolitis, ekspresioni profil

*IL17A, IL17F, IL23A i TLR9* gena

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

## **Intestinal gene expression of *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* and *TLR9* in inflammatory bowel diseases**

### **ABSTRACT**

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic, idiopathic diseases that include Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). IBD development is associated with disrupted immune response to the intestinal microflora in genetically susceptible hosts. The signaling interplay of Toll-like receptor 9 (TLR9), interleukin (IL) -23 and IL-17 in the pathogenesis of IBD has not been completely clarified.

The aim of this study was to investigate differences in *IL17A*, *IL17F*, *IL23A*, and *TLR9* expression in paired inflamed and non-inflamed intestinal mucosa in patients with endoscopically active IBD. An additional goal was to associate the expression levels of these genes with the clinical parameters of CD and UC. Since the *IL17A* and *IL17F* ratio is important for the regulation of the inflammatory process, another aim was to evaluate the interrelation of their expression in inflamed and non-inflamed IBD mucosa.

The study included 104 newly diagnosed IBD patients (50 CD, 54 UC). Expression analysis of selected genes was performed in paired samples of inflamed and non-inflamed mucosa of the intestine by real-time PCR.

Expression profile results showed significantly increased levels of *IL17A* and *IL17F* in inflamed IBD mucosa. Inflamed CD ileal and UC mucosa showed increased *IL23A*, while only inflamed CD ileal samples showed increased *TLR9* levels. The examined genes expression level was related to the phenotype and severity of IBD. A significant difference was observed in the level of *IL17A* / *IL17F* expression ratio between inflamed and non-inflamed mucosa in the UC.

We showed that *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* and *TLR9* are significant for IBD development and clinical presentation. However, the expression profiles of these genes are not the same for different CD and UC

phenotypes, which may contribute to the more precise, molecular classification of IBD and personalized approach in the treatment of these diseases.

**Key words:** inflammatory bowel disease, Crohn disease, ulcerative colitis, expression profiling of

*IL17A, IL17F, IL23A, TLR9* gene

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Molecular medicine



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Istorijat zapaljenskih bolesti creva .....	2
1.2. Klinički pristup i manifestacije zapaljenskih bolesti creva.....	3
1.3. Epidemiologija zapaljenskih bolesti creva.....	5
1.4. Patogeneza zapaljenskih bolesti creva.....	6
1.4.1. Uloga genetike u zapaljenskim bolestima creva.....	11
1.4.2. Uloga imunskog sistema u razvoju zapaljenskih bolesti creva.....	13
1.4.2.1. Th17 profil zapaljenskih bolesti creva.....	16
1.5. Uloga citokina u razvoju zapaljenskih bolesti creva.....	21
1.5.1. Uloga citokina IL-23 u nastanku zapaljenskih bolesti creva.....	22
1.5.2. Uloga citokina IL-17 u nastanku zapaljenskih bolesti creva.....	27
1.6. Uloga TLR9 u nastanku zapaljenskih bolesti creva.....	31
<b>2. CILJEVI .....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>37</b>
3.1. Ispitanici.....	38
3.1.1. Klinička klasifikacija pacijenta sa Kronovom bolesti i ulceroznim kolitisom.....	39
3.1.2. Klinička aktivnost zapaljenske bolesti creva.....	40
3.1.3. Endoskopska aktivnost zapaljenskih bolesti creva.....	43
3.2. Prikupljanje bioptata mukoze intestinuma.....	44
3.3 Analiza ekspresije gena <i>IL17A</i> , <i>IL17F</i> , <i>IL23A</i> i <i>TLR9</i> .....	44
3.3.1. Izolacija RNK materijala iz bioptata intestinalnog tkiva.....	44

3.3.2. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) metodom reverzne transkripcije.....	45
3.3.3. Kontrola kvaliteta cDNK.....	46
3.3.4. Analiza kvaliteta cDNK na agaroznom gelu.....	47
3.3.5 TaqMan real-time PCR.....	47
3.3.5.1 Dizajn prajmera za merenje nivoa ekspresije gena <i>TLR9</i> .....	51
3.3.5.2. Validacija metode za merenje nivoa ekspresije <i>TLR9</i> .....	52
3.4. Statistička analiza rezultata.....	54
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>55</b>
4.1. Karakteristike studijske grupe pacijenata sa zapaljenskim bolestima creva.....	56
4.2. Optimizacija metode za određivanje nivoa ekspresije gena <i>TLR9</i> .....	59
4.3 Ispitivanje nivoa ekspresije ciljanih gena u intestinalnom tkivu pacijenata sa zapaljenskim bolestima creva.....	61
4.3.1 Ispitivanje razlika u nivoima ekspresije gena <i>IL17A</i> , <i>IL17F</i> , <i>IL23A</i> , <i>TLR9</i> između inflamacijom zahvaćene i nezahvaćene mukoze intestinuma.....	61
4.3.2 Korelacija nivoa ekspresije gena <i>IL17A</i> , <i>IL17F</i> , <i>IL23A</i> i <i>TLR9</i> sa kliničkom i endoskopskom prezentacijom KB i UK.....	65
4.3.3. Određivanje međusobnog odnosa ekspresije gena <i>IL17A</i> i <i>IL17F</i> u zapaljenjem zahvaćenoj i nezahvaćenoj mukozi intestinuma kod pacijenata sa endoskopski aktivnom KB i UK.....	74
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>77</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>86</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>89</b>

# 1. UVOD

---

Zapaljenske bolesti creva (eng. *inflammatory bowel disease (IBD)*) su hronične, idiopatske i relapsirajuće bolesti gastrointestinalnog trakta koje se mogu manifestovati kao Kronova bolest (KB) i ulcerozni kolitis (UK). Ključni mehanizmi u patogenezi zapaljenskih bolesti creva (ZBC) obuhvataju defekt u funkciji epitelijalne barijere (povećanje permeabilnosti, adherencije bakterija i smanjene ekspresije defenzina), disbalans intestinalnog imunskog sistema koji se ogleda u preteranoj aktivaciji urođenog imuniteta na prisustvo rizičnih antigena i odgovoru stečene imunosti sa aktivacijom efektorskih limfocita. Ulcerozni kolitis predstavlja oboljenje čija kontinuirana inflamacija zahvata mukozu intestinuma limitiranu isključivo na debelo crevo, dok se Kronova bolest odlikuje diskontinuiranom transmuralnom inflamacijom koja može biti lokalizovana u bilo kom delu gastrointestinalnog trakta.

### **1.1 Istorijat zapaljenskih bolesti creva**

Zapaljenske bolesti creva su inicijalno opisane kao izolovani slučajevi u Velikoj Britaniji (Samuel Wilks, 1859) i severnoj Americi (1932, Buriril Bernard Crohn) [1, 2].

Dijagnoza "prost ulcerozni kolitis" je postavljena prvi put 1859. godine autopsijskim nalazom ulcerativnih i inflamatornih promena kolona nakon letalnog ishoda 42-godišnje žene sa prethodnom kliničkom slikom prolongiranih krvavih dijareja i febrilnosti [1]. Do početka XX veka (1909. godine) u Londonu hospitalizovano je do 317 pacijenata sa dijagnozom ulceroznog kolitisa, većinom umrlih zbog perforacije debelog creva, peritonitisa, krvarenja, sepse i plućne embolije [3]. Porast novotkrivenih slučajeva UK registrovan je i u Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), sa spekulacijama u naučnim krugovima oko etiologije nastanka, uključujući alergiju na hranu i psihijatrijske poremećaje. Primena antibiotika penicilina 1946.godine u uspešnom lečenju UK ukazala je na potencijalnu infektivnu etiologiju bolesti, dok je pozitivan terapijski odgovor na ordiniranje kortikotropina 1950. predstavio prekretnicu u daljem istraživanju imunoloških mehanizama patogeneze ZBC [4].

Do XVIII veka slučajevi KB opisani su autopsijskim nalazima "ulcerisanog cekuma i njegove invaginacije" i perforacijom distalnog ileuma sa uvećanjem mezenteričnih limfnih čvorova [5, 6]. U XIX veku uočene su fistulozne forme Kronove bolesti, 1830.godine kod dece opisane su perianalne, rektovaginalne i rektovezikularne fistule, a 1889.godine ileokolonične fistule sa dilatacijom i hipertrofijom ileuma kod mlade žene [7, 8]. U XX veku, u Evropi, dokumentovani su slični slučajevi KB opisane pojavom „inflatornih masa“ limitiranih za hirurško lečenje, sa kliničkom slikom abdominalnog bola, dijareja, pojedinačnih progresija u intestinalnu obstrukciju i smrt pod sumnjom na mikobakterijalno intestinalno oboljenje [9, 10]. U SAD registrovane su serije slučajeva mlađih pacijenata, nakon apendektomije, sa simptomima febrilnosti, bolova u trbuhu, dijareje, gubitka u telesnoj masi i pojavom granulomatoznih lezija gastrointestinalnog trakta najčešće terminalnog ileuma i ileocekalne regije [11]. Iako su Crohn i saradnici 1932. godine prvi put definisali regionalni ileitis kao nov izolovani patološki entitet, dijagnoza KB nije bila u potpunosti prihvaćena u SAD sve do 1960 godine [2, 12, 13].

## **1.2. Klinički pristup i manifestacije zapaljenskih bolesti creva**

Dijagnostički algoritam ZBC uključuje anamnestičke podatke pacijenta, laboratorijske analize, kliničku prezentaciju bolesti, kolonoskopiju sa terminalnom ileoskopijom i uzimanjem biopsija mukoze za histopatološku potvrdu bolesti, a u određenim slučajevima gornju endoskopiju sa biopsijama sluznice i dopunske radiografske vizuelizacione metode (kompjuterizovana tomografija (CT) ili nuklearna magnetna rezonanca (NMR) abdomena i male karlice, enterografija ili enterokliza). U kliničkoj praksi procena aktivnosti UK i KB je važna u cilju izbora terapijskog protokola i efekta istog, kao i prognoze daljeg toka bolesti. Iako ne postoji zlatni standard, primenom kliničkih indeksa i skorova određenih na osnovu simptoma i ponašanja bolesti, endoskopske i histološke aktivnosti ZBC, rezultata laboratorijskih i radiografskih ispitivanja, procenjuje se aktivnost UK i KB [14, 15].

ZBC imaju neprevidiv klinički tok, sa fazama relapsa (pogoršanja) i remisije (stabilna bolest). Faktori koji utiču na kliničke manifestacije ZBC su lokalizacija (ekstenzivnost) bolesti, stepen aktivnosti, fenotipske odlike i priustvo ekstraintestinalnih manifestacija [14, 15]. Klinički tok je najčešće teži kod mlađih pacijenata u odnosu na stariju životnu dob na dijagnozi [16].

Pacijenti sa UK imaju najčešće simptome u vidu učestalih prolivastih stolica sa primesom krvi, bolove u trbuhu, lažne pozive na crevno pražnjenje uz pojavu malaksalosti, gubitka u telesnoj masi (TM) i povišene telesne temperature. Lokalizacija zapaljenskog procesa u UK može biti ograničena na rektum (proktitis), levi kolon (levostrani kolitis), izvan granica levog kolona (ekstenzivni kolitis) ili ceo kolon (pankolitis). Nezavisno od lokalizacije, aktivnost bolesti može biti blaga, umerena ili teška [14].

Klinički simptomi kod KB zavise od lokalizacije bolesti, često sa pojavom prolivastih stolica, bolova u trbuhu, gubitka u TM, mučnine, povraćanja i slabosti. Najčešći simptom je proliv koji se javlja i noću za razliku od funkcionalnih bolesti creva [15, 17]. Aproximativno u 10% slučajeva dijagnoza KB se postavlja operativno, dok na dijagnozi 10% pacijenata ima ekstraintestinalne komplikacije [15, 17]. Lokalizacija transmuralne inflamacije u KB može biti izolovana u tankom crevu (ileitis), debelom crevu (colitis), ileumu i kolonu (ileocolitis) i proksimalnim partijama digestivnog trakta. Perianalna bolest se karakteriše prisustvom perianalnih fistula i fisura [15, 17, 18]. Prema podacima iz literature, identifikovana je kod trećine novodijagnostikovanih pacijenata sa KB i češće u slučaju kolonične lokalizacije. Izolovani slučajevi perianalne bolesti su retki i javljaju se u približno 5% pacijenata [18]. KB može imati nestrikturirajući-nepenetrirajući (inflamatorni), fistulizirajući (penetrantni) ili stenozaantni fenotip bolesti [15, 17, 18].

Najčešće intestinalne komplikacija toka ZBC su perforacija kolona, fulminantni tok bolesti, opstruktivni ileus, pojava abscesnih kolekcija i fistula (komunikacije lumena creva sa ostalim organima) i nastanak karcinoma [14, 15]. Ekstraintestinalne manifestacije (EIM) se javljaju kod aktivne ZBC ili su

prisutne nezavisno od bolesti [19]. Kod UK oko trećina pacijenata ima EIM, dok kod približno četvrtine pacijenata iste su prisutne na dijagnozi [14]. EIM se javljaju u aproksimativno 35% pacijenata sa KB [20]. Mogu biti udružene sa aktivnom ZBC, najčešće koštano-zglobnog porekla, kožne promene u vidu eriteme nodozum (EN), promene na očima (episkleritis), aftozne ulceracije usne duplje i venske tromboze udružene sa tromboembolijom. Nezavisno od aktivnosti UK i KB javljaju se pridružene manifestacije kao što je uveitis, ankilozirajući spondilitis, pioderma gangrenozum, primarni slekrozirajući holangitis kao i druge pridružene komplikacije vancrevnih sistema [19, 20].

### **1.3 Epidemiologija zapaljenskih bolesti creva**

Poslednjih nekoliko decenija ZBC postale su značajni činilac ukupnog morbiditeta u opštoj populaciji, a porast incidence obolevanja od KB i UK predstavlja medicinski problem velikih razmera [21, 22].

Ukupan broj obolelih od ZBC u Evropi i Severnoj Americi iznosi do oko 2.5-3 miliona ljudi, dok u Srbiji tačan podatak ne postoji [23]. Epidemiološke studije ukazuju na najveću prevalencu ZBC u Evropi (UK 505/100 000 u Norveškoj; KB 322/100 000 u Nemačkoj) i Severnoj Americi (UK 286/100 000 u SAD; KB 319/100 000 u Kanadi) [21]. Novije populacione studije ukazuju na potencijalni porast incidence u Južnoj Americi, istočnoj Evropi, Aziji i Africi [21, 24]. Porast prevalencije ZBC do proksimalno 3% opšte populacije registrovan je u Kanadi, Danskoj, Nemačkoj, Mađarskoj, Australiji, Švedskoj i SAD [25-31]. Porast incidence i prevalencije ZBC u zemljama istočne Evrope i Azije interpretira se boljim dijagnostičkim algoritmima, ali i efektu industrijalizacije i promenama faktora sredine [30]. Novije epidemiološke studije geografskih varijacija ZBC poslednjih godina ukazuju na efemernost fenomena gradijent sever-jug sa porastom incidence UK i KB u južnim regionima sveta [32, 33].

ZBC se mogu javiti u pedijatrijskoj i adultnoj populaciji, sa bimodalnom starosnom distribucijom u adultnom periodu, najčešće kod mlađih individua starosti od 20 do 30 godina, dok drugi, ređi, starostni pik se javlja u periodu od 50 do 70 godine [34, 35]. KB najčešće počinje između 20 i 40 godine, dok UK u periodu od 30 do 40 godine [36, 37, 38]. Na osnovu novih epidemioških studija, rizik za nastanak ZBC isti kod muškaraca i žena [14, 15].

Na osnovu prethodnih istraživanja koja su uključila različite etničke i rasne grupe stanovništva, Aškenazi jevrejska populacija pokazala je veći rizik za nastanak KB u odnosu na nejevrejsku belu populaciju [39]. Interesantno, među jevrejskim stanovništvom postoje značajne razlike u prevalenci ZBC u različitim geografskim regionima što ističe efekat faktora sredine [34, 39]. Sprovedena istraživanja ukazivala su da bela populacija predominantno oboleva od ZBC [34, 40]. Međutim, studije sprovedene u SAD ukazale su na češće obolevanje i belaca i Afričkih Amerikanaca od KB, dok su Meksikanci češće imali UK [41].

Tačni podaci o incidenci i prevalenci ZBC u Srbiji i dalje ne postoje. Epidemiološke studije u Istočnoj Evropi su registrovale porast incidence i prevalence ZBC [33]. Prema rezultatima mađarske studije u periodu od 2002. do 2006.godine, incidenca ZBC je bila 18.9/100 000 stanovnika 2002.godine, a 4 godina kasnije bila je 29.9/100 000 [42]. Populaciona studija uradjena u periodu 2000-2004. godine u Hrvatskoj ukazala je na prosečnu incidencu UK 4.6/100 000, a za KB 6.5/100000 [43]

#### **1.4. Patogeneza zapaljnskih bolesti creva**

Dijapazon kompleksnih interakcija imunoloških, genetičkih, mikrobijalnih i faktora sredine doprinosi povećanju propustljivosti mukoze digestivnog trakta, aktivaciji i amplifikaciji imunskog odgovora i oštećenju tkiva u patogenezi KB i UK [44, 45]. Aktuelna hipoteza o nastanku ZBC bazira se



na poremećenom imunološkom odgovoru na intestinalnu mikrofloru pod uticajem sredinskih faktora kod genetički predisponiranih osoba [46].

Strachan-ova higijenska hipoteza iz 1989.godine imala je za cilj da objasni dramatičan porast atopijskih bolesti poremećajem imunskog odgovora usled poboljšavanja uslova lične higijene i redukovanom ekspozicijom mikrobima [47]. Noverr i Huffnagle su 2005.godine predstavili higijensku hipotezu nastanka ZBC kao poremećen odgovor imunskog sistema CD4+T helper (Th)-2 limfocita na intestinalnu mikrofloru u asocijaciji sa nekim okidačem faktora sredine [48].

Crevna mikroflora ima metaboličku i imunološku ulogu u održavanju homeostaze i simbioze sa domaćinom [49, 50]. Sterilna humana intestinalna flora na rođenju, već u prvim satima života, kolonizovana je bakterijama. Porast broja i raznovrsnost bakterija intestinalne flore zavisi od toka porođaja, načina ishrane novorođenčeta i faktora sredine. U toku odrastanja diverzitet crevnih mikroorganizama se povećava do adultnog doba [49]. Crevna mikroflora je pod dinamičnim uticajem genoma domaćina, sredinskih faktora, kao i intestinalne inflamacije [49, 51]. Četiri najčešća bakterijska filuma crevne flore su *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria* [52].

Faktori sredine mogu uticati na promene u sastavu intestinalne mikrobiote [53-55]. Najčešće proučavani faktori sredine kao faktori rizika za nastanak ZBC su stil života (pušenje, izlaganje stresu, spavanje, dijetetski režimi, dojenje novorođenčadi), upotreba farmakoloških agenasa (nesteroidni anti-inflamatorni lekovi, antibiotici, oralni kontraceptivi, vakcinacija), ekološki faktori (zagađenje vazduha i vode, deficit vitamina D) i prethodne operacije (apendektomija) [53, 55].

Prolongirane izmene režima ishrane mogu indukovati promene intestinalne mikrobiote [53, 56]. Studije vezane za ispitivanje faktora rizika za razvoj ZBC ukazale su na potencijalni protektivni efekat unosa namernica bogatih biljnim vlaknima, za razliku od negativnog efekta povećanog unosa proteina

životinjskog porekla [57]. EPIC studija (*the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) koja je uključila oko 200 000 Evropljana iz šest različitih zemalja ukazala je da povećan unos omega-6-masne kiseline predstavlja faktor rizika za razvoj UK [57]. Nakon unosa namirnica bogatih linolnom kiselinom (crveno meso, određene vrste ulja i margarina) u organizmu dolazi do metaboličke konverzije u polinezasićenu omega-6 masnu kiselinu koja se naziva arahidonska kiselina. Ona predstavlja komponentu ćelijske membrane debelog creva, te njeno oslobađanje dovodi do daljeg metabolisanja u proinflatorne medijatore prostaglandin E2, leukotrijen B4 i tromboksan A2 koji su povišeni u mukozi intestinuma UK [57]. Dosadašnja ispitivanja istakla su potencijalno protektivni efekat unosa ribe, voćnih vlakana, kalijuma i cinka na pojavu KB, ali ne i UK [58, 59]. Primena aditiva (šećer i zaslađivači, soli, surfaktanti, organski rastvarači, gluten, nanopatikule, transglutaminaze) u svakodnevnoj ishrani povećava rizik od autoimunih bolesti, potencijalno utiče na permeabilnost intestinalne membrane preko međućelijskih čvrstih veza („*tight junction*“) rezultujući prodorom stranih antigena i aktivacijom autoinflatorne kaskade [60].

Upotreba visokih doza nesteroidni-antiinflatornih lekova (NSAIL) u dužem vremenskom periodu dovedena je u vezu sa rizikom od nastanka KB i UK [17, 61]. Navedeni lekovi mogu dovesti do oštećenja mukoze digestivnog trakta efektom inhibicije sinteze prostaglandin-endoperoksida ili ciklooksigenaze (COX). COX posredovan poremećaj intestinalne epitelijane barijere doprinosi riziku od nastanka ZBC tako što utiče na interakciju između crevnih mikroba i intestinalnih imunih ćelija. Takođe, promene u agregaciji trombocita, oslobađanju proinflatornih medijatora i mikrovaskularni odgovor na stres kao posledica upotrebe NSAIL može imati ulogu u nastanku UK i KB [61]. Neselektivni NSAIL blokiraju obe izoforme COX-1 i COX-2, dok su selektivni NSAIL COX-2 inhibitori [54, 62]. COX-1 izoforma učestvuje u produkciji prostaglandina u cilju održavanja intestinalne epitelijalne barijere, a COX-2 je medijator zapaljenja. Intestinalna inflamacija dovodi do porasta sinteze prostaglandina i

aktivnosti COX-2, ali podatak o potencijalno protektivnom efektu COX-2 inhibicije u ZBC nije dokazan. Iako kauzalni odnos nije utvrđen, objavljene su studije konfliktnih rezultata o efektu viših doza NSAID na pogoršanje ZBC [62-67].

Promene u sastavu intestinalna mikrobiote u adultnoj populaciji mogu nastati kao posledica upotrebe antibiotika [47, 68]. Epidemiološka istraživanja su pokazala da je upotreba antibiotika bila 1.5 puta češća kod pacijenta sa ZBC 5 godina pre postavljanja dijagnoze, a da lečenje pneumonije prvih 5 godina života povećava rizik od nastanka KB [68, 69]. Sprovedenom meta-analizom registrovan je povećan rizik od nastanka KB, ali ne i UK kod povećanog izlaganja antibioticima [70]

Upotreba oralnih kontraceptiva je dovedena u vezu sa povećanim rizikom od nastanka KB i komplikovanog toka bolesti, dok asocijacija nije pokazana sa nastankom UK [71, 72]. Uticaj oralnih kontraceptiva na razvoj KB se može objasniti potencijalnom modifikacijom intestinalne permeabilnosti i promenama u mikrobioti dejstvom endogenih androgena [73].

Uprkos dokazanom protektivnom efektu duvanskog dima na UK, pušenje je jedan od najpoznatijih faktora rizika za nastanak i agresivniji tok KB [74, 75]. Sprovedena metacentrična istraživanja pokazala su dvostruko veći rizik kod pušača za nastanak KB, kao i značajniju asocijaciju između KB i pušenja kod pacijenata ženskog pola. Pušači sa KB imaju veći rizik od relapsa, pogoršanja nakon operativnog lečenja i reoperacije u poređenju sa nepušačima [76]. Mehanizam efekta pušenja na nastanak i tok ZBC je i dalje nepoznat, ali podaci studije na animalnom modelu nakon 24 nedelja izlaganja miševa duvanskom dimu ukazali su na alteraciju kolonične bakterijske flore, sa porastom koncentracije *Lachnospiraceae*, kao i poremećajem mRNA ekspresije intestinalnog mucina i citokina CXCL2, IFN- $\gamma$ , IL-6 i TGF- $\beta$  [77]. U humanoj populaciji registrovana je veća koncentracija *Bacteroides-Prevotella* kod pušača sa KB i kontrola u odnosu na nepušače [78].

Dramatične ekološke okolnosti industrijalizacije u vidu porasta zagađenja vazduha i vode utiču i na incidencu ZBC, pojavu relapsa i uspeh terapije [79-82].

Podaci o udruženosti KB i apendektomije su nekonzistentni, tačnije, rezultati nekih studija ističu prethodnu operaciju slepog creva kao faktor rizika za razvoj KB i navode vremenski period od 5 godina nakon operacije posle koga rizik za KB opada, dok rezultati drugih studija opovrgavaju navedeno [83-86]. Interesantno, studije na miševima i opservacione studije na humanoj populaciji ukazuju na protektivni efekat operativnog odstranjenja slepog creva na UK, kao i postojanje inverzne veze između apendektomije i UK kod pacijenata mlađih od 20 godina [87, 88, 89]. Navedene asocijacije su se odnosile na apendektomije usled apendicitisa ili mezenteričnog limfadenitisa, dok asocijacije nisu utvrđene u slučaju drugih patoloških entiteta [88].

Novija istraživanja ukazuju na značajnu ulogu deficita kalcitriola (vitamina D) u nastanku i aktivnosti ZBC [90, 91]. Osim protektivnog efekta na intestinalnu barijeru, kalcitriol utiče na urođeni i stečeni imunski odgovor tako što stimuliše ekspresiju NOD2/CARD15 (nukleotid-vezujući oligomerizacioni domen 2 / kaspaza regrutujući domen 15) i antimikrobnih peptida, i inhibira proinflamatorni odgovor Th1 i Th17 ćelija [91].

Trajna promena crevnog mikrobioma, sa promenom u interakciji humanog domaćina i bakterija, definiše se kao disbioza. Primenom tehnologije sekvenciranja nove generacije (*Next generation sequencing*, NGS) ustanovljeno je da je disbalans crevne mikrobiote činilac nastanka ZBC, a ne neki specifični patogen. U poređenju sa zdravom populacijom, kod pacijenata sa ZBC uočena je smanjena zastupljenost i raznovrsnost filuma *Firmicutes* i *Bacteroides*, kao i porast *Proteobacteria* i *Actinobacteria* [92-94]. Takođe, studije su opisale razlike u sastavu mikrobiote pacijenta sa KB i UK, ukazujući na veću disbiozu i nestabilnost bakterijske mikroflore kod KB u odnosu na UK [95]. U ZBC dolazi i do transformacije metabolizma mikrobioma u vidu promene anaerobnog statusa mikrobiote, metabolizma

ugljenih hidrata i sekretornih enzima. Na osnovu metagenomskih analiza potvrđen je 25% redukovan broj gena, a metaproteinskim istraživanjima smanjenje broja proteina u ćelijskim procesima [96]. Promene u mikrobiomu potencijalno mogu nastati usled postojanja izmenjenog imunološkog odgovora kod genetički predisponiranog domaćina [97]. Aktuelne su hipoteze o postojanju genetičkih defekata kao uzroku disbioze i potencijalo rizičnih alela gena *NOD2* i *ATG16L1* udruženih sa disbiozom [98, 99].

Epidemiološke studije su potvrdile asocijaciju pozitivne porodične anamneze kod KB sa agresivnijim kliničkim tokom [100-102]. Familijarna pojava ZBC je u asocijaciji sa ranijim početkom bolesti kod obe forme [102]. Konkordantnost obolevanja monozigotnih blizanaca iznosi oko 50-60% za KB, dok za UK znatno manje do 18%, a u slučaju dizigotnih blizanaca za KB iznosi 12%, dok za UK oko 5% [101, 103].

#### **1.4.1 Uloga genetike u nastanku zapaljenskih bolesti creva**

U brojnim studijama koje su izučavale genomske asocijacije (GWAS-*Genome Wide Association Study*), do danas je identifikovano oko 240 rizičnih genskih lokusa udruženih sa nastankom KB i UK [104-106]. Doprinosa registrovanih genetičkih lokusa u nastanku ZBC je 7.5% u slučaju UK, dok je neznatno viša vrednost 13.6% kod KB [107].

Prvi identifikovan gen udružen sa KB bio je gen *NOD2* (u okviru IBD1 lokusa) koji i do danas nosi najveći procenat rizika za nastanak KB, a potom su detektovani i drugi značajni geni uključujući *IL23R* za ZBC, *HLA* za UK, autofagne gene *ATG16L1* i *IRGM* udružene sa KB, itd. [107-115].

*NOD2/CARD15* (nukleotid-vezujući oligomerizacioni domen 2 / kaspaza regrutujući domen 15) je intracelularni receptor koga eksprimiraju ćelije urođenog imuniteta i intestinalne epitelijalne ćelije [114, 116]. *NOD2* ima sposobnost prepoznavanja peptidoglikana muramil dipeptida (MDP), komponente ćelijskog zida Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija, aktivirajući signalnu kaskadu

koja rezultira translokacijom NF- $\kappa$ B u jedro i transkripcijom proinflamatornih gena [116]. Aktivacija NOD2 je u asocijaciji i sa transkripcijom defenzina koji čine komponentu mukusnog sloja intestinuma [116, 109]. Varijante u genu *NOD2*, posebno *R702W*, *G908R* i *3020insC*, pokazale su do sada najjaču udruženost sa pojavom KB, dok ista nije registrovana za UK [114, 117]. Nosioci jednog rizičnog alela *NOD2* imaju 8% veći rizik od razvoja komplikovane forme KB, dok nosioci dva rizična alela (složeni heterozigotni i homozigotni nosioci) imaju približno 41% veći rizik [118]. Na osnovu sprovedenih ispitivanja dokazano je da receptori NOD2 kodirani pomenutim genskim varijantama redukuju NF- $\kappa$ B aktivaciju i antimikrobni odgovor, suprimiraju transkripciju antiinflamatornog citokina IL-10 što rezultira bakterijskom invazijom i inflamatornom aktivacijom uz redukciju TLR (eng. *toll-like receptors*) 2 inhibicije i pojačan Th1 odgovor [119, 120].

Brojne sprovedene studije opisuju povezanost KB i UK sa *IL23R* genom, ukazujući na značaj IL-23 posredovane signalne kaskade u ZBC [121, 122]. Identifikovana varijanta *IL23R381Q* (rs11209026) povezana sa protektivnim efektom od nastanka KB, udružena je sa redukovanom STAT3 fosforilacijom i smanjenim brojem T ćelija aktiviranim preko IL-23 [122]. Značajna asocijacija je utvrđena sa postojanjem ekstenzivnog UK i *HLA A1-B8-DR3-DQ2* haplotipa koji ima recesivni rizik i za razvoj primarnog sklerozirajućeg holangitisa koji je udružen sa povišenim rizikom za razvoj kolorektalnog karcinoma [123].

Opisani genski lokusi indikovali su potencijalne nove mehanizme nastanka ZBC uključujući autofagiju, kao i udruženost sa drugim autoimunskim bolestima kao što su reumatoidni artritis, sistemski lupus eritematosus (SLE), multipla skleroza ili psorijaza [114, 124]. Narušena intestinalna barijera i povećana intestinalna propustljivost kod ZBC može biti posledica poremećaja u regulaciji apoptoze epitelijalnih i mukoznih T ćelija sa potencijalnim mehanizmima koji uključujuju Bcl-2/Bax proteine, Fas/Fas ligand sistem i NF- $\kappa$ B faktor preživljavanja [125]. Sprovedena genetička ispitivanja

identifikovala su gene udružene sa funkcijom epitelijalne barijere intestinuma kao značajne za nastanak UK, dok je kod KB ustanovljeno da su za nastanak značajni geni uključeni u celularni urođeni imunitet [111-113]. Varijante gena uključenih u procese autofagije, fagocitoze i regulacije Panetovih ćelija kao što su *NOD2*, *IRGM*, *ATG16L1* i *NCF4/NCF2* asocirane su sa ranim početkom i strikturirajućim fenotipom KB, dok su varijante u genima *IL-10/IL10R* udružene sa komplikovanom i ranom formom ZBC [126, 127]. Jedna od najvećih multicentričnih studija koja je objedinila 49 centara iz 16 zemalja ukazala je na asocijaciju tri genska lokusa *NOD2*, *MHC* i *MST1 3p21* sa lokalizacijom ZBC prema Montrealskoj klasifikaciji i redefinisala ZBC na tri subtipa oboljenja UK, KB kolonične i KB tankocrevne lokalizacije [123]. Istraživanje je pokazalo da je ekstenzivnost ZBC delom genetički determinisana i da je glavna smernica daljem ponašanju bolesti kroz vreme [123].

Genetičke studije vezane za ZBC na srpskoj populaciji nisu brojne i do sad su pokazale asocijaciju između nastanka i prezenetacije ZBC i varijanti u genima *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC), *TLR4* (Asp299Gly), *TNF- $\alpha$*  (G-308A), *IL6* (G-174C) i *IL1RN VNTR*, kao i u genu *IL10* rs3024505 [128, 129]. Uočena je veća učestalost rizičnih varijanti *NOD2* gena kod pacijenta sa KB ilealne lokalizacije, kao i udruženost ovog fenotipa sa prisustvom *IL-6* -174C alela. Pacijenti sa KB nosioci genetičke varijante *TLR4* 299Gly imali su veći rizik od operativnog lečenja na dijagnozi, sugerišući fulminatan i komplikovaniji tok bolesti [130]. Takođe, pokazana je veza između varijanti *C1236T*, *G2677T/A* i *C3435T* u genu *MDRI* i nastanka UK kod ZBC pacijenata u Srbiji [131].

#### **1.4.2 Uloga imunskog sistema u razvoju zapaljenskih bolesti creva**

Crevni epitel, u fiziološkim uslovima permeabilan za esencijalne nutritijente, predstavlja efektivnu barijeru bakterijskoj translokaciji i luminalnim agensima pomoću funkcionalnih međućeljskih tesnih spojeva, intestinalnih ćelija i mucinskog glikoproteinskog omotača [132]. Crevni epitel čine predominantno enterociti i druge specijalizovane ćelije uključujući „goblet“ćelije koje proizvode mukus,

Panetove ćelije koje sekretuju antimikrobne agense, M (microfold) ćelije koje omogućavaju transport luminalnih antigena do sloja lamine proprie i imunskih ćelija [132, 133].

