

**Univerzitet u Beogradu**  
**Medicinski fakultet**



Dragana Mijač

**ZNAČAJ POLIMORFIZAMA**  
***TNFA, IL10, IL12B, IL23R* I *MDR1* GENA**  
**U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016. god

**University of Belgrade**  
**School of Medicine**



Dragana Mijač

**THE POLYMORPHISMS OF**  
***TNFA, IL10, IL12B, IL23R* AND *MDR1* GENES**  
**IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016

## **Mentor**

---

Prof. dr Miloš Marković  
Medicinski fakultet u Beogradu

## **Komentor**

---

Prof. dr Đorđe Čulafić  
Medicinski fakultet u Beogradu

## **Članovi komisije**

---

Prof. dr Miodrag Krstić  
Medicinski fakultet u Beogradu  
Predsednik komisije

---

Prof. dr Vera Pravica  
Medicinski fakultet u Beogradu

---

Prof. dr Srđan Đuranović  
Medicinski fakultet u Beogradu

---

Prof. dr Dragan Popović  
Medicinski fakultet u Beogradu

---

Prof. dr Njegica Jojić  
Stomatološki fakultet u Beogradu

Genetsko ispitivanje je izvršeno u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u okviru projekta osnovnih istraživanja broj 175038 pod nazivom „Imunopatogenetski i regulatorni mehanizmi u autoimunskim bolestima i hroničnoj inflamaciji“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Klinički deo istraživanja je sproveden u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog centra Srbije u saradnji sa Katedrom za internu medicinu Medicinskog fakulteta u Beogradu. Ispitivanje je odobreno od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije (br.1058/13).

*Zahvaljujem se:*

*Prof. dr Milošu Markoviću, mentoru ove doktorske disertacije, na stručnoj pomoći, temeljnom i preciznom pristupu i trudu koji je uložio u konačno oblikovanje postojeće verzije doktorata.*

*Prof. dr Đorđu Čulafiću, komentoru, na izuzetnoj saradnji, nesebičnoj pomoći i podršci koja ima nezamenljivu vrednost.*

*Doc. dr Danieli Bojić, na entuzijazmu, posvećenosti i pomoći u odabiranju pacijenata za doktorsku tezu.*

*Poštovanim članovima komisije, Prof. dr Srđanu Đuranoviću, Prof. dr Miodragu Krstiću, Prof. dr Veri Pravici, Prof. dr Draganu Popoviću i Prof. dr Njegici Jojić na ohrabrenju, dragocenim savetima i sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove teze.*

*Prof. dr Dušanu Popadiću, za nesebičnu pomoć i vredne sugestije u oblikovanju doktorske teze.*

*Dr Ireni Vuković-Petrović i Dr Vladimiru Peroviću, za kolegijalnost i veliki trud i rad u Imunološkoj laboratoriji.*

*Medicinskim sestrama Intenzivne nege, Klinike za GEH, koje su odgovorno i savesno sakupljale i transportovale uzorke krvi za genetsko ispitivanje.*

*Posebnu zahvalnost dugujem mom suprugu Milošu, na ogromnom strpljenju i toleranciji.*

*Najveću zahvalnost, van konkurencije, dugujem ćerki Mili i mojim roditeljima, Mirjani i Danilu, na bezgraničnoj ljubavi, razumevanju i безусловnoj podršci.*

*Rad posvećujem Mili, koja daje smisao svemu*

## ZNAČAJ POLIMORFIZAMA *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* I *MDR1* GENA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA

Dragana Mijač

### SAŽETAK

**Uvod:** Inflammatorna bolest creva (IBC), čija su dva glavna klinička oblika ulcerozni kolitis (UK) i Kronova bolest (KB), predstavlja heterogenu grupu bolesti hroničnog toka koje se karakterišu ponavljanim epizodama inflamacije u gastrointestinalnom traktu. Iako etiopatogeneza IBC još uvek nije razjašnjena, smatra se da nastaje kao posledica aberantnog imunskog odgovora na mikroorganizme u crevima koji kod genetski predisponirane osobe dovodi do hronične inflamacije i oštećenja crevne mukoze. Sa napretkom molekularne genetike identifikovan je veliki broj polimorfizama pojedinačnih nukleotida u različitim genima koji bi mogli da se koriste kao biomarkeri u IBC i pomognu u dijagnostici, klasifikaciji bolesti, prognozi i praćenju terapijskog odgovora. Među njima se posebno ističu polimorfizmi u genima koji kodiraju proinflamatorne citokine (TNF), antiinflamatorne citokine (IL-10) i citokine važne za razvoj i funkciju Th1 i Th17 ćelija (IL-12 i IL-23 i njihove receptore), kao i polimorfizmi u *MDR1* genu koji kodira transporter P-glikoprotein. Svi ovi polimorfizmi su povezani sa razvojem KB i/ili UK i njihovim fenotipskim karakteristikama u različitim populacijama, ali nijedan od njih nije do sada ispitivan kod pacijenata sa IBC u Srbiji.

**Ciljevi istraživanja:** Odrediti distribuciju alela i genotipova polimorfizama *TNFA* (rs1800629), *IL10* (rs1800896, rs1800871 i rs3024505), *IL12B* (rs6887695), *IL23R* (rs11209026) i *MDR1* gena (rs1128503, rs2032582 i rs1045642) kod pacijenata sa IBC, kao i kod zdravih osoba u Srbiji (osim rs1800629 za koji rezultati već postoje) i ispitati da li je neki od tih polimorfizama faktor rizika za nastanak KB i UK i/ili utiče na kliničke manifestacije ovih bolesti. Proceniti da li se distribucije ispitivanih polimorfizama kod pacijenata sa KB i UK i zdravih kontrola u ovoj studiji razlikuju u odnosu na studije u kojima su ovi polimorfizmi ispitivani u drugim populacijama.

**Pacijenti i metode:** Istraživanje je obuhvatilo 206 pacijenata sa IBC, i to 107 sa KB i 99 sa UK, ispitivanih i lečenih u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju, Kliničkog centra Srbije, i 255 zdravih osoba (dobrovoljnih davaoca krvi) koji su činili kontrolnu grupu ispitanika. Dijagnoza KB i UK postavljena je u skladu sa savremenim vodičima, za definisanje fenotipskih karakteristika bolesti korišćena je Montrealska klasifikacija, a za procenu kliničke aktivnosti bolesti primenjeni su Indeks aktivnosti Kronove bolesti (CDAI) za KB i Mayo skor za UK. DNK ispitanika je izolovana iz njihove periferne krvi, a genotipizacija za sve polimorfizme je obavljena pomoću PCR metode u realnom vremenu korišćenjem komercijalnih optimizovanih smeša specifičnih oligonukleotida i TaqMan proba (PE, Applied Biosystems). Statistička analiza uključivala je primenu  $\chi^2$  testa ili Fišerovog testa tačne verovatnoće za procenu značajnosti razlike u frekvenciji alela i genotipova kod pacijenata i kontrolnih ispitanika.