Promene u integritetu intestinalne barijere zavise od genetičke pozadine domaćina i uticaja različitih egzogenih antigena. [134, 135]. Primarni događaj u patofiziologiji ZBC predstavlja narušen integritet i povećana propustljivost epitelijalne membrane koja omogućava prodor luminalnih antigena i bakterija u dublje slojeve tkiva digestivnog trakta [115, 135, 136]. Interakcija između mikrobioma i imunskog odgovora domaćina odvija se preko familije receptora intestinuma koji prepoznaju opšte molekularne obrasce bakterijskih antigena (eng. *pattern recognition receptors* (PRRs)), održavaju imunološku toleranciju prema komensalnoj flori i aktiviraju signalne kaskade sa ciljem eliminacije invazivnih bakterija [137]. Disbalans homeostaze navedenih mehanizama aktivacije imunskog odgovora i održavanja tolerancije utiče na nastanak KB i UK [138].

Razvoj imunološke tolerancije prema crevnoj mikrobioti u fiziološkim uslovima omogućava minimalna izloženost mikroorganizmima, adekvatno prepoznavanje mikroflora kao i intra/interćeljski mehanizmi aktivirani signalima mikroba [138, 139]. Ćelije urođenog imuniteta uključujući makrofage, dendrične ćelije i neutrofile regulišu aktivnost ćelija specifičnog imuniteta [115, 137, 138]. Sinteza interleukin 10 (IL-10), transformirajućeg faktor rasta (eng. *transforming growth factor*) TGF- $\beta$  i retinoične kiseline utiče na diferencijaciju regulatornih Foxp3-Treg limfocita (eng. *forkhead box P3*) važnih za supresiju imunološkog odgovora [138, 139]. Studije na animalnim modelima dokazale su nastanak kolitisa kod miševa sa deficitom IL-10 i TGF- $\beta$  [140]. Smanjenje Treg i povećanja broja efektorskih T ćelija usled izostanka navedenih molekula ili promene sastava citokina koje sekretuju ćelije urođenog imuniteta doprinosi nastanku ZBC [115, 137]. Navedena narušena imunološka homeostaza sluznice intestinuma dovodi do sinteze proinflamatornih medijatora kao što su reaktivni kiseonični i



azotni metaboliti, hemokini i citokini (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IL-23) koji kaskadno dovode do nekontrolisane hronične infamacije [115, 137]

Centralnu ulogu u oštećenju mukoze kod ZBC imaju T limfociti. Aktivacija ćelija urođenog imuniteta lamina proprie (makrofaga i dendritičnih ćelija) stimuliše sekreciju proinflamatornih citokina [141]. Perzistiranje zapaljenskog procesa odvija se stimulacijom stečenog imunskog odgovora, najčešće posredovanog efektorskim CD4+T pomoćnim (Th, eng. *T helper*) ćelijama i redukovanom apoptozom ovih ćelija. Diferencijacija efektorskih CD4+Th ćelija je determinisana profilom citokinske signalizacije i vrstom invazivnog patogena, interakcijom određenih citokina i STAT (eng. *signal transducer and activator of transcription*) faktora. Stratifikacija Th1 i Th2 ćelijske linije zasnovana je na imunološkoj funkciji, ekspresiji transkripcionih faktora i citokinskom profilu [141, 142]. Th1 ćelije imaju protektivnu ulogu u odbrani od intraćelijskih patogena kao što su bakterije i virusi tako što sekretuju interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Antigen prezentujuće ćelije kao odgovor na intracelularne patogene sekretuju IL-12 koji promoviše Th1 ćelije i dovodi do povećane ekspresije T-box transkripcionog faktora (T-bet) i sekrecije IFN- $\gamma$  [138, 142]. Th2 ćelije učestvuju u odbrani domaćina od helminata, eksprimiraju transkripcioni faktor GATA vezujući protein 3 (GATA-3) putem STAT6 fosforilacije i produkuju IL-4, IL-5, IL-13 [138, 143]. Bilateralna regulacija Th1/Th2 polarizacije odvija se putem IFN- $\gamma$  i IL-4, kao i ekspresijom specifičnih transkripcionih faktora T-bet i GATA-3, principom antagonističkog efekta [142-144].

Prethodno prihvaćena paradigma ključne uloge pomoćnih CD4+Th1 ćelija u KB i Th2 ćelija u UK u cilju održavanja hronične inflamacije je prevaziđena otkrićem značaja imunskog odgovora Th-17 ćelija. Proinflamatorni citokin IL-23 stimuliše ekspanziju Th17 ćelija koje produkuju inflamatorne citokine i hemokine uključujući IL-17A i IL-17F. Navedeni mehanizam danas predstavlja jedan od najvažnijih puteva u patogenezi ZBC.

### 1.4.2.1 Th17 profil zapaljenskih bolesti creva

Naivne CD4<sup>+</sup> ćelije se delovanjem specifičnih citokina diferenciraju u efektorske Th1, Th2, Th9, Th17 i folikularne helper T (Tfh) ćelije [138, 144]. Promoteri T ćelijske polarizacije su citokini urođenih imunskih ćelija koji prepoznaju specifične molekularne obrasce različitih grupa mikroorganizama (eng. *microbe-associated molecular pattern* (MAMPs)) [138, 144]. Determinacija T ćelijskih subtipova i njihovog citokinskog profila zavisi od ekspresije transkripcionih faktora: T-bet (IFN- $\gamma$ ; Th1 ćelije), GATA 3 (IL-4, IL-5, IL-13; Th2 ćelije), Bcl-6 (Tfh), Ets1 i PU.1 (IL-9, Th9 ćelije), ROR $\gamma$ t (IL-17A/F, IL-22; Th17 ćelije), FoxP3 (FOXP3<sup>+</sup>Treg), dok su BATF, IRF1 i T ćelijski receptor IL-2-indukovane tirozin kinaze (ITK) važni za Tr1 ćelije [145-148]. Međutim, novijim istraživanjima dokazano je postojanje transdiferentovanih T ćelijskih populacija koje ekspimiraju transkripcione faktore i citokine više različitih Th subtipova. Navedene Th ćelije uključujući Th17 se odlikuju takozvanim plasticitetom tj višestrukim imunskim odgovorima [149].

Th17 ćelije sekretuju različite citokine IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 i granulocitno-makrofagni kolonijalno stimulirajući faktor (GM-CSF), kao i hemokinske CXC ligande CXCL8 i CCL20. Odlikuju se višestrukim biološkim funkcijama, učestvuju u zaštiti epitelijalnih i mukoznih barijera od ekstraćelijskih mikroba, ali imaju i ulogu u patogenezi različitih autoimunskih oboljenja uključujući ZBC [144, 149]. Inflamirana mukoza intestinuma pacijenata sa ZBC odlukuje se masivnom infiltracijom Th17 ćelija i produkcijom Th17 proinflamatornih citokina [150]. Takođe, identifikovani genski lokusi asocirani sa ZBC obuhvatali su gene udružene sa ulogom Th17 ćelija kao što su *IL23R*, *IL12B*, *JAK2*, *STAT3* i *CCR6* [150].

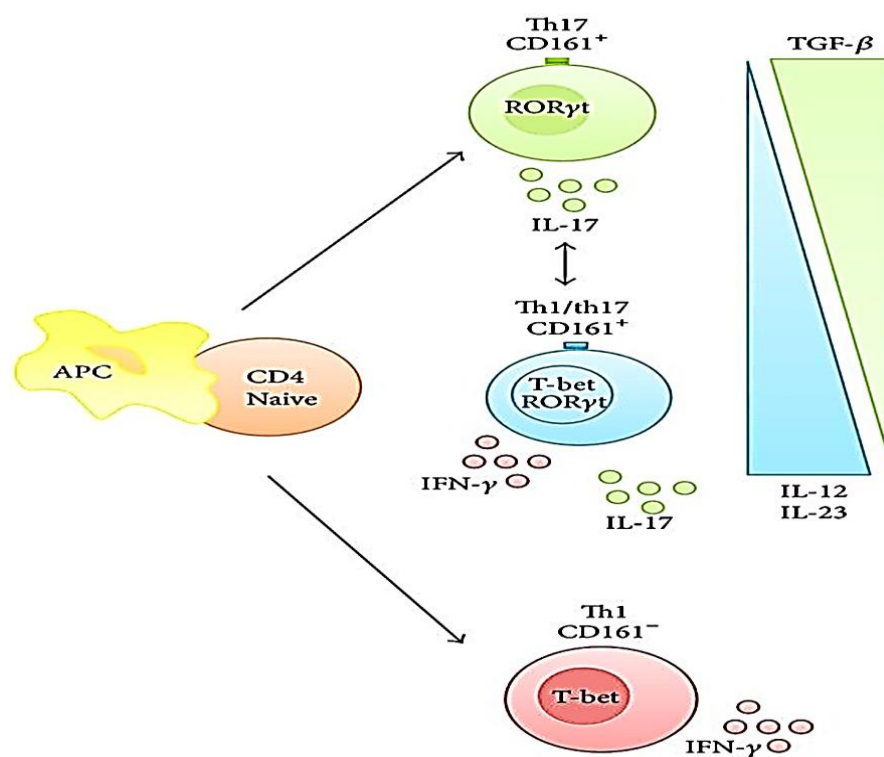
Razvoj Th17 ćelija počinje u timusu, poreklom od naivnih T ćelija progenitora koje ekspimiraju membranski C-tip lecitinski receptor CD161, čiji ligand i funkcija nisu dovoljno istraženi, i citokinske receptore IL-6R, TGF $\beta$ R, IL-23R, IL-21R i IL-1R [144, 150]. Citokini koji se vezuju za prethodno

pomenute receptore kombinovano utiču na polarizaciju Th17 ćelije, efektom promocije ili supresije određenih transkripcionih faktora [150, 151]. U inflamiranoj mukozi intestinuma povišene vrednosti IL-6, zajedno sa IL-1 $\beta$  i faktorom nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) utiču na indukciju diferencijacije Th17 ćelija, dok je IL-23 krucijalan za njihovu proliferaciju i opstanak [149].

Transkripcioni faktor ključan za Th17 ćelijsku diferencijaciju je ROR $\gamma$ t. On se aktivira preko IL-6 i IL-23 JAK/STAT3 singalne kaskade i dalje reguliše ekspresiju proinflamatornih gena, uključujući i *IL17A/F* i *IL23* [151, 152]. Međutim, ROR $\gamma$ t ima ulogu u regulaciji transkripcije samo nekoliko genskih lokusa u Th17 ćelijama, dok je njegova ekspresija pod uticajem sredinskih faktora što čini Th17 ćelije sklone funkcionalnoj modifikaciji [152]. Citokin IL-21 utiče na povećanu ekspresiju IL-23R na membrani Th17 ćelija koji dalje aktivira STAT3 i ROR $\gamma$ t [151, 153, 154]. Uloga TGF $\beta$  u Th17 diferencijaciji je dvostruka i dozno zavisna. Nizak nivo TGF $\beta$  uz IL-6 favorizuje dalju Th17 polarizaciju, dok visoke koncentracije inhibiraju ROR $\gamma$ t i indukuju FOXP3 ekspresiju u pravcu dalje Fox3+Treg diferencijacije [151]. Ulogu u regulaciji genske ekspresije i Th17 ćelijskoj diferencijaciji imaju i drugi transkripcioni faktori, uključujući i bazični leucin zipper TF (BATF), interferon regulatorni faktor 4 (IRF4), aril-hidrokarbonski receptor (AHR) kao i ROR $\alpha$  [151, 155-158].

Inflamatorni hemokini stimulišu migraciju Th17 ćelija do intestinalnog tkiva zahvaćenog zapaljenjem. Ekspresija hemokinskih receptora (CCR6R) koji imaju ulogu u proliferaciji Th17 ćelija u intestinalnoj mukozi regulisana je PLZF proteinom (eng. *promyelocytic leukemia zinc finger protein*) pomoću CCL20 liganda [159]. Takođe, TGF $\beta$  i IL-6/ IL-21 indukuju ekspresiju IL-23R na površini Th17 ćelija, a citokin IL-23 preuzima dalju ulogu stabilizatora ovog ćelijskog tipa. Istraživanja su pokazala da citokini IL-12, IFN- $\gamma$  i IL-24 deluju inhibitory na Th17 polarizaciju, dok IL-21 ima autokrini efekat na proces dalje determinacije i opstanaka Th17 ćelija [160-162]

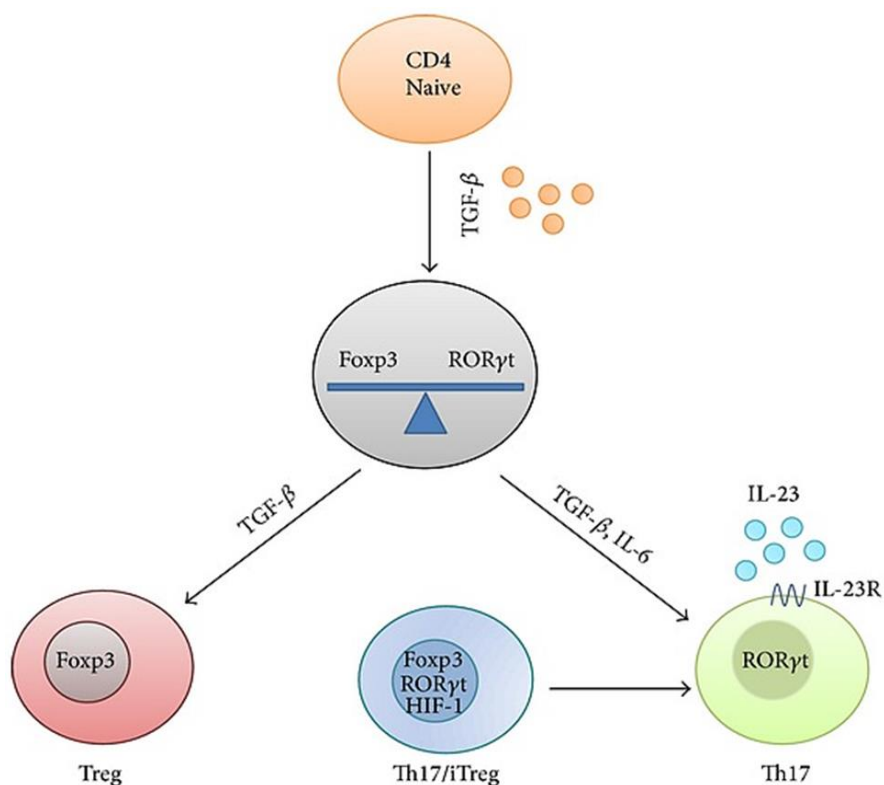
Identifikacija Th17 ćelija koje proizvode IL-17 i IFN- $\gamma$  je prvi put opisana u intestinumu pacijenata sa KB [163]. TGF $\beta$  je neophodan za ekspresiju IL-17A/F, ali u nedostatku istog IL-23 i IL-12 mogu suprimirati IL-17 i mehanizmom STAT4 i T-bet signalne kaskade doprineti produkciji IFN- $\gamma$  [164]. Polarizacija Th17 ćelija u Th1 ćelije se odvija stimulacijom IL-12 i ekspresijom Th1 transkripcionog faktora T-bet, sa smanjenjem ekspresije ROR $\gamma$ t i IL-17. Navedene ćelije se nazivaju Th17.1 i imaju mogućnost sekrecije IL-17 i dominantno IFN- $\gamma$ . U poređenju sa klasičnim Th1, ove ćelije se karakterišu ekspresijom membranskog CD161 receptora progenitora Th17 ćelija. (Slika 1). *In vivo* istraživanja ističu ulogu IL-23 kao promotora konverzije IL-17A sekretujućih u IFN- $\gamma$  produkujuće T ćelije [165]. Navedena transdiferencijacija Th17 ćelija opisana je u humanim i animalnim uzorcima ZBC, intestinalnim infekcijama *Helicobacter hepaticus* i *Citobacter rodentium* [151, 163, 165-167].



**Slika 1.** Šematski prikaz diferencijacije Th17, Th1/Th17 i Th1 ćelijskih podtipova. Modifikovano iz

rada Julio Gálvez iz 2014.godine [144]

Uzajamna regulacija proliferacije Th17 i Treg ćelija održava homeostazu u intestinumu. Diferencijacija navedenih ćelijskih tipova je po uticajem  $TGF\beta$ . On vrši promociju Treg ćelija indukcijom ekspresije Foxp3, dok u prisustvu IL-6 navedena ekspresija je inhibirana stimulacijom ekspresije IL-23R i ROR $\gamma$  i daljom diferencijacijom Th17 ćelija [169, 170]. Studije na animalnim modelima identifikovale su postojanje Th17/Treg ćelije prekursora koja simultano vrši dvostruku ekspresiju ROR $\gamma$ t i Foxp3 (Sika 2). Kontrola Th17/Treg ćelija u smeru promocije Th17 ćelija preko STAT3 mehanizma iz prekursorne ćelije odvija se pomoću heterodimeričnog hipoksija inducibilnog faktora 1 $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ )[171].



**Slika 2.** Šematski prikaz diferencijacije Treg, Th17/iTreg i Th17 ćelijskih podtipova. Modifikovano iz rada Julio Gálvez iz 2014.godine [144]

Disbalans proinflamatornih i antiinflamatornih signala kod ZBC dovodi do migracije leukocita u regiju intestinalne mukoze i preteranog imunskog odgovora T ćelija. Različite T ćelije mogu biti dalji

okidači imunskog odgovora u intestinumu kod KB i UK, što se u kliničkoj praksi manifestuje različitim fenotipovima bolesti kao i individualnim terapijskim odgovorima [171]. Povišene vrednosti Th17 citokinskog profila registrovane su u tkivu pacijenata sa UK i KB uključujući IL-17A/F, IL-22, IL-26, IL-21 i IL-23 [151, 161]. Prethodno je opisano da je KB povezana sa aktivnosti Th1 i Th17 ćelija, dok je UK najverovatnije posledica citokinskog profila Th2 ćelija [171, 172].

Stimulisane sekrecijom IL-12, Th1 ćelije sekretuju IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  i IL-12, dok IL-13 indukuje Th2 ćelijski odgovor i sekreciju IL-4, IL-5 i IL-13. Poremećen Th1 imuni odgovor udružen sa povišenim vrednostima IL-18 i IL-12 doveden je u vezu sa nastankom KB, dok NK ćelije u UK oslobađaju veće količine IL-13 i imaju značajno mesto patogenezi [138].

U poređenju sa KB, sekrecija IL-5 kod UK dovodi do efikasnije aktivacije B ćelija [173]. Međutim, opisane Th ćelije u UK nemaju tipične osobine Th2 ćelija, produkujući niske nivoe IL-4. Citokinski profil antigen prezentujućih ćelija u KB koji uključuje citokine IL-12, IL-18, IL-23 i TGF $\beta$  dovodi do diferencijacije Th1 i Th17 ćelija [171, 173]. Dalja proliferacija Th1 i Th17 ćelija u KB vrši se daljom sintezom proinflamatornih citokina IL-17, INF- $\gamma$  i TNF $\alpha$  uz cikličnu stimulaciju antigen prezentujućih ćelija, makrofaga, fibroblasta i endotelnih ćelija koje sekretuju citokine IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 i IL-18 [136, 171]. O uticaju Th17 ćelija na razvoj ZBC govori i to da su varijante u genima *STAT3* i *IL23R*, važnim za Th17 ćelijski odgovor, asocirane sa nastankom ZBC [151, 174]. Rezultati sprovedenih studija ističu da su u perifernoj krvi i inflamiranom intestinumu pacijenata sa ZBC detektovane Th17.1 ćelija koje produkuju IL-17 i IFN- $\gamma$  [151, 175].

U uslovima normalne crevne homeostaze TGF $\beta$  vrši promociju Treg ćelija [176, 177]. Kod ZBC TGF $\beta$  uz druge signale proinflamatornih citokina i mikroba dovodi do proliferacije Th17 ćelija [171, 177]. Prema rezultatima istraživanja na eksperimentalnim modelima, inflamatorni proces u kolonu je posledica aktivacije Th17 ćelija i supresije Treg. Signalna kaskada indukovana sa IL-1 blokira inhibitorni

molekul supresor citokinske signalizacije 3 (SOCS3) STAT3 mehanizma, narušava ravnotežu STAT3/STAT5 i rezultira promocijom Th17 ćelija, što može objasniti konvertovanje Treg u IL-17+ Foxp3+ T ćelije [178]. Takođe, u slučaju mutacije transkripcionog faktora Treg ćelija Foxp3, prisustvu nefunkcionalnih Treg ili njihovom odsustvu u mukozi, registrovana je izraženija inflamacija intestinuma udružena sa limfocitnom infiltracijom kod pacijenata sa ZBC [171, 179, 180]. Podaci o povišenom nivou apoptoze Treg u inflamiranoj sluznici kolona ZBC u poređenju sa neinflamiranom je ukazala na potencijalnu ulogu ovih ćelija u nastanku bolesti [181]

### **1.5. Uloga citokina u razvoju zapaljenskih bolesti creva**

Infamacija posredovana Th17 ćelijama predstavlja jednu od centralnih mehanizama patogeneze ZBC [144]. Navedene ćelije imaju sposobnost produkcije proinflamatornih citokina IL-17A i IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  i GM-CSF koji kaskadno vrše stimulaciju imunskih ćelija i direktno ili indirektno dovode do oštećenja tkiva digestivnog trakta [144]. Imaju sposobnost sekrecije CXC liganda CXCL8 i CCL20. Centralnu ulogu u inflamaciji imaju citokini IL-17A/F koji vrše aktivaciju i inicijaciju migracije granulocita, ćelija epitela i endotela, fibroblasta i makrofaga, stimulišući dalju sekreciju proinflamatornih medijatora kao što su IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF, G-CSF, prostaglandina E2, hemokini, azot-oksidi, i matriksne metaloproteinaze [182]. CCL20 predstavlja ligand za hemokin CC receptor CCR6 koji se eksprimira na različitim imunim ćelijama uključujući Th17, dendritske ćelije i B ćelije. Oslobođanje CCL20 iz Th17 ćelija nakon aktivacije IL-17 dovodi do dalje proliferacije Th17 ćelija na mestu inflamacije u intestinumu [183]. Th17 ćelije proizvode IL-21 koji ima ulogu u promociji Th1 ćelijskog odgovora i diferencijaciji Th17 iz ćelije prekursora [184]. Th17 ćelije vrše sekreciju TNF- $\alpha$  i GM-CSF što rezultira daljom aktivacijom neutrofila u procesu inflamacije kod ZBC [144]. Signalna kaskada IL-23/Th17 predstavlja važan regulator intestinalne homeostaze i činilac u patogenezi ZBC [185].

Novi studijski protokoli u ZBC su aktuelno bazirani na proflisanju terapijskih algoritama usmerenih na IL-23/Th17 osovinu. Prema dosadašnjim rezultatima, blokada aktivacije receptora IL-23 (IL-23R) sprečava nastanak kolitisa kod miševa, dok se u kliničkim studijama monoklonska antitela usmerena na p40 subjedinicu IL-23R primenjuju u lečenju KB kao inhibitori kako IL-12, tako i IL-23 [186-188]. Međutim, studije bazirane na testiranju AIN457, monoklonskog anti-IL17A antitela u terapiji KB, ukazale su da inaktivacija IL-17A dovodi do pogoršanja bolesti [189].

Značajna uloga inflamatornih citokina u razvoju ZBC predstavlja stimulaciju i održavanje hroničnog zapaljenskog procesa pomoću promocije i transkripcije drugih proinflamatornih medijatora. Analiza ekspresionih profila u oboleloj mukozi intestinuma i njihovih interakcija, uticaj iste na fenotip i dalji tok bolesti, važna je za identifikaciju mehanizama patogeneze kod ZBC, kao i na poboljšanje terapijskog odgovora u njihovom lečenju [190, 191]. Takodje, analiza zdrave mukoze pacijenata sa ZBC može biti informativna za razumevanje nastanka i toka bolesti, s obzirom da je pokazano da i delovi intestinuma nezahvaćeni inflamacijom kod pacijenata sa ZBC imaju povišenu ekspresija proinflamatornih citokina [192, 193].

### **1.5.1 Uloga citokina IL-23 u nastanku zapaljenskih bolesti creva**

IL-23 je proinflamatorni medijator koga sekretuju dendritske ćelije, monociti i makrofagi u perifernim tkivima kao što su submukoza intestinuma, koža i pluća. Citokin IL-23 je heterodimer sa dve subjedinice, subjedinice IL-12p40 koja je kodirana *IL12B* genom (koja pored IL-23 ulazi i u sastav citokina IL-12), kao i subjedinice IL-23p19 kodirane *IL23A* genom [194, 195].

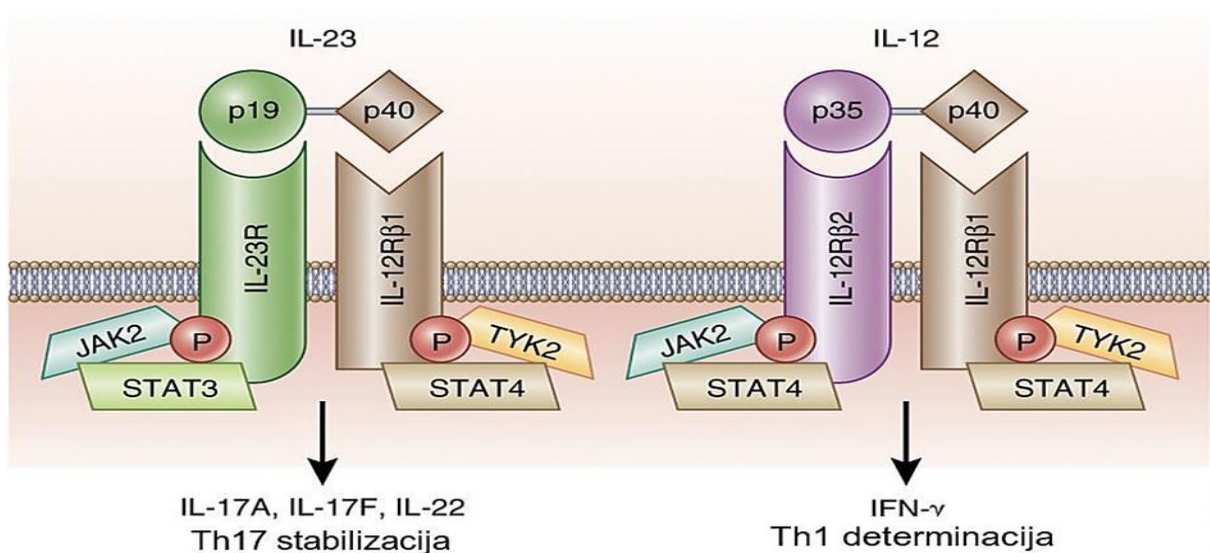
*IL23A* gen se nalazi na hromozomu 12 u regionu q13.3 (HGNC: 15488) i obuhvata regiju od 1531 baznih parova (bp) koju čine 4 egzona i 3 introna. Transkript *IL23A* iznosi 1041bp sa 166 bp 5' nekodirajućih delova egzona (UTR, eng. *untranslated region*), 570 bp kodirajuće sekvence i 305 bp 3'



UTR [196]. Protein kodiran *IL23A* genom (IL-23p19 subjedinica) se kovalnetno vezuje za p40 subjedinicu da bi formirao kompletan IL-23 [197].

IL-23 svoju biološku funkciju ostvaruje vezujanjem za IL-23 receptor (IL-23R), prisutan na aktiviranim T ćelijama, NK ćelijama, monocitima/makrofagima i DC. Nakon vezivanja za receptor, dolazi do aktivacije Janus kinaze 2 (JAK2) i tirozin kinaze 2 (TYK2) koje dovode do fosforilacije receptora, kao i fosforilacije STAT3 i STAT4 po vezivanju za receptor [198]. Proces fosforilacije dovodi do formiranja STAT3/STAT4 heterodimera i njihove translokacije u jedro gde kaskadno aktiviraju ciljane gene. Dok je fosforilacija STAT4 od značaja za povećanu produkciju IFN- $\gamma$  i dalju diferencijaciju Th1 ćelija, STAT3 je esencijalan za ekspresiju IL-17A, IL-17F i transkripcionog faktora ROR  $\gamma$ t kod Th17 ćelija [194, 195, 198].

Iako IL-23 ima sličnu biološku strukturu kao IL-12, njihova funkcionalna uloga nije ista. IL-23 učestvuje u regulaciji Th17 ćelijskog odgovora, dok IL-12 ima esencijalnu ulogu u odbrani od intracelularnih patogena aktiviranjem Th1 ćelija i porastu sekrecije IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  [195] (Slika3.)



**Slika 3.** Šematski prikaz IL-23 i IL-12 signalnog mehanizma. Modifikovano iz rada Teng MW i saradnika iz 2015 godine [195]

Diferencijaciji Th17 ćelija doprinose citokini TGF- $\beta$  i IL-6. Th17 ćelije sekretuju IL-21 koji dalje autokrino stimuliše njihovu proliferaciju. IL-23 ima ključnu ulogu u održavanju i ekspanziji Th-17 imunološkog odgovora sekrecijom IL-17 i ekspresijom transkripcionog faktora ROR $\gamma$ t [197, 199]. Prema sprovedenim studijama u mukozi intestinuma identifikovano je nekoliko mehanizama regulacije intestinalne inflamacije supresijom IL-23 uključujući efekat LAG3 (eng. *Lymphocyte-activation gene 3*), interakcijom Treg i MHC II molekula na CX3CR1+makrofagima, kao i smanjenom ekspresijom IL-23R delovanjem vitamina D [200, 201].

Intestinalna sluznica predstavlja tkivo sa najvećom ekspresijom IL-23. Jedna od potencijalnih funkcija IL-23 u održavanju intestinalne homeostaze je supresivni efekat na Treg ćelije i aktivacija celularnog imuniteta u slučaju infekcije [197].

Proinflamatorni profil mukoze intestinuma pacijenta sa KB odlikuje se povišenim nivoom sekrecije IL-23 od strane makrofaga lamine proprije i daljom promocijom Th1 i Th17 imunskog odgovora [202]. Imunomodulatorna uloga IL-23 se primarno može odvijati u mezenteričnim limfnim čvorovima kao odgovor mijeloidnih dedritičnih ćelija na stimulaciju bakterijskim antigenima [202, 203]. Sakuraba i autori dokazali su da mijeloidne dedritične ćelije u KB sekretuju veću količinu IL-23, a manju IL-10. Navdena neravnoteža u količini IL-23 i IL-10 utiče na indukciju dominantno Th1 ćelijskog odgovora u KB [203].

Sprovedene GWAS studije su ukazale na veliki broj genetičkih varijanti u regionu *IL23R* gena udruženih sa nastankom KB i UK [198, 204-206]. Nastanak KB je asociran sa *IL23R* genom na hromozomu 1p31, dok je kodirajuća varijanta u ovom genu *rs11209026* (*c.1142G>A, p.Arg381Gln*) povezana sa smanjenim rizikom za nastanak KB [204]. Pokazana je udruženost *IL23R G149R* sa nastankom KB, a varijante *G149R* i *Q3H* označene su kao rizične za nastanak UK [204]. Genetička

varijanta *IL23R R381Q (Arg381Gln)* asocirana je sa protektivnim efektom od razvoja KB u pedijatrijskoj populaciji [207].

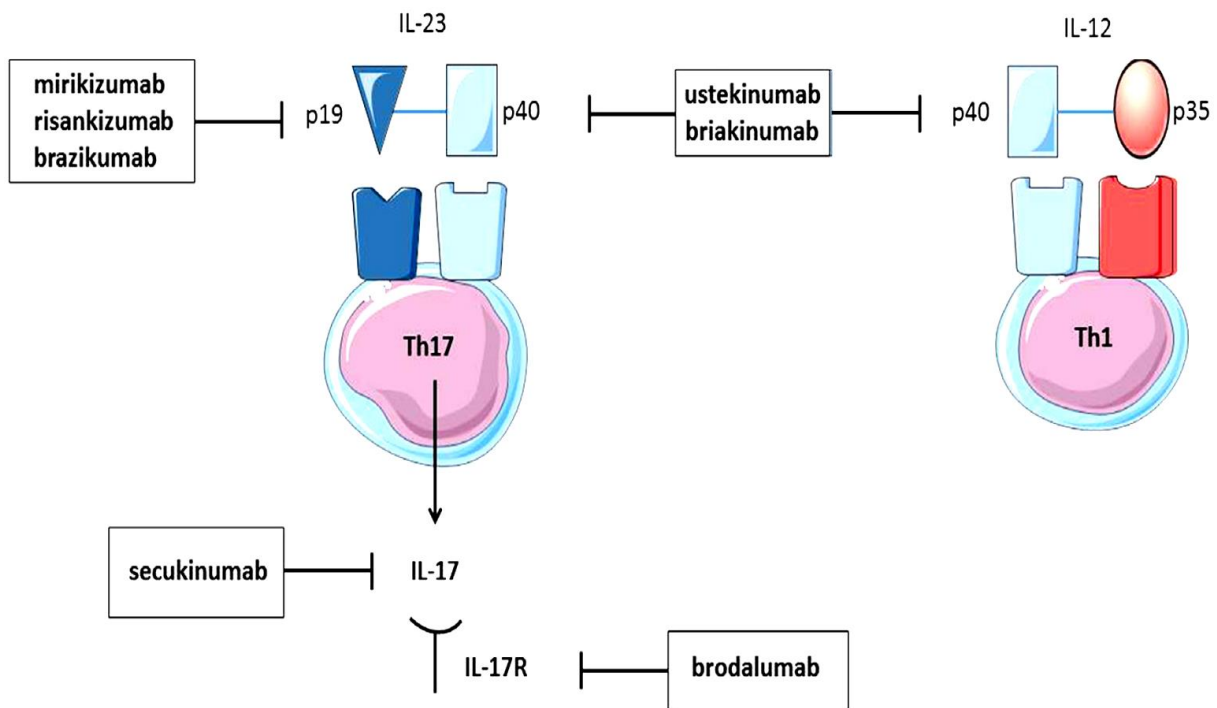
Studije koje su ispitivale serološke vrednosti IL-23 u ZBC potvrdile su važnu proinflamatornu ulogu ovog citokina u patogenezi KB i UK. U serumu pacijenta sa ZBC registrovane su značajno više vrednosti IL-23 u odnosu na kontrole, sa izrazito višim vrednostima kod KB u odnosu na UK. Takođe, značajan porast je uočen kod ZBC pacijenata sa perifernim ili aksijalnim artritismom [208]. Takođe, utvrđena je pozitivna korelacija između seroloških vrednosti IL-23 i nivoa azot-monoksida kod pacijenata sa KB [209]. Brojne studije su potvrdile povišene vrednosti IL-23 u serumu pacijenata sa UK u odnosu na kontrole, kao i pozitivnu korelaciju sa aktivnošću bolesti kod UK [198, 210, 211].

Na osnovu sprovedene meta-analize genske ekspresije celih genoma (tzv. transkriptomске analize), ustanovljeni su slični ekspresioni profili u oboleloj sluznici kolona UK i KB, osim u slučaju *IL23A* koji je značajno bio povišen kod UK u odnosu na KB [212]. Analiza IL-23 mRNA i proteinske ekspresije u mukozi intestinuma pacijenata sa ZBC ukazala je na povišene vrednosti u oboleloj sluznici kod KB u poređenju sa UK i zdravim kontrolama, dok su rezultati jedne studije detektovali povišenu ekspresiju IL-23 p19 subjediniце u pozitivnoj korelaciji sa IL17A kod UK, a kod KB pozitivno je korelisala sa IFN $\gamma$  [213, 214]. Navedeni rezultati ukazali su da bi IL-23 mogao biti potencijalni regulator diferencijacije Th1/Th17 u ZBC. Pokazano je da su pacijenti sa KB koji su imali loš odgovor na terapiju anti-TNF imali povišen nivo ekspresije IL-23 mRNA u intestinalnoj mukozi pacijenata, i ukazalo na IL-23 kao potencijalan molekularni faktor rezistencije [213].

Stimulus antigenom mikroba u lamini propriji može biti esencijalni pokretač dalje produkcije IL-23 u ZBC. Primenom imunohistochemijske analize je pokazano da makrofagi i mijeloidne dendritske ćelije pacijenata sa KB imaju sposobnost produkcije višeg nivoa IL-23 i nižeg nivoa IL-10 u odnosu na kontrole po stimulaciji Toll-like receptora bakterijskim antigenima [198, 203]. Takođe, pokazano je da makrofagi

pacijenta sa KB koji eksprimiraju CD14 (eng. cluster of differentiation) kao ko-receptora u detekciji bakterijskih lipopolisaharida, sintetišu više IL-23 u poređenju sa UK ili kontrolama [198, 202]. Sekretija IL-23 od strane makrofaga u ZBC može biti inhibirana delovanjem anti-TNF terapije (infliksimab, adalimumab) [215].

Uzimajući u obzir ulogu IL-23, kao i signalnog puta IL-23/Th17 u aktivaciji intestinalne inflamacije, predloženo je nekoliko smernica za nove terapijske algoritme u lečenju ZBC. Jedna od strategija predstavlja blokadu zajedničke subjedinice p40 koja ulazi u sastav IL-23 i IL-12 čime se zajedno modulira i Th1 i Th17 ćelijski odgovor. Druga strategija se odnosi na blokadu IL-23 specifične p19 subjedinice selektivno usmerene na obolelu mukozu digestivnog trakta (Slika 4) [199]. Farmakološki potencijal za lečenje ZBC uočen je primenom inhibitora tirozin kinaze Jak-STAT signalnog puta [216].



**Slika 4.** Šematski prikaz molekularnog targetiranja IL-23/Th17 signalnog puta u ZBC. Modifikovano prema radu M. Allocca i saradnika iz 2018[199].

### 1.5.2 Uloga citokina IL-17 u natanku zapaljenskih bolesti creva

IL-17 je proinflamatorni citokin koji učestvuje u odbrani domaćina od ekstracelularnih bakterija i gljivičnih infekcija. Sa druge strane, neregulisana produkcija IL-17 dovodi do hroničnog zapaljenja, oštećenja tkiva i potencijalnog razvoja autoimunskih oboljenja uključujući ZBC [217].

Th17 ćelije i ćelije urođenog imuniteta kao što su prirodne ćelije ubice (NK ćelije), ćelije induktori limfoidnog tkiva, Panetove ćelije i neutrofilu produkuju proinflamatorne citokine IL-17A i IL-17F [217, 218]. Navedeni citokini imaju ulogu u zaštiti mukoznih barijera od invazivnih patogena i aktivaciji fibroblasta, epitelnih i endotelnih ćelija i migracije neutrofila. Simultano učestvuju i u indukciji sekrecije drugih proinflamatornih medijatora (IL-6, IL-1, TNF $\alpha$ ), antimikrobnih faktora kao što su defenzini, hemokini i matriksne metaloproteinaze (MMP1, MMP3, MMP13). Matriksne metaloproteinaze su proteolitički enzimi koji učestvuju u remodelovanju tkiva razgradnjom komponenti ekstraćelijskog matriksa i utiču na ćelijsku diferencijaciju, proliferaciju, migraciju i apoptozu [218-220].

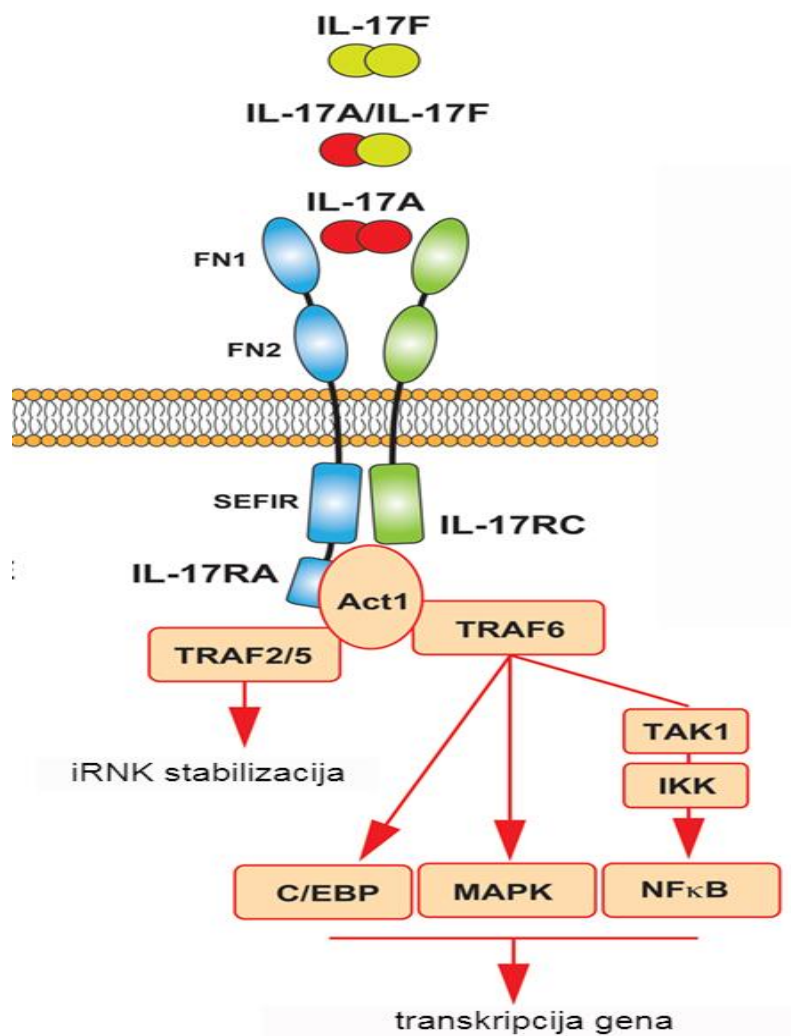
Gen *IL17* je kloniran iz hibridoma koji je nastao fuzijom citotoksične T ćelije miša i limfoma pacova i inicijalno nazvan CTLA-8 (eng. *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 8*). Iako je početna pretpostavka bila da je ovaj gen poreklom iz mišijeg citotoksičnog T-limfocita, dalja ispitivanja su potvrdila gensko poreklo iz T ćelija pacova, sa velikim brojem adenin-uracil bogatih ponovaka u 3'regionu iRNK [221, 222]. Ova osobina iRNK identifikovanog gena ukazala je na veliku sličnost sa iRNK faktora rasta, citokina i onkogenom [221]. Dajim ispitivanjima kodirani protein ovim genom je označen kao IL-17, a uspešnim sekvencioniranjem genoma čoveka utvrđeno je da familiju IL-17 čini šest srodnih citokina (IL-17A-F) [222]. Geni *IL17A* i *IL17F* se nalaze na hromozomu 6 u regionu p12.2 (HGNC: 5981; HGNC 16404). *IL17A* je dužine 4252 b, sa 3 egzona i 2 introna. Transkript *IL17A* iznosi 1859 bp (45bp 5'UTR, 468 bp kodirajuće sekvence i 1346bp 3' UTR). Gen *IL17F* obuhvata 7.86 kb koju čine tri egzona i 2 introna [182].

Familija IL-17 (A-F) su homodimerni glikoproteini sa 4 visoko očuvana cisteinska ostatka koja formiraju dva disulfidna mosta [223]. IL-17A može da formira homodimer disulfidnom vezom ili heterodimer sa IL-17F proteinom [223]. Filogenetičkim ispitivanjem utvrđen je visok stepen homologije između IL-17A i IL-17F koji iznosi 50% aminokiselinskih sekvenci [223, 224].

Biološka uloga IL-17 ostvaruje se preko familije transmembranskih receptora IL-17 (IL-17R) koju čine pet subjedinica (IL-17RA–E) sa konzerviranim aminokiselinskim sekvencama (motivima) uključujući dva ekstraćelijska domena slična fibronektinu (FN) tipa III i citoplazmatični SEFIR domen (eng. *similar expression to fibroblast growth factor genes, IL-17 receptors*) [225, 226]. Iako IL-17R predstavlja receptorski kompleks, IL-17RA predstavlja subjedinicu koja je najčešće uključena u procese signalizacije različitih liganda. IL-17RA omogućava transmisijsku signalizaciju signala IL-17A i IL-17F. Na osnovu prethodnih istraživanja ustanovljen je slabiji afinitet IL-17RA prema IL-17A i IL-17F, što je rezultiralo detekcijom dodatne subjedinice IL-17C receptora koja je uključena u vezivanje liganda i proces dalje signalizacije [226, 227]. Glavna karakteristika navedenog receptorskog kompleksa su citoplazmatični domeni u okviru kojih su detektovani konzervisani homologni TIR (eng. *Toll-IL-1 Receptor*) koji se nazivaju SEFIR domeni. Signalni put IL-17 u ćeliji počinje fosforilacijom TIR-like loop (TILL) motiva koji se nalazi na C-terminalnom kraju SEFIR domena u okviru IL-17RA i C-terminalnog C/EBP $\beta$  aktivacionog domena (CBAD, eng. *C-terminal C/EBP $\beta$ -activation domain*). Nakon aktivacije IL-17R, aktivator 1 NF- $\kappa$ B (Act1) vezuje se za SEFIR i TILL domene kompleksa. Adaptorni protein Act1, ključan u autoimunim procesima, uz aktivnost E3 ligaze učestvuje u regrutaciji faktora povezanog sa TNF receptorom 6 (eng. *TNF-Receptor-Associated Factor*) promovirajući dalju TRAF6 zavisnu aktivaciju NF $\kappa$ B i MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinase*) signalizacije [228-230].

Proces transkripcije proinflamatornih gena koji su regulisani IL-17 zavisi od aktivacije transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B receptorskim kompleksom (IL-17RA i IL-17RC) i adaptornim proteinom

Act1 [229]. Posttranslaciona modifikacija TRAF6, vezivanjem Act1, odvija se lizin-63 udruženom ubikvitacijom. Po izvršenoj modifikaciji dolazi do regrutovanja TAK1 (eng. *transforming growth factor-activated kinase*) vezujućih proteina TAB2 i TAB3 (eng. *TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein*), aktivacije TAK1 i IKK (eng. *inhibitor of NFκB kinaze*) kompleksa i NF-κB, rezultujući daljom transkripcijom gena [227, 228]. Takodje, IKK može fosforlisati Act1 na mestu Ser311 u okviru IL-17R–Act1 kompleksa i formirati mesto vezivanja za TRAF2 i TRAF5, nezavisno od TRAF6 signalizacije i uticati na stabilnost iRNK ciljanih gena [227, 228] (Slika 5)



**Slika 5.** Šematski prikaz signalizacije IL-17A i IL17-F aktivacijom receptorskog kompleksa.

Modifikovano iz rada Brembilla NC i saradnika iz 2018 [229]

U zavisnosti od vrste ćelije, IL-17 može aktivirati MAPK (mitogen-activated protein kinase) signalnu kaskadu koja obuhvata ekstraćelijsku signal-regulisanu kinazu (EPK), p38 i JUN N-terminal kinazu (JNK) [224]. Dodatni transkripcioni regulator značajan u IL-17 signalizaciji je C/EBP (eng. *CCAAT/enhancer-binding protein*) koji je doveden u vezu sa aktivacijom IL17 pomoću TNF- $\alpha$  [224, 231].

Incijalna istraživanja uloge IL-17 u patogenezi ZBC detektovala su povećan nivo ovog citokina u mukozi creva zahvaćenoj inflamacijom kod KB i UK, u poređenju sa zdravim kontrolama i pacijentima sa ishemijskim kolitisom [230]. Analizirajući ćelije intestinalne mukoze kod KB metodom protočne citometrije detektovano je značajno veći broj IL-17 sekretujućih ćelija sa ko-ekspresijom IFN $\gamma$  u odnosu na zdrave ispitanike [163]. Ćelije koje ekspimiraju IL-17 su kod UK lokalizovane u lamini propriji, dok su kod KB rasprostranjene kroz submukozu i mišićni sloj, što može objasniti transmuralnu inflamaciju. U poređenju sa zdravom populacijom, mukoza creva zahvaćena inflamacijom kod ZBC je imala povišene nivoe ekspresije gena *IL17A* kao i *IL17F*. S druge strane, ekspresija *IL17F* je bila značajno povišena u koloničnoj mukozi zahvaćenoj inflamacijom u poređenju sa zdravom mukozom kod pacijenata sa KB, ali ne i kod UK [232]. Opisana je i pozitivna korelacija između stepena aktivnosti UK i nivoa IL-17 sekretujućih mononuklearnih ćelija periferne krvi [144, 232].

IL-17A i IL-17F svoju biološku aktivnost ostvaruju preko zajedničkog IL-17RA, pa je teško razlikovati pojedinačne efekte i doprinos u patogenezi ZBC. Studije koje su ispitivale kolitis indukovan dekstran sodijum sulfatom (DSS) na *IL17 knockout* miševima (miševi sa inaktiviranim *IL17* genom), pokazale su da deficijencija IL-17F rezultira redukcijom kolitisa, dok u slučaju *IL17 knockout* miševa kolitis ima agresivniji tok [233]. U eksperimentalnim istraživanjima dokazano je da transfer CD4+ CD45RBhi T ćelija u imunodeficijentne miševe dovodi do intestinalne inflamacije. Posredovan protektivni efekat IL-17A pokazan je modelom *IL17A*<sup>-/-</sup> CD45RBhi ćelija, koje nakon transfera u *RAG*



(eng. *recombination-activating gene*)  $-/-$  dovode do agresivnije intestinalne inflamacije, a dalja polarizacija  $IL17a^{-/-}$  CD45RBhi u Th1 ćelije rezultira povišenoj ekspresiji IFN- $\gamma$  [234]. Navedena istraživanja sugerisala su da u ZBC povišen nivo ekspresije IL-17A može imati protektivni efekat na mukozi, dok IL-17F dovodi do egzacerbacije inflamacije. Razlike u ravnoteži nivoa ekspresije gena  $IL17A$  i  $IL17F$  mogu imati važnu ulogu u patogenezi ZBC.

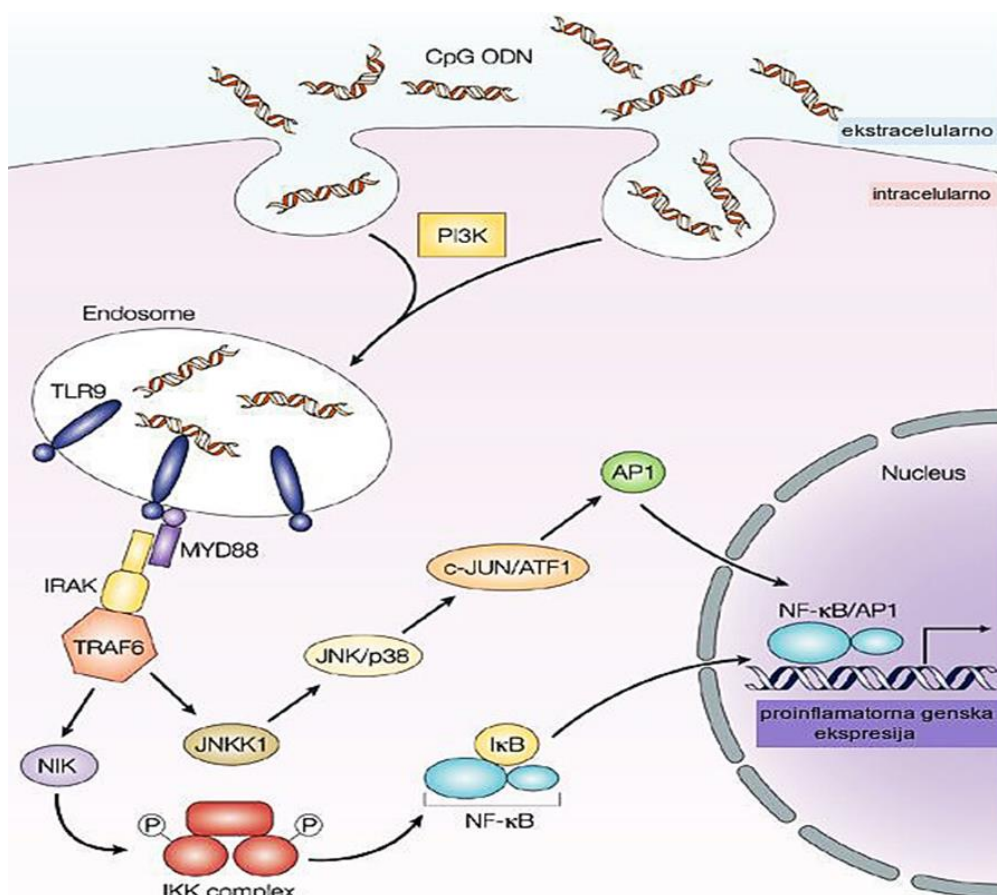
### 1.6. Uloga TLR9 u nastanku zapaljenskih bolesti creva

Receptori TLR (*Toll-like receptor*) predstavljaju transmembranske receptore tip 1 koji detektuju patogene preko određenih molekulskih obrazaca, kao što su PRRs (eng. *pathogen pattern recognition molecules*), PAMPs (eng. *pathogen-associated molecular pattern*) i DAMPs (eng. *damage-associated molecular patterns*), igrajući ključnu ulogu u urođenom imunskom odgovoru. Signalni put je posredovan adaptivnim proteinom mijeloidne diferencijacije faktorom 88 (MYD88) koji putem intracelularnih mehanizama aktivira transkripciju NF- $\kappa$ B i gene koji regulišu proces inflamacije [235].

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je prisustvo varijanti u  $TLR$  genima, kao i poremećaj funkcije ili ekspresije ovih receptora povezan sa razvojem ili relapsom ZBC. Takođe, njihova povišena ekspresija pokazana kod UK i KB može biti posledica poremećaja u homeostazi komensalne intestinalne flore [235].

TLR9 se eksprimira na apikalnim i bazolateralnim stranama membrana različitih ćelija gastrointestinalnog trakta uključujući intestinalne epitelne ćelije (IEĆ), monocite/makrofage i dendritske ćelije [235]. TLR9 prepoznaje i vezuje bakterijsku i virusnu DNK, tačnije sekvence koje se sastoje od nemetilovanih CG dinukleotida nakon čega dovodi do aktivacije urođenog imunskog odgovora. Dok aktivacija apikalnih TLR9 dovodi do tolerancije, stimulacija bazolateralnih receptora pokreće signalizaciju koja vodi do aktivacije NF $\kappa$ B i sekrecije IL-8 [236-239].

Transport kompleksa CpG oligodeoksinukleotida (ODNs) i TLR9 u endozom omogućava klasa III fofatidilinozitol 3 kinaze (PI3K). Interakcija CpG DNA i TLR9 dovodi do aktiviranja MYD88 pomoću TIR domena TLR9. Potom MYD88 dovodi do regrutovanja IRAK (eng. *interleukin-1 (IL-1) receptor-activated kinase*) 1 i 4, što rezultuje fosforilacijom IRAK-1. Nakon interakcije sa TRAF6, IRAK-1 se odvaja od receptora. Nadalje, kompleks sastavljen od TRAF6, TAK1, TAB 1 i 2 aktivira IKK, što rezultuje translokacijom NFκB u jedro. Navedeni kompleks dovodi i do aktivacije signalne kaskade mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK: JNK1/2 i p38). Opisani signalni mehanizmi rezultiraju stimulacijom različitih transkripcionih faktora uključujući NF-κB i aktivirajućeg proteina 1 (AP1) što dovodi do ekspresije gena određenih citokina i hemokina [239] (Slika 6).



**Slika 6.** Mehanizam signalnog puta TLR9. Modifikovano iz rada Klinman DM. 2004 godine [239]

TLR9 ima ulogu u povezivanju mikrobijalne i imunološke osnove nastanka ZBC. Na osnovu sprovedenih *in vitro* ispitivanja, pokazano je da detekcija patogenih bakterija *Salmonella* i *Escherichia coli* posredstvom TLR9 receptora dovodi do intestinalnog oštećenja [240]. TLR9 ima sposobnost da kao odgovor na DNK komensalnih bakterija inhibira diferencijaciju Treg i doprinosi otpuštanju Th1 citokina uključujući IL-6, IL-10, IL-12 i TNF- $\alpha$  [241]. Aktiviran TLR9 može indukovati ekspresiju IL-12 i IL-23 doprinoseći ekspanziji Th17 ćelija [242, 243]. Studije na *TLR9*<sup>-/-</sup> miševima detektovale su porast broja Treg intestinalne mukoze i redukovan broj Th17 i Th1 ćelija [244]. Studija Torok HP i saradnika pokazala je asocijaciju varijante -1237C u promotoru gena *TLR9* sa nastankom KB, dok su Fuse K i saradnici ukazali da nosioci *TLR9* 1486CC, 1174GG i 2848AA genotipova imaju veći rizik od nastanka UK [245, 246]. Takođe, varijanta *TLR9* -1237T/C je pokazala udruženost sa varijantama *IL23R* (rs1004819) i *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fxX1008) u asocijaciji sa rizikom za nastanak KB [247]. S obzirom na navedeno, pretpostavlja se da TLR9 može delovati sinergistički sa IL-23 signalnim putem kod susceptibilnosti za KB.

Postoje podaci da intestinalna inflamacija sa neutrofilnom infiltracijom i postojanjem mikrobijalne disbioze utiče na povećanje ekspresije TLR9 u mukozi kolona kod pacijenta sa UK [248]. Naime, povišena ekspresija *TLR9* iRNA u submukoznim imunskim ćelijama i kriptalnom epitelu intestinuma korelisala je sa kliničkom, endoskopskom i histološkom aktivnošću bolesti [248]. U poređenju sa zdravim kontrolama i pacijentima sa UK koji su bili u remisiji, nivo *TLR9* iRNK je bio značajno veći u biopsijama rektuma kod aktivne bolesti, dok je uočena i pozitivna korelacija sa ekspresijom *IL6* [249]. Takođe, značajno povišena ekspresija proteina TLR9 i iRNK registrovana je u citoplazmi epitelijalnih ćelija intestinuma kod UK [250]. Povećana ekspresija iRNK i proteina TLR9 registrovana kod pacijenta sa UK i KB sugerše da ZBC mogu biti udružene sa promenama u TLR9 ekspresiji u epitelu intestinuma.

Na osnovu dosadašnjih istraživanja, centralna uloga TLR u odbrani domaćina od invazivnih mikroorganizama, obnavljanju tkiva i zapaljenskim procesima, označila ih je kao potencijalne komponente buduće terapijske strategije u lečenju ZBC. Primenom specifičnih TLR agonista ili antagonista uticalo bi se na proces signalizacije koji je u osnovi razvoja UK i KB. Tako je na pacijenatima sa teško aktivnom formom UK, refraktornim na terapiju glukokortikoidima, ispitana lokalna primena TLR9 agonista u vidu imunomodulisane DNK sekvence (DIMS0150). Aplikacija DIMS0150 dovela je do uspostavljanja pozitivnog terapijskog odgovora na kortikosteroide. Tačnije, ovaj eksperimentalni terapeutik je doveo do aktiviranja TLR9 receptora i otpuštanja IL-10 i tip I interferona iz mononuklearnih ćelija periferne krvi. Dokazano je da navedeni citokini doprinose porastu senzibilizacije ćelija intestinuma na kortikosteroide [251]

Takođe, novija istraživanja o primeni TLR9 agonista su potvrdila efekat jednolačane DNK imunomodulatorne sekvence (DIMS-cobitolimod) koja sadrži nemetilovane CpG motive na supresiju nivoa iRNK *IL6*, *IL17A*, *IL17F*, dok su ekspresije *IL10* i *Foxp3* bile povišene. *In vitro* rezultati ukazali su da dodavanje TLR9 agonista doprinosi smanjenju broja CD4+IL17+ćelija, dok dodavanje inhibitornih anti-IL10 antitela obustavlja efekat aktivacije TLR9 signalizacije i smanjuje *IL17* ekspresije [252]

Na osnovu prethodnih istraživanja ustanovljena je veza TLR9, IL-23, IL-17 sa nastankom ZBC, ali zajednička signalna kaskada nije detaljno proučavana. Uprkos dokazima o postojanju njihove uloge u razvoju ZBC, do sada nije ispitivana veza sa različitim podtipovima bolesti i kliničkim parametrima. Cilj ove doktorske disertacije predstavlja određivanje detaljne molekularne klasifikacije UK i KB sa idejom primene personalizovanog pristupa u terapiji pacijenata obolelih od ZBC.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

---

Ciljevi istraživanja ove studije su:

1. Optimizacija metode za određivanje nivoa ekspresije gena *TLR9*: dizajn prajmera i probe za TaqMan tehnologiju, izbor endogene kontrole, validacija metode i kriva efikasnosti.
2. Ispitivanje razlika u ekspresiji gena *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* između zapaljenjem zahvaćene i nezahvaćene mukoze creva (kolon i ileum) kod pacijenata sa endoskopski aktivnom Kronovom bolesti i ulceroznim kolitisom.
3. Korelacija ekspresije gena *IL17A*, *IL17F*, *IL23* i *TLR9* sa kliničkom i endoskopskom prezentacijom Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa.
4. Određivanje međusobnog odnosa ekspresije gena *IL17A* i *IL17F* u zapaljenjem zahvaćenoj i nezahvaćenoj mukozi intestinuma kod pacijenata sa endoskopski aktivnom Kronovom bolesti i ulceroznim kolitisom.

### **3. MATERIЈAL I METODE**

---

### 3.1. Ispitanici

Istraživanje po tipu studije preseka sprovedeno je na Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju, Kliničkog centra Srbije, u Beogradu i Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta 41004 Ministarstva za nauku u periodu od 2011. do 2017. godine. Sprovedena studija je u saglasnosti sa etičkim principima Helsinške deklaracije i odobrena je od strane Etičkog odbora Kliničkog Centra Srbije (broj odluke 1393/12). Pre početka istraživanja, svi ispitanici su detaljno upoznati sa ciljevima studije, a potpisan informisani pristanak je bio osnovni uslov za učešće.

U studiju su uključena 104 novodijagnostikovana pacijenta sa ZBC, od kojih je 50 obolelo od KB, dok je kod 54 ustanovljen UK. Dijagnoza KB i UK je potvrđena konvencionalnim kliničkim, laboratorijskim, endoskopskim i histopatološkim nalazima u skladu sa savremenim evropskim preporukama iz 2019. godine [253]. Kod 9 pacijenata dijagnoza KB postavljena je intraoperativno usled znakova intestinalne opstukcije. Kriterijumi za isključenje iz studije bili su prisustvo nedeterminisanog oblika ZBC, trudnoća i starost manja od 18 godina. Novodijagnostikovani pacijenti sa ZBC nisu prethodno lečeni sledećim lekovima: kortikosteroidi, azatioprin/6-merkaptopurin, metotreksat i biološka terapija.

U toku istraživanja analizirani su demografski i epidemiološki podaci pacijenta sa KB i UK koji su obuhvatili pol, godine, dužinu trajanja simptoma do postavljanja dijagnoze, prethodnu upotrebu nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL), pušenje, pozitivnu porodičnu anamnezu na ZBC, operativno lečenje zbog osnovne bolesti i postojanje ekstraintestinalnih manifestacija (EIM).

Kod pacijenata uključenih u studiju beleženo je postojanje artritisa, promena po koži u vidu eriteme nodozum, pioderme gangrenozum, febrilne neutrofilne dermatoze (*Sweet syndrom*), oralnih aftoznih ulceracija, promena na očima uključujući episkleritis i uveitis, kao i udruženih hepatobilijarnih bolesti (primarni sklerozirajući holangitis).



Stepen uhranjenosti pacijenata sa ZBC procenjen je prema indeksu telesne mase (*eng. Body mass index*, BMI), koji se dobija na osnovu vrednosti telesne mase (TM) izmerene u jutarnjim satima (izražene u kilogramima (kg)) i telesne visine (TV) (izražene u metrima (m)), formulom  $BMI = TM (kg)/TV^2 (m^2)$ . Vrednosti manje od  $18\text{kg}/\text{m}^2$  su označavale pothranjene pacijente, normalnu uhranjenost su imali ispitanici sa BMI do  $25\text{kg}/\text{m}^2$ , dok su veće vrednosti od  $25\text{kg}/\text{m}^2$  ukazivale na gojaznost, a više od  $30\text{kg}/\text{m}^2$  na morbidnu gojaznost [254].

U sklopu rutinskih biohemijskih analiza u laboratoriji Klinike za gastroenterologiju i hepatologiju Instituta za medicinsku biohemiju KCS određivane su vrednosti C-reaktivnog proteina (CRP) imunohistohemijsko-turbidometrijskim merenjem sa vrednostima većim od  $5\text{mg}/\text{l}$  za detekciju inflamacije.

### **3.1.1 Klinička klasifikacija pacijenta sa Kronovom bolesti i ulceroznim kolitisom**

Fenotipske karakteristike ispitanika sa ZBC, uključujući godine starosti kada je ustanovljena dijagnoza, lokalizaciju u gastrointestinalnom traktu (GIT) i tok/formu oboljenja određene su prema Montrealskoj klasifikaciji [255] (Tabela 1).

Dijagnoza UK ili KB može biti ustanovljena u pedijatrijskom dobu (do 16 godine života) ili u adultnom periodu (pre ili posle 40 godine). Lokalizacija KB može biti izolovana u tankom crevu (ileum), debelom crevu (kolon), ileumu i kolonu, kao i proksimalnim partijama GITa. Ekstenzivnost UK uključuje lokalizacije u kolonu distalno od rektosigmoidalnog prelaza (E1), distalno od lijenalne fleksure (E2) ili zahvata regiju kolona iznad lijenalne fleksure uključujući i celokupan kolon (pankolitis) (E3). Dok inflamatorna forma KB (B1) isključuje postojanje stenoza ili penetracije, KB može imati i stenozantnu formu sa registrovanim suženjima lumena creva (B2) ili penetrantnu formu fistulizirajućeg karaktera (B3). Perianalna bolest obuhvata postojanje perianalnih fistula i fisura [255]. Procena toka UK bazira se na kliničkoj prezentaciji bolesti: remisija tj. asimptomatski pacijenti (S0), pojava 4 ili manje stolica sa/bez prisustva krvi uz normalne zapaljenske markere (sedimentacija eritrocita) (S1), više od 4

stolice sa/bez krvi sa minimalnim znacima sistemske toksičnosti (S2), više od 6 krvavih stolica/24h, srčana frekvencija veća od 90 otkucaja/min, telesna temperatura minimum 37.5 °C, nivo hemoglobina manji od 105g/l i sedimentacija eritrocita minimum 30 mm/h (S3) [255]

**Tablela 1. Montralska klasifikacija zapaljenskih bolesti creva**

Montrealska klasifikacija		
Zapaljenska bolest creva	Kronova bolest	Ulcerozni kolitis
Godine života kada je ustanovljena dijagnoza	A1 manje od 16 godina	
	A2 od 16-40 godina	
	A3 posle 40 godina	
Lokalizacija bolesti	L1 ileum	E1 proktitis
	L2 kolon	E2 levostrani kolitis
	L3 ileum i kolon	E3 ekstenzivni kolitis
	L4 proksimalne partije GITa	
Tok bolesti (forma)	B1 inflamatorna	S0 klinička remisija
	B2 stenožantna	S1 blaga
	B3 penetrantna	S2 umerena
	p* perianalna bolest	S3 teška

### 3.1.2 Klinička aktivnost zapaljenske bolesti creva

Procena aktivnosti KB izvršena je prema vrednostima indeksa aktivnosti Kronove bolesti (eng. *Crohn's disease activity index* CDAI), dok je kod pacijenata sa UK primenjen ukupan Mayo skor [17, 256].

Pacijenti sa KB uključeni u studiju su popunjavali dnevnik tokom sedam dana i unosili podatke bazirane na broju stolica za 24h, abdominalnom bolu (0-nema, 1-blag, 2-umeren, 3-jak), opštem stanju (0-dobro; 1-malo lošije, 2-loše, 3-veoma loše, 4-teško), prisustvu ekstraintestinalnih manifestacija uključujući artralgijske, eritemu nodosum, pioderme gangrenozum, aftozni stomatitis, iritis, prisustvo fistula, fisura i telesne temperature više od 37.8 °C, primeni opijata i telesnoj masi. Određivanje CDAI skora je prikazano u Tabeli 2. kao zbir svih kriterijuma, sa izračunatim vrednostima CDAI  $\leq 150$  koji ukazuju na kliničku remisiju, CDAI 150-220 blagu aktivnost bolesti, CDAI 220-450 umerenu aktivnost, dok vrednosti CDAI  $> 450$  su ukazivali na tešku aktivnost KB.