**Rezultati:** U ovom istraživanju genotipovi svih ispitivanih polimorfizama u *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* genima su bili u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži. Distribucije

alela ispitivanih gena u uzorku populacije zdravih osoba sa teritorije Srbije su bile: *TNFA* (rs1800629 G/A→0,876/0,124), *IL10* (rs1800896 G/A→0,406/0,594, rs1800871 T/C→0,255/0,745 i rs3024505 T/C→0,137/0,863), *IL12B* (rs6887695 G/C→0,718/0,282), *IL23R* (rs11209026 G/A→0,941/0,059) i *MDR1* (rs1128503T/C→0,441/0,559, rs2032582 G/T→0,553/0,433 i rs1045642 T/C→0,486/0,514). Učestalost alela ispitivanih gena kod pacijenata sa KB i njihovo poređenje sa kontrolnom grupom ispitanika je imala sledeće vrednosti: *TNFA* (rs1800629 G/A→0,893/0,107, nesignifikantno, NS), *IL10* (rs1800896 G/A→0,439/0,561, NS, rs1800871 T/C→0,743/0,257, NS, rs3024505T/C→0,776/0,224, p=0,004), *IL12B* (rs6887695 G/C→0,659/0,341, NS), *IL23R* (rs11209026 G/A→0,991/0,09, p=0,003) i *MDR1* (rs1128503 T/C→0,589/0,411, NS, rs2032582 G/T→0,584/0,397, NS i rs1045642 T/C→0,439/0,561, NS). Distribucija alela ispitivanih gena u kohorti pacijenata sa UK u odnosu na kontrolnu grupu imala je sledeće vrednosti: *TNFA* (rs1800629 G/A→0,894/0,106, NS), *IL10* (rs1800896 G/A→0,424/0,576, NS, rs1800871 T/C→0,702/0,298, NS i rs3024505 T/C→0,818/0,182, NS), *IL12B* (rs6887695 G/C→0,692/0,318, NS), *IL23R* (rs11209026 G/A→0,985/0,015, p=0,01) i *MDR1* (rs1128503 T/C→0,409/0,591, p=0,0003, rs2032582 G/T→0,584/0,397, p=0,004 i rs1045642 T/C→0,399/0,601, p=0,04).

U ovoj studiji, alel G i genotip GG polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena su bili statistički značajno povezani sa nastankom i KB i UK. Polimorfizam rs3024505 *IL10* gena (alel T i genotip CT), kao i polimorfizam rs6887695 *IL12B* gena (genotip CC) su bili značajno povezani sa nastankom KB, dok su neke varijante ovih polimorfizama bile povezane sa određenim fenotipskim karakteristikama bolesti (anemijom, prisustvom stenoza, fistula i/ili ekstrakrevnih manifestacija). Polimorfizmi rs1128503, rs2032582 i rs1045642 u *MDR1* genu su statistički značajno povezani sa nastankom UK (T alel sva tri polimorfizma, kao i TT genotip rs1128503 i rs2032582). Genotipsko-fenotipska analiza je utvrdila povezanost nekih od *MDR1* polimorfizama sa pušenjem i rizikom od hirurškog lečenja. Haplotipovi polimorfizama u *IL10* i *MDR1* genu su povezani sa nastankom KB (haplotip GCCT *IL10* gena) i UK (haplotip TTT *MDR1* gena).

**Zaključak:** Polimorfizam rs3024505 *IL10* gena, kao i polimorfizam rs6887695 *IL12B* gena bili su značajno povezani sa nastankom KB i sa fenotipskim karakteristikama bolesti. Polimorfizmi (rs1128503, rs2032582 i rs1045642) i haplotipovi *MDR1* gena bili su udruženi sa razvojem UK, kao i sa pušenjem i operativnim rizikom kod pacijenata sa UK. Polimorfizam rs11209026 *IL23R* gena je bio povezan sa nastankom i KB i UK, dok nije uočena udruženost polimorfizma rs1800629 *TNFA* gena ni sa jednom formom IBC. Naši rezultati sugerišu važnu ulogu navedenih polimorfizama *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u patogenezi IBC i potvrđuju njihov značaj kao potencijalnih biomarkera u IBC.

**KLJUČNE REČI:** Kronova bolest, Ulcerozni kolitis, Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida, *TNFA* (rs1800629), *IL10* (rs1800896, rs1800871, rs3024505), *IL12B* (rs6887695), *IL23R* (rs11209026), *MDR1* (rs1045642, rs1128503, rs2032582)

**NAUČNA OBLAST:** Medicina

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Gastroenterologija

**UDK:**



# THE POLYMORPHISMS OF *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* AND *MDR1* GENES IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Dragana Mijač

## ABSTRACT

**Introduction:** Inflammatory bowel disease (IBD) with its major forms, ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), represents a heterogeneous group of chronic disorders characterized by recurring episodes of inflammation in the gastrointestinal tract. Although the etiopathogenesis of IBD is still not fully understood, evidence suggests that it results from aberrant immune response to gut microbiota in genetically susceptible individuals leading to a chronic inflammation and damage of the intestinal mucosa. With the advance of molecular genetics, a large number of single nucleotide polymorphisms (SNP) in various genes has been identified as potential biomarkers in IBD that can help in the diagnosis, disease classification, prognosis and monitoring of treatment response. Among the best candidates for reliable biomarkers in IBD are the SNPs in the genes encoding pro-inflammatory (TNF), anti-inflammatory (IL-10) and Th1 and Th17-inducing cytokines (IL-12 and IL-23 and their receptors), as well as the polymorphisms in the *MDR1* gene encoding P-glycoprotein transporter. All these SNPs have been associated with the susceptibility and phenotype of UC and/or CD in different populations, but none of them has been studied in patients with IBD in Serbia so far.

**Aims:** To determine allele and genotype distributions of the SNPs within *TNFA* (rs1800629), *IL10* (rs1800896, rs1800871 and rs3024505), *IL12B* (rs6887695), *IL23R* (rs11209026) and *MDR1* (rs1128503, rs2032582 and rs1045642) genes in Serbian IBD patients and healthy controls (with the exception for rs1800629, for which the results already exist) and to assess their associations with susceptibility and phenotype of UC and CD. Also, our aim was to compare allele and genotype frequencies found in our study with those from the other studies that were done in different populations.

**Patients and methods:** The study involved a total of 206 IBD patients and 255 unrelated healthy controls (blood donors). IBD group comprised 107 CD patients and 99 UC patients followed up for IBD at the Clinic for Gastroenterology and Hepatology, School of Medicine, University Belgrade, Clinical Center of Serbia. Diagnosis of CD and UC was determined according to established guidelines, phenotype characteristics of disease were defined according to the Montreal classification and the clinical disease activity was estimated using the Mayo score and Crohn's Disease Activity Index (CDAI) for UC and CD patients, respectively. DNA was extracted from peripheral blood samples from all subjects and the genotyping was done using real-time PCR with commercial optimized mixtures of specific oligonucleotides and TaqMan probes (PE, Applied Biosystems). Comparison between genotype and allele frequencies in different groups was performed using the Pearson Chi-square or Fisher's exact test, where appropriate.

**Results:** Genotypes of all analyzed SNPs of *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* and *MDR1* genes were in Hardy-Weinberg equilibrium. Distributions of alleles of tested genes in

sample population of healthy subjects from Serbia, were as follows: *TNFA* (rs1800629 G/A→0.876/0.124), *IL10* (rs1800896 G/A→0.406/0.594, rs1800871 T/C→0.255/0.745, rs3024505 T/C→0.137/0.863), *IL12B* (rs6887695 G/C→0.718/0.282), *IL23R* (rs11209026 G/A→0.941/0.059) and *MDR1* (rs1128503T/C→0.441/0.559, rs2032582 G/T→0.553/0.433 and rs1045642 T/C→0.486/0.514). The distribution of alleles of tested genes in patients with CD were as follows: *TNFA* (rs1800629 G/A→0.893/0.107, non-significant, NS), *IL10* (rs1800896 G/A→0.439/0.561, NS, rs1800871 T/C→0.743/0.257, NS, rs3024505 T/C→0.776/0.224, p=0.004), *IL12B* (rs6887695 G/C→0.659/0.341, NS), *IL23R* (rs11209026 G/A→0.991/0.09, p=0.003) and *MDR1* (rs1128503 T/C→0.589/0.411, NS, rs2032582 G/T→0.584/0.397, NS and rs1045642 T/C→0.439/0.561, NS). The distributions of alleles of tested genes in patients with UC were as follows: *TNFA* (rs1800629 G/A→0.894/0.106, NS), *IL10* (rs1800896 G/A→0.424/0.576, NS, rs1800871 T/C→0.702/0.298, NS and rs3024505 T/C→0.818/0.182, NS), *IL12B* (rs6887695 G/C→0.692/0.318, NS), *IL23R* (rs11209026 G/A→0.985/0.015, p=0.01) and *MDR1* (rs1128503 T/C→0.409/0.591, p=0.0003, rs2032582 G/T→0.584/0.397, p=0.004 and rs1045642 T/C→0.399/0.601, p=0.04).

In this study, the G allele and GG genotype of rs11209026 in *IL23R* gene were associated with both CD and UC. *IL10* gene SNP rs3024505 (T allele and CT genotype) and rs6887695 SNP in *IL12B* gene (CC genotype) were associated with CD, while certain variants of these polymorphisms correlated with some phenotypic characteristics of the disease (presence of anemia, stenoses, fistulas and/or extra-intestinal manifestations). Polymorphisms in the *MDR1* gene (rs1128503, rs2032582 and rs1045642) were all significantly associated with UC (T allele of all three SNPs, as well as TT genotype of rs1128503 and rs2032582). Genotype-phenotype analysis revealed associations of some allele/genotypes of *MDR1* SNPs with smoking and increased risk for surgical treatment. Also, haplotypes in *IL10* gene (GCCT haplotype) and *MDR1* gene (TTT haplotype) were associated with CD and UC, respectively.

**Conclusions:** The polymorphism rs3024505 in *IL10* gene and rs6887695 in *IL12B* gene were both associated with susceptibility and severity of disease in Serbian CD patients. On the other hand, *MDR1* gene polymorphisms (rs1128503, rs2032582 rs1045642) and their haplotypes were associated with the susceptibility, as well as with smoking and risk for surgery in UC patients. *IL23R* rs11209026 polymorphism gene was associated with the both CD and UC, whereas no association was observed between rs1800629 SNP in *TNFA* gene and any form of IBD. Our results suggest important roles of analyzed SNPs in *IL10*, *IL12B*, *IL23R* and *MDR1* genes in IBD pathogenesis and further support their potential use as biomarkers in IBD.

**KEY WORDS:** Crohn's Disease, Ulcerative colitis, Single nucleotide polymorphisms, *TNFA* (rs1800629), *IL10* (rs1800896, rs1800871, rs3024505), *IL12B* (rs6887695), *IL23R* (rs11209026), *MDR1* (rs1045642, rs1128503, rs2032582)

**SCIENTIFIC FIELD:** Medicine

**SPECIALISED SCIENTIFIC FIELD:** Gastroenterology

**UDK:**

## SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>DEFINICIJA INFLAMATORNE BOLESTI CREVA</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>EPIDEMIOLOGIJA INFLAMATORNE BOLESTI CREVA</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>ETIOLOGIJA I PATOGENEZA INFLAMATORNE BOLESTI CREVA</b>	<b>5</b>
1.3.1	IMUNSKI SISTEM MUKOZE CREVA	5
1.3.2	ULOGA CREVNA MIKROBIOTE U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA	7
1.3.3	ULOGA EPITELA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA	8
1.3.4	ULOGA CREVNE VASKULARIZACIJE U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA	9
1.3.5	ULOGA IMUNSKIH MEHANIZAMA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA	10
1.3.5.1	Uloga urođene imunosti u inflamatornoj bolesti creva	10
1.3.5.2	Uloga stečene imunosti u inflamatornoj bolesti creva	13
<b>1.4</b>	<b>KLINIČKA PREZENTACIJA INFLAMATORNE BOLESTI CREVA</b>	<b>16</b>
1.4.1	EKSTRACREVNNE MANIFESTACIJE INFLAMATORNE BOLESTI CREVA	16
1.4.2	DIJAGNOZA I DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA INFLAMATORNE BOLESTI CREVA	17
1.4.3	PROCENA AKTIVNOSTI INFLAMATORNE BOLESTI CREVA	17
<b>1.5</b>	<b>TERAPIJSKI MODALITETI LEČENJA INFLAMATORNE BOLESTI CREVA</b>	<b>18</b>
1.5.1	AMINOSALICILATI	20
1.5.2	KORTIKOSTEROIDNA TERAPIJA	20
1.5.3	ANTIBIOTICI	20
1.5.4	IMUNOSUPRESIVNA TERAPIJA	21
1.5.5	HIRURŠKO LEČENJE	21
1.5.6	INHIBITORI TNF	21
1.5.7	NOVE TERAPIJSKE MOGUĆNOSTI	22
<b>1.6</b>	<b>GENETSKI FAKTORI U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA</b>	<b>24</b>
1.6.1	POLIMORFIZMI POJEDINAČNIH NUKLEOTIDA	25
1.6.1.1	Polimorfizmi u <i>TNFA</i> genu	28
1.6.1.2	Polimorfizmi u <i>IL10</i> genu	28
1.6.1.3	Polimorfizmi u <i>IL12B</i> i <i>IL23R</i> genima	30
1.6.1.4	Polimorfizmi u <i>MDR1</i> genu	31
1.6.2	ZNAČAJ ISPITIVANJA POLIMORFIZAMA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA U SRBIJI	33
<b>2</b>	<b>CILJEVI</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>DIZAJN STUDIJE</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>SELEKCIJA ISPITANIKA</b>	<b>37</b>
3.2.1	GRUPA PACIJENATA SA INFLAMATORNOM BOLESTI CREVA	37
3.2.2	KARAKTERISTIKE BOLESNIKA SA INFLAMATORNOM BOLESTI CREVA	37
3.2.3	LABORATORIJSKI PARAMETRI	38
3.2.4	KOPROLOŠKE ANALIZE	38
3.2.5	KLASIFIKACIJA INFLAMATORNE BOLESTI CREVA	38
3.2.6	KLINIČKI PARAMETRI AKTIVNOSTI BOLESTI	39
3.2.7	EKSTRACREVNNE MANIFESTACIJE I PRIDRUŽENE BOLESTI	41
3.2.8	PROCENA UHRANJENOSTI	41
3.2.9	KRITERIJUMI ISKLJUČENJA IZ STUDIJE	41
3.2.10	KONTROLNA GRUPA ISPITANIKA	42