**Tabela 2. Klinička procena aktivnosti KB primenom CDAI**

<b>Indeks aktivnosti Kronove bolesti (CDAI)</b>		
Broj tečnih/kašastih stolica za 24h (tokom 7 dana)		<b>x 2</b>
Abdominalni bol za 24h (tokom 7 dana)	(procena od 0-3)	<b>x 5</b>
Opšte stanje za 24h (tokom 7 dana)	(procena od 0-4)	<b>x 7</b>
Ekstraintestinalne manifestacije (tokom 7 dana)		<b>x 20</b>
Opijati	0-ne; 1-da	<b>x 30</b>
Abdominalna masa	0-ne; 2-nesigurno; 5-da	<b>x 10</b>
Hematokrit (Hct)	muškarci (47- Hct); žene (42-Hct)	<b>x 6</b>
Odstupanje od standardne telesne mase (%)		<b>x 1</b>

Aktivnost bolesti kod pacijenta sa UK određena je prema ukupnom Mayo skor koji uključuje broj stolica za 24h, prisustvo krvi u stolici, kolonoskopski nalaz (Mayo endoskopski skor), procenu opšteg stanja od strane lekara. Na osnovu zbira pojedinačnih parametara skora bolest je kod UK okarakterisana u remisiji (0-2), blaga (3-5), umerena (6-10) ili teška (11-12) (Tabela 3).

**Tablela 3. Klinička procena ulceroznog kolitisa primenom ukupnog Mayo skora**

<b>Ukupan Mayo skor</b>
Broj stolica za 24h  0- normalan (uobičajen) broj stolica za pacijenta  1- 1 do 2 više uobičajenog  2- 3 do 4 više od uobičajenog  3- više od 5 stolica od uobičajenog
Reklano krvarenje  0- nije uočena krv  1- trag krvi u stolici u manje od 50% pražnjenja  2- krv u stolici u većini crevnog pražnjenja  3- izolovano krvarenje na čmar
Endoskopski nalaz (Mayo endoskopski skor)  0- normalna sluznica (neaktivna bolest)  1- eritem, smanjena vaskularna šara, blaga vulnerabilnost sluznice  2- izražen eritem, izostanak vaskularne šare, fragilnost i erozije sluznice  3- spontano krvarenje i ulceracije sluznice
Klinička procena opšteg stanja  0- normalno opšte stanje  1- blaga bolest  2- umerena bolest  3- teška bolest

### 3.1.3. Endoskopska aktivnost zapaljenskih bolesti creva

Kolonoskopija sa terminalnom ileoskopijom je urađena korišćenjem Olympus endoskopa (model CF-H180AL video colonoscop High Definition Television-HDTV) kod svih pacijenta koji su uključeni u ispitivanje.

Procena endoskopske aktivnosti kod pacijenata sa KB izvršena je primenom pojednostavljenog endoskopskog skora za KB (SES-CD, eng. *Simple Endoscopic Score for Crohn Disease*) na osnovu prisusva ulceracija (površinskih i dubokih), ulcerativnih/neulcerativnih stenoza u različitim segmentima creva uključujući terminalni ileum, ascendens, transverzum, descendens, sigma i rektum (Tabela 4.) [257]. Izračunate vrednosti SES-CD do 2 su ukazivale na endoskopsku remisiju, blaga endoskopska bolest okarakterisana je vrednostima 3-6, umerena 7-15, dok vrednosti iznad 15 su ukazivale na tešku aktivnu formu KB.

**Tabela 4. Kriterijumi endoskopski indeks za procenu aktivnosti Kronove bolesti (KB)**

SES-CD SKOR				
	0	1	2	3
Prisustvo i veličina ulceracije	/	0,1-0,5cm	0,5-2cm	>2cm
Ekstenzivnost ulcerisanih površina	/	<10%	10%-30%	>30%
Ekstenzivnost zahvaćene površine	/	<50%	50-75%	>75%
Prisustvo i tip stenoza	/	jedna	višestruke	neprolazna

Endoskopska aktivnost kod UK je procenjena na osnovu vrednosti endoskopskog Mayo skora od 0 do 3 nakon analize eritema, vaskularne šare sluznice, vulnerabilnosti, kao i prisustva erozija, spontanog krvarenja i ulceracija [256] (Tabela 3.).

### **3.2. Prikupljanje bioptata mukoze intestinumama**

U toku ileokolonoskopije uzimane su biopsije ileuma ili kolona, u zavisnosti od lokalizacije bolesti, za svakog pacijenta iz dve regije: regije endoskopski aktivne bolesti (mukoze zahvaćene inflamacijom) i regije koja je na pregledu prepoznata kao mukoza nezahvaćena inflamacijom od strane iskusnog gastroenterologa. Odmah nakon uzimanja biopsija intestinalnog tkiva, bioptati su zaronjeni u 200 µl rastvora Allprotect Tissue Reagenta (Qiagen, Hilden, Germany) u cilju stabilizacije RNK. Uzorci dobijeni tokom endoskopskih pregleda su potom inkubirani preko noći na 4°C i čuvani na -20°C do planirane izolacije. Sa istih lokalizacija odakle su uzete biopsije predviđene za analizu iRNK, uzeti su i uzorci tkiva sa ciljem njihove histopatološke analize. Ukoliko je histopatološka analiza potvrdila inflamaciju u endoskopski aktivnim delovima intestinumama okarakterisanim neutrofilnom infiltracijom mukoze, kriptitisom ili kriptalnim apscesima, ona je uključena u ispitivanje kao obolela mukoza. Ukoliko je pokazano da su biopsije iz regije intestinumama bez vidljive endoskopske aktivnosti bili histopatološki bez prisustva zapaljenja, oni su dalje uključeni u ispitivanje kao neinflamirana mukoza.

### **3.3 Analiza ekspresije gena *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9***

Za ispitivanje ekspresije odabranih gena (*IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9*) korišćena je metoda PCR u realnom vremenu (eng. *real-time PCR*) kojom se meri količina PCR produkta u toku svakog ciklusa amplifikacije ciljne sekvence. Kao matrica za amplifikaciju ciljne sekvence korišćena je komplementarna DNK (cDNK) dobijena metodom reverzne transkripcije izolovane totalne RNK iz uzoraka intestinalne mukoze pacijenata sa ZBC.

#### **3.3.1 Izolacija RNK materijala iz bioptata intestinalnog tkiva**

Za izolovanje RNK materijala iz uzoraka intestinalnog tkiva pacijenata sa ZBC korišćen je Rneasy Mini Kit (Qiagen), po protokolu proizvođača. Za izolaciju RNK materijala korišćeno je 3-5mg intestinalnog tkiva. Uzorci bioptata su čuvani na -20°C, a pre izolacije su otopljeni 15-30 minuta na

sobnoj temperaturi. Uzorci tkiva su homogenizovani u tubi od 10ml u prisustvu 350  $\mu$ l denaturišućeg pufera RTL (10  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanol, 1 ml pufera RTL) korišćenjem homogenizatora TissueRuptor (Qiagen). Po završenoj homogenizaciji lizat je 3 minuta centrifugiran u mikrotubi od 1.5ml na 13200 rpm. Supernant dobijen centrifugiranjem je prikupljen i njegova ukupna zapremina je pomešana sa istom zapreminom 70% DEPC (dietil pirokarbonat) (etanol razblažen sa 0.1% DEPC vodom) u cilju vezivanja RNK za kolonu. Uloga dietil pirokarbonata je da inaktivira ribonukleaze u rastvorima za izolaciju RNK. Ova smeša je zatim nanošena na kolonu i centrifugirana na 13000 rpm tokom 15 s. Dobijeni eluat se odbacivao a kolona sa vezanom RNK se dalje ispirao sa 700  $\mu$ l pufera RW1, što je bilo praćeno centrifugiranjem 15 s na 13000 rpm. Nakon toga se eluat odbacivao a na kolonu se dodavalo 500  $\mu$ l pufera RPE i ista je centrifugirana na 13000 rpm, 15 s, uz ponovno odbacivanje eluata. U postupku finalnog ispiranja kolone korišćeno je 500  $\mu$ l pufera RPE, nakon čega je sledilo centrifugiranje na 13000 rpm u toku 2 min. Dodatno se kolona centrifugirala na maksimalnoj brzini u trajanju od 1 min u čistoj mikrotubi od 1.5ml kako bi se potpuno uklonio zaostali etanola. Po završetku centrifugiranja, RNK sa kolone je eluirana sa 30  $\mu$ l vode oslobođene od Rnaza (Rnase-free) u novoj mikrotubu od 1.5ml. Do upotrebe, izolovana RNK je čuvana na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Koncentracija i čistoća RNK materijala je izmerena na spektrofotometru *NanoVue*, prema uputstvu za rad na aparatu. Čistoća se procenjivala odnosom apsorbancije na talasnim dužinama 260nm/280 nm, a optimalan koeficijent za čistoću je bio preko 1.9.

### **3.3.2 Sinteza komplementarne DNK (cDNK) metodom reverzne transkripcije**

Proces reverzne transkripcije koji podrazumeva sintezu komplementarne DNK (cDNK) iz izolovane RNK izvršen je korišćenjem kita *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific), prema uputstvu proizvođača. Reverzna transkripcija je rađena u PCR aparatu.

Sastav reakcione smeše finalne zapremine 20  $\mu$ l se sastojao od: 1  $\mu$ g totalne RNK, 5 $\mu$ M nasumičnih heksamera kao prajmera (Thermo Scientific), 1 x RT pufera (Thermo Scientific), 20 U Ribo-Lock RNaznog inhibitora (Thermo Scientific), 1 mM dNTP (Thermo Scientific) i 200 U RevertAid reverzne

transkriptaze (Thermo Scientific). Priprema reakcione smeše je obuhvatala inkubaciju RNK i prajmera u zapremini od 11 µl na temperaturi od 70°C u trajanju od 5 min, nakon čega je u svaki dodavano 9 µl smeše koja je sadržala RT pufer, Ribo-Lock RNazni inhibitor, dNTP i RevertAid reverznu transkriptazu. Ova smeša je inkubirana na 25°C u trajanju od 10 min, zatim 1 h na 42°C, nakon čega se reakcija zaustavljala inkubacijom na 70°C 10 minuta. Dobijeni uzorak cDNK imao je koncentraciju 50 ng/µl i do dalje upotrebe je čuvan na -20°C.

### 3.3.3 Kontrola kvaliteta cDNK

Kako bi se proverio kvalitet sintetisane totalne komplementarne DNK (cDNK) izvršeno je umnožavanje cDNK regiona gena *Abl1* koji je konstitutivno eksprimiran u ćeliji, korišćenjem metode PCR. Na ovaj način je proveren integritet izolovane RNK i efikasnost reverzne transkripcije. Prajmeri korišćeni za umnožavanje regiona *Abl1* gena prikazani su u Tabeli 5.

**Tabla 5. Prajmeri primenjeni u proceni kvaliteta cDNK**

Naziv prajmera	Sekvenca (5' - 3' smer)
<i>Abl1</i> F	ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCT
<i>Abl1</i> R	TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG

Napomena: Skraćenice F - (eng. *forward*) uzvodni prajmer (5'→3'); R - (eng. *reverse*) (3'→5') nizvodni prajmer

Reakcija za umnožavanje *Abl1* cDNK regiona bila je finalne zapremine 25 µl i sastojala se od: 100 ng cDNK, 1 x PCR pufer (Qiagen), 1 x Q rastvor (Qiagen), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen), 0.2 µM dNTP (Thermo Scientific), 0.4 µM prajmera (uzvodni i nizvodni), 1 U Taq polimeraze (KAPA Biosystems). Nakon toga, umnožen fragment je analiziran na 2% agaroznom gelu. U slučaju da je u PCR reakciji umnožen fragment dužine od 277 bp, procenjeno je da je cDNK adekvatnog kvaliteta za analizu ekspresije gena primenom metode real-time PCR.

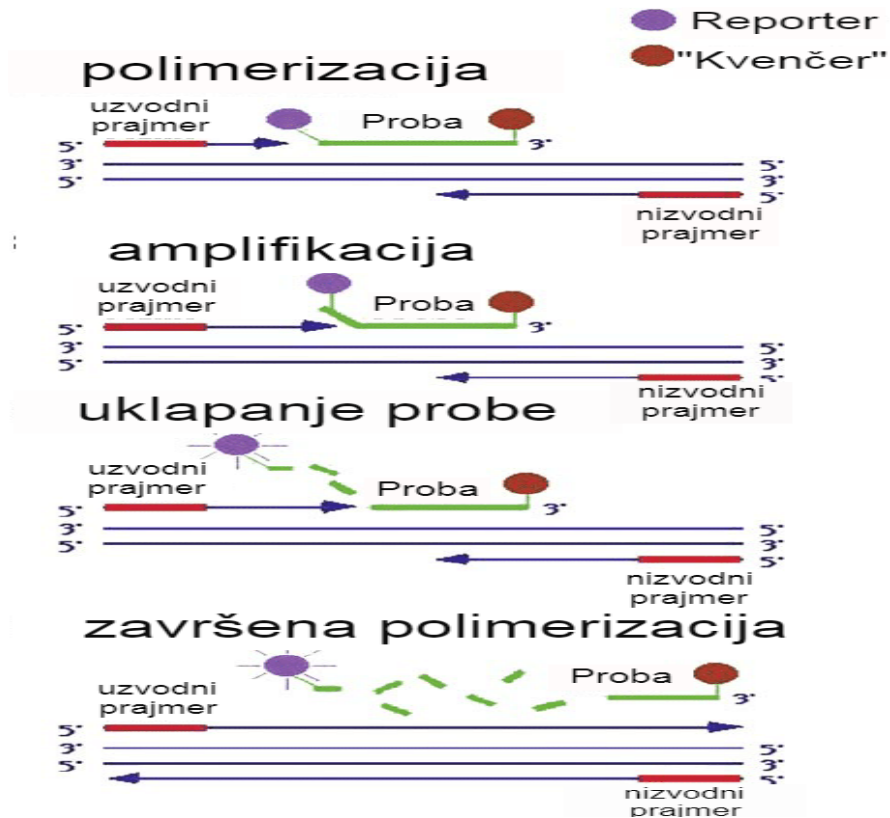


### 3.3.4 Analiza kvaliteta cDNK na agaroznom gelu

Analiza kvaliteta cDNK je izvršena elektroforezom na horizontalnom agaroznom gelu koncentracije (2 - 4%) u koje je pre polimerizacije dodavan etidijum bromid (završne koncentracije 0.7  $\mu\text{g/mL}$ ). Naveden proces elektroforeze je vršen u TAE puferu (40 mM Tris, 20 mM sirćetna kiselina, 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), pri naponu od 5 V/cm i amperaži od 5 A/cm. Osvetljavanjem gela UV svetlom na CCD kameri *BioDocAnalyze* sistomom registrovana je cDNK

### 3.3.5 TaqMan real-time PCR

U cilju kvantifikacije ekspresije gena u uzorcima intestinalnog tkiva primenjena je metoda TaqMan real-time PCR (Slika 7.). U ovoj metodi se pored prajmera specifičnih za sekvencu koristi i oligonukleotidna proba koja se vezuje za matricu nizvodno od prajmera i komplementarna je delu sekvence koji se umnožava. Proba sadrži fluorescentni reporterski molekul (fluoroforu) na 5' kraju i takozvani kvenčer molekul (prigušivač) na 3' kraju. Kada su ova dva molekula blizu jedan drugom, fluorescencija reporterskog molekula je utišana zbog procesa transfera fluorescentne rezonantne energije (*eng. Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET*). Tokom PCR amplifikacije, proba se prvo vezuje za DNK matricu, a zatim se tokom elongacije fragmenta pod dejstvom 5'-3' egzonuklearne aktivnosti Taq polimeraze reporter oslobađa od kvenčera. Ovo dovodi do emitovanja fluorescentnog signala koji je proporcionalan broju umnoženih PCR fragmenata. Tako će jačina emitovanog signala eksponencijalno rasti tokom svakog ciklusa amplifikacije. Kada fluorescentni signal pređe prag detekcije, taj ciklus se naziva Ct ciklus (*eng. threshold cycle*). Ct vrednost odražava kvantitet produkta, tačnije, obrnuto je proporcionalna početnom nivou ciljne mRNK. Glavna prednost TaqMan metode je njena visoka specifičnost [258].



**Slika 7:** Osnovni principi TaqMan real-time PCR metode. Modifikovano iz rada Schaad NW i saradnika iz 2003[259].

Prajmeri i probe upotrebljeni za analizu ekspresije izabranih gena navedeni su u Tabeli 6. Za analizu gena *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* korišćeni su komercijalno dostupni eseji, *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems). Prajmeri i probe korišćeni za analizu ekspresije *TLR9* su dizajnirani za potrebe ove studije. Koraci u dizajnu prajmera za gen *TLR9* i provera njihove efikasnosti opisani su u Tabeli 7.

Kvantifikacija produkta real-time PCR metodom može biti apsolutna i relativna. Apsolutna kvantifikacija se koristi za dobijanje apsolutnog broja produkta koji se meri, dok se kod relativne kvantifikacije ona predstavlja kao relativni odnos merenog i kontrolnog produkta (kalibratora). U oba slučaja je neophodno normalizovati mereni produkt u odnosu na referentni gen, takozvanu endogenu kontrolu, kako eventualne razlike u ekspresiji ne bi bile posledica različitog kvaliteta analiziranih

uzoraka. Kao endogena kontrola koristi se gen koji je konstitutivno eksprimiran u ćeliji (*eng. housekeeping gen*), tj. gen koji ima stabilnu ekspresiju u svim uzorcima koji se koriste za kvantifikaciju. Zbog toga je važno da prajmeri za umnožavanje ciljnog gena i endogene kontrole imaju sličnu temperaturu topljenja, kao i da je efikasnost amplifikacije u ova dva eseja podjednako visoka kako bi mogli da se analiziraju zajedno tokom real-time PCR amplifikacije. Kao endogena kontrola za kvantifikaciju ekspresije analiziranih gena odabran je gen *GAPDH* (*eng. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*), prethodno korišćen kao endogena kontrola za merenje genske ekspresije u intestinalnom tkivu [260]. Prajmeri i proba za analizu ekspresije gena *GAPDH* su opisani u Tabeli 6.

**Tabela 6. Prajmeri i probe korišćeni za real-time PCR analizu**

Gen	Prajmeri i probe (sekvenca 5'-3' smer)
<i>IL17A</i>	TaqMan Gene Expression Assay *Hs00174383_m1 <i>Applied Biosystems</i>
<i>IL17F</i>	TaqMan Gene Expression Assay *Hs00369400_m1 <i>Applied Biosystems</i>
<i>IL23A</i>	TaqMan Gene Expression Assay *Hs00900828_g1 <i>Applied Biosystems</i>
<i>TLR9 F</i>	GGACCTCTGGTACTGCTTCCA
<i>TLR9 R</i>	AAGCTCGTTGTACACCCAGTCT
<i>TLR9</i> proba	<b>FAM-ACGATGCCTTCGTGGTCTTCGACAAA-TAMRA</b>
<i>GAPDH F</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGT
<i>GAPDH R</i>	GAAGATGGTGATGGGATTTC
<i>GAPDH</i> proba	<b>FAM-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-TAMRA</b>

Napomena: \*komercijalno dostupni prajmeri i njihov kataloški broj. FAM – fluorofora, TAMRA – kvenčer. Skraćenice: F - uzvodni prajmer, R - nizvodni prajmer.

Ekspresija gena je analizirana korišćenjem KAPA PROBE FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal (KAPA Biosystems), po uputstvu proizvođača. Merenje je urađeno na ABI PRISM 7500 Real Time PCR aparatu (Applied Biosystems, USA).

Sve reakcije su rađene u duplikatu i imale su odgovarajuće kontrole bez matrice, takozvane blank kontrole. Reakciona smeša finalnog volumena 10 µl sastojala se od sledećih komponenti:

- 75ng cDNK za *IL17A* i *IL17F*, 20 ng cDNK za *IL23A* i *TLR9* (količina cDNK korišćena za endogenu kontrolu odgovarala je količini cDNK korišćenoj za ciljni gen)
- 1 x KAPA PROBE FAST Universal qPCR Master Mix (KAPA Biosystems)
- 1 x ROX Low referentna boja (KAPA Biosystems)
- 1 x *IL17A / IL17F / IL23A TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems) / u slučaju *TLR9*: 300 nM F i R prajmera i 200 nM probe/ u slučaju endogene kontrole *GAPDH*: 300 nM F i R prajmera i 200 nM probe

Temperaturni profil reakcije korišćene za amplifikaciju svih gena bio je isti:

- 2 min / 50°C
- 3 min / 95°C
- 45 ciklusa:
- 15 s / 95°C
- 1 min / 60°C (aniling)

Za izražavanje relativne vrednosti ekspresije gena korišćena je ddCt metoda [261]. Nivo ekspresije ispitivanog gena (Q), koji je normalizovan u odnosu na endogenu kontrolu i relativno izražen u odnosu na kalibrator računa se po sledećoj formuli:

$Q = 2^{-ddCt}$  ; pri čemu je  $ddCt = dCt_{uzorak} - dCt_{kalibrator} = (Ct_{gen\ uzorak} - Ct_{endogena\ uzorak}) - (Ct_{gen\ kalibrator} - Ct_{endogena\ kalibrator})$

Kao kalibrator za dobijanje relativne ekspresije gena izabrana je medijana dCt vrednosti ekspresije gena u zdravom tkivu pacijenata. Dalje je relativna vrednost Q korišćena za statističku obradu podataka.

### 3.3.5.1 Dizajn prajmera za merenje nivoa ekspresije gena *TLR9*

Da bi TaqMan real-time PCR metoda mogla biti korišćena za kvantifikaciju iRNK, umnožavanje produkta mora da bude specifično i efikasno, što najviše zavisi od odabira prajmera. Poželjno je da sekvenca koja se umnožava bude dužine 80-200 bp, zbog toga što se kraći fragmenti umnožavaju sa većom efikasnošću. Optimalna dužina prajmera je 18–24 bp. Temperatura topljenja između prajmera bi trebalo da bude slična (sa razlikom ne većom od 1-2°C) i u temperaturnom opsegu 59-68°C (optimalno 63-64°C). Optimalni aniling prajmera za real-time PCR reakciju je oko 59-60°C. Prajmeri koji su visoko specifični (homologi samo sa jednom ciljnom sekvencom), ne formiraju sekundarne strukture i nisu međusobno komplementarni na 3' kraju ("prajmer-dimer" strukture), mogu se uzeti u obzir kao optimalni za real-time PCR metodu [262, 263].

TaqMan proba bi trebalo da ima temperaturu topljenja koja je 5-10°C viša u poređenju sa prajmerima. Ovo je važno kako bi se osiguralo da proba ostane vezana za matricu tokom ekstenzije prajmera. U većini slučajeva, probe imaju dužinu manju od 30 bp i ne sadrže G bazu na svom 5' kraju jer ona može da indukuje fluorescentni signal čak i nakon hidrolize. Optimalno je da ciljna sekvenca sadrži 30-80% GC parova. Probu treba dizajnirati tako da ona sadrži više C baza komplementarnih matrici koja u tom slučaju sadrži više G baza.

U cilju odabira optimalnih prajmera i probe za kvantifikaciju genske ekspresije *TLR9*, korišćena je RTPrimerDB baza (<http://www.rtpimerdb.org/>). Ova baza sadrži sekvence prajmera i proba prethodno korišćenih u real-time PCR esejima. Međutim, kako efikasnost svake real-time PCR reakcije

zavisi od specifične hemije koja se koristi, aparata, kao i vrste tkiva u kome se genska ekspresija prati, neophodno je izvršiti validaciju metode i proveriti krivu efikasnosti [264]. Specifičnost *TLR9* prajmera i probe, njihove temperature topljenja, kao i predikcija sekundarnih struktura i 3' komplementarnost, provereni su korišćenjem PrimerBLAST alata dostupnog na National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), kao i Beacon Designer alata (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/>). Sekvence izabranih prajmera i probe dizajniranih za analizu ekspresije gena *TLR9* prikazani su u Tabeli 7.

**Tabela 7. Prajmeri i probe korišćeni za merenje nivoa ekspresije gena *TLR9***

Naziv	Sekvenca (5' - 3' smer)	T <sub>m</sub> (°C)	Dužina prajmera (bp)	Dužina amplikona (bp)
<i>TLR9</i> F	GGACCTCTGGTACTGCTTCCA	69.3	21	151
<i>TLR9</i> R	AAGCTCGTTGTACACCCAGTCT	69.6	22	
<i>TLR9</i> proba	<b>FAM-ACGATGCCTTCGTGGTCTTCGACAAA-TAMRA</b>	73.7	26	

Napomena: FAM – fluorofora, TAMRA – kvenčer. Skraćenice: F - uzvodni prajmer, R - nizvodni prajmer.

### 3.3.5.2. Validacija metode za merenje nivoa ekspresije *TLR9*

Optimizovan TaqMan esej treba da pokazuje visoku efikasnost amplifikacije koja pokriva širi spektar koncentracija analiziranih uzoraka. Da bi se procenila efikasnost TaqMan eseja, treba konstruisati standardnu krivu korišćenjem raznih razblaženja uzorka poreklom iz tkiva koje se analizira, koja će obuhvatiti koncentraciju test uzorka. Ona se konstruiše tako što se na *x* osi grafikona prikazuju

logaritamske vrednosti količine uzoraka, dok se na y osi predstavljaju Ct vrednosti za svako testirano razblaženje. Jednačina standardne krive, kao i koeficijent determinacije  $R^2$  koriste se za procenu efikasnosti real-time PCR reakcije.  $R^2$  vrednost pokazuje koliko su eksperimentalni podaci dobro opisani u regresionoj krivi, tj koliko odstupaju od nje. Manja odstupanja daće veću  $R^2$  vrednost i poželjno je da ona bude  $>0.98$ . Ukoliko se savršeno dupliranje matrice dešava u svakom PCR ciklusu, razmak amplifikacionih kriva biće određen jednačinom  $2^n = \text{faktor razblaženja}$ . Efikasnost amplifikacije se može predstaviti i preko nagiba standardne krive, koristeći formulu:  $E = 10^{-1/\text{nagib st krive}}$ . Idealno, u svakom ciklusu trebalo bi da dođe do dvostrukog povećanja broja kopija produkta, što znači  $2 = 10^{-1/\text{nagib st krive}}$ . U tom slučaju, očekivani optimalni nagib iznosio bi  $-3.32$ . Efikasnost se može prikazati i u procentima: % Efficiency =  $(E-1) \times 100\%$ , gde bi u idealnim uslovima efikasnost bila % Efficiency =  $(2-1) \times 100\% = 100\%$ . Efikasnost manja od 90% ukazuje na loš dizajn prajmera i suboptimalne uslove reakcije. Efikasnost veća od 100% može ukazivati na koamplifikaciju neželjenih produkata.

Sve reakcije korišćene za pravljenje standardne krive su rađene u duplikatu i imale su blank kontrolu. Reakciona smeša za *TLR9* bila je ukupnog volumena 10  $\mu\text{l}$  i sastojala se od sledećih komponenti:

- Ukupno 5 razblaženja cDNK iz biopsije intestinalnog tkiva (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ng)
- 1x KAPA PROBE FAST Universal qPCR Master Mix (Kapa Biosystems)
- 1x ROX Low referentna boja (KAPA Biosystems)
- Prajmer uzvodni (forward, F) i nizvodni (reverse, R) finalne koncentracije 300 nM
- Proba finalne koncentracije 200 nM

Temperaturni profil reakcije bio je:

1. 2 min / 50°C

2. 3 min / 95°C

3. 40 ciklusa:

- 15 s / 95°C
- 1 min / 60°C (aniling i ekstenzija)

### 3.4. Statistička analiza rezultata

Statistička analiza je urađena primenom softverskog paketa SPSS 21.0 (IBM SPSS Statistics, Chicago, USA) i softvera R 3.4.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Normalna raspodela merenih varijabli testirana je Šapiro-Vilk testom. Za analizu nivoa genske ekspresije primenjene su mere centralne tendencije uključujući medijanu, opseg i vrednosti prvog i trećeg kvartala. Za analizu razlika u nivou ekspresije gena između testiranih grupa korišćeni su neparametrijski testovi, Vilkoksonov test ekvivalentnih parova (za testiranje razlika između uparenih uzoraka inflamacijom nezahvaćene i zahvaćene mukoze) i Man-Vitnjev U test (za testiranje razlika između definisanih fenotipskih grupa pacijenata). Za ispitivanje korelacija između analiziranih varijabli korišćen je neparametrijski Spirmanov test. Svi primenjeni testovi su bili nedirekcioni, a granična vrednost za statističku značajnost bila je 0.05 ( $p < 0.05$ ).



## **4. REZULTATI**

---

#### **4.1 Karakteristike studijske grupe pacijenata sa zapaljenskim bolestima creva**

Istraživanje je uključilo 50 novodijagnostikovanih pacijenata sa KB i 54 sa UK. Ispitivane demografske i kliničke karakteristike pacijenta sa ZBC prikazane su u Tabeli 8.

U grupi od 50 pacijenata sa KB, 26 je imalo dominantno aktivnu bolest u predelu ileuma, dok je kod 24 ispitanika najizraženija aktivnost bila u predelu kolona.

Podgrupu KB aktivne ilealne lokalizacije činilo je 14 osoba muškog pola (53.8%), prosečne starosti 36 godina (raspon 25-44 godina), normalne uhranjenosti (BMI 24.6kg/m<sup>2</sup>) sa prethodnim trajanjem simptoma od prosečno 9.5 meseci (raspon 4.5-13 meseci) do postavljanja dijagnoze. Prema Montrealskoj klasifikaciji 16 ispitanika je imalo izolovanu ilealnu lokalizaciju bolesti, dok je kod 10 pacijenata verifikovana ileokolonična bolest sa dominantnom endoskopskom aktivnosti u tankom crevu. Inflamatorna forma bolesti je verifikovana kod 11 pacijenata, kao i stenožantna, dok je penetrantna KB ilealne lokalizacije sa perianalnom bolesti uočena kod 4 ispitanika. Prosečna vrednost CRP u ovoj grupi iznosila je 11.5 mg/l (opseg 8.0-6.0). Pacijenti ove podgrupe su prosečno imali blagu kliničku aktivnost bolesti prema vrednostima CDAI 180 (opseg 137.5-222.5) uprkos endoskopskoj aktivnosti. U 6 slučajeva dijagnoza je postavljena postoperativno zbog pojave subokluzivnih tegoba.

Aktivnu koloničnu lokalizaciju KB imalo je 19 ispitanika muškog (79.2%) i 5 ženskog (20.8%) pola, prosečne starosti 34 godina (opsega 28-47), normalne uhranjenosti (posećan BMI 24.4kg/m<sup>2</sup>) i prosečnog trajanja simptoma do postavljanja dijagnoze od 7.5 meseci (opseg 6-12). Izolovana kolonična KB je opisana u 15 ispitanika, dok je 9 imalo ileokoloničnu lokalizaciju sa aktivnom bolesti u predelu debelog creva. Kod 15 slučajeva bolest je bila inflamatorne forme, kod 6 pacijenata je opisana stenožantna bolest, dok je 3 pacijenta imalo penetrirajuću formu od kojih su 2 imala perianalnu bolest. Prosečna vrednost CRP je bila 14.5mg/l (opsega 9-30). Dok je klinička aktivnost KB aktivne kolonične

lokalizacije prema prosečnim vrednostima CDAI okarakterisana kao blaga (CDAI 180, opsega 154-246), kod 3 pacijenta dijagnoza je postavljena postoperativno.

Grupa pacijenata sa UK je bila prosečne starosti 43 godina (opseg 34-57) i uključila je 24 muškarca (44.4%) i 30 ispitanika ženskog pola, normalne uhranjenosti (BMI 23.7kg/m<sup>2</sup>, opseg 21.2-24.7), prosečnog trajanja simptoma od 6.5 meseci (opseg 6-12 meseci) do postavljanja dijagnoze. Aktivan ulcerozni proktitis je registrovan kod 16 pacijenata, levostrani kolitis je imalo 19, dok je ekstenzivnu bolest imalo 19 ispitanika sa UK. Tok bolesti prema Montrealskoj klasifikaciji procenjen je kao blag kod 36 (66.7%) pacijenta, umeren kod 15 (27.8%) ispitanika, dok je težak UK verifikovan kod 3 (5.6%) pacijenta. Vrednost prosečnog CRP iznosila je 12.0 mg/l (8.0-18.8). Prosečna vrednost ukupnog Mayo skora ispitanika je iznosila 6 (opsega 4-8) i okarakterisana kao umereno aktivna bolest.

Prema anamnestičkim podacima, pacijenti sa ilealnom lokalizacijom KB su imali više porodičnih slučajeva ZBC (23.1%) u odnosu na ostale ispitanike. Iako se pušenje smatra značajnim faktorom rizika u KB, pušački status je bio uniforman između grupa sa KB i UK. Redovna upotreba NSAID je bila češća u grupi pacijenata sa UK u odnosu na KB. Razlika u učestalosti ekstraintestinalnih manifestacija između analiziranih grupa pacijenata sa UK i KB nije registrovana.

**Tabela 8. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa UK i KB**

Karakteristike	KBi (n = 26)	KBc (n = 24)	UK (n = 54)
Starost (godine), medijana (opseg)	36.0 (25.0 - 44.3)	34.0 (28.3 - 46.8)	43.5 (33.8 - 57.0)
Pol muški/ženski (broj, %)	14 /12 (53.8/46.2)	19/5 (79.2/20.8)	24/30 (44.4/55.6)
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), medijana (opseg)	24.6 (22.5 - 26.8)	24.4 (20.5 - 26.1)	23.7 (21.2 - 24.7)
Trajanje simptoma do dijagnoze, (meseći), medijana (opseg)	9.5 (4.5 - 13.0)	7.5 (6.0 - 12.0)	6.5 (6.0 - 12.0)
Lokalizacija bolesti			
L1 <sup>a</sup> / E1 <sup>b</sup> (%)	16 (61.5)	NA	16 (29.6)
L2 <sup>a</sup> / E2 <sup>b</sup> (%)	NA	15 (62.5)	19 (35.2)
L3 <sup>a</sup> / E3 <sup>b</sup> (%)	10 (38.5)	9 (37.5)	19 (35.2)
Fenotip ZBC			
B1 <sup>c</sup> / S1 <sup>d</sup> (%)	11 (42.3)	15 (62.5)	36 (66.7)
B2 <sup>c</sup> / S2 <sup>d</sup> (%)	11 (42.3)	6 (25.0)	15 (27.8)
B3 <sup>c</sup> / S3 <sup>d</sup> (%)	4 (15.4)*	3 (12.5) <sup>#</sup>	3 (5.6)
CRP (mg/l), medijana (opseg)	11.5 (8.0 - 16.0)	14.5 (9.0 - 30.0)	12.0 (8.0 - 18.8)
CDAI, medijana (opseg)	180.0 (137.5 - 222.5)	180.0 (154.0 - 246.3)	NA
Mayo skor, medijana(opseg)	NA	NA	6.0 (4.0 - 8.0)
Operacija na dijagnozi (%)	6 (23.1)	3 (12.5)	0 (0.0)
Prethodna upotreba NSAIL (%)	4 (15.4)	6 (25.0)	18 (33.3)
EIM (%)	3 (11.5)	3 (12.5)	8 (14.8)
Pušenje (%)	8 (30.8)	11 (45.8)	21 (38.9)
Porodična anamneza ZBC	6 (23.1)	1 (4.2)	2 (3.7)

Napomena KBi-uzorci tkiva ilealne mukoze KB; KBc-uzorci tkiva kolonične mukoze KB; UK-uzorci tkiva mukoze kolona UK. \*sve penetrantne forme KBi su imale perianalni modifikator, # 2 pacijenta sa KBc su imala perianalnu bolest; BMI-indeks telesne mase; CRP-C-reaktivni protein; NSAIL-nesteroidni antiinflamatorni lekovi; EIM-ekstraintestinalne manifestacije. Fenotip ZBC je klasifikovan prema Montealskoj klasifikacij (sup>a)lokalizacija KB; sup>b)lokalizacija UK; sup>c)forma KB; sup>d)tok UK).

## 4.2 Optimizacija metode za određivanje nivoa ekspresije gena *TLR9*

U cilju validacije metode za kvantifikaciju *TLR9* ekspresije, podaci su analizirani i standardna kriva efikasnosti je bila konstruisana korišćenjem 7500 System SDS softvera v.1.3.1 (Applied Biosystems).

Na Slici 8A prikazane su amplifikacione krive koje odgovaraju razblaženjima cDNK (50, 25, 12.5, 6,25, 3.125 ng) sintetisane iz totalne RNK poreklom iz intestinalne mukoze. Faktor razblaženja je u ovom slučaju bio 2, što znači da krive amplifikacije treba da budu međusobno razmaknute za 1 ciklus (na osnovu formule  $2^n = \text{faktor razblaženja}$ ), što je potvrđeno analizom podataka (Slika 8A).



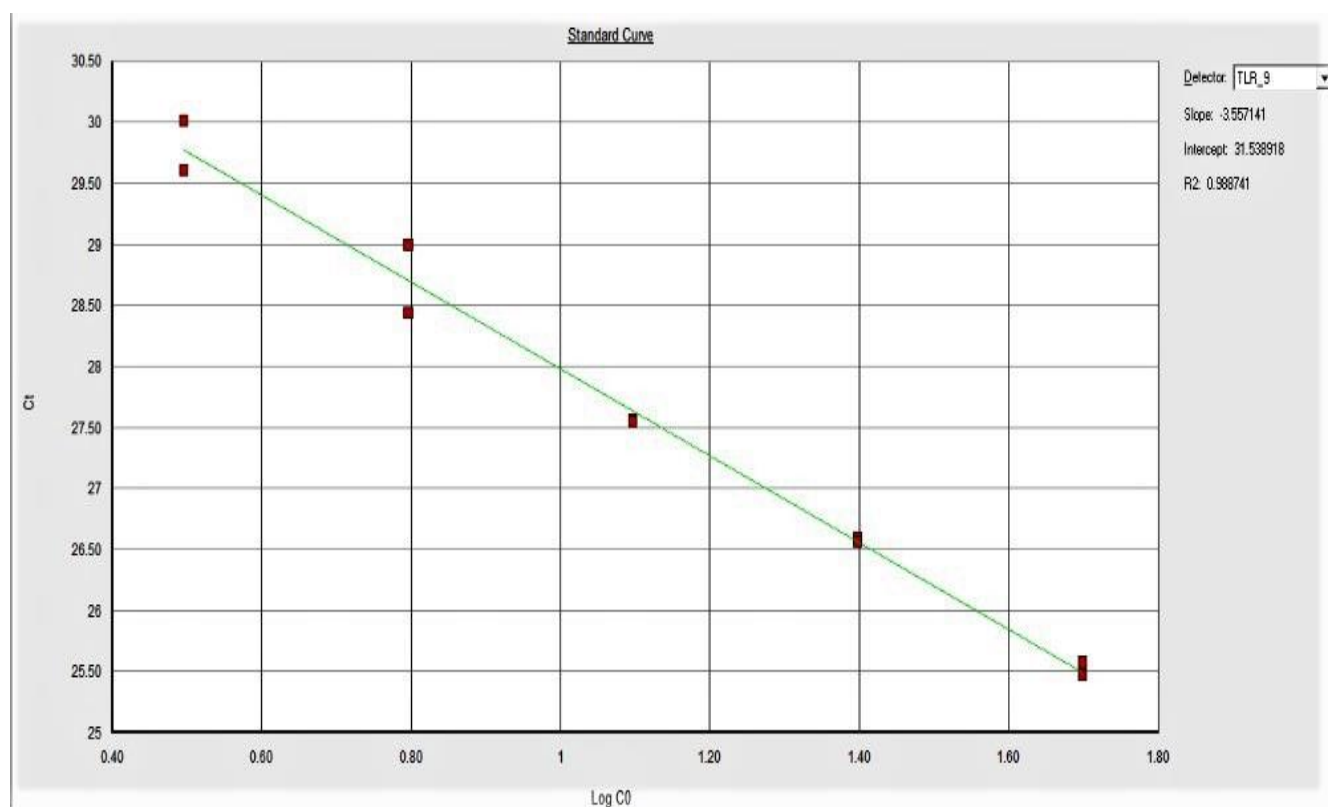
**Slika 8A.** Amplifikaciona kriva validacije za kvantifikaciju *TLR9* ekspresije

Na Slici 8B prikazana je standardna kriva koja opisuje Ct vrednosti u zavisnosti od merenih razblaženja.  $R^2$  vrednost standardne krive iznosila je 0.99, što je optimalna vrednost za krivu efikasnosti. Nagib krive iznosio je -3.5. Efikasnost real-time PCR reakcije se može dalje preračunati:

$$E=10^{-1/-3,55}=1.93$$

$$\% \text{ Efficiency} = (1.93-1) \times 100\%=93\%$$

Parametri standardne krive su bili optimalni, a metoda validirana za dalje korišćenje prilikom merenja genske ekspresije *TLR9* u intestinalnom tkivu poreklom od ZBC pacijenata.



**Slika 8B.** Standardna kriva validacije metode merenja genske ekspresije *TLR9* u intestinalnom tkivu  
ZBC

### **4.3. Ispitivanje nivoa ekspresije ciljanih gena u intestinalnom tkivu pacijenata sa zapaljenskim bolestima creva**

#### **4.3.1 Ispitivanje razlika u nivoima ekspresije gena *IL17A*, *IL17F*, *IL23A*, *TLR9* između inflamacijom zahvaćene i nezahvaćene mukoze intestinuma**

U ovoj studiji analiziran je nivo ekspresije *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* u intestinalnom tkivu pacijenata sa aktivnom ZBC. U toku ileokolonoskopije uzimane su uparene biopsije iz 2 regiona, regiona mukoze zahvaćene inflamacijom (obolela/inflamirana mukoza) i mukoze bez znakova zapaljenja (zdrava/neinflamirana mukoza). Uparene biopsije uzorkovane su sa istog lokaliteta (ileuma ili kolona kod KB i kolona kod UK).

Rezultati su pokazali značajan porast ekspresije *IL17A* i *IL17F* u mukozi koja je zahvaćena inflamacijom u poređenju sa nezahvaćenom, kako u ileumu ( $p = 0.0001$  i  $p = 0.0002$ ) tako i u kolonu ( $p = 0.00004$  i  $p = 0.001$ ) pacijenata sa KB. Nivo ekspresije *IL17A* i *IL17F* je takođe bio značajno viši u oboleloj u odnosu na zdravu mukožu kolona kod pacijenata sa UK ( $p = 0.000001$  i  $p = 0.000005$ ) (Slika 9.).

Značajno viši nivo ekspresije *IL23A* detektovan je u bolesnoj u poređenju sa zdravom ilealnom mukozom pacijenata sa KB ( $p = 0.007$ ). U slučaju mukoze kolona kod pacijanta sa KB, uočena je povišena ekspresija *IL23A* u inflamiranoj u odnosu na neinflamiranu sluznicu, ali bez statistički značajne razlike ( $p = 0.08$ ). Uzorci inflamacijom zahvaćene mukoze kolona kod UK imali su značajno višu ekspresiju *IL23A* u poređenju sa mukozom koja nije bila zahvaćena inflamacijom ( $p = 0.00004$ ) (Slika 9.).

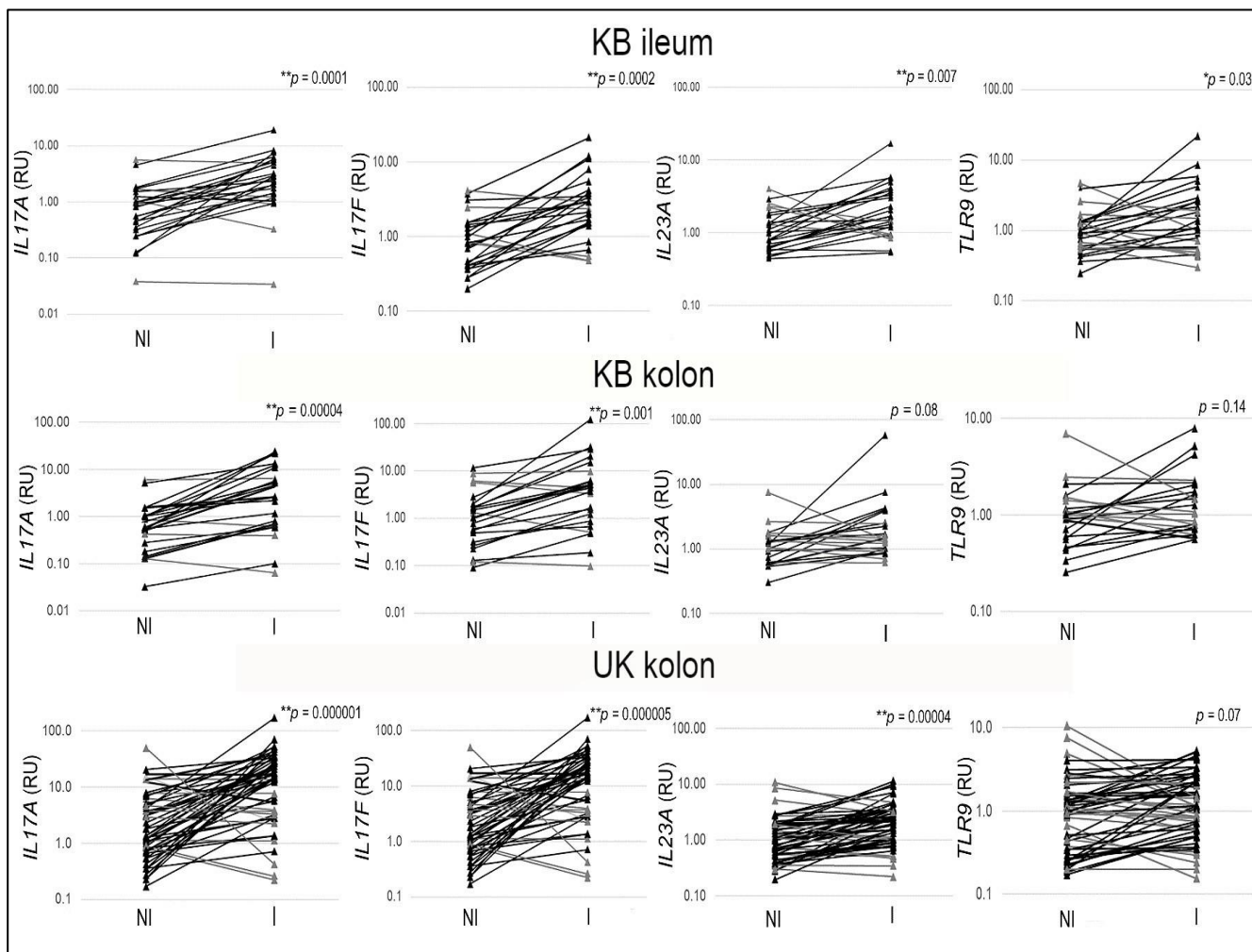
Rezultati su pokazali značajni porast nivoa ekspresije *TLR9* u oboleloj mukozi u odnosu na mukožu koja nije bila zahvaćena zapaljenjem u ileumu pacijenata sa KB ( $p = 0.03$ ), dok u uzorcima

kolona pacijenata sa KB i UK nije uočena razlika između obolele i zdrave sluznice u nivou ovog membranskog receptora (Slika 9).

Navedeni rezultati ukazuju na postojanje diferencijalne ekspresije gena *IL17A* i *IL17F* u mukozi zahvaćenoj inflamacijom u odnosu na mukožu koja nije bila zahvaćena zapaljenskim procesima kod pacijenata sa ZBC. Takođe, može se pretpostaviti da ekspresija gena *IL23A* ima veći značaj za nastanak hronične inflamacije kod UK u odnosu na KB sa dominantno koloničnom lokalizacijom (Slika 9).

U cilju daljeg definisanja inflamatornog profila u mukozi KB i UK, sprovedena je korelaciona analiza ekspresije ispitivanih gena (Tabela 9). Analiza je pokazala pozitivnu korelaciju između nivoa ekspresije gena *IL17A* i *IL17F* ( $rs=0.745$ ,  $p<0.001$  i  $rs=0.813$ ,  $p<0.001$  kod ilealne KB;  $rs=0.923$ ,  $p<0.001$  i  $rs=0.834$ ,  $p<0.001$  kod kolonične KB;  $rs=0.771$ ,  $p<0.001$  i  $rs=0.871$ ,  $p<0.001$  kod UK) kao i između nivoa ekspresije *IL23A* i *TLR9* ( $rs=0.815$ ,  $p<0.001$  i  $rs=0.751$ ,  $p<0.001$  kod ilealne KB;  $rs=0.786$ ,  $p<0.001$  i  $rs=0.820$ ,  $p<0.001$  kod kolonične KB;  $rs=0.686$ ,  $p<0.001$  i  $rs=0.771$ ,  $p<0.001$  kod UK) u svim analiziranim tipovima mukoze ZBC (inflamacijom zahvaćeni i nezahvaćeni uzorci ileuma i kolona kod pacijenata sa KB, kao i uzorci kolona kod pacijenata sa UK). Nivoi ekspresije *IL17A* i *IL17F* su korelisali sa *IL23A* ( $rs=0.370$ ,  $p=0.006$  u svim analiziranim uzorcima;  $rs=0.311$ ,  $p=0.022$  u inflamiranoj sluznici i  $rs=0.332$ ,  $p=0.014$  u neinflamiranoj sluznici) kod UK. Navedeni rezultati sugerišu pozitivnu korelaciju ekspresije *TLR9* i *IL23*, kao sinergiju ekspresije *IL17A* i *IL17F* u patogenezi KB i UK. Pozitivna korelacija između nivoa ekspresije *IL17A* kao i *IL17F* sa nivoom ekspresije *IL23A* kod UK, može ukazivati na direktnu vezu između *TLR9-IL23A-IL17* kod ovog fenotipskog oblika ZBC, dok je kod KB regulacija verovatno kompleksnija i uključuje druge medijatore





**Slika 9.** Relativni nivo ekspresije *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* u uparenim uzorcima bolesne i zdrave intesinalne mukoze kod KB i UK

Napomena za Sliku 9: Nivoi ekspresije gena u mukozi koja nije zahvaćena inflamacijom (NI) i mukozi zahvaćenoj inflamacijom (I) od istog pacijenta povezani su linijom. Razlike između uparenih uzoraka ispitivane su neparametarskim Vilkoksonovim testom ranga. Ekspresija gena izražena je u relativnim jedinicama RU (eng *relative units*) čije su vrednosti dobijene ddCt metodom. Statistički značajne razlike označene su \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

**Tabela 9. Korelaciona analiza genske ekspresije u intestinalnoj mukozi pacijenata sa KB i UK**

		KBi (n = 26)		KBc (n = 24)		UK (n = 54)	
		NI	I	NI	I	NI	I
<b>IL17A</b>	<b>IL17A</b>	ns <sup>†</sup>		rs = 0.657 <sup>†</sup> p < 0.001		ns <sup>†</sup>	
	<b>IL17F</b>	rs = 0.813 p < 0.001	rs = 0.745 p < 0.001	rs = 0.834 p < 0.001	rs = 0.923 p < 0.001	rs = 0.871 p < 0.001	rs = 0.771 p < 0.001
	<b>IL23A</b>	ns	ns	Ns	ns	rs = 0.370 p = 0.006	rs = 0.370 p = 0.006
	<b>TLR9</b>	ns	ns	Ns	ns	ns	Ns
<b>IL17F</b>	<b>IL17F</b>	ns <sup>†</sup>		rs = 0.764 <sup>†</sup> p < 0.001		ns <sup>†</sup>	
	<b>IL23A</b>	ns	ns	Ns	ns	rs = 0.332 p = 0.014	rs = 0.311 p = 0.022
	<b>TLR9</b>	ns	ns	Ns	ns	ns	rs = 0.292 p = 0.032
<b>IL23</b>	<b>IL23A</b>	ns <sup>†</sup>		ns <sup>†</sup>		rs = 0.464 <sup>†</sup> p = 0.0004	
	<b>TLR9</b>	rs = 0.751 p < 0.001	rs = 0.815 p < 0.001	rs = 0.820 p < 0.001	rs = 0.786 p < 0.001	rs = 0.771 p < 0.001	rs = 0.686 p < 0.001
<b>TLR9</b>	<b>TLR9</b>	rs = 0.420 <sup>†</sup> p = 0.03		rs = 0.417 <sup>†</sup> p = 0.04		rs = 0.543 <sup>†</sup> p < 0.001	

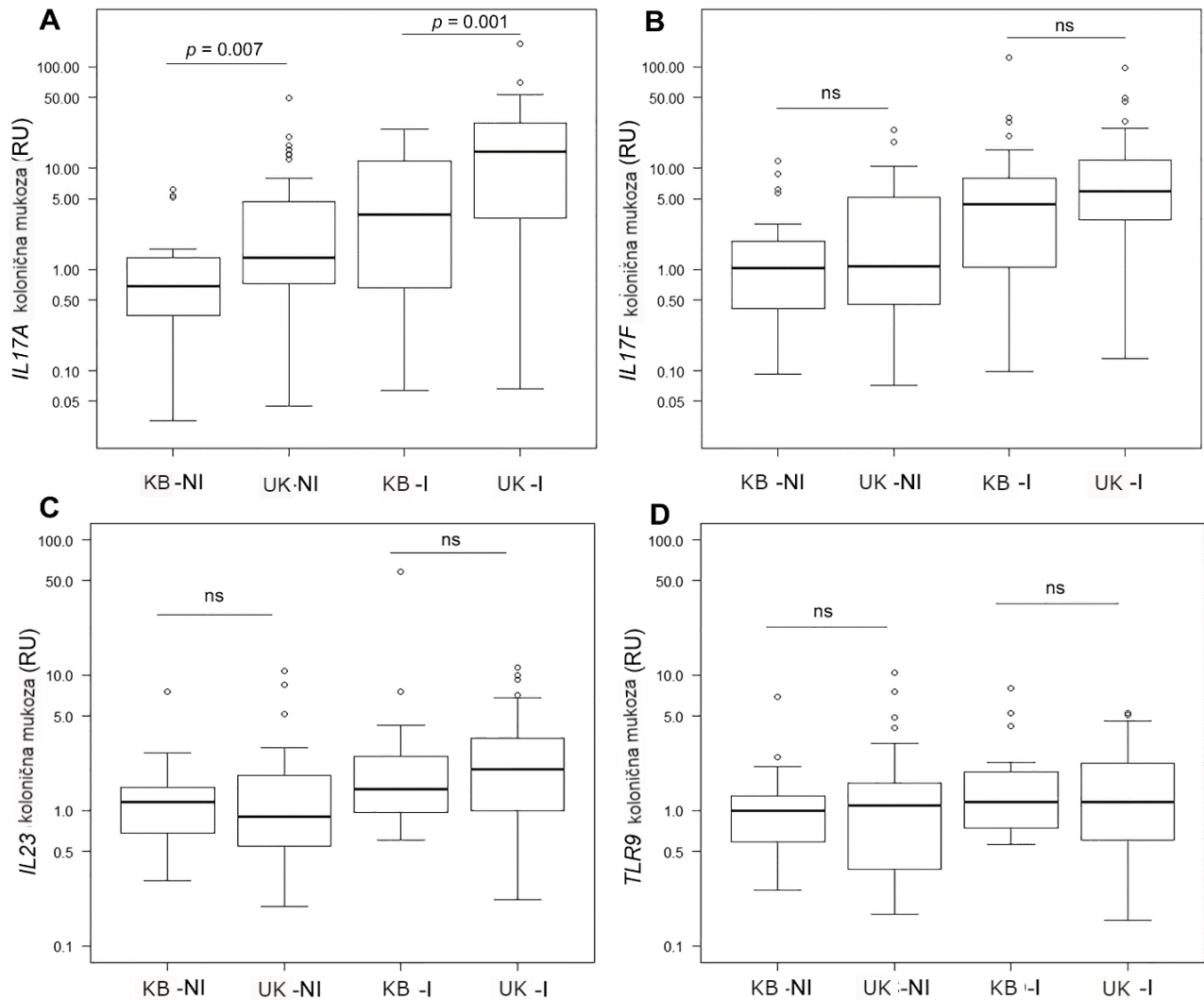
Napomena za Tabelu 9: Stepennost korelacije je određen primenom neparametarskog Spirmanovog testa i prikazan koeficijentom korelacije rho (rs). Statistička značajnost je određena p < 0.05. <sup>†</sup>Nivo ekspresije specifičnog gena koji je korelisao između obolele i zdrave mukoze. KBi – uzorci ilealne mukoze pacijenata sa KB, KBc – uzorci kolonične mukoze pacijanta sa KB, UK – uzorci kolona pacijenata sa UK, NI-mukoza koja nije zahvaćena inflamacijom; I-mukoza zahvaćena inflamacijom.

### **4.3.2 Korelacija nivoa ekspresije gena *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* sa kliničkom i endoskopskom prezentacijom KB i UK**

Lokalizacija tj ekstenzivnost UK i KB je važan faktor koji doprinosi odluci u kliničkoj praksi o terapijskom pristupu kod pacijenata. Zbog toga su ispitivane razlike u profilima ekspresije između kolonične mukoze KB i UK, obzirom da je ove fenotipske entitete nekada teško determinisati (Slika 10). Osim boljeg razumevanja molekularne patogeneze navedenih bolesti, ovaj tip molekularne klasifikacije ZBC bi mogao potencijalno doprineti određivanju precizne dijagnoze i primeni boljih terapijskih algoritama u lečenju KB i UK.

Rezultati ispitivanja su ukazali na povišenu ekspresiju *IL17A* kod pacijenata sa UK, kako u bolesnoj, tako i u zdravoj mukozi kolona u poređenju sa ekspresijom u tkivu kolona kod KB ( $p = 0.007$  između KB i UK u zdravoj mukozi i  $p = 0.001$  između KB i UK u oboleloj mukozi kolona) (Slika 9A).

Nivoi ekspresije *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* se nisu značajno razlikovali između obolele i zdrave mukoze kolona kod KB i UK (Slika 10B, C i D). Međutim, nivoi ekspresije *IL17F* i *IL23A* su bili u proseku viši u bolesnoj mukozi kolona kod UK u poređenju sa KB (UK vs KB redom za *IL17F* 5.91 vs 4.42 i *IL23A* 2.01 vs 1.43). Navedeni rezultati ukazuju na dominantniju ulogu medijatora Th17 imunskog odgovora u procesima hronične inflamacije kod UK u odnosu na KB.



**Slika 10.** Razlike u nivou genskoj ekspresiji između bolesne i zdrave mukoze kolona kod KB (n = 24) i UK (n = 54).

Napomena za Sliku 10. Za ispitivanje razike između navedenih grupa primenjen je neparametarski Man-Vitnijev U test, a kao prag za statistički značajne razlike određena je vrednost  $p < 0.05$ . KB – Kronova bolest, UK – ulcerozni kolitis, ns – nema statističke značajnosti, NI – mukoza koja nije zahvaćena inflamacijom, zdrava mukoza, I – mukoza zahvaćena inflamacijom, bolesna mukoza, RU – relativne jedinice genske ekspresije.

U cilju identifikovanja potencijalno važnih kliničkih biomarkera za KB i UK, ispitivana je korelacija između nivoa genske ekspresije i kliničkih parametara ZBC. Analizirana je korelacija nivoa intesinalne ekspresije *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* sa endoskopskim i kliničkim skrovima aktivnosti za KB (SES-CD i CDAI) i UK (endoskopski i ukupni Mayo skor) a rezultati analize su prikazani u Tabeli 10.

Iako u slučaju KB nije uočena korelacija između nivoa ekspresije analiziranih gena i endoskopskog skora aktivnosti (SES-CD), korelacija je utvrđena sa indeksom kliničke aktivnosti KB (CDAI) kod kolonične lokalizacije. Nivo ekspresije *IL17A* i *IL17F* u zapaljenjem nezahvaćenoj mukozi kolona korelisao je sa CDAI ( $r_s=0.405$ ,  $p=0.049$ ;  $r_s=0.506$ ,  $p=0.012$ ), dok je ekspresioni profil *IL23A* i *TLR9* u inflamiranoj mukozi kolona negativno korelisao sa kliničkom aktivnosti KB ( $r_s= - 0.413$ ,  $p=0.045$ ;  $r_s= - 0.406$ ,  $p=0.049$ ). Navedeni rezultati ukazuju na značaj ekspresije *IL17A* i *IL17F* u neinflamiranoj sluznici na stepen kliničke aktivnosti procenjene kod pacijenta sa KB kolonične lokalizacije. Kod UK, kada je genska ekspresija korelisala sa endoskopskim Mayo skorom, ista je uočena i sa ukupnim Mayo skorom. Naveden rezultat se može objasniti činjenicom da je endoskopski Mayo skor komponenta ukupnog Mayo skora. Kod pacijenata sa UK, pokazana je pozitivna korelacija između nivoa ekspresije *IL17A* u bolesnoj i zdravoj mukozi sa endoskopskim ( $r_s=0.359$ ,  $p=0.008$  i  $r_s=0.405$ ,  $p=0.002$ ) i ukupnim Mayo skorom ( $r_s=0.351$ ,  $p=0.009$  i  $r_s=0.384$ ,  $p=0.004$ ). Endoskopski i ukupni Mayo skor je pozitivno korelisao i sa ekspresije *IL17F* u bolesnoj mukozi kolona pacijenata sa UK ( $r_s=0.327$ ,  $p=0.016$ ;  $r_s=0.290$ ,  $p=0.034$ ). Takođe, nivo ekspresije *IL23A* u bolesnoj mukozi UK je pokazao pozitivnu korelaciju sa vrednostima kliničkog i endoskopskog Mayo skora ( $r_s=0.359$ ,  $p=0.008$ ;  $r_s=0.311$ ,  $p=0.022$ ). Kod ilealnih uzoraka KB, nivo ekspresije analiziranih gena nije korelisao sa vrednostima endoskopskih niti kliničkih skorova aktivnosti bolesti (SES-CD, CDAI). Navedene ispitivane značajne korelacije za KB i UK su okarakterisane kao umerene.

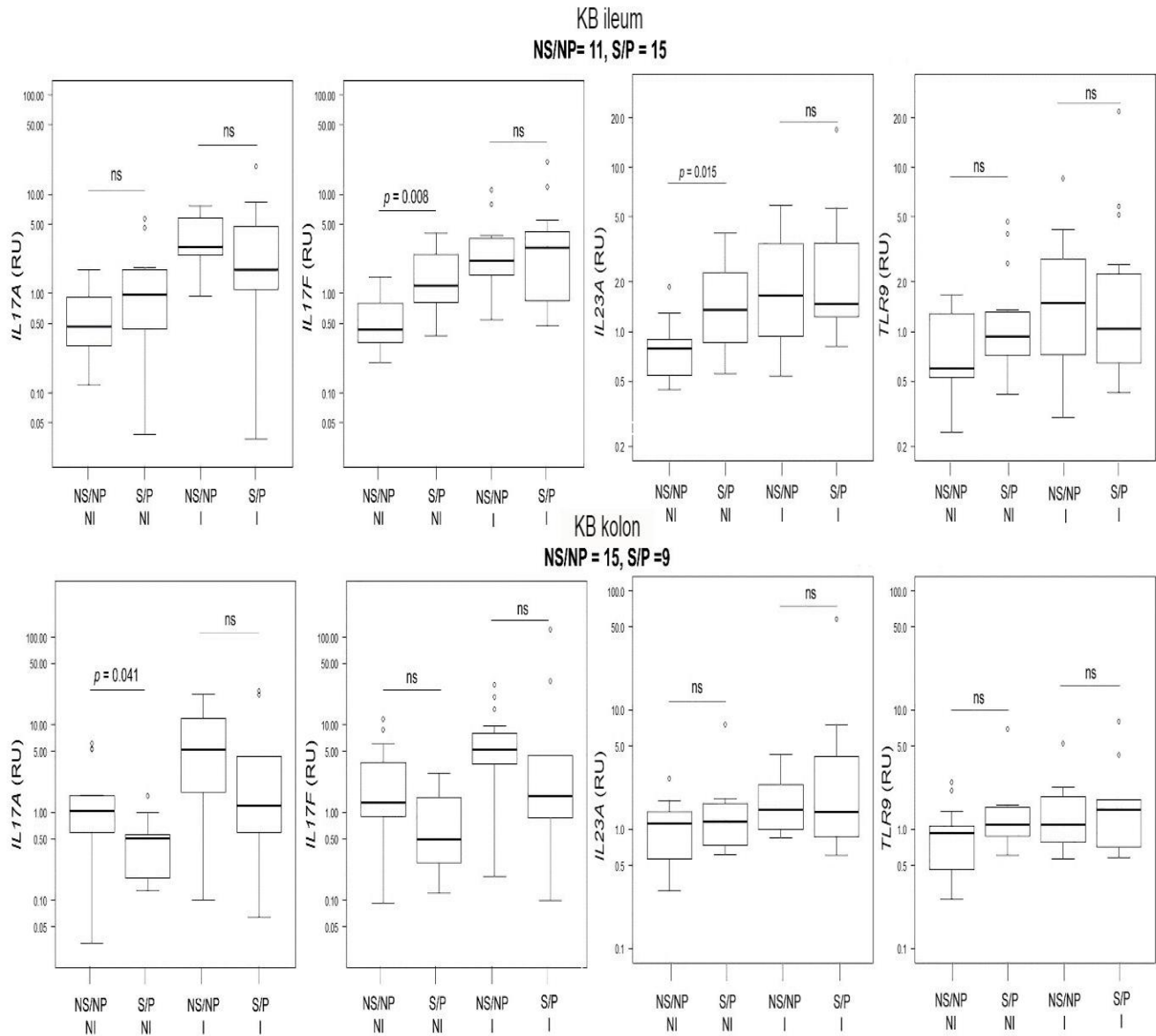
**Tabela 10. Korelacija nivoa intestinalne ekspresije ciljanih gena sa kliničkom i endoskopskom aktivnosti UK i KB.**

			SES-CD* / endoskopski Mayo <sup>#</sup>	CDAI* / ukupni Mayo <sup>#</sup>
<i>IL17A</i>	KBi	Neinflamirana	Ns	ns
		Inflamirana	Ns	ns
	KBc	Neinflamirana	Ns	rs = 0.405 <i>p</i> = 0.049
		Inflamirana	Ns	ns
	UK	Neinflamirana	rs = 0.405 <i>p</i> = 0.002	rs = 0.384 <i>p</i> = 0.004
		Inflamirana	rs = 0.359 <i>p</i> = 0.008	rs = 0.351 <i>p</i> = 0.009
<i>IL17F</i>	KBi	Neinflamirana	Ns	ns
		Inflamirana	Ns	ns
	KBc	Neinflamirana	Ns	rs = 0.506 <i>p</i> = 0.012
		Inflamirana	Ns	ns
	UK	Neinflamirana	rs = 0.327 <i>p</i> = 0.016	rs = 0.290 <i>p</i> = 0.034
		Inflamirana	Ns	ns
<i>IL23A</i>	KBi	Neinflamirana	Ns	ns
		Inflamirana	Ns	ns
	KBc	Neinflamirana	Ns	ns
		Inflamirana	Ns	rs = - 0.413 <i>p</i> = 0.045
	UK	Neinflamirana	Ns	ns
		Inflamirana	rs = 0.359 <i>p</i> = 0.008	rs = 0.311 <i>p</i> = 0.022
<i>TLR9</i>	KBi	Neinflamirana	Ns	ns
		Inflamirana	Ns	ns
	KBc	Neinflamirana	Ns	ns
		Inflamirana	Ns	rs = - 0.406 <i>p</i> = 0.049
	UK	Neinflamirana	Ns	ns
		Inflamirana	Ns	ns

\* SES-CD (Pojednostavljen endoskopski skor za Kronovu bolest) i CDAI (Indeks aktivnosti Kronove bolesti) – klinički skorovi procene aktivnosti KB, <sup>#</sup> Endoskopski i ukupni Mayo skor – klinički skorovi za procenu aktivnosti UK. ns –nema statističke značajnosti, rs = Spirmanov rho koeficijent korelacije. KBi –ilealna mukoza pacijenata sa KB; KBc – mukoza kolona pacijenata sa KB, UK – mukoza kolona pacijenata sa UK.