<b>3.3 GENETSKA ISPITIVANJA.....</b>	<b>42</b>
3.3.1 UZIMANJE KRVI.....	42
3.3.2 IZOLACIJA DNK.....	42
3.3.3 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I ČISTOĆE IZOLOVANE DNK.....	43
3.3.4 DETEKCIJA I ANALIZA POLIMORFIZAMA GENA REAKCIJOM LANČANOG UMNOŽAVANJA U REALNOM VREMENU.....	43
<b>3.4 STATISTIČKA ANALIZA.....</b>	<b>44</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 PRIKAZ DEMOGRAFSKIH I KLINIČKIH KARAKTERISTIKA PACIJENATA .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 DISTRIBUCIJA POLIMORFIZAMA <i>TNFA</i>, <i>IL10</i>, <i>IL12B</i>, <i>IL23R</i> I <i>MDR1</i> GENA U ODNOSU NA HARDY-WEINBERG-OV MODEL RAVNOTEŽE.....</b>	<b>51</b>
<b>4.3 ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA <i>TNFA</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC .....</b>	<b>51</b>
4.3.1 DISTRIBUCIJA ALELA I GENOTIPOVA POLIMORFIZMA RS1800629 <i>TNFA</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC .....	52
4.3.2 KLINIČKI ZNAČAJ POLIMORFIZMA RS1800629 <i>TNFA</i> GENA KOD PACIJENATA SA KB, UK I IBC ....	52
<b>4.4 ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA <i>IL10</i> U GRUPI ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC .....</b>	<b>53</b>
4.4.1 DISTRIBUCIJA ALELA I GENOTIPOVA POLIMORFIZMA RS3024505 <i>IL10</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA UK, KB I IBC .....	54
4.4.2 DISTRIBUCIJA ALELA I GENOTIPOVA POLIMORFIZMA RS1800896 <i>IL10</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA UK, KB I IBC .....	55
4.4.3 DISTRIBUCIJA ALELA I GENOTIPOVA POLIMORFIZMA RS1800871 <i>IL10</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA UK, KB I IBC .....	56
4.4.4 DISTRIBUCIJA HAPLOTIPOVA I DIPLOTIPOVA POLIMORFIZAMA <i>IL10</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC .....	57
4.4.5 KLINIČKI ZNAČAJ ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA <i>IL10</i> GENA KOD PACIJENATA SA KB, UK I IBC .....	59
<b>4.5 ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA <i>IL12B</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC .....</b>	<b>60</b>
4.5.1 DISTRIBUCIJA ALELA I GENOTIPOVA POLIMORFIZMA RS6887695 <i>IL12B</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA UK, KB I IBC .....	60
4.5.2 KLINIČKI ZNAČAJ POLIMORFIZMA RS6887695 <i>IL12B</i> GENA KOD PACIJENATA SA KB, UK I IBC....	61
<b>4.6 ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA <i>IL23R</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC .....</b>	<b>62</b>
4.6.1 DISTRIBUCIJA ALELA I GENOTIPOVA POLIMORFIZMA RS11209026 <i>IL23R</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC .....	62
4.6.2 KLINIČKI ZNAČAJ POLIMORFIZMA RS11209026 <i>IL23R</i> GENA KOD PACIJENATA SA KB, UK I IBC.	63
<b>4.7 ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA <i>MDR1</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC .....</b>	<b>64</b>
4.7.1 DISTRIBUCIJA ALELA I GENOTIPOVA POLIMORFIZAMA <i>MDR1</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA UK, KB I IBC.....	64
4.7.1.1 Poređenje distribucije alela i genotipova polimorfizma rs1128503 <i>MDR1</i> gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KB, UK i IBC.....	64
4.7.1.2 Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs2032582 <i>MDR1</i> gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KB, UK i IBC .....	66
4.7.1.3 Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs1045642 <i>MDR1</i> gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KB, UK i IBC .....	66
4.7.2 POREĐENJE UČESTALOST NOSIOCA ALELA POLIMORFIZAMA <i>MDR1</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC .....	67
4.7.3 DISTRIBUCIJA HAPLOTIPOVA I DIPLOTIPOVA POLIMORFIZAMA <i>MDR1</i> GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC .....	67

4.7.4	KLINIČKI ZNAČAJ ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA <i>MDR1</i> GENA KOD PACIJENATA SA KB, UK I IBC..	69
<b>4.8</b>	<b>POREĐENJE RASPODELE ALELA POLIMORFIZAMA <i>IL10</i>, <i>IL12B</i>, <i>IL23R</i> I <i>MDR1</i> GENA KOD ZDRAVIH OSOBA U SRBIJI SA DRUGIM POPULACIJAMA</b>	<b>70</b>
4.8.1	POREĐENJE RASPODELE ALELA POLIMORFIZAMA <i>IL10</i> GENA KOD ZDRAVIH OSOBA U SRBIJI SA DRUGIM POPULACIJAMA	71
4.8.1.1	Poređenje raspodele alela polimorfizma rs3024505 <i>IL12B</i> gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama	71
4.8.1.2	Poređenje raspodele alela polimorfizma rs1800896 <i>IL10</i> gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama	71
4.8.1.3	Poređenje raspodele alela polimorfizma rs1800871 <i>IL10</i> gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama	72
4.8.2	POREĐENJE RASPODELE ALELA POLIMORFIZMA RS6887695 <i>IL12B</i> GENA KOD ZDRAVIH OSOBA U SRBIJI SA DRUGIM POPULACIJAMA	73
4.8.3	POREĐENJE RASPODELE ALELA POLIMORFIZMA RS11209026 <i>IL23R</i> GENA KOD ZDRAVIH OSOBA U SRBIJI SA DRUGIM POPULACIJAMA	73
4.8.4	POREĐENJE RASPODELE ALELA POLIMORFIZAMA <i>MDR1</i> GENA KOD ZDRAVIH OSOBA U SRBIJI SA DRUGIM POPULACIJAMA	74
4.8.4.1	Poređenje raspodele alela polimorfizma rs1128503 <i>MDR1</i> gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama	74
4.8.4.2	Poređenje raspodele alela polimorfizma rs2032582 <i>MDR1</i> gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama	75
4.8.4.3	Poređenje raspodele alela polimorfizma rs1045642 <i>MDR1</i> gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama	75
<b>5</b>	<b>DISKUSIJA</b>	<b>78</b>
<b>5.1</b>	<b>EPIDEMIOLOŠKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE PACIJENATA SA INFLAMATORNOM BOLESTI CREVA</b>	<b>79</b>
<b>5.2</b>	<b>ZNAČAJ POLIMORFIZMA RS1800629 <i>TNFA</i> GENA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA</b>	<b>83</b>
<b>5.3</b>	<b>ZNAČAJ POLIMORFIZAMA <i>IL10</i> GENA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA</b>	<b>85</b>
<b>5.4</b>	<b>ZNAČAJ POLIMORFIZMA RS6887695 <i>IL12B</i> GENA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA</b>	<b>90</b>
<b>5.5</b>	<b>ZNAČAJ POLIMORFIZMA RS11209026 <i>IL23R</i> GENA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA</b>	<b>93</b>
<b>5.6</b>	<b>ZNAČAJ POLIMORFIZAMA <i>MDR1</i> GENA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA</b>	<b>98</b>
<b>5.7</b>	<b>ZNAČAJ I OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>110</b>

# ***1. Uvod***

---

## **1.1 DEFINICIJA INFLAMATORNE BOLESTI CREVA**

Inflamatorna bolest creva (IBC) predstavlja heterogenu grupu bolesti hroničnog toka i nepoznate etiologije koja se karakteriše ponavljanim epizodama inflamacije u gastrointestinalnom traktu (GIT). Dva glavna klinička oblika IBC su ulcerozni kolitis (UK) i Kronova bolest (KB) [1]. Ulcerozni kolitis je bolest koja dovodi do hronične inflamacije mukoze kolona, zahvata rektum i proksimalne delove kolona u kontinuitetu do različitih nivoa i karakteriše se remisijama i relapsima bolesti [2]. Kronova bolest je hronična transmuralna bolest koja se karakteriše postojanjem lezija „na preskok“ i može da zahvati različite delove digestivnog trakta od usne duplje do anusa [3]. I pored detaljne dijagnostičke procedure, u nekim slučajevima kod pacijenta sa IBC nije moguće odrediti da li se radi o UK ili KB. Ovakva stanja se nazivaju neklasifikovani kolitisi (N-IBC) [4]. Učestalost neklasifikovanih kolitisa kod odraslih iznosi od 10% do 15% slučajeva, dok je neklasifikovana bolest kod dece češće prisutna, u čak 25% do 30% slučajeva [5]. Pored termina neklasifikovani kolitis, u upotrebi je i naziv nedeterminisani kolitis, ali je to prevažodno patohistološki termin rezervisan za patologe koji se koristi u situacijama kada biopsijski uzorci kolona imaju karakteristike i UK i KB („overlap“ ili preklapajuće karakteristike) [6].

## **1.2 EPIDEMIOLOGIJA INFLAMATORNE BOLESTI CREVA**

I pored značajnog napretka u utvrđivanju etiopatogeneze bolesti i novim terapijskim mogućnostima lečenja, uzrok nastanka IBC i dalje ostaje nepoznat. Takođe, do danas ne postoji mogućnost prevencije ove bolesti, kao ni kompletno izlečenje. Zbog toga IBC ima veliki medicinski značaj i predstavlja veliki zdravstveni problem u svetu.

Prevalenca (statistički pojam kojim se u epidemiologiji izražava broj obolelih na 100.000 ili 1.000.000 stanovnika) i incidenca (broj novoobolelih osoba na 100.000 ili 1.000.000 stanovnika) IBC varira između različitih etničkih populacija i unutar različitih geografskih područja. Tako se najviše stope incidence i prevalence IBC javljaju u zemljama severne Evrope, Velikoj Britaniji i Severnoj Americi [7]. Naročito je zabrinjavajući podatak da je incidenca IBC poslednjih decenija u značajnom porastu širom sveta, uključujući i zemlje koje su do skora smatrane zemljama niskog rizika sa malom incidencom, kao što su Indija i Japan [8].

U Sjedinjenim Američkim državama (SAD), prema poslednjim podacima, od IBC boluje od 1 do 1,5 miliona ljudi [8, 9], pri čemu je prevalenca UK veća nego prevalenca KB i iznosi 38-249/100.000 za UK u odnosu na 26-199/100.000 odraslih stanovnika za KB. Prema epidemiološkim podacima u Evropi od IBC boluje 2,2 miliona ljudi, od čega oko 1 milion ima dijagnozu KB [8]. U Evropi prevalenca IBC veoma varira, i za UK iznosi 5-505/100.000, a prevalenca KB iznosi 8-214/100.000 stanovnika u zavisnosti od zemlje, odnosno regiona [10, 11].

Pouzdana podaci o učestalosti IBC u našoj zemlji do danas ne postoje. Prvi epidemiološki podaci o IBC su objavljeni u studiji praćenja koja je obuhvatila 980 pacijenata sa IBC (49% KB i 51% UK) u periodu od 10 godina, iz jedne Univerzitetske Klinike u Beogradu (KBC Zvezdara) [12]. Potom je objavljena i prva epidemiološka nacionalna studija iz Srbije koja je registrovala 1017 pacijenata (454 pacijenata sa KB, odnosno 45% i 563 sa UK, odnosno 55%) u periodu praćenja od jedne godine [13]. Iako ne postoje potpuni podaci o incidenci i prevalenci IBC u Srbiji, pretpostavlja se da su njihovi nivoi uporedivi sa zemljama u okruženju. Tako, podaci dve populacione studije sprovedene u dva regiona u Hrvatskoj su pokazali da se incidenca UK kreće između 3,5 i 4,3/100.000, a KB između 1 i 7/100.000 stanovnika, što su nivoi koji su uporedivi sa drugim zemljama Evrope i nalaze se negde između nivoa koji se sreću u razvijenim zemljama i onih u zemljama u razvoju [14, 15]. Navedni podaci ukazuju da je incidenca UK nešto veća u odnosu na KB kod nas i u većini zemalja (osim u Kanadi i nekim zemljama Evrope), mada u poslednjih 50 godina na svetskom nivou postoji trend promene distribucije ove dve forme IBC [16-19]. Tako je praćenje prevalencije IBC u Minesoti (SAD) tokom više desetina godina pokazalo kontinuirani porast prevalencije UK do 1991. godine, posle čega je usledio pad, dok je u istom području prevalenca KB konstantno rasla tokom navedenog perioda [20, 21]. Sličan epidemiološki trend bolesti je zabeležen i u severnoj Francuskoj [22], dok se u drugim područjima Evrope kao što su Švedska, Nemačka, Italija, Danska i Škotska, beleži konstantan porast oboljevanja od UK [10]. Osim u zemljama Evrope i Severne Amerike, uočen je porast incidence IBC i u zemljama koje su ranije imale veoma malu učestalost IBC kao što su Južna Koreja, Kina, Indija i Severna Afrika [23-25]. Tako je u Japanu tokom poslednjih godina uočen porast prevalencije KB, dok je u Južnoj Koreji naročito značajan porast zabeležen kod obolelih od UK [23]. Epidemiološki podaci jasno pokazuju da višu prevalencu IBC imaju sredine sa višim stepenom socioekonomskog razvoja nego nerazvijeni delovi sveta, odnosno zemlje u razvoju, kao i osobe iz viših socioekonomskih slojeva u odnosu na one koji pripadaju



nižim slojevima [26]. Međutim, postoje i istraživanja u kojima je pokazano da su UK i KB manje zastupljene u slojevima društva sa višim obrazovanjem i boljim materijalnim uslovima [27]. Ovakve razlike sugerišu da je urbanizacija potencijalni faktor koji doprinosi nastanku bolesti. Prema ovoj hipotezi, promene u načinu ishrane u zapadnim kulturama, higijenske navike, upotreba lekova, zagađenost sredine i industrijalizacija predstavljaju moguće faktore rizika za nastanak IBC. U brojnim studijama je ispitivana povezanost različitih faktora sredine kao što su način ishrane, higijenske navike, perinatalne infekcije, upotreba antibiotika, korišćenje oralnih kontraceptiva, intestinalna kolonizacija ili infekcije atipičnim mikobakterijama, ali za sada nema jasnih dokaza o njihovoj povezanosti sa IBC [28, 29]. Naročito je interesantna udruženost pušenja sa IBC, pri čemu je poznato da pušenje utiče na UK i KB na različite načine: dok se UK češće javlja kod nepušača ili bivših pušača, KB je zastupljenija i ima komplikovaniji tok kod pušača [1, 8, 30].

IBC se najčešće javlja u trećoj i četvrtoj deceniji života, mada se može javiti u bilo kom životnom dobu. Pri tome, i u vremenu pojave bolesti postoje razlike između UK i KB. UK se češće javlja između tridesete i četrdesete godine života, dok KB nastaje ranije, između dvadesete i tridesete godine života. Drugi „pik“, odnosno starosna dob povećanog rizika od oboljevanja od IBC, javlja se u sedmoj deceniji, između 60. i 70. godine života. UK se češće javlja kod muškaraca (60%), dok je KB više zastupljena kod osoba ženskog pola. Veća zastupljenost KB kod žena, uočena je u razvijenim zemljama na severu Evrope i u Severnoj Americi, dok je ujednačena incidenca javljanja KB zabeležena u pojedinim zemljama u razvoju [20, 23, 31, 32].

Oboleli od KB imaju nešto veći mortalitet u odnosu na opštu populaciju, mada je mortalitet od KB neznatno u padu u poslednjih 30 godina [33]. Smrtnost u KB je najčešće udružena sa komplikacijama bolesti kao što su postoperativne komplikacije, pothranjenost i infekcije. Iako mortalitet u UK nije veći u odnosu na opštu populaciju, postoji povećan mortalitet kod pacijenata sa ekstenzivnom formom bolesti, kao i kod bolesnika sa dugotrajnim tokom bolesti zbog rizika od nastanka karcinoma debelog creva. I pored navedenog, danas je ukupni mortalitet od IBC nizak i iznosi manje od 1% [34].