Da bi se ispitalo da li je nivo ekspresije selektovanih gena udružen sa težim fenotipom ZBC, poređen je nivo genske ekspresije između pacijenta sa nestenozantnom-nepenetrantnom (NS/NP) inflamatornom formom bolesti i stenozantnom ili penetrantnom formom (S/P) KB. U slučaju UK, analizirana je veza između nivoa ekspresije gena sa blagom i umereno/teškom formom bolesti.

Značajno viši nivoi ekspresije *IL17F* i *IL23A* su detektovani u zdravoj ilealnoj mukozi KB pacijenata sa S/P formom bolesti u poređenju sa pacijentima sa NS/NP formom ( $p = 0.008$  i  $p = 0.015$ ). U zdravoj mukozi kolona kod KB nivo ekspresije *IL17A* je bio značajno niži kod S/P u poređenju sa NS/NP formom ( $p = 0.041$ ). Generalno, u mukozi kolona KB prosečne vrednosti nivoa ekspresije *IL17A* i *IL17F* su bile niže u S/P formi bolesti u poređenju sa NS/NP, kako u zdravoj tako i u bolesnoj mukozi. Razlike u nivou ekspresije *TLR9* između analiziranih fenotipova KB nisu uočene (Slika 11).



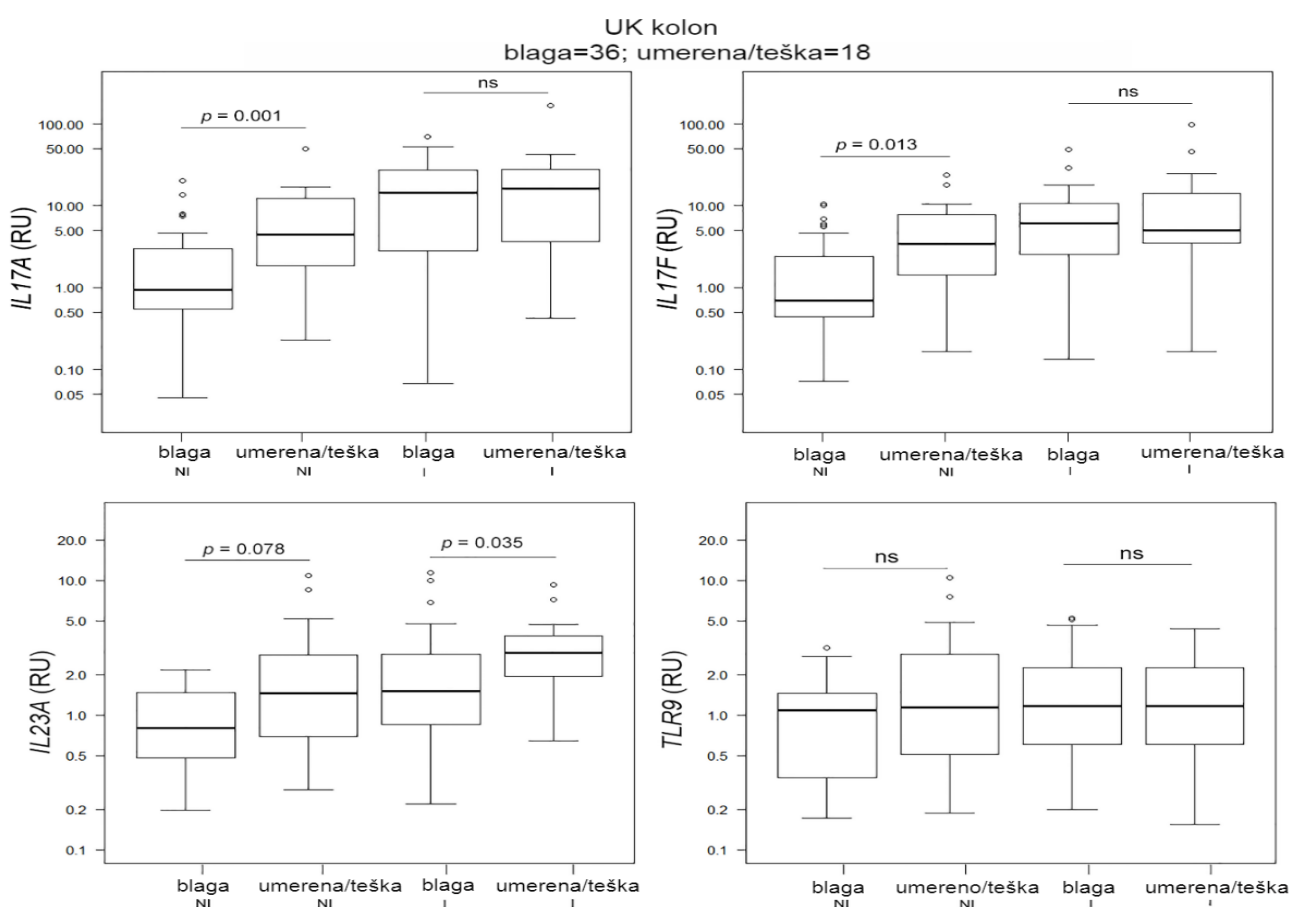
**Slika 11.** Nivo ekspresije selektovanih gena u mukozi intestinuma sa KB

nestenzozantnog/nepenterantnog (NS/NP) fenotipa i stenozantne/penetrantne (S/P) bolesti.

Napomena za Sliku 11. Za analizu razlika između NS/NP i S/P grupe korišćen je Man-Vitnijev U test, a vrednosti  $p < 0.05$  su smatrane statistički značajne. ns –nema statističke značajnosti NS/NP-nestrikurirajuća/nepenetrirajuća forma, S/P strikturirajuća/ penetrirajuća forma, NI-neinflamirana sluznica, I –inflamirana sluznica; RU-relativne jedinice genske ekspresije.



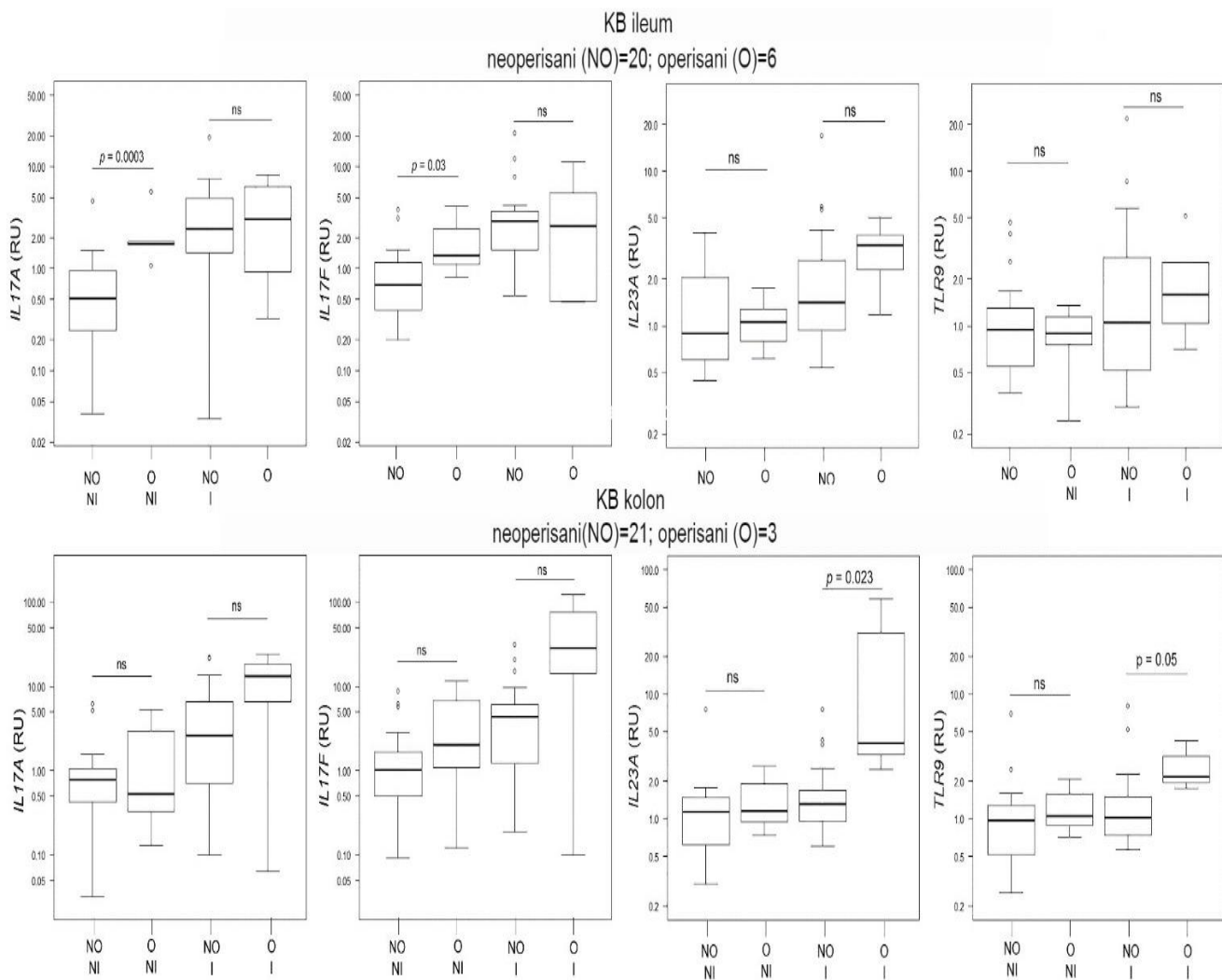
Kod pacijenata sa UK, pokazani su značajno viši nivoi ekspresije *IL17A* i *IL17F* kod umerene i teške forme u poređenju sa blažom formom bolesti, ali samo u mukozi kolona nezahvaćenoj inflamacijom ( $p = 0.001$  i  $p = 0.013$ ). Takođe, kod pacijenata sa umerenom i teškom formom UK uočen je viši nivo ekspresije *IL23A* u zdravoj i bolesnoj mukozi kolona u poređenju sa blagom formom bolesti ( $p = 0.078$  i  $p = 0.035$ ). Nivo ekspresije *TLR9* se nije razlikovao između umerene/teške i blage forme UK (Slika 12)



**Slika 12.** Nivoi ekspresije seletovanih gena u mukozi kolona kod blage i umerene/teške forme UK.

Napomena za Sliku 12. Za analizu razika u nivoima ekspresije ispitivanih gena između grupa sa blagom i umerenom/teškom formom UK korišćen je Man-Vitnijev U test, vrednosti  $p < 0.05$  su smatrane statistički značajne. NI- neinflamirana sluznica; I-inflamirana sluznica; RU-relativne jedinice ekspresije

U daljoj analizi, ispitivane su razlike u genskoj ekspresiji između pacijenata sa KB koji nisu bili operisani i koji su operisani na dijagnozi (Slika 13). Pacijenti operisani na dijagnozi su imali komplikovaniji klinički tok, te je bilo interesantno porediti ekspresione profile i identifikovati potencijalni molekularni marker težeg toka KB. Detektovani su značajno viši nivoi ekspresije *IL17A* i *IL17F* u ilealnoj zdravoj mukozi operisanih pacijenata u poređenju sa pacijentima koji nisu imali indikaciju za hiruškim lečenjem ( $p = 0.0003$  i  $p = 0.03$ ). U uzorcima kolona kod KB, nivoi ekspresije *IL23* i *TLR9* su bili značajno viši u bolesnoj mukozi pacijenata operisanih na dijagnozi u poređenju sa pacijentima koji nisu operativno lečeni ( $p = 0.023$  i  $p = 0.05$ ). Rezultati su ukazali da ekspresija *IL17A* i *IL17F* u zdravoj ilealnoj mukozi KB može uticati na dalji tok bolesti i ukazali na potencijalni prognostički značaj ekspresionog profila neinflamirane sluznice.

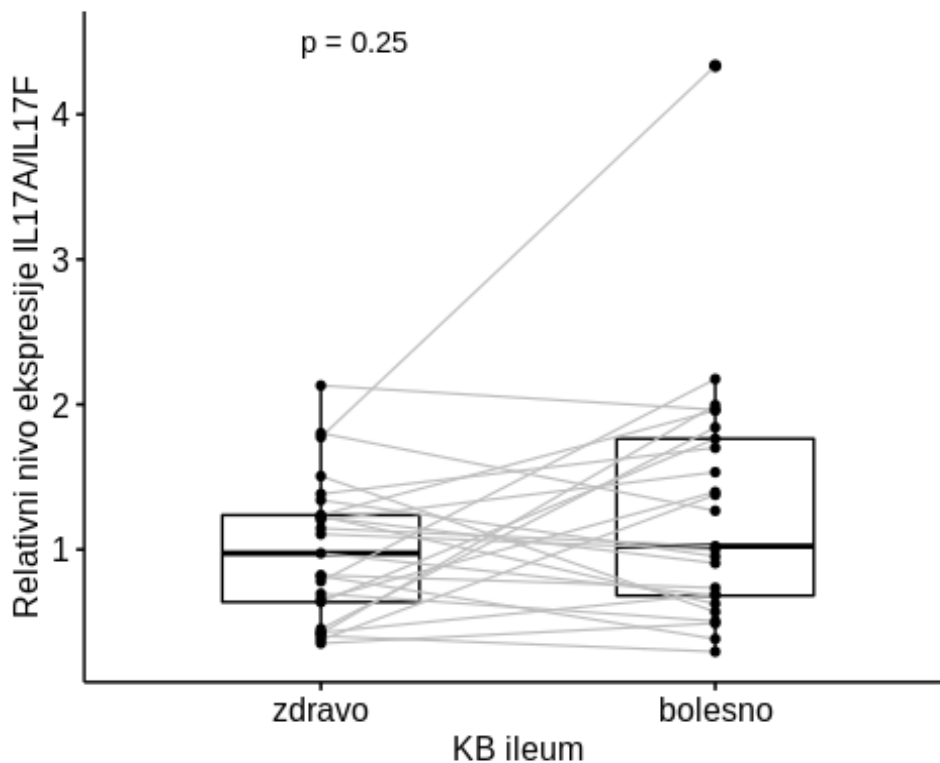


**Slika 13.** Nivoi intestinalne ekspresije ispitivanih gena kod operisanih i neoperisanih pacijenata sa KB

Napomena za Sliku 13. Za analizu razlike između neopersane i operisane grupe KB pacijenta korišćen je Man-Vitnijev U test, statistička značajnost je podrazumevala vrednosti  $p < 0.05$ . NO-neoperisani; O-operisani; NI-neinflamirana sluznica; I-infamirana sluznica; RU-relativne jedinice ekspresije

### 4.3.3. Određivanje međusobnog odnosa ekspresije gena *IL17A* i *IL17F* u zapaljenjem zahvaćenom i nezahvaćenom mukozi intestinuma kod pacijenata sa endoskopski aktivnom KB i UK

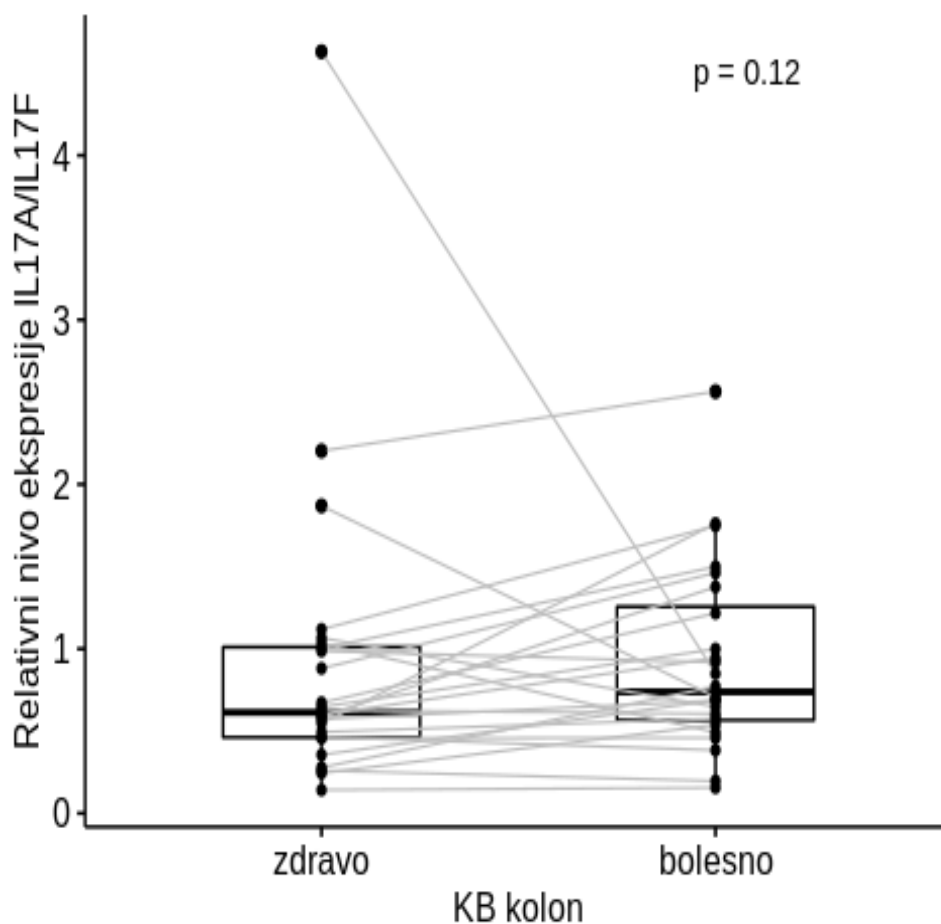
Međuobni odnos ekspresije *IL17A/IL17F* u inflamiranoj i neinflamiranoj mukozi intestinuma kod ZBC određen je primenom uparenog Vilkoksonovog testa. Vrednost medijane i IQR relativnog odnosa ekspresije *IL17A/IL17F* u zdravom tkivu ileuma je iznosila 0.9738267 (IQR 0.6376057- 1.2375691), a u inflamiranoj sluznici 1.022901 (IQR 0.6821053-1.7638037). Nije registrovana statistička značajnost u odnosu ekspresije *IL17A/IL17F* između inflamirane i neinflamirane sluznice ileuma u KB ( $p=0.25$ ).



**Slika 14.** Odnos ekspresije *IL17A/IL17F* između zdravog i bolesnog tkiva ileuma kod KB

Napomena za Sliku 14: Za analizu odnosa ekspresije *IL17A/IL17F* između zdravog i bolesnog tkiva intestinuma korišćen je uparen Vilkoksonov test, vrednosti  $p < 0.05$  su smatrane statistički značajne.

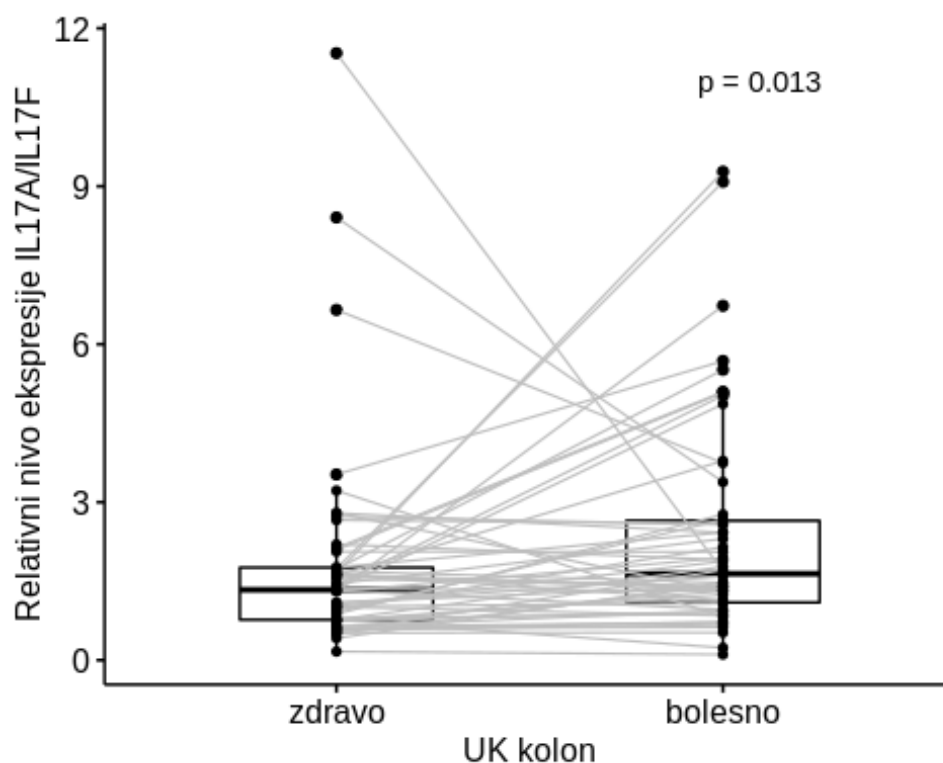
Na Slici 15. prikazan je odnos ekspresije *IL17A/IL17F* između neinflamirane i inflamirane mukoze kolona kod KB. Vrednost medijane i IQR relativnog odnosa ispitivane ekspresije u zdravoj mukozi kolona je bila 0.6130286 (0.4611038-1.0103285), dok je u inflamiranoj sluznici kolona vrednost iznosila 0.7381966 (0.5660588-1.2561075). Nije uočena statistička značajnost u odnosu ekspresije *IL17A/IL17F* između inflamirane i neinflamirane sluznice kod kolonične lokalizacije KB ( $p=0.12$ )



**Slika 15.** Odnos ekspresije *IL17A/IL17F* između zdravog i bolesnog tkiva kolona kod KB

Napomena za Sliku 15: Za analizu odnosa ekspresije *IL17A/IL17F* između zdravog i bolesnog tkiva intestinuma korišćen je uparen Vilkoksonov test, vrednosti  $p < 0.05$  su smatrane statistički značajne.

Kod pacijenata sa UK, uočena je statistička značajnost u odnosu ekspresije *IL17A/IL17F* između neinflamirane i inflamirane mukoze kolona ( $p=0.013$ ) (Slika 16) Medijana i IQR relativnog odnosa ekspresije *IL17A/IL17F* u zdravom tkivu kolona iznosila je 1.335367 (0.7678976-1.7582428), dok je u inflamiranoj mukozi kolona kod UK bila 1.640522 (1.095009-2.648934)



**Slika 16.** Odnos ekspresije *IL17A/IL17F* između zdravog i bolesnog tkiva kolona kod UK

Napomena za Sliku 16. Za analizu odnosa ekspresije *IL17A/IL17F* između zdravog i bolesnog tkiva intestinumuma korišćen je uparen Vilkoksonov test, vrednosti  $p < 0.05$  su smatrane statistički značajne.

## **5. DISKUSIJA**

---

Novija istraživanja imunopatogeneze ZBC ukazala su na ulogu Th 17 ćelija, subpopulacije CD4+ T limfocita, u nastanku hronične intestinalne inflamacije [149-151, 265]. Načelno, razvoj ZBC je posledica poremećaja funkcije epitelne barijere i permeabilnosti intestinuma udružen sa porastom bakterijske translokacije [46, 135]. Kao odgovor na invaziju mikrobima, specijalizovani detektori bakterijskih antigena, kao što su receptori iz familije NOD i TLR, indukuju aktivaciju specifičnih efektorskih citokina, koji u kaskadi događaja promovišu porast proinflamatornih medijatora kao što je IL-17 [217, 235]. Međutim, nedovoljno je razjašnjeno kako su ovi mehanizmi regulisani kod ZBC i koji proinflamatorni medijatori doprinose nastanku određene lokalizacije i tipu bolesti. Distinkcija KB od UK je u aproksimativno 10-20% slučajeva otežana zbog prisutnih preklapajućih karakteristika, što utiče na efikasnost primenjene terapije i dalji algoritam lečenja [266]. Stoga, važno je definisati specifične molekularne profile koji karakterišu različite fenotipove ZBC. Naučni doprinos ove studije ogleda se u određivanju ekspresionih profila gena za koje se smatra da učestvuju u nastanku ZBC (*IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9*) u cilju identifikacije specifičnih molekularnih markera za pojedinačne fenotipske forme i teži klinički tok ovih bolesti. Identifikacija biomarkera specifičnih za određene podtipove ZBC značajno bi doprinela personalizaciji terapije i primeni efikasnijih terapijskih algoritama u lečenju. Takođe, predviđanje kliničkog toka na osnovu pouzdanih markera moglo bi da spreči razvijanje težih formi ZBC i selektuje pacijente koji su pod većim rizikom, kao kandidate za terapijske protokole koji bi smanjili šansu za pojavu komplikacija kao što su stenoze i fibroze.

U ovom istraživanju analizirani su profili iRNK u uparenim uzorcima inflamacijom zahvaćene i nezahvaćene mukoze ileuma i kolona kod KB, kao i kolona kod UK, za gene udružene sa Th17 inflamatornom kaskadom, *IL23A*, *IL17A* i *IL17F* i *TLR9*. Rezultati su ukazali na povišen nivo ekspresije *IL17A* i *IL17F* u bolesnoj mukozi svih analiziranih fenotipova ZBC, ukazujući na značaj Th17 efektorskih ćelija u nastanku KB i UK što je i u saglasnosti sa drugim podacima iz literature [214, 267-



269]. I pored rezultata koji ukazuju na njihov značaj, uloga citokina IL-17 u inflamaciji ZBC je i dalje nedovoljno razjašnjena. Th17 ćelije imaju heterogenu funkciju i njihova uloga može obuhvatati regulaciju kako proinflamatornog tako i antiinflamatornog procesa. Postoje indikacije da IL-17 pored neregulirane inflamacije može doprineti i anti-zapaljenskim procesima u intestinumu [270, 271]. Neravnoteža između IL-17A i IL-17F može imati važnu ulogu u imunopatogenezi ZBC. Studije su ukazale na potencijalno protektivni efekat IL-17A i patogenu ulogu IL-17F u eksperimentalnim studijama DSS indukovano kolitisa na knockout miševima deficitarnih za IL-17 ili IL-17F, kao i značaj IL-17A u modulaciji Th1 polarizacije *in vitro* na CD45RBhi transfer modelu kolitisa [233, 234]. Tokom proučavanja eksperimentalnog kolitisa kod miševa deficitarnih za IL-17A, IL-17F ili oba citokina, Tang i saradnici ukazali su na protektivnu ulogu IL-17A koja je dovedena u vezu sa porastom frekvencije intestinalnih regulatornih T ćelija kao posledice kolonizacije bakterija *Clostridium klastera XIVa* i *Lactobacillus murinis* [272]. IL-17F je uticao na promociju antimikrobnih peptida koji su inhibirali navedene sojeve bakterija i time doprinosili nastanku kolitisa. Težina kliničke slike i tok kolitisa suprimiran je nakon ordiniranja terapije anti-IL-17F antitelima [272]. Naši rezultati potvrđuju postavljenu hipotezu, obzirom da smo pokazali povišen nivo ekspresije *IL17A* i *IL17F* u bolesnoj mukozni ileuma i kolona kod KB i UK. Takođe, detektovali smo i pozitivnu korelaciju nivoa ekspresije *IL17A* i *IL17F* što ukazuje na njihovu udruženu regulaciju transkripcije u ZBC. Navedena korelacija se može objasniti i postojanjem IL-17A/F heterodimera [218, 270, 273]. *IL17A* i *IL17F* gen su locirani na istom hromozomskom lokusu u humanoju populaciji i kod miševa, te je njihova transkripcija najverovatnije koordinisana, ali novije studije sugerišu da ekspresija navedenih gena može biti različito regulisana u zavisnosti od proinflamatornog okruženja osnovne bolesti [274]. Kao potencijalni modulatori sekrecije IL-17 od strane Th17 ćelija identifikovani su prostaglandin E2 (PGE2), IL-23 i IL-1 $\beta$  [274]. Pokazano je da *IL17A* i *IL17F* imaju različitu epigenetičku strukturu, a njihova transkripcija uslovljena je različitim histonskim modifikacijama. Prema sprovedenom istraživanju, PGE2, IL-23 i IL-1 $\beta$  objedinjeno regulišu

ekspresiju Th17 medijatora, promovišu IL-17A, ali ne i IL-17F imuni odgovor. Zajednički efekat citokina IL-23 i IL-1 $\beta$  dovodi do indukcije ekspresije IL-17F [274]. Rezultati nekih studija ukazuju na veći proinflamatorni uticaj IL-17A u odnosu na IL-17F i heterodimer IL17-A/F [267, 271, 273, 275]. Ekspresioni profili *IL17* gena su varirirali u zavisnosti od tipa ZBC i lokalizacije iste. Ekspresija *IL17F* je bila značajno povišena u koloničnoj oboleloj mukozi u poređenju sa zdravom kod KB, ali ne i kod UK [232]. Takođe, Nemeth i saradnici su detektovali povišenu ekspresiju *IL17* u bolesnoj sluznici kod KB, dok je ista izostala kod UK, ukazujući na veći značaj Th17 imunog odgovora u nastanku KB [276]. Međutim, naši rezultati kod UK su ukazali na značajno viši nivo ekspresije *IL17A* u oboleloj mukozi, kao i značajno viši nivo u odnosu ekspresije *IL17A/IL17F* između bolesne i zdrave sluznice intestinuma.

Nasuprot *IL17A* i *IL17F*, ekspresioni profili *IL23A* i *TLR9* nisu bili podjednako izraženi u ispitivanim fenotipskim podtipovima ZBC u prikazanoj studiji. Obolela ilealna sluznica kod KB je ukazala na značajan porast nivoa ekspresije *TLR9* u poređenju sa zdravom mukozom, ali navedeno nije uočeno kod kolonične lokalizacije. Bez obzira na odsustvo značajnosti, obolela mukoza kolona imala je viši nivo ekspresije *IL23A* u odnosu na zdravu kod KB. Sa druge strane, pacijenti sa UK su imali značajno povišen nivo ekspresije *IL23A* u sluznici zahvaćenoj inflamacijom u odnosu na zdravu mukozu, dok se ekspresija *TLR9* nije značajno razlikovala. Izrazito povišena ekspresija *TLR9* u oboleloj sluznici ileuma može biti udružena sa postojanjem Panetovih ćelija koje ekspimiraju TLR9 [277]. Pokazano je da bakterijski oligonukleotidi koji sadrže CpG sekvence mogu dovesti do degranulacije Panetovih ćelija i daljeg otpuštanja različitih antimikrobnih molekula. Aktivacija receptora TLR9 dovodi do predominantne sekrecije citokina Th1 imunskog odgovora [277]. Na intraćelijskom endozomu TLR9 imaju ulogu u prepoznavanju CpG sekvenci bakterijske DNK [235, 278, 279]. U nekoliko eksperimentalnih modela kolitisa, aktivacija TLR9 je doprinela prevenciji mukozne inflamacije i zaceljenju sluznice [280, 281]. Rezultati *in vitro* studija ukazali su na značaj TLR9 signalnog puta u

prepoznavanju patogenih bakterija i posledičnom intestinalnom oštećenju preko citokina Th1 imunskog odgovora kao što su IL-6, IL-10, IL-12 i TNF- $\alpha$  [240, 245, 282]. Povišen nivo ekspresije *TLR9* u ZBC je asociran sa postojanjem polimorfne sekvence u promotoru *TLR9* pacijenata, neutrofilnim infiltratom u obolelom intestinumu i disbiozom kod UK [235, 248]. Nekoliko studija je pokazalo povišen nivo *TLR9* iRNK u mukozi zahvaćenoj inflamacijom kod UK, međutim ekspresioni profili su bili bazirani na poređenju zdravih individua i bolesne mukoze u UK, dok su u ovom istraživanju analizirani upareni uzorci zdrave i bolesne mukoze pacijenata [249, 250]. Jedna studija je pokazala da je ekspresioni profil *TLR9* bio povišen u mukozi kolona aktivnog UK u poređenju sa pacijentima koji su bili u remisivnoj fazi [249]. Međutim, neke studije nisu ustanovile značajnu razliku u nivou ekspresije *TLR9* iRNK između mukoze kolona kod UK i zdravih kontrola, kao i u slučaju UK i KB u aktivnoj i remisivnoj fazi [283, 284]. Ipak, podaci o ulozi receptora *TLR9* u ZBC su oskudni i neophodna su dalja istraživanja.

Iako je ekspresioni profil *IL23A* i *TLR9* bio specifičan za fenotipske podtipove ZBC, jaka pozitivna korelacija navedenih gena je detektovana u svim analiziranim uzorcima intestinuma. Na osnovu dobijenih rezultata i postojeće literature, verovatno je postojanje pozitivne sprege tool-like receptora (TLR) u indukciji IL23/Th17 signalizacije, iako ona nije u potpunosti razjašnjena [285-287]. Studija na dendritskim ćelijama eksperimentalnih miševa ukazala je na *TLR9*-zavistan IL-23/IL-17 imunski odgovor u toku granulomatozne infekcije u plućima i aktivaciju ekspresije *IL23A* nakon stimulacije *TLR9* antigenom preko NF- $\kappa$ B signalnog puta [288]. Međutim, potrebno je istaći da Th17 ćelijski odgovor može biti pokrenut nezavisno od TLR aktivacije [289, 290]. U našoj studiji, nivo ekspresije *TLR9* nije korelisao sa nivoima *IL17A* i *IL17F*, osim u oboleloj mukozi kolona kod pacijenata sa UK, što ukazuje na različitu regulaciju Th17 ćelijskog odgovora kod UK u odnosu na KB.

Značajno viši nivo ekspresije *IL17A* detektovan je kako u inflamacijom zahvaćenoj tako i nezahvaćenoj mukozi pacijenata sa UK u odnosu na KB, dok su u proseku više vrednosti nivoa

ekspresije *IL23A* i *IL17F* identifikovane u oboleloj mukozi UK, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija [214, 269]. Zanimljivo je da su Granlund i saradnici u meta-analizi transkriptoma pokazali da je ekspresija gena asociranih sa Th1 i Th17 ćelijskim odgovorom vrlo slična između KB i UK, osim nivoa ekspresije *IL23A* koja je bila značajno viša u UK u poređenju sa mukozom KB [212]. Takođe, Kobayashi i saradnici su sugerisali da IL-23 može usmeravati produkciju različitih citokina kod UK i KB, uključujući Th17 imunski odgovor značajan za patogenezu UK, kao i Th1/Th17 koji je dominantan u nastanku KB [214]. Rezultati naše studije su u saglasnosti sa navedenom hipotezom.

Jedan od ciljeva naše studije je bio da ispitamo značaj nivoa analiziranih iRNK kao potencijalnih markera toka bolesti i fenotipskih podtipova. U uzorcima kolona pacijenata sa KB, nivo ekspresije *IL17A* i *IL17F* u inflamacijom nezahvaćenju mukozi pozitivno je korelisao sa vrednostima indeksa kliničke aktivnosti CDAI. Međutim, nivo ekspresije *IL23A* i *TLR9* u oboleloj mukozi kolona negativno je korelisao sa CDAI. Nasuprot kliničkoj aktivnosti, kod pacijenata sa KB nije detektovana korelacija nivoa iRNK analiziranih gena sa indeksima za endoskopsku aktivnost bolesti. Navedeni rezultati su u saglasnosti sa podacima iz literature koji ukazuju na slabu korelaciju endoskopske aktivnosti KB sa CDAI [291]. U grupi pacijenata sa UK, nivoi ekspresije *IL17A* i *IL17F* u zdravju mukozi, kao i *IL17A* i *IL23A* u oboleloj mukozi pozitivno su korelisali sa endoskopskim i ukupnim Mayo skorom. Roman i saradnici su analizom transkriptoma identifikovali brojne transkripte u mukozi pacijenata sa UK koji su korelisali sa ukupnim Mayo skorom, uključujući iRNK *IL17A* i *IL23A*, što je pokazano i u našem istraživanju [292]. Takođe, Olsen i saradnici su ukazali na pozitivnu korelaciju nivoa ekspresije *IL17A* i *IL23A* u infamiranoj mukozi sa indeksom kliničke i endoskopske aktivnosti kod UK, a u slučaju KB sa vrednostima CDAI [269]. Treba uzeti u obzir da su se u studijama koje su ispitivale ZBC često koristili različiti endoskopski skorovi za procenu aktivnosti, što možda može objasniti varijabilne rezultate nađene u literaturi. Na primer, u studiji Schmidt i saradnika identifikovana je pozitivna korelacija između

nivoa ekspresije *IL23A* i Rutgeert skora, koji se koristi za procenu endoskopske aktivnosti kod KB [293]. Iboshi i saradnici nisu pokazali povezanost između težine UK i ekspresije iRNK *IL17A* i *IL17F* u oboleloj mukozi kolona, ali su zato našli da povišen odnos IL-17A/IL-17F pozitivno koreliše sa Rachmilewitz skorom endoskopske aktivnosti [267, 294]. U našoj studiji nije nađena korelacija između skorova aktivnosti UK i intestinalne ekspresije *TLR9* iRNA. Međutim, neke studije su pokazale pozitivnu korelaciju između ekspresije *TLR9* i stepena endoskopske i histološke aktivnosti bolesti [248, 249].

Analizirajući kliniču težinu ZBC, identifikovali smo značajno više nivoe intestinalne ekspresije *IL17F* i *IL23A* u zdravoj mukozi ileuma kod KB sa strikturirajućim/penetrirajućim (S/P) u poređenju sa nestrukturirajućim/nepenetrirajućim (NS/NP) fenotipom. S druge strane, zdrava mukoza kolona kod S/P forme je imala značajno niže nivoe ekspresije *IL17A* u poređenju sa inflamatornom formom (NS/NP) bolesti. Kerami i saradnici su ukazali na IL-17 kao modulatora intestinalne fibroze, čija povišena ekspresija kod KB indukuje ekspresiju proinflamatornog hemokina CXCL1 i transkripcionog faktora NFkBIZ kod intestinalnih fibroblasta [295]. Transkripcioni faktor NFkBIZ je predstavnik NFkB familije proteina koji je značajno eksprimiran u Th17 ćelijama, dok hemokin CXCL1 simuliše aktivaciju neutrofila i inflamatorni odgovor. Izolacijom intestinalnih fibroblasta poreklom od pacijenata sa KB, detektovana je značajno viša ekspresija IL-17 receptora na ovim ćelijama [295]. Iako detaljan patofiziološki mehanizam nastanka fibroznih stenoza u KB nije u potpunosti razjašnjen, treba imati u vidu mali uzorak studije Kerami i saradnika.

Rezultati ove studije su pokazali da kod UK postoji značajno viši nivo ekspresije *IL17A* i *IL17F* kod pacijenata sa umerenom i teškom u poređenju sa blagom formom bolesti, ali samo na nivou mukoze kolona koja nije zahvaćena inflamacijom. Verma R. i saradnici su opisali povišenu ekspresiju *IL17A* u mukozi kolona umerene i teške aktivnosti UK, u poređenju sa pacijentima u remisiji i zdravim kontrolama [296]. Povišen nivo iRNA *IL17A* je detektovan u oboleloj sluznici kolona kod umerenog i

teškog UK [297]. Jedna studija je pokazala prediktivni značaj nivoa IL-17A za klinički tok UK, tačnije serološke vrednosti IL-17A su značajno korelisale sa težinom bolesti. U istoj studiji je nivo ekspresije *IL17A* u oboleloj mukozi bio povišen, ali je korelacija sa težinom UK izostala [298]. Naši rezultati su pokazali viši nivo intestinalne ekspresije *IL23A* u oboleloj i zdravoj mukozi kolona kod pacijenata sa umerenom i teškom formom UK u odnosu na blagu formu. Ovo se može objasniti ulogom IL-23 u regulisanju intestinalne inflamacije, od redukcije Treg ćelijske aktivnosti do indukcije ekspresije drugih Th17 proinflamatornih citokina [299].

Operativno lečenje kod ZBC je indikovano u slučaju agresivnog toka osnovne bolesti, intestinalne opstrukcije kao posledice pojave striktura na terenu hronične inflamacije i fibroze intestinuma, obilnog krvarenja, perforacije intestinuma, pojave fistula i abscesa, toksičnog megakolona ili kolorektalnog karcinoma [300]. Rezultati ove studije ukazali su na udruženost operativnog lečenja i povišenog nivoa ekspresije *IL17A* i *IL17F* u zdravoj mukozi ileuma kod KB pacijenata. Takođe, pokazano je da je operativno lečenje udruženo sa povišenim nivoom ekspresije *IL23A* i *TLR9* u mukozi kolona zahvaćenoj inflamacijom. Međutim, grupa operisanih KB pacijenata bila je mala, te je neophodan veći uzorak ispitanika u cilju validacije navedenih rezultata i procene realnog značaja u kliničkoj praksi.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, interesantno je zapažanje vezano za merenje potencijalnih markera bolesti u sluznici koja u momentu biopsije nije bila zahvaćena inflamacijom (u ovoj tezi navođenoj pod terminom zdrava sluznica). Nivo analizirane iRNK u aktuelno zdravoj sluznici kod ZBC je bio specifičniji za fenotip i težinu bolesti u poređenju sa nivoima iRNK u mukozi koja je već zahvaćena inflamacijom. León AJ i saradnici su ukazali na povišenu ekspresiju određenog seta citokina u zdravoj sluznici kod ZBC uključujući IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-23, IL-6, IL-15 i IL-18. Prema navedenoj studiji mukoza nezahvaćena inflamacijom kod ZBC je uključena u aktivni imunološki proces koji još nije doveo do tkivnog oštećenja [193]. Takođe, razlike u genskoj ekspresiji u zdravoj sluznici intestinuma

ZBC u odnosu na zdrave kontrole registrovali su Wu F i saradnici, sa povišenom ekspresijom PSKH1 (eng. *serine/threonine-protein kinase H1*) koji reguliše sintezu iRNK i PPID (eng. *peptidylprolyl isomerase D*) koja ima ulogu u inhibiciji apoptoze [301]. S obzirom na učestalo nepoklapanje endoskopske slike i kliničke slike pacijenata sa ZBC, Xu L i saradnici su pokazali da pacijenti sa umerenom formom ZBC pokazuju izmenjenu gensku ekspresiju zdrave mukoze kolona u odnosu na zdrave kontrole, kao i povišen nivo ekspresije *IL17* [302]. Na osnovu navedenog može se zaključiti da inflamatorni proces u ZBC nije ograničen makroskopskim lezijama intestinalnog tkiva kao i da genski ekspresioni profili sluznice koja aktuelno nije zahvaćena zapaljenjem u ZBC može biti potencijalni prediktor daljeg toka bolesti. Iako ambiciozna pretpostavka, nivo iRNK ciljnih gena u mukozi intestinuma koja nije zahvaćena inflamacijom može biti pokazatelj fenotipskih karakteristika ZBC. Međutim, potrebno je sprovesti još istraživanja sa praćenjem pacijenata sa ZBC kako bi se ova pretpostavka potvrdila.

Analiza profila genske ekspresije u biopatima inestinalne mukoze ZBC je važna u daljem rasvetljavanju molekularne patogeneze bolesti i identifikovanju novih signalnih puteva specifičnih za KB i UK u cilju daljeg lečenja. Rezultati naše studije ukazali su na značaj genske ekspresije *TLR9-IL23-IL17* u nastanku i kliničkoj prezentaciji ZBC. Analizirani ekspresioni profili su specifični za tip i fenotip ZBC, ukazujući da UK ima profil koji bi je svrstao više u „Th17 bolest“ u poređenju sa profilom KB. Ovo istraživanje može doprineti boljem razumevanju i definisanju ekspresionog profila različitih fenotipa ZBC. Takođe, prikazani rezultati ukazuju na značaj analize nivoa iRNK u mukozi ZBC koja nije zahvaćena inflamacijom. S obzirom da se efikasnost lekova koji su antagonisti citokina IL-23, IL-17 kao i TLR9 ispituje u brojnim kliničkim studijama, bolje razumevanje inflamatornog procesa kod različitih fenotipova ZBC može usmeriti i optimizovati aktuelne terapijske protokole u cilju boljeg ishoda.

## **6. ZAKLJUČCI**

---



Na osnovu dobijenih rezultata ove studije, mogu su izvesti sledeći zaključci:

1. Analizom genskih ekspresionih profila intestinalnog tkiva, detektovana je povišena ekspresija *IL17A* i *IL17F* u mukozi koja je zahvaćena inflamacijom u poređenju sa mukozom koja nije zahvaćena inflamacijom, kod ilealne i kolonične forme KB, kao i u slučaju UK.
2. Kod pacijenata sa KB, povišen nivo ekspresije *IL23A* registrovan je u oboleloj mukozi ileuma, dok je u oboleloj mukozi kolona bio povišen ali bez statističke značajnosti. Kod pacijenata sa UK, obolela mukoza kolona imala je značajno višu ekspresiju *IL23A* u poređenju sa zdravom mukozom. Navedeni rezultati ukazuju na značajniju ulogu *IL23A* u hroničnoj inflamaciji kod UK u poređenju sa KB kolonične lokalizacije.
3. Nivo ekspresije *TLR9* je bio značajno viši u oboleloj u odnosu na zdravu mukozu ileuma pacijenata sa KB, dok u uzorcima kolona KB i UK, razlika između zdrave i bolesne mukoze u nivou *TLR9* nije uočena.
4. Intestinalni ekspresioni profili *IL17A* i *IL17F* su pozitivno korelisali sa nivoom ekspresije *IL23A* i *TLR9* u svim analiziranim tipovima mukoze ZBC. Značajna pozitivna korelacija registrovana je između nivoa ekspresije *IL17A* i *IL23A*, *IL17F* i *IL23A*, kao i *IL17F* i *TLR9* u mukozi kolona UK, dok je ista izostala u uzorcima intestinuma KB.
5. Značajno viši nivo ekspresije *IL17A* zabeležen je u oboleloj i zdravoj mukozi kolona pacijenta sa UK u poređenju sa KB. Iako značajna razlika nije pokazana u nivoima ekspresije *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* između KB i UK, povišeni nivoi iRNK *IL17F* i *IL23A* su uočeni kod UK ukazujući na veći značaj Th17 medijatora u inflamatornom procesu ovog tipa ZBC.
6. Indeks kliničke aktivnosti KB pozitivno je korelisao sa nivoom ekspresije *IL17A* i *IL17F*, a negativno sa nivoom *IL23* i *TLR9* u inflamiranoj sluznici kolona. U UK detektovana je pozitivna korelacija između endoskopske i kliničke aktivnosti prema vrednostima Mayo skora i nivoa kolonične ekspresije *IL17A* u

svim analiziranim uzorcima mukoze, *IL17F* u neinflamiranoj mukozi i *IL23* u inflamiranoj sluznici intestinuma.

7. Obolela mukoza ileuma kod stenozantne/penetrantne forme KB je ukazala na viši nivo ekspresije *IL17F* i *IL23A* u poređenju sa nestenozirajućom/nepenetrirajućom, dok kod kolonične lokalizacije nivo ekspresije *IL17A* je bio značajno niži u poređenju sa inflamatornom (nestenozantnom/nepenetrantnom) formom bolesti.

8. Pacijenti sa umerenom i teškom formom UK su imali značajno više nivoe ekspresije *IL17A* i *IL17F* u zdravoj mukozi, i viši nivo ekspresije *IL23A* u zdravoj i oboleloj mukozi kolona u poređenju sa blagom formom UK.

9. Pacijenti sa KB koji su operisani na dijagnozi su imali značajno viši nivo ekspresije *IL17A* i *IL17F* u zdravoj mukozi ileuma u poređenju sa onima koji nisu bili podvrgnuti operativnom tretmanu. Takođe, operisani pacijenti su imali povišene nivoe *IL23A* i *TLR9* u oboleloj sluznici kolona u odnosu na neoperisane.

10. Uočena je značajna razlika u nivou odnosa ekspresije *IL17A/IL17F* između bolesne i zdrave mukoze kod UK

## **7. LITERATURA**

---

1. Wilks S. Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. *London Medical Gazette*, 1859; 2:264.
2. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *JAMA*, 1932; 99:1323
3. Cameron HC, Rippman CH. Statistics of ulcerative colitis from London hospitals. *Proc R Soc Med*, 1909; 2:100
4. Kirsner JB, Palmer WL. Effects of corticotropin (ACTH) in chronic ulcerative colitis. *JAMA*, 1951; 147:541
5. Fabry W. Ex scirrho et ulcere cancioso in intestino cocco exorta iliaca passio. In *Opera, observation LXI, Centuriae I*. Frankfurt: 31 J.L. Dufour, 1682:49 cited by Fielding JF. Crohn's disease and Dalziel's syndrome. *J Clin Gastroent*, 1988; 10:279.
6. Morgagni GB. The seats and causes of disease investigated by anatomy. In: Johnson and Payne, eds. *Five Books Containing a Great Variety of Dissections with Remarks (Translated from the Latin of John Baptist Morgagni by Benjamin Alexander)*. In Three Volumes. London: A Millar and T Cadell, 1769.
7. Colles A. Practical observations upon certain diseases of intestines, colon and rectum. *Dublin Hosp Reports*, 1830; 5:131.
8. Fenwick S. *Clinical lectures on some obscure diseases of the abdomen*. London, Churchill, 1889.
9. Shapiro R. Regional ileitis-A summary of the literature. *Am J Med Sci*, 1939; 198:269
10. Dalziel TK. Chronic interstitial enteritis. *Br Med J (Clin Res)*, 1913; 2:1068.

11. Coffen TH. Nonspecific granuloma of the intestine causing intestinal obstruction. *JAMA*, 1925; 35:1303.
12. Morson BC, Lockhart Mummery HE. Crohn's disease of the colon. *Gastroenterologia*, 1959; 92:168
13. Lockhart Mummery HE, Morson BC. Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. *Gut*, 1960; 1:87
14. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2017; 389:1756-1770.
15. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet*. 2017; 389:1741-1755.
16. Butter M, Weiler S, Biedermann L, Scharl M, Rogler G, Bischoff-Ferrari HA, Misselwitz B. Clinical manifestations, pathophysiology, treatment and outcome of inflammatory bowel diseases in older people. *Maturitas*. 2018; 110:71-78
17. Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Dis Mon*. 2018; 64:20-57.
18. Feuerstein JD, Cheifetz AS. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clin Proc*. 2017; 92:1088-1103
19. Garber A, Regueiro M. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Etiopathogenesis, and Management. *Curr Gastroenterol Rep*. 2019; 21:31.
20. Gionchetti P, Dignass A, Danese S, Magro Dias FJ, Rogler G, Lakatos PL, Adamina M, Ardizzone S, Buskens CJ, Sebastian S, Laureti S, Sampietro GM, Vucelic B, van der Woude CJ,

Barreiro-de Acosta M, Maaser C, Portela F, Vavricka SR, Gomollón F; ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 2: Surgical Management and Special Situations. *J Crohns Colitis*. 2017; 11:135-149.

21. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL, Sung JY, Kaplan GG. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2018; 390:2769-2778.

22. Kamm MA. Rapid changes in epidemiology of inflammatory bowel disease. *Lancet*. 2018; 390:2741-2742.

23. Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL, for ECCO EpiCom. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis* 2013; 7: 322–37.

24. Kaplan GG, Ng SC. Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2017; 152: 313–21.

25. Benchimol EI, Manuel DG, Guttman A, Nguyen GC, Mojaverian N, Quach P, Mack DR. Changing age demographics of inflammatory bowel disease in Ontario, Canada: a population-based cohort study of epidemiology trends. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20: 1761–69.

26. Jacobsen BA, Fallingborg J, Rasmussen HH, Nielsen KR, Drewes AM, Puho E, Nielsen GL, Sørensen HT. Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978–2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 601–06.

27. Hein R, Koster I, Bollschweiler E, Schubert I. Prevalence of inflammatory bowel disease: estimates for 2010 and trends in Germany from a large insurance-based regional cohort. *Scand J Gastroenterol* 2014; 49: 1325–35.

28. Kurti Z, Vegh Z, Golovics PA, Fadgyas-Freyler P, Gecse KB, Gonczi L, Gimesi-Orszagh J, Lovasz BD, Lakatos PL. Nationwide prevalence and drug treatment practices of inflammatory bowel diseases in Hungary: a population-based study based on the National Health Insurance Fund database. *Dig Liver Dis* 2016; 48: 1302–07.
29. Studd C, Cameron G, Beswick L, Knight R, Hair C, McNeil J, Desmond P, Wilson J, Connell W, Bell S. Never underestimate inflammatory bowel disease: high prevalence rates and confirmation of high incidence rates in Australia. *J gastroenterol Hepatol* 2016; 31: 81–86.
30. Busch K, Ludvigsson JF, Ekstrom-Smedby K, Ekbom A, Askling J, Neovius M. Nationwide prevalence of inflammatory bowel disease in Sweden: a population-based register study. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39: 57–68.
31. Shivashankar R, Tremaine WJ, Harmsen WS, Loftus EV. Incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota from 1970 through 2010. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017; 15: 857–63.
32. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (ECIBD). *Gut* 1996; 39: 690–7.
33. Vegh Z, Kurti Z, Lakatos PL. Epidemiology of inflammatory bowel diseases from west to east. *J Dig Dis*. 2017; 18:92-98.
34. Betteridge JD, Armbruster SP, Maydonovitch C, Veerappan GR. Inflammatory bowel disease prevalence by age, gender, race, and geographic location in the U.S. military health care population. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19:1421-7.

35. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis*. 2006; 12 Suppl 1:S3-9.
36. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012; 142:46-54.e42; quiz e30.
37. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1785–94.
38. Shapiro JM, Zoega H, Shah SA, Bright RM, Mallette M, Moniz H, Grabert SA, Bancroft B, Merrick M, Flowers NT, Samad Z, Lidofsky S, LeLeiko NS, Sands BE. Incidence of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in Rhode Island: Report from the Ocean State Crohn's and Colitis Area Registry. *Inflamm Bowel Dis*. 2016; 22:1456-61.
39. Karban A, Waterman M, Panhuysen CI, Pollak RD, Neshier S, Datta L, Weiss B, Suissa A, Shamir R, Brant SR, Eliakim R. NOD2/CARD15 genotype and phenotype differences between Ashkenazi and Sephardic Jews with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2004; 99:1134-40.
40. Sewell JL, Inadomi JM, Yee HF Jr. Race and inflammatory bowel disease in an urban healthcare system. *Dig Dis Sci*. 2010; 55:3479-87.
41. Basu D, Lopez I, Kulkarni A, Sellin JH. Impact of race and ethnicity on inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2005; 100:2254-61.
42. Lakatos L, Kiss LS, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Mester G, Balogh M, Szipocs I, Molnar C, Komaromi E, Lakatos PL. Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in Western Hungary, 2002–2006. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 2558–65.



43. Sincić BM, Vucelić B, Persić M, Brncić N, Erzen DJ, Radaković B, Mićović V, Stimac D. Incidence of inflammatory bowel disease in Primorsko-goranska County, Croatia, 2000-2004: A prospective population-based study. *Scand J Gastroenterol.* 2006; 41:437-44.
44. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease pathogenesis: where are we? *J Gastroenterol Hepatol* 2015; 30:12-8
45. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2014; 20:91-9.
46. de Souza HSP. Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: today and tomorrow. *Curr Opin Gastroenterol.* 2017; 33:222-229.
47. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299: 1259-1260
48. Noverr MC, Huffnagle GB. The 'microflora hypothesis' of allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 1511-1520
49. Dominguez-Bello MG, Blaser MJ, Ley RE, Knight R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from highthroughput sequencing. *Gastroenterology* 2011; 140: 1713-1719.
50. Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017; 14:573-584.
51. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P,

Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59-65.

52. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009; 326: 1694-1697.

53. Bernstein CN. Review article: changes in the epidemiology of inflammatory bowel disease-clues for aetiology. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017; 46:911-919.

54. Abegunde AT, Muhammad BH, Bhatti O, Ali T. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. *World J Gastroenterol.* 2016; 22:6296-317.

55. van der Sloot KWJ, Amini M, Peters V, Dijkstra G, Alizadeh BZ. Inflammatory Bowel Diseases: Review of Known Environmental Protective and Risk Factors Involved. *Inflamm Bowel Dis.* 2017; 23:1499-1509.

56. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 2014; 505:559-63.

57. Tjønneland A, Overvad K, Bergmann MM, Nagel G, Linseisen J, Hallmans G, Palmqvist R, Sjödin H, Hagglund G, Berglund G, Lindgren S, Grip O, Palli D, Day NE, Khaw KT, Bingham S, Riboli E, Kennedy H, Hart A; IBD in EPIC Study Investigators. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut.* 2009; 58:1606-11

58. Khalili H, Malik S, Ananthakrishnan AN, Garber JJ, Higuchi LM, Joshi A, Peloquin J, Richter JM, Stewart KO, Curhan GC, Awasthi A, Yajnik V, Chan AT. Identification and Characterization of a

Novel Association between Dietary Potassium and Risk of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Front Immunol.* 2016; 7:554.

59. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Song M, Higuchi LM, Richter JM, Chan AT. Zinc intake and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Int J Epidemiol.* 2015; 44:1995-2005.

60. Lerner A, Matthias T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2015; 14:479-89.

61. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med.* 2012; 156:350-9.

62. Long MD, Kappelman MD, Martin CF, Chen W, Anton K, Sandler RS. Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Exacerbations of Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol.* 2016; 50:152-6.

63. Bonner GF, Fakhri A, Vennamaneni SR. A long-term cohort study of nonsteroidal anti-inflammatory drug use and disease activity in outpatients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 751-757

64. Biancone L, Tosti C, Geremia A, Fina D, Petruzzello C, Emerenziani S, Pallone F. Rofecoxib and early relapse of inflammatory bowel disease: an open-label trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 755-764

65. Matuk R, Crawford J, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA, Papadakis KA. The spectrum of gastrointestinal toxicity and effect on disease activity of selective cyclooxygenase-2 inhibitors inpatients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 352-356

66. Bonner GF, Walczak M, Kitchen L, Bayona M. Tolerance of nonsteroidal antiinflammatory drugs in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1946 -1948.
67. Reinisch W, Miehsler W, Dejaco C, Harrer M, Waldhoer T, Lichtenberger C, Vogelsang H. An open-label trial of the selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, rofecoxib, in inflammatory bowel disease-associated peripheral arthritis and arthralgia. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1371-1380
68. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 2133-2142.
69. Hildebrand H, Malmberg P, Askling J, Ekbohm A, Montgomery SM. Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 961-966.
70. Ungaro R, Bernstein CN, Garry R, Hviid A, Kolho KL, Kronman MP, Shaw S, Van Kruiningen H, Colombel JF, Atreja A. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014; 109: 1728-1738.
71. Cornish JA, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2008; 103:2394-400.
72. Khalili H, Granath F, Smedby KE, Ekbohm A, Neovius M, Chan AT, Olen O. Association Between Long-term Oral Contraceptive Use and Risk of Crohn's Disease Complications in a Nationwide Study. *Gastroenterology*. 2016; 150:1561-1567.
73. Khalili H. Risk of Inflammatory Bowel Disease with Oral Contraceptives and Menopausal Hormone Therapy: Current Evidence and Future Directions. *Drug Saf*. 2016; 39:193-7

74. Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Inflammatory bowel disease and tobacco smoke--a case-control study. *Gut*. 1990; 31:1377-81.
75. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2006; 81:1462-71.
76. To N, Ford AC, Gracie DJ. Systematic review with meta-analysis: the effect of tobacco smoking on the natural history of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016; 44:117-26.
77. Allais L, Kerckhof FM, Verschuere S3 Bracke KR4 De Smet R, Laukens D, Van den Abbeele P, De Vos M, Boon N, Brusselle GG, Cuvelier CA, Van de Wiele T. Chronic cigarette smoke exposure induces microbial and inflammatory shifts and mucin changes in the murine gut. *Environ Microbiol*. 2016; 18:1352-63.
78. Benjamin JL, Hedin CR, Koutsoumpas A, Ng SC, McCarthy NE, Prescott NJ, Pessoa-Lopes P, Mathew CG, Sanderson J, Hart AL, Kamm MA, Knight SC, Forbes A, Stagg AJ, Lindsay JO, Whelan K. Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. 2012; 18:1092-100.
79. Hu D, Ren J, Wang G, Gu G, Liu S, Wu X, Chen J, Ren H, Hong Z, Li J. Geographic mapping of Crohn's disease and its relation to affluence in jiangsu province, an eastern coastal province of china. *Gastroenterol Res Pract* 2014; 2014: 590467.
80. Kaplan GG, Hubbard J, Korzenik J, Sands BE, Panaccione R, Ghosh S, Wheeler AJ, Villeneuve PJ. The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 2412-2419.

81. Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ Int* 2008; 34:1033-1049.
82. Wagner M, Schlüsener MP, Ternes TA, Oehlmann J. Identification of putative steroid receptor antagonists in bottled water: combining bioassays and high-resolution mass spectrometry. *PLoS One* 2013; 8: e72472.
83. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 40-46.
84. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kapsoritakis A, Spanoudakis S, Roussomoustakaki M, Mouzas IA, Kouroumalis EA, Manousos ON. Appendectomy, tonsillectomy, and risk of inflammatory bowel disease: case-controlled study in Crete. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 225-230.
85. Kaplan GG, Jackson T, Sands BE, Frisch M, Andersson RE, Korzenik J. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2925-2931.
86. Reif S, Lavy A, Keter D, Broide E, Niv Y, Halak A, Ron Y, Eliakim R, Odes S, Patz J, Fich A, Villa Y, Arber N, Gilat T. Appendectomy is more frequent but not a risk factor in Crohn's disease while being protective in ulcerative colitis: a comparison of surgical procedures in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 829-832.
87. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, Bhan AK. Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice. *J Exp Med* 1996; 184: 707-715.
88. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2001; 344:808-814.

89. Russel MG, Dorant E, Brummer RJ, van de Kruijs MA, Muris JW, Bergers JM, Goedhard J, Stockbrügger RW. Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. South Limburg Inflammatory Bowel Disease Study Group. *Gastroenterology* 1997; 113: 377-382.
90. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, and the immune system. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1717S-1720S.
91. Gubatan J, Moss AC. Vitamin D in inflammatory bowel disease: more than just a supplement. *Curr Opin Gastroenterol*. 2018; 34:217-225.
92. Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol*. 2015; 37:47-55.
93. Elson CO, Cong Y. Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*. 2012; 3:332-44.
94. Chow J, Mazmanian SK. A Pathobiont of the Microbiota Balances Host Colonization and Intestinal Inflammation. *Cell Host Microbe*. Elsevier Ltd; 2010; 7:265-76.
95. Pascal V, Pozuelo M, Borruel N, Casellas F, Campos D, Santiago A, Martinez X, Varela E, Sarrabayrouse G, Machiels K, Vermeire S, Sokol H, Guarner F, Manichanh C. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*. 2017; 66:813-822.
96. Tong M, Li X, Wegener Parfrey L, Roth B, Ippoliti A, Wei B, Borneman J, McGovern DP, Frank DN, Li E, Horvath S, Knight R, Braun J. A modular organization of the human intestinal mucosal microbiota and its association with inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2013; 8:e80702.

97. McIlroy J, Ianiro G, Mukhopadhy I, Hansen R, Hold GL. Review article: the gut microbiome in inflammatory bowel disease-avenues for microbial management. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018; 47:26-42.
98. Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhy I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol.* 2014; 20:1192-210.
99. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, Järnerot G, Tysk C, Jansson JK, Engstrand L. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology.* 2010; 139:1844-1854.e1.
100. Childers RE, Eluri S, Vazquez C, Weise RM, Bayless TM, Hutfless S. Family history of inflammatory bowel disease among patients with ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis. *J Crohns Colitis.* 2014; 8:1480-97.
101. Hwang SW, Kwak MS, Kim WS, Lee JM, Park SH, Lee HS, Yang DH, Kim KJ, Ye BD, Byeon JS, Myung SJ, Yoon YS, Yu CS, Kim JH, Yang SK. Influence of a Positive Family History on the Clinical Course of Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis.* 2016; 10:1024-32.
102. Borren NZ, Conway G, Garber JJ, Khalili H, Budree S, Mallick H4, Yajnik V, Xavier RJ, Ananthakrishnan AN. Differences in Clinical Course, Genetics, and the Microbiome Between Familial and Sporadic Inflammatory Bowel Diseases. *J Crohns Colitis.* 2018; 12:525-531.
103. Brant SR. Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17:1–5.
104. Mirkov MU, Verstockt B, Cleynen I. Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017; 2:224-234.



105. Brant SR. Promises, delivery, and challenges of inflammatory bowel disease risk gene discovery. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013; 11:22–6.
106. de Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, Lamb CA, Luo Y, Kennedy NA, Jostins L, Rice DL, Gutierrez-Achury J, Ji SG, Heap G, Nimmo ER, Edwards C, Henderson P, Mowat C, Sanderson J, Satsangi J, Simmons A, Wilson DC, Tremelling M, Hart A, Mathew CG, Newman WG, Parkes M, Lees CW, Uhlig H, Hawkey C, Prescott NJ, Ahmad T, Mansfield JC, Anderson CA, Barrett JC. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2017;49:256–61.
107. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL, Raychaudhuri S, Goyette P, Wei Z, Abraham C, Achkar JP, Ahmad T, Amininejad L, Ananthakrishnan AN, Andersen V, Andrews JM, Baidoo L, Balschun T, Bampton PA, Bitton A, Boucher G, Brand S, Büning C, Cohain A, Cichon S, D'Amato M, De Jong D, Devaney KL, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Ferguson LR, Franchimont D, Fransen K, Gearry R, Georges M, Gieger C, Glas J, Haritunians T, Hart A, Hawkey C, Hedl M, Hu X, Karlsen TH, Kupcinskis L, Kugathasan S, Latiano A, Laukens D, Lawrance IC, Lees CW, Louis E, Mahy G, Mansfield J, Morgan AR, Mowat C, Newman W, Palmieri O, Ponsioen CY, Potocnik U, Prescott NJ, Regueiro M, Rotter JI, Russell RK, Sanderson JD, Sans M, Satsangi J, Schreiber S, Simms LA, Sventoraityte J, Targan SR, Taylor KD, Tremelling M, Verspaget HW, De Vos M, Wijmenga C, Wilson DC, Winkelmann J, Xavier RJ, Zeissig S, Zhang B, Zhang CK, Zhao H; International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), Silverberg MS, Annese V, Hakonarson H, Brant SR, Radford-Smith G, Mathew CG, Rioux JD, Schadt EE, Daly MJ, Franke A, Parkes M, Vermeire S, Barrett JC, Cho JH. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012; 491:119-24.

108. McGovern DP, van Heel DA, Ahmad T, Jewell DP. NOD2 (CARD15), the first susceptibility gene for Crohn's disease. *Gut*. 2001; 49:752-4.
109. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001; 411:599-603.
110. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001; 411:603-6.
111. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011; 474:307–17.
112. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut*. 2011; 60:1739–53.
113. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007; 448:427–34
114. Ye BD, McGovern DP. Genetic variation in IBD: progress, clues to pathogenesis and possible clinical utility. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016; 12:1091-107.
115. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016; 13:13-27.

116. Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-like receptors in human diseases. *Front Immunol.* 2013; 4:333.
117. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002; 122:867-74.
118. Adler J, Rangwalla SC, Dwamena BA, Higgins PD. The prognostic power of the NOD2 genotype for complicated Crohn's disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2011; 106:699-712.
119. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol.* 2004; 5:800-8.
120. Noguchi E, Homma Y, Kang X, Netea MG, Ma X. A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat Immunol.* 2009; 10:471-9.
121. Uniken Venema WT, Voskuil MD, Dijkstra G, Weersma RK, Festen EA. The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality. *J Pathol.* 2017; 241:146-158.
122. Pidasheva S, Trifari S, Phillips A, Hackney JA, Ma Y, Smith A, Sohn SJ, Spits H, Little RD, Behrens TW, Honigberg L, Ghilardi N, Clark HF. Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q. *PLoS One.* 2011; 6:e25038.
123. Cleynen I, Boucher G, Jostins L, Schumm LP, Zeissig S, Ahmad T, Andersen V, Andrews JM, Annese V, Brand S, Brant SR, Cho JH, Daly M, Dubinsky M, Duerr RH, Ferguson LR, Franke A, Geary RB, Goyette P, Hakonarson H, Halfvarson J, Hov JR, Huang H, Kennedy NA, Kupcinskis L, Lawrance

IC, Lee JC, Satsangi J, Schreiber S, Théâtre E, van der Meulen-de Jong AE, Weersma RK, Wilson DC; International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium, Parkes M, Vermeire S, Rioux JD, Mansfield J, Silverberg MS, Radford-Smith G, McGovern DP, Barrett JC, Lees CW. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet*. 2016; 387:156-67.