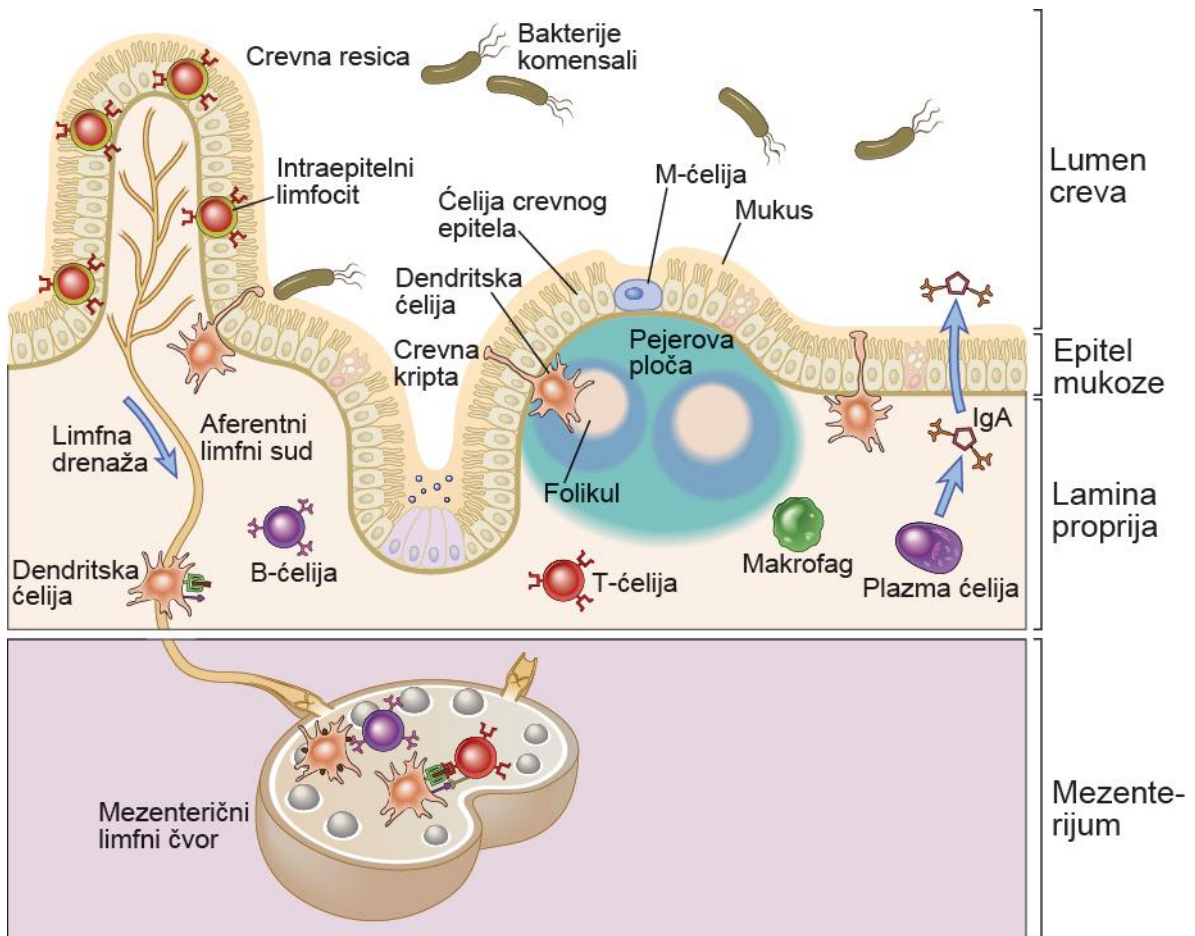
### 1.3 ETIOLOGIJA I PATOGENEZA INFLAMATORNE BOLESTI CREVA

Etiologija i patogeneza IBC su do danas nedovoljno razjašnjene. Na osnovu dosadašnjih saznanja pretpostavlja se da se radi o multifaktorskoj bolesti u kojoj, kod genetski predisponirane osobe, pod uticajem određenih faktora sredine dolazi do neadekvatnog imunskog odgovora na mikroorganizme koji nastanjuju gastrointestinalni trakt (tzv. crevnu mikrofloru ili mikrobiotu) što dovodi do zapaljenja i posledičnog oštećenja creva [35]. Tradicionalno se smatra da stečena imunost ima glavnu ulogu u patogenezi IBC, ali rezultati istraživanja poslednjih godina ukazuju da je i urođeni imunski odgovor veoma važan i da poremećaji u funkcionisanju epitelne barijere creva doprinose patogenezi UK, dok su neadekvatna produkcija antimikrobnih peptida i poremećaji u prepoznavanju mikroorganizama i autofagiji povezani sa razvojem KB. Nedavno otkriće i bolja karakterizacija novih subpopulacija T-limfocita, prevažodno Th17 ćelija i regulatornih T-ćelija (Treg ćelija), menja sliku i o učešću stečene imunosti u patogenezi IBC.

#### 1.3.1 Imunski sistem mukoze creva

S obzirom na svoju veličinu i građu, gastrointestinalni trakt predstavlja verovatno najsloženiji i najsofisticiraniji imunski organ u ljudskom organizmu. Smatra se da se veliki deo (i do jedne četvrtine) limfocita u svakom trenutku nalazi u GIT-u [36]. Imunski sistem mukoze creva ili GALT (*engl.* gut-associated lymphoid tissue, GALT) je deo mukoznog imunskog sistema čoveka ili MALT-a (*engl.* mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) koji predstavlja nakupine imunskih i drugih tipova ćelija u sluzokožama respiratornog, urogenitalnog i gastrointestinalnog trakta (Pejerove ploče u ileumu). Mukoza digestivnog trakta je konstantno izložena različitim antigenima koji potiču iz hrane ili od bakterija i drugih mikroorganizama crevne mikrobiote. Nasuprot komensalnim bakterijama, u lumenu creva se mogu naći i patogene bakterije koje mogu dovesti do njegovog oštećenja. Stoga epitelijalna barijera creva zajedno sa imunskim sistemom creva ima veoma složenu ulogu da efikasnim imunskim odgovorom spreči potencijalno oštećenje izazvano patogenim bakterijama, a da, istovremeno, prepozna „dobre bakterije“ i neškodljive antigene poreklom iz hrane i ne reaguje na njih (razvije toleranciju).

**Slika 1: Imunski sistem mukoze creva** (Preuzeto iz [37])



U lamini propriji digestivnog trakta nalazi se složena populacija imunskih ćelija koje imaju ulogu u održavanju homeostaze na nivou intestinalne mukoze (Slika 1). U mukozi se nalaze različite populacije limfocita, koje pored „klasičnih“ T i B-limfocita i plazma ćelija koje proizvode antitela (prevažno IgA klase), uključuju i limfocite sa ograničenom raznolikošću receptora, kao što su B-1 ćelije,  $\gamma\delta$  T-ćelije ili NKT ćelije [37]. Takođe u lamini propriji se nalazi mnoštvo antigen-prezentujućih ćelija (APC), pre svega makrofaga i dendritskih ćelija, kao i nedavno otkrivene urođene limfoidne ćelije (*engl.* innate lymphoid cells, ILC) za koje se pretpostavlja da imaju važnu ulogu u odbrani od patogena, ali se dovode u vezu i sa različitim bolestima, uključujući i IBC. Mnoge od tih ćelija su važne za ravnotežu između nereagovanja (tolerancije) na normalno prisutnu luminalnu crevnu mikrofloru i odbrane od patogena, odnosno luminalne mikrobiote, u slučaju njihovog ekscesivnog prodora. Urođeni imunski odgovor usmeren na luminalne mikrobiote je precizno regulisan, i od te regulacije zavisi da li će imunski odgovor ići u pravcu imunološke tolerancije ili aktivacije. Poremećaji u ravnoteži ovog složenog

specijalizovanog imunskog sistema digestivnog trakta dovodi do aberantnog imunskog odgovora i posledične hronične inflamacije kakva postoji u IBC [36].

### **1.3.2 Uloga crevna mikrobiote u inflamatornoj bolesti creva**

Crevna mikroflora ili crevna mikrobiota podrazumeva sve mikroorganizme koji nastanjuju digestivni trakt čoveka. Humani digestivni trakt zauzima veliku površinu od približno 200 do 400 m<sup>2</sup>. Procenjuje se da lumen GIT-a nastanjuje oko 100 triliona ćelija različitih mikroorganizama. Komensalni mikroorganizmi imaju brojne, veoma važne metaboličke funkcije koje su esencijalne za domaćina. Oni, između ostalog, učestvuju u metabolizmu nesvarenih sastojaka hrane i imaju važnu ulogu u proizvodnji vitamina. Međutim, kada dođe do poremećaja ovog kompleksnog ekosistema, komensalni mikroorganizmi mogu da postanu agresivni patogeni i da dovedu do brojnih bolesti [38]. Crevna mikrobiota nastaje na rođenju, ali se intenzivno menja i formira u toku prve godine života. Postoje individualne razlike u sastavu mikrobiote i svaka odrasla osoba ima svoju jedinstvenu populaciju crevnih mikroorganizama koja je stabilna tokom vremena, ali se može promeniti pod uticajem određenih spoljašnjih faktora ili nekih bolesti [39-41].

Brojna istraživanja ukazuju na značaj crevne mikroflore u nastanku IBC. Tako su epidemiološke kohortne studije pokazale da se IBC ređe javlja unutar višočlanih porodica sa većim brojem dece, kao i kod osoba koje su u ranom detinjstvu bile u kontaktu sa kućnim ljubimcima i domaćim životinjama, odnosno kod onih koja su živela u seoskim domaćinstvima [42-44]. Poznato je da navedeni faktori predstavljaju važne determinante koje mogu da utiču na formiranje crevne mikroflore kod odraslih, što ukazuje na to da bi crevna mikrobiota mogla da ima značajnu ulogu u patogenezi IBC. Na osnovu navedenog, može se pretpostaviti da izlaganje mikroorganizmima rano u životu ima protektivnu ulogu i smanjuje rizik za razvoj mnogih bolesti posredovanih imunskim mehanizmima, uključujući i IBC. Suprotno tome, poremećaj u sastavu mikrobiote usled smanjene izloženosti mikroorganizmima može da bude predisponirajući faktor za razvoj IBC, što čini osnov tzv. „Higijenske hipoteze“. Pokazano je da pacijenti sa IBC češće imaju poremećenu crevnu floru (disbiozu) u odnosu na zdrave osobe, što se naročito manifestuje kao smanjen diverzitet mikrobiote. Poremećaj crevne flore je više izražen u KB nego u UK [45-47]. Iako su brojni crevni patogeni ispitivani kao potencijalni uzročnici nastanka IBC, do danas nije potvrđena uloga nijednog od njih kao direktnog uzročnika IBC. Moguće je da su antigeni mikroorganizama koji su normalno prisutni u lumenu creva pokretači

inflamacije u digestivnim traktu kod osoba sa IBC. Tako se adherentno-invazivna *Escherichia coli* (*engl. adherent-invasive Escherichia coli* AIEC) dovodi u vezu sa nastankom KB, jer je primećeno njeno češće prisustvo u ileumu osoba sa KB (kod 22%), u odnosu na zdravu populaciju kod koje je ova bakterija izolovana u oko 6% ispitanika [48]. Suprotno, neke studije su potvrdile protektivno dejstvo određenih bakterija za nastanak IBC. Tako osobe sa UK i KB imaju manju raznolikost ili smanjeno prisustvo bakterija koje pripadaju filumu (tipu, razdelu) *Firmicutes*, odnosno *Bacteroides* [28, 45, 49]. Kod miševa je pokazano da ove bakterije imaju antiinflamatorni efekat, koji ostvaruju tako što povećavaju nivo interleukina (IL)-10 a smanjuju nivo IL-17 [49-51]. Da li ovakve promene doprinose nastanku IBC ili su više posledica inflamacije, za sada ostaje nepoznato.

### **1.3.3 Uloga epitela gastrointestinalnog trakta u inflamatornoj bolesti creva**

Epitel GIT-a čini barijeru između crevne mikrobiote i limfnog tkiva digestivnog sistema i ima veoma važnu ulogu u modelovanju imunskog odgovora. Sa jedne strane on treba da prepozna patogene dospele ingestijom i pokrene mehanizme odbrane, a sa druge strane, treba da ne reaguje na ogroman broj korisnih komensalnih mikroorganizama prisutnih u crevu. Čelije crevnog epitela predstavljaju fizičku barijeru koja štiti od prodora bakterija i drugih antigena iz lumena creva u cirkulaciju. Intaktna mukozna barijera podrazumeva postojanje čvrstih intercelularnih veza koje sprečavaju propustljivost između epitelnih ćelija (paracelularni prostor), u čemu ključnu ulogu imaju uske veze (*engl. tight junctions*) [52]. Smatra se da u IBC, paracelularni prostor ima poremećenu regulaciju uskih veza i povećanu propustljivost. Ovi poremećaji mogu da budu posledica primarnog funkcionalnog defekta barijere ili mogu da nastanu kao posledica inflamacije [53]. Pored navedenog, specijalizovane epitelne ćelije digestivnog trakta, kao što su peharaste i Panetove ćelije, imaju takođe važnu odbrambenu ulogu u zaštiti od crevnih bakterija. Peharaste ćelije stvaraju mukus i druge faktore koji učestvuju u regulaciji zapaljenja i čine reparatorne mehanizme sluznice. Crevni mukus formira mukusni matriks koji oblaže sluznicu i sprečava kontakt između bakterija i epitelnih ćelija i time vrši prevenciju invazije mikroorganizama čineći prvu liniju odbrane od mikroorganizama [54, 55]. Panetove ćelije su intestinalne epitelne ćelije koje imaju važnu ulogu u homeostazi mukusa. Smatra se da poremećaj njihove funkcije može da dovede do nastanka IBC [35, 56]. Panetove ćelije se nalaze u crevnim kriptama i luče antimikrobne peptide ( $\alpha$ -defenzine), sekretuju adenzin-monofosfat (AMP) i brojne važne inflamatorne medijatore.

Poremećaj funkcije Panetovih ćelija je udružen i sa genetskim poremećajima uključujući i poremećaj u genu *NOD2*. *NOD2* kodira NOD-2 receptor koji pripada receptorima za prepoznavanje molekulskih obrazaca mikroorganizama. Pokazano je da određeni polimorfizmi u *NOD2* genu mogu biti udruženi sa pojavom IBC [57]. Pored Panetovih ćelija, NOD-2 receptor je eksprimiran i u drugim tipovima ćelija koje učestvuju u primarnom imunskom odgovoru kao što su makrofagi i dendritske ćelije. Izgleda da osim *NOD2* i poremećaji u procesu autofagije i stres na nivou endoplazmatskog retikuluma takođe doprinose razvoju IBC i da svi navedeni poremećaji mogu da budu prisutni u Panetovim ćelijama [58, 59]. Kao što je ranije pomenuto, u patogenezi IBC takođe je važna i uloga određenih bakterija koji čine deo mikrobiote, mada one same po sebi nisu dovoljne da bi se pokrenuli patološki mehanizmi u nastanku IBC [58]. U IBC, inflamatorni odgovor često dovodi do segmentnog ili kontinuiranog oštećenja sluznice i nastanka erozija i ulceracija. Ovako oštećena sluznica više je izložena crevnoj mikroflori, što dalje podstiče inflamatorni odgovor [60, 61]. Ipak, zahvaljujući izraženoj regenerativnoj sposobnosti sluznice digestivnog trakta, dolazi i do reparacije oštećenog epitela nastalog usled zapaljenja.

#### **1.3.4 Uloga crevne vaskularizacije u inflamatornoj bolesti creva**

Intestinalna vaskularizacija održava adekvatni protok krvi u zidu creva i reguliše ulazak leukocita u crevni zid i lumen creva. Prelazak ovih ćelija iz krvi u crevni zid posredovan je adhezivnim molekulima (najčešće iz grupe selektina i integrina) i hemokinima, tj. citokinima koji usmeravaju kretanje leukocita i drugih ćelija. Tako, odlazak T-ćelija u mezenterijalne limfne čvorove i Pajerove ploče zavisi od ekspresije  $\alpha 4\beta 7$  integrina na T-limfocitima, koji reaguje sa ligandima prisutnim na venulama sa visokim endotelom u mukoznom limfnom tkivu. T-limfociti koji imaju afinitet za creva takođe eksprimiraju hemokinski receptor CCR9 koji reaguje sa hemokinom CCL25 kojeg proizvode ćelije epitela creva, a taj proces je pod uticajem retinoične kiseline [62, 63]. Relativna specifičnost u migraciji ćelija u zid creva je u današnje vreme osnova brojnih novih istraživanja sa ciljem da se otkriju molekuli koji će blokirati ovu kaskadu i na taj način predstavljati osnov terapije IBC.

Akumulacija leukocita u crevnom zidu je važna karakteristika IBC. Adherencija leukocita i njihova mobilizacija je povećana u malim krvnim sudovima i delimično je posredovana ushodnom regulacijom adhezivnih molekula na vaskularnom endotelu ćelija,

što se dešava pod uticajem proinflammatoryh citokina, pre svega faktora nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor, TNF) i IL-1 $\beta$ . Takođe, povišen nivo proinflammatoryh hemokina u tkivu podstiče migraciju leukocita. Smatra se da poremećaji u funkciji mikrocirkulacije doprinose zapaljenju, ishemiji i neadekvatnom zaceljenju mukoze u IBC [64].

### **1.3.5 Uloga imunskih mehanizama u inflamatornoj bolesti creva**

Tokom prethodne dve decenije, imunološka istraživanja potpomognuta genetskim studijama značajno su doprinela rasvetljavanju patogeneze IBC i razjašnjenju imunskih mehanizama uključenih u razvoj bolesti. Danas je jasno da poremećaji i na nivou urođenog imunskog odgovora i na nivou stečene imunosti dovode do hronične inflamacije u crevima, oštećenja mukoze i razvoja IBC, mada veoma kompleksna povezanost između urođenog i stečenog imunskog odgovora koja se tom prilikom ostvaruje još nije u potpunosti rasvetljena [65]. Prema savremenim saznanjima, u aktivnoj fazi IBC aktivira se urođeni imunski odgovor i dolazi do pokretanja zapaljenja i infiltracije lamine proprije imunskim ćelijama kao što su neutrofil i makrofagi. Potom sledi aktivacija ćelija stečene imunosti (T i B-limfocita) i njihove diferencijacije u efektorske ćelije koje naknadno odlaze u mukoza creva. Na ovakav način, dolazi do akumulacije velikog broja aktiviranih imunskih ćelija u mukozu creva i lokalnog povećanja proinflammatoryh citokina, pre svega TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , interferona- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i citokina IL-23/Th17 osovine važne za nastanak Th17 ćelija, što za posledicu ima pojačavanje i produžavanje inflamatornog procesa i oštećenje integriteta creva [37, 66]. Kao što je već ranije pomenuto, dugo je prihvatana hipoteza da glavnu ulogu u patogenezi IBC ima stečeni imunski odgovor i da je u KB, inflamacija posredovana Th1 imunskim odgovorom, dok ključnu ulogu u UK ima Th2 odgovor [67]. Nedavno je pokazano da veoma važnu ulogu u patogenezi IBC ima i Th17 subpopulacija T-ćelija, koja ima izrazit inflamatorni potencijal i za čiju funkciju je neophodan IL-23, citokin kojeg proizvode APC [65].

#### **1.3.5.1 Uloga urođene imunosti u inflamatornoj bolesti creva**

Urođeni imunski odgovor predstavlja prvu liniju odbrane od patogena i on obezbeđuje inicijalni odgovor na infektivne agense. On se značajno razlikuje u odnosu na stečeni imunski odgovor, pre svega zato što je nespecifičan i ne obezbeđuje dugotrajan imunitet (tj. nema memoriju). Komponente urođene imunosti, između ostalog, čine

epitelne barijere, fagociti (neutrofili, monociti/makrofagi), dendritske ćelije, mastociti, urođenoubilačke, odnosno NK ćelije (*engl.* natural killer cells, NK) i druge ćelije, kao i različiti citokini koje one proizvode. Urođeni imunski sistem prepoznaje strukture koje su zajedničke za različite klase mikroorganizama (pri čemu ih nema u/na normalnim ćelijama domaćina), kao što su komponente ćelijskog zida različitih vrsta bakterija ili nukleinske kiseline virusa. Te strukture se zajednički nazivaju molekulski obrasci patogena (*engl.* pathogen-associated molecular patterns, PAMP) i njih prepoznaju receptori na ćelijama urođene imunosti, odnosno receptori za prepoznavanje obrazaca (*engl.* pattern recognition receptors, PRR). PRR su receptori slični Tollu (*engl.* Toll-like receptors, TLR), koji se nalaze na plazma ili endozomalnoj membrani, kao i intracitoplazmatski receptori koji uključuju receptore slične NOD-u (*engl.* NOD-like receptors, NLR; nucleotid oligomerization domain, NOD). Ti receptori se nalaze na makrofagima, dendritskim ćelijama, ali i neimunskim ćelijama kao što su epitelne ćelije i miofibroblasti i oni posreduju u aktivaciji urođenog imunskog odgovora od strane mikrobnih antigena. Familiju NOD receptora čine intracelularni proteini odgovorni za vezivanje peptidoglikana koji sačinjavaju važnu komponentu ćelijskog zida bakterije. PRR signalna kaskada dovodi do aktivacije nuklearnog faktora- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) i produkcije proinflamatornih medijatora koji obezbeđuju efikasan urođeni odgovor na patogene. Započinjanje brzog i efikasnog inflamatornog odgovora dovodi do zapaljenja i fagocitoze i posledičnog uništavanja mikroorganizama, kao i stimulisanja stečenog imunskog odgovora [37]. PRR takođe dovode do sazrevanja APC, prevažno dendritskih ćelija, koje imaju ključnu ulogu u aktivaciji T-ćelija i povezivanju urođenog i stečenog imunskog odgovora. TLR prepoznaje PAMP koji su lokalizovani bilo ekstracelularno ili u intracelularnim vezikulama, kao što su endozomi. NLR porodica, koja uključuje NOD1 i NOD2, prepoznaje PAMP u citoplazmi, pri čemu NOD2 predstavlja prvi dokazan gen koji je doveden u vezu sa povećanim rizikom za nastanak KB [68]. Autofagija predstavlja evolutivno konzerviran ćelijski proces, koji najčešće nastaje u odgovoru na stres ili gladovanje ćelije sa ciljem da se ponovo iskoriste ključni ćelijski proteini i amino kiseline. Autofagija je uključena i u odbranu od patogena, kao što je ubijanje intracelularnih bakterija. Svi ovi procesi su međusobno povezani, tako da stimulacija putem TLR ili NOD2 može da dovede do autofagije [69]. Kako bi se održala ravnoteža u zidu creva, ovi različiti tipovi molekula i ćelija urođene imunosti imaju takođe ulogu i u razvoju mehanizama tolerancije. U tome je posebno važna nishodna regulacija ekspresije TLR i drugih receptora za mikroorganizme na dendritskim ćelijama, makrofagima i ćelijama parenhima, što sprečava dalju produkciju inflamatornih citokina



kao što su TNF i IL1. Na taj način se ograničava i aktivacija epitelnih ćelija creva na prisustvo luminalnih mikrobiota. Ovo nereagovanje na sopstvene antigene naziva se imunološka tolerancija, a odnosi se na sposobnost imunskog sistema da toleriše sopstvene, potencijalno antigene supstance, kao što su luminalne mikrobiote [37, 70].

U IBC, patogenetski proces počinje aktivacijom APC mukoznog imunskog sistema (makrofaga i dendritskih ćelija) najverovatnije zbog narušenog integriteta i povećane propustljivosti epitelne barijere creva ili neadekvatnog preuzimanja i prezentacije antigena iz lumena creva (npr. antigena komensalne flore) zbog poremećaja na nivou pomenutih receptora za prepoznavanje molekularnih obrazaca patogena, izmenjene autofagije ili usled stresa na nivou endoplazmatskog retikuluma [70, 71]. Aktivirane APC dovode do produkcije TNF, IL1 i drugih proinflamatornih citokina, pokretanja procesa zapaljenja i adhezije inflamatornih ćelija sa posledičnim oštećenjem sluznice digestivnog trakta. Dendritske ćelije, kao profesionalne APC, kroz aktivaciju T-limfocita i nastanak efektorskih ćelija (naročito pomoćničkih CD4<sup>+</sup> T-ćelija, odnosno Th ćelija) pokreću stečeni imunski odgovor koji dovodi do pojačavanja i održavanja crevne inflamacije u IBC [54, 