124. Wawrzyniak M, Scharl M. Genetics and epigenetics of inflammatory bowel disease. *Swiss Med Wkly*. 2018; 148:w14671.

125. Neuman MG. Signaling for inflammation and repair in inflammatory bowel disease. *Rom J Gastroenterol*. 2004; 13:309-16.

126. Knights D, Lassen KG, Xavier RJ. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut*. 2013; 62:1505–10

127. Moran CJ. Very early onset inflammatory bowel disease. *Semin Pediatr Surg*. 2017; 26:356–9.

128. Stankovic B, Dragasevic S, Popovic D, Zukic B, Kotur N, Sokic-Milutinovic A, Alempijevic T, Lukic S, Milosavljevic T, Nikcevic G, Pavlovic S. Variations in inflammatory genes as molecular markers for prediction of inflammatory bowel disease occurrence. *J Dig Dis*. 2015; 16:723-33.

129. Mijac D, Petrovic IV, Djuranovic S, Perovic V, Bojic D, Culafic D, Popovic D, Krstic M, Jankovic G, Djoric M, Pravica V, Markovic M. The Polymorphism rs3024505 (C/T) Downstream of the IL10 Gene Is Associated with Crohn's Disease in Serbian Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Tohoku J Exp Med*. 2016; 240:15-24.

130. Dragasevic S, Stankovic B, Milosavljevic T, Sokic-Milutinovic A, Lukic S, Alempijevic T, Zukic B, Kotur N, Nikcevic G, Pavlovic S, Popovic D. Genetic and environmental factors significant for the

presentation and development of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2017; 29:909-915.

131. Mijac D, Vukovic-Petrovic I, Mijac V, Perovic V, Milic N, Djuranovic S, Bojic D, Popovic D, Culafic D, Krstic M, Jankovic G, Pravica V, Markovic M. MDR1 gene polymorphisms are associated with ulcerative colitis in a cohort of Serbian patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 2018; 13:e0194536.

132. Pastorelli L, De Salvo C, Mercado JR, Vecchi M, Pizarro TT. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics. *Front Immunol.* 2013; 4:280.

133. Coskun M. Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Front Med (Lausanne).* 2014; 1:24.

134. Vancamelbeke M, Vanuytsel T, Farré R, Verstockt S, Ferrante M, Van Assche G, Rutgeerts P, Schuit F, Vermeire S, Arijs I, Cleynen. Genetic and Transcriptomic Bases of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2017; 23:1718-1729.

135. Park JH, Peyrin-Biroulet L, Eisenhut M, Shin JI. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules. *Autoimmun Rev.* 2017; 16:416-426.

136. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014; 14:329–42.

137. Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand J Gastroenterol.* 2018; 53:379-389.

138. Choy MC, Visvanathan K, De Cruz P. An Overview of the Innate and Adaptive Immune System in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2017; 23:2-13.

139. Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011; 140:1729-37.
140. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev*. 2005; 206:260-76.
141. Yadav V, Varum F, Bravo R, Furrer E, Bojic D, Basit AW. Inflammatory bowel disease: exploring gut pathophysiology for novel therapeutic targets. *Transl Res*. 2016; 176:38-68.
142. Zanello G, Kevans D, Goethel A, Silverberg M, Tyler A, Croitoru K. Genetics and innate and adaptive immunity in IBD. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*. 2014; 79:41-55.
143. Okamura M, Yoh K, Ojima M, Morito N, Takahashi S. Overexpression of GATA-3 in T cells accelerates dextran sulfate sodium-induced colitis. *Exp Anim*. 2014; 63:133-40.
144. Gálvez J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflamm*. 2014; 2014:928461.
145. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*. 2010; 327:1098-102.
146. Koh B, Hufford MM, Pham D, Olson MR, Wu T, Jabeen R, Sun X, Kaplan MH. The ETS Family Transcription Factors ETV5 and PU.1 Function in Parallel To Promote Th9 Cell Development. *J Immunol*. 2016; 197:2465-72.
147. Huang W, Solouki S, Koylass N, Zheng SG, August A. ITK signalling via the Ras/IRF4 pathway regulates the development and function of Tr1 cells. *Nat Commun*. 2017; 8:15871.

148. Karwacz K, Miraldi ER, Pokrovskii M, Madi A, Yosef N, Wortman I, Chen X, Watters A, Carriero N, Awasthi A, Regev A, Bonneau R, Littman D, Kuchroo VK. Critical role of IRF1 and BATF in forming chromatin landscape during type 1 regulatory cell differentiation. *Nat Immunol.* 2017; 18:412-421.
149. Ueno A, Ghosh A, Hung D, Li J, Jijon H. Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2015; 21:12283-95.
150. Wu W, Chen F, Liu Z, Cong Y. Microbiota-specific Th17 Cells: Yin and Yang in Regulation of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2016; 22:1473-82.
151. Stadhouders R, Lubberts E, Hendriks RW. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J Autoimmun.* 2018; 87:1-15.
152. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, Agarwal A, Huang W, Parkhurst CN, Muratet M, Newberry KM, Meadows S, Greenfield A, Yang Y, Jain P, Kirigin FK, Birchmeier C, Wagner EF, Murphy KM, Myers RM, Bonneau R, Littman DR. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* 2012; 151:289-303.
153. Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH, Kuchroo VK. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol.* 2009; 10:167-75.
154. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 2007; 448:484-487.
155. Schraml BU, Hildner K, Ise W, Lee WL, Smith WA, Solomon B, Sahota G, Sim J, Mukasa R, Cemerski S, Hatton RD, Stormo GD, Weaver CT, Russell JH, Murphy TL, Murphy KM. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature.* 2009; 460:405-9.

156. Brüstle A, Heink S, Huber M, Rosenplänter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T, Lohoff M. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol.* 2007; 8:958-66.
157. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature.* 2008; 453:65-71.
158. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity.* 2008; 28:29-39.
159. Singh SP, Zhang HH, Tsang H, Gardina PJ, Myers TG, Nagarajan V, Lee CH, Farber JM4. PLZF regulates CCR6 and is critical for the acquisition and maintenance of the Th17 phenotype in human cells. *J Immunol.* 2015; 194:4350-61.
160. Agalioti T, Villablanca EJ, Huber S, Gagliani N. TH17 cell plasticity: The role of dendritic cells and molecular mechanisms. *J Autoimmun.* 2018; 87:50-60.
161. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood.* 2013; 121:2402-14.
162. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature.* 2007; 448:480-3.
163. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Filì L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007; 204:1849-61.



164. Boniface K, Blumenschein WM, Brovont-Porth K, McGeachy MJ, Basham B, Desai B, Pierce R, McClanahan TK, Sadekova S, de Waal Malefyt R. Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN-gamma-producing cells with distinct properties from the Th1 lineage. *J Immunol*. 2010; 185:679-87.
165. Stockinger B, Omenetti S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17:535-544.
166. Harbour SN, Maynard CL, Zindl CL, Schoeb TR, Weaver CT. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112:7061-6.
167. Morrison PJ, Bending D, Fouser LA, Wright JF, Stockinger B, Cooke A, Kullberg MC. Th17-cell plasticity in *Helicobacter hepaticus*-induced intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2013; 6:1143-56
168. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol*. 2015; 6:639.
169. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 441:235-8.
170. Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR, Luo W, Zeller K, Shimoda L, Topalian SL, Semenza GL, Dang CV, Pardoll DM, Pan F. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011; 146: 772-784.
171. Ramos GP, Papadakis KA. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clin Proc*. 2019; 94:155-165

172. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:521-533.
173. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4<sup>+</sup> lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease: Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- $\gamma$ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol.* 1996; 157:1261-1270.
174. Barbi J, Pardoll D, Pan F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunol Rev.* 2013; 252:52-77.
175. Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Rossi MC, Querci V, Mazzoni A, Cimaz R, De Palma R, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Cosmi L, Annunziato F. Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *Eur J Immunol.* 2012; 42:3180-8.
176. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF- $\beta$  and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007; 8:1390-7.
177. Gagliani N, Amezcu Vesely MC, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, de Zoete MR, Licona-Limón P, Paiva RS, Ching T, Weaver C, Zi X, Pan X, Fan R, Garmire LX, Cotton MJ, Drier Y, Bernstein B, Geginat J, Stockinger B, Esplugues E, Huber S, Flavell RA. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature.* 2015; 523:221-5.
178. Basu R, Whitley SK, Bhaumik S, Zindl CL, Schoeb TR, Benveniste EN, Pear WS, Hatton RD, Weaver CT. IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell-iTreg cell balance. *Nat Immunol* 2015; 16: 286-295.

179. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011; 474:298-306.
180. Himmel ME, Yao Y, Orban PC, Steiner TS, Levings MK. Regulatory T-cell therapy for inflammatory bowel disease: more questions than answers. *Immunology*. 2012; 136:115-122.
181. Veltkamp C, Anstaett M, Wahl K, Möller S, Gangl S, Bachmann O, Hardtke-Wolenski M, Länger F, Stremmel W, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Apoptosis of regulatory T lymphocytes is increased in chronic inflammatory bowel disease and reversed by anti-TNF $\alpha$  treatment. *Gut*. 2011; 60:1345-53.
182. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. 2011; 34:149-62.
183. Baba M, Imai T, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Hieshima K, Nomiyama H, Yoshie O. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem*. 1997; 272:14893-8.
184. Fina D, Sarra M, Fantini MC, Rizzo A, Caruso R, Caprioli F, Stolfi C, Cardolini I, Dottori M, Boirivant M, Pallone F, Macdonald TT, Monteleone G. Regulation of gut inflammation and th17 cell response by interleukin-21. *Gastroenterology*. 2008; 134:1038-48.
185. Bianchi E, Rogge L. The IL-23/IL-17 pathway in human chronic inflammatory diseases-new insight from genetics and targeted therapies. *Genes Immun*. 2019; 20:415-425.
186. Sands BE, Chen J, Feagan BG, Penney M, Rees WA, Danese S, Higgins PDR, Newbold P, Faggioni R, Patra K, Li J, Klekotka P, Morehouse C, Pulkstenis E, Drappa J, van der Merwe R, Gasser RA Jr. Efficacy and Safety of MEDI2070, an Antibody Against Interleukin 23, in Patients With Moderate to Severe Crohn's Disease: A Phase 2a Study. *Gastroenterology*. 2017; 153:77-86.e6.

187. Cayatte C, Joyce-Shaikh B, Vega F, Boniface K, Grein J, Murphy E, Blumenschein WM, Chen S, Malinao MC, Basham B, Pierce RH, Bowman EP, McKenzie BS, Elson CO, Faubion WA, Malefyt Rde W, Kastelein RA, Cua D, McClanahan TK, Beaumont M. Biomarkers of Therapeutic Response in the IL-23 Pathway in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Transl Gastroenterol.* 2012; 3:e10.
188. Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, Blank MA, Johanns J, Guzzo C, Sands BE, Hanauer SB, Targan S, Rutgeerts P, Ghosh S, de Villiers WJ, Panaccione R, Greenberg G, Schreiber S, Lichtiger S, Feagan BG; CERTIFI Study Group. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2012; 367:1519-28.
189. Verstockt B, Deleenheer B, Van Assche G, Vermeire S, Ferrante M. A safety assessment of biological therapies targeting the IL-23/IL-17 axis in inflammatory bowel diseases. *Expert Opin Drug Saf.* 2017; 16:809-821
190. Gologan S, Iacob R, Iancu D, Iacob S, Cotruta B, Vadan R, Catuneanu AM, Constantinescu I, Barbarii L, Gheorghe C, Diculescu M. Inflammatory gene expression profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis: a comparative analysis using a reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification protocol. *J Crohns Colitis.* 2013; 7:622-30.
191. Jiang Z, Zhou X, Li R, Michal JJ, Zhang S, Dodson MV, Zhang Z, Harland RM. Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solutions. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72:3425-39.
192. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut.* 1996; 39:684-9

193. León AJ, Gómez E, Garrote JA, Bernardo D, Barrera A, Marcos JL, Fernández-Salazar L, Velayos B, Blanco-Quirós A, Arranz E. High levels of proinflammatory cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD. *Mediators Inflamm* 2009;580450.
194. Song L, Zhou R, Huang S, Zhou F, Xu S, Wang W, Yi F, Wang X, Xia B. High intestinal and systemic levels of interleukin-23/T-helper 17 pathway in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:425915.
195. Teng MW, Bowman EP, McElwee JJ, Smyth MJ, Casanova JL, Cooper AM, Cua D. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med*. 2015; 21:719-29.
196. Tindall EA, Hayes VM. Comprehensive sequence analysis of the human IL23A gene defines new variation content and high rate of evolutionary conservation. *DNA Res*. 2010; 17:117-22.
197. Sarra M, Pallone F, Macdonald TT, Monteleone G. IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2010; 16:1808-13.
198. Neurath MF. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019; 45:1-8.
199. Allocca M, Furfaro F, Fiorino G, Gilardi D, D'Alessio S, Danese S. Can IL-23 be a good target for ulcerative colitis? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2018; 32-33:95-102.
200. Rankin LC, Arpaia N. Treg Cells: A LAGging Hand Holds the Double-Edged Sword of the IL-23 Axis. *Immunity*. 2018; 49:201-203.

201. Konya V, Czarnewski P, Forkel M, Rao A, Kokkinou E, Villablanca EJ, Almer S, Lindfors U, Friberg D, Höög C, Bergman P, Mjösberg J. Vitamin D downregulates the IL-23 receptor pathway in human mucosal group 3 innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2018; 141:279-292.
202. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K, Akagawa KS, Hibi T. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest*. 2008; 118:2269-80.
203. Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2009; 137:1736–1745.
204. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barnada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006; 314:1461-3.
205. Kim SW, Kim ES, Moon CM, Park JJ, Kim TI, Kim WH, Cheon JH. Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2011; 60:1527-36.
206. Turpin W, Goethel A, Bedrani L, Croitoru M, K. Determinants of IBD Heritability: Genes, Bugs, and More. *Inflamm Bowel Dis*. 2018; 24:1133-1148.
207. Dubinsky MC, Wang D, Picornell Y, Wrobel I, Katzir L, Quiros A, Dutridge D, Wahbeh G, Silber G, Bahar R, Mengesha E, Targan SR, Taylor KD, Rotter JI; Western Regional Research Alliance for Pediatric IBD. IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13:511-5.

208. Gheita TA, El Gazzar II, El-Fishawy HS, Aboul-Ezz MA, Kenawy SA. Involvement of IL-23 in enteropathic arthritis patients with inflammatory bowel disease: preliminary results. *Clin Rheumatol.* 2014; 33:713-7.
209. Rafa H, Saoula H, Belkhelfa M, Medjeber O, Soufli I, Toumi R, de Launoit Y, Moralès O, Nakmouche M, Delhem N, Touil-Boukoffa C. IL-23/IL-17A axis correlates with the nitric oxide pathway in inflammatory bowel disease: immunomodulatory effect of retinoic acid. *J Interferon Cytokine Res.* 2013; 33:355-68.
210. Zheng ZD, Wan XQ, Liu LY. Serum contents of IL-23 and IL-17 in the patients with ulcerative colitis and the clinical significance. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2011; 27:203-6.
211. Youssef T, Saleh SA, Rund A, Montasser I, Mohsen M, Hazem O. Evaluation of interleukin 23 (IL-23) as a non-invasive test of disease severity in patients with ulcerative colitis. *Arab J Gastroenterol.* 2018; 19:116-120.
212. Granlund Av, Flatberg A, Østvik AE, Drozdov I, Gustafsson BI, Kidd M, Beisvag V, Torp SH, Waldum HL, Martinsen TC, Damås JK, Espevik T, Sandvik AK. Whole genome gene expression meta-analysis of inflammatory bowel disease colon mucosa demonstrates lack of major differences between Crohn's disease and ulcerative colitis. *PLoS One.* 2013; 8:e56818.
213. Liu Z, Yadav PK, Xu X, Su J, Chen C, Tang M, Lin H, Yu J, Qian J, Yang PC, Wang X. The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J Leukoc Biol.* 2011; 89:597-606.
214. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.* 2008; 57:1682-9.

215. Bloemendaal FM, Koelink PJ, van Schie KA, Rispens T, Peters CP, Buskens CJ, van der Bilt JD, Bemelman WA, Korf H, Sabino JG, Ponsioen CY, Te Velde AA, D'Haens GRAM, van den Brink GR Wildenberg ME. TNF-anti-TNF Immune Complexes Inhibit IL-12/IL-23 Secretion by Inflammatory Macrophages via an Fc-dependent Mechanism *J Crohns Colitis*. 2018; 12:1122-1130.
216. He X, Chen X, Zhang H, Xie T, Ye XY. Selective Tyk2 inhibitors as potential therapeutic agents: a patent review (2015-2018). *Expert Opin Ther Pat*. 2019; 29:137-149.
217. Omidian Z, Ahmed R, Giwa A, Donner T, Hamad ARA. IL-17 and limits of success. *Cell Immunol*. 2019; 339:33-40.
218. Goepfert A, Lehmann S, Wirth E, Rondeau JM. The human IL-17A/F heterodimer: a two-faced cytokine with unique receptor recognition properties. *Sci Rep*. 2017; 7:8906.
219. Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010; 21:413-23
220. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10:479-89.
221. Wu L, Zepp J, Li X. Function of Act1 in IL-17 family signaling and autoimmunity. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 946:223-35.
222. Monteleone I, Sarra M, Pallone F, Monteleone G. Th17-related cytokines in inflammatory bowel diseases: friends or foes? *Curr Mol Med*. 2012; 12:592-7
223. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:556-67.



224. Amatya N, Garg AV, Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 2017; 38:310-322.
225. Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J, Tocker J, Peschon J. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol.* 2006; 177:36-9.
226. Qian Y, Liu C, Hartupee J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-Wit D, Xiao J, Lu Y, Giltiay N, Liu J, Kordula T, Zhang QW, Vallance B, Swaidani S, Aronica M, Tuohy VK, Hamilton T, Li X. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol.* 2007; 8:247-56.
227. Bing Zhang, Caini Liu, Wen Qian, Yue Han, Xiaoxia Li, Junpeng Deng. Crystal structure of interleukin 17 receptor B SEFIR domain. *J Immunol.* 2013; 190: 2320–2326.
228. May MJ. IL-17R signaling: new players get in on the Act1. *Nat Immunol.* 2011; 12:813-5.
229. Brembilla NC, Senra L, Boehncke WH. The IL-17 Family of Cytokines in Psoriasis: IL-17A and Beyond. *Front Immunol.* 2018; 9:1682.
230. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2003; 52:65-70
231. Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, Yamamoto H, Kasayama S, Kirkwood KL, Gaffen SL. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem.* 2004; 279:2559–2567.
232. Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, Pfennig S, Jürgens M, Schmechel S, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Lohse P, Brand S. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in

active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 14:437-45.

233. Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, Wang YH, Schluns KS, Broaddus RR, Zhu Z, Dong C. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med.* 2008; 205:1063-75.

234. O'Connor W Jr1, Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, Kolls JK, Flavell RA. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol.* 2009; 10:603-9.

235. Kordjazy N, Haj-Mirzaian A, Haj-Mirzaian A, Rohani MM, Gelfand EW, Rezaei N, Abdolghaffari AH. Role of toll-like receptors in inflammatory bowel disease. *Pharmacol Res.* 2018; 129:204-215.

236. Ohto U, Ishida H, Shibata T, Sato R, Miyake K, Shimizu T Toll-like Receptor 9 Contains Two DNA Binding Sites that Function Cooperatively to Promote Receptor Dimerization and Activation. *Immunity.* 2018; 48:649-658.e4.

237. Krieg AM. CPG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual review of immunology.* 2002; 20:709-60.

238. Wagner H. Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity.* 2001; 14:499-502.

239. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4:249-58.

240. Ewaschuk JB, Backer JL, Churchill TA, Obermeier F, Krause DO, Madsen KL. Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infection and immunity.* 2007; 75:2572-9.

241. Ghadimi D, Vrese Md, Heller KJ, Schrezenmeir J. Effect of natural commensal-origin DNA on tolllike receptor 9 (TLR9) signaling cascade, chemokine IL-8 expression, and barrier integrity of polarized intestinal epithelial cells. *Inflammatory bowel diseases*. 2010; 16:410-27.
242. Goriely S, Neurath MF, Goldman M. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:81–6.
243. Davila E, Kolls J. A "Toll" for Th17 cell expansion. *J Leukoc Biol*. 2010; 88:5-7.
244. Hall JA, Bouladoux N, Sun CM, Wohlfert EA, Blank RB, Zhu Q, Grigg ME, Berzofsky JA, Belkaid Y. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity* 2008; 29:637–49.
245. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology*. 2004; 127:365–366.
246. Fuse K, Katakura K, Sakamoto N, Ohira H. Toll-like receptor 9 gene mutations and polymorphisms in Japanese ulcerative colitis patients. *World J Gastroenterol*. 2010; 16:5815-21.
247. Török HP, Glas J, Endres I, Tonenchi L, Teshome MY, Wetzke M, Klein W, Lohse P, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Göke B, Folwaczny C, Müller-Myhsok B, Brand S. Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104:1723-33.
248. Tan Y, Zou K-f, Qian W, Chen S, Hou X-h. Expression and implication of toll-like receptors TLR2, TLR4 and TLR9 in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. 2014; 34:785-90.

249. Sánchez-Muñoz F, Fonseca-Camarillo GC, Villeda-Ramirez MA, Barreto-Zuniga R, Bojalil R, Domínguez-Lopez A, Uribe M, Yamamoto-Furusho JK. TLR9 mRNA expression is upregulated in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16:1267-8.
250. Fan Y, Liu I. Expression of Toll-like receptors in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Exp Ther Med.* 2015; 9:1455-1459.
251. Musch E, Lutfi T, von Stein P, Zargari A, Admyre C, Malek M, Löfberg R, von Stein OD. Topical treatment with the Toll-like receptor agonist DIMS0150 has potential for lasting relief of symptoms in patients with chronic active ulcerative colitis by restoring glucocorticoid sensitivity. *Inflamm Bowel Dis.* 2013; 19:283-92.
252. Schmitt H, Ulmschneider J, Billmeier U, Vieth M, Scarozza , Sonnewald S, Reid S, Atreya I, Rath T, Zundler S, Langheinrich M, Schüttler J, Hartmann A, Winkler T, Admyre C, Knittel T, Dieterich Johansson C, Zargari A, Neurath MF, Atreya R. The TLR9 agonist cobitolimod induces IL10 producing wound healing macrophages and regulatory T cells in ulcerative colitis. *J Crohns Colitis.* 2020; 14:508-524.
253. Maaser C, Sturm A, Vavricka SR, Kucharzik T, Fiorino G, Annese V, Calabrese E, Baumgart DC, Bettenworth D, Borralho Nunes P, Burisch J, Castiglione F, Eliakim R, Ellul P, González-Lama Y, Gordon H, Halligan S, Katsanos K, Kopylov U, Kotze PG, Krustinš E, Laghi A, Limdi JK, Rieder F, Rimola J, Taylor SA, Tolan D, van Rheenen P, Verstockt B, Stoker J; European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO] and the European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology [ESGAR]. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J Crohns Colitis.* 2019; 13:144-164.
254. World Health Organization. "BMI Classification". Global Database on Body Mass Index.

255. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Classification of inflammatory bowel disease: the old and the new. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012; 28:321-6.
256. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med*. 1987; 317:1625-9.
257. Koutroumpakis E, Katsanos KH. Implementation of the simple endoscopic activity score in Crohn's disease. *Saudi J Gastroenterol*. 2016; 22:183–191.
258. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996; 6:986-94.
259. Schaad NW, Frederick RD, Shaw J, Schneider WL, Hickson R, Petrillo MD, Luster DG. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu Rev Phytopathol*. 2003; 41:305–324.
260. Stankovic B. Molecular markers of chronic inflammation and apoptosis in inflammatory bowel diseases [dissertation]. Belgrade: Faculty of Biology, University of Belgrade; 2015.
261. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C (T))</sup> Method. *Methods* 2001; 25: 402-408
262. Thornton B, Basu C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ*. 2011; 39:145-54.
263. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol*. 2002; 168:554-61.
264. Bustina S, Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif*. 2017; 14: 19–28.

265. Iacomino G, Rotondi Aufiero V, Iannaccone N, Melina R, Giardullo N, De Chiara G, Venezia A, Taccone FS, Iaquinto G, Mazzarella G. IBD: Role of intestinal compartments in the mucosal immune response. *Immunobiology*. 2020; 225:151849.
266. Soubières AA, Poullis A. Emerging role of novel biomarkers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2016; 7:41-50.
267. Iboshi Y, Nakamura K, Fukaura K, Iwasa T, Ogino H, Sumida Y, Ihara E, Akiho H, Harada N, Nakamuta M. Increased IL-17A/IL-17F expression ratio represents the key mucosal T helper/regulatory cell-related gene signature paralleling disease activity in ulcerative colitis. *J Gastroenterol*. 2017; 52:315-326.
268. Bogaert S, Laukens D, Peeters H, Melis L, Olievier K, Boon N, Verbruggen G, Vandesompele J, Elewaut D, De Vos M. Differential mucosal expression of Th17-related genes between the inflamed colon and ileum of patients with inflammatory bowel disease. *BMC Immunol*. 2010; 11:61.
269. Olsen T, Rismo R, Cui G, Goll R, Christiansen I, Florholmen J. TH1 and TH17 interactions in untreated inflamed mucosa of inflammatory bowel disease, and their potential to mediate the inflammation. *Cytokine*. 2011; 56:633-40.
270. Giles MS, Trivigno C. Identity crisis of Th17 cells: many forms, many functions, many questions. *Semin Immunol*. 2013; 25:263–72.
271. Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A. The interleukin 17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. *Immunology*. 2011; 134:8–16.
272. Tang C, Kakuta S, Shimizu K, Kadoki M, Kamiya T, Shimazu T, Kubo S, Saijo S, Ishigame H, Nakae S, Iwakura Y. Suppression of IL-17F, but not of IL-17A, provides protection against colitis by inducing Treg cells through modification of the intestinal microbiota. *Nat Immunol*. 2018; 19:755-765.

273. Chang SH, Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res.* 2007; 17:435–40.
274. Adamik J, Henkel M, Ray A, Auron PE, Duerr R, Barrie A. The IL17A and IL17F loci have divergent histone modifications and are differentially regulated by prostaglandin E2 in Th17 cells. *Cytokine.* 2013; 64:404-12.
275. Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, Qiu Y, Whitters MJ, Tomkinson KN, Dunussi-Joannopoulos K, Carreno BM, Collins M, Wolfman NM. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem.* 2007; 282:13447-55.
276. Nemeth ZH, Bogdanovski DA, Barratt-Stopper P, Paglinco SR, Antonioli L, Rolandelli RH. Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Show Unique Cytokine Profiles. *Cureus.* 2017; 9:e1177.
277. Rumio C, Besusso D, Palazzo M, Selleri S, Sfondrini L, Dubini F, Ménard S, Balsari A. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. *Am J Pathol.* 2004; 165:373-81.
278. Lu Y, Li X, Liu S, Zhang Y, Zhang D. Toll-like Receptors and Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol.* 2018; 9:72.
279. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000; 408:740-5.
280. Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Hofmann C, Bleich A, Grunwald N, Hedrich HJ, Aschenbrenner E, Schlegelberger B, Rogler G, Schölmerich J, Falk W. CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology.* 2005; 129:913-27.
281. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal.* 2010; 3:cm1.

282. Lee J, Rachmilewitz D, Raz E. Homeostatic effects of TLR9 signaling in experimental colitis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1072:351-5.
283. Fernandes P, MacSharry J, Darby T, Fanning A, Shanahan F, Houston A, Brint E. Differential expression of key regulators of Toll-like receptors in ulcerative colitis and Crohn's disease: a role for Tollip and peroxisome proliferator-activated receptor gamma? *Clin Exp Immunol*. 2016; 183:358-68.
284. Pedersen G, Andresen L, Matthiessen M, Rask-Madsen J, Brynskov J. Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clinical & Experimental Immunology*. 2005; 141:298-306.
285. Nadorp B, Soreq H. Gut feeling: MicroRNA discriminators of the intestinal TLR9-cholinergic links. *Int Immunopharmacol*. 2015; 29:8-14.
286. Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol*. 2009; 2:403-11.
287. Happel K, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, Shellito JE, Schurr JR, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol*. 2003; 170:4432-6.
288. Bhan U, Newstead MJ, Zeng X, Podsaid A, Goswami M, Ballinger MN, Kunkel SL, Standiford TJ. TLR9-dependent IL-23/IL-17 is required for the generation of *Stachybotrys chartarum*-induced hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol*. 2013; 190:349-56.
289. Ivanov II, Frutos Rde L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, Finlay BB, Littman DR. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe*. 2008; 4:337-49.



290. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, Yagita H, Ishii N, Evans R, Honda K, Takeda K. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature*. 2008; 455:808-12.
291. Minderhoud IM, Samsom M, Oldenburg B. What predicts mucosal inflammation in Crohn's disease patients? *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13:1567-72.
292. Román J, Planell N, Lozano JJ, Aceituno M, Esteller M, Pontes C, Balsa D, Merlos M, Panés J, Salas A. Evaluation of responsive gene expression as a sensitive and specific biomarker in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19:221-9.
293. Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Marth T, Zeuzem S, Meuer SC, Stallmach A. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2005; 11:16-23.
294. Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *Br Med J*. 1989; 298:82–86.
295. Kerami Z, Duijvis NW, Vogels EW, van Dooren FH, Moerland PD, Te Velde AA. Effect of interleukin-17 on gene expression profile of fibroblasts from Crohn's disease patients. *J Crohns Colitis*. 2014; 8:1208-16
296. Verma R, Verma N, Paul J. Expression of inflammatory genes in the colon of ulcerative colitis patients varies with activity both at the mRNA and protein level. *Eur Cytokine Netw*. 2013; 24:130–8
297. Nielsen OH, Kirman I, Rüdiger N, Hendel J, Vainer B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2003; 38:180-5.

298. Ohman L, Dahlén R, Isaksson S, Sjöling A, Wick MJ, Sjövall H, Van Oudenhove L, Simrén M, Strid H. Serum IL-17A in newly diagnosed treatment-naive patients with ulcerative colitis reflects clinical disease severity and predicts the course of disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19:2433-9.
299. Morrison PJ, Ballantyne SJ, Kullberg MC. Interleukin-23 and T helper 17-type responses in intestinal inflammation: from cytokines to T-cell plasticity. *Immunology*. 2011; 133:397-408.
300. Bemelman WA, Warusavitarne J, Sampietro GM, Serclova Z, Zmora O, Luglio G, de Buck van Overstraeten A, Burke JP, Buskens CJ, Colombo F, Dias JA, Eliakim R, Elosua T, Gecim IE, Kolacek S, Kierkus J, Kolho KL, Lefevre JH, Millan M, Panis Y, Pinkney T, Russell RK, Shwaartz C, Vaizey C, Yassin N, D'Hoore A. ECCO-ESCP Consensus on Surgery for Crohn's Disease. *J Crohns Colitis*. 2018; 12:1-16.
301. Wu F, Dassopoulos T, Cope L, Maitra A, Brant SR, Harris ML, Bayless TM, Parmigiani G, Chakravarti S. Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13:807-21.
302. Xu L, Ma L, Lian J, Yang J, Chen S. Gene expression alterations in inflamed and unaffected colon mucosa from patients with mild inflammatory bowel disease. *Mol Med Rep*. 2016; 13:2729-35.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Sanja Dragašević rođena je 24.01.1983. godine u Beogradu. Od 2012. godine zaposlena je u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju, Kliničkog centra Srbije kao doktor medicine, od aprila 2018 specijalista interne medicine, a 2019.godine izabrana je u zvanje kliničkog asistenta za užu naučnu oblast Interna medicina.

Osnovnu školu i Prvu beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu sa odličnim uspehom i Vukovom diplomom. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu 2009. godine, sa prosečnom ocenom 9.03. Specijalističke akademske studije iz digestivnog sistema završila je 2013.godine sa odbranom završne teze pod nazivom “Komparativna analiza kliničkih, laboratorijskih, endoskopskih i histoloških parametara u inflamatornim bolestima creva“. Doktorske studije iz molekularne medicine na Univerzitetu u Beogradu upisala je 2013. godine sa uspešno završenim ispitima planiranim na ovom modulu.

Specijalistički ispit položila je 30.04.2018 sa odličnim uspehom pred komisijom Medicinskog fakulteta u Beogradu. U toku specijalističkog staža deo prakse provela je na odeljenju gastroenterologije i hepatologije, Krankenhaus Hietzing, Beč, Austrija, u periodu od 2 meseca 2016. godine. U februaru 2019. godine izabrana je u zvanje kliničkog asistenta za užu naučnu oblast Interna medicina (gastroenterohepatologija) na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Dr Sanja Dragašević je autor i koautor više originalnih radova objavljenih u domaćim i međunarodnim časopisima.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a dr Sanja Dragašević

broj upisa 61206-2295/2-17

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

"Intestinalna tkivna ekspresija *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* gena u zapaljenskim bolestima creva"

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranta**



U Beogradu, 24.2.2020

---

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: dr Sanja Dragašević

Broj upisa 61206-2295/2-17

Studijski program: molekularna medicina

Naslov rada "Intestinalna tkivna ekspresija *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* gena u zapaljenskim bolestima creva"

Mentor Prof.dr Dragan Popović

Komentor Sonja Pavlović, naučni savetnik

Potpisani dr Sanja Dragašević

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranta**



U Beogradu, 24.2.2020

---

**Prilog 3.**

## **Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

"Intestinalna tkivna ekspresija *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* gena u zapaljenskim bolestima creva"

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

**Potpis doktoranta**



U Beogradu, 24.2.2020.

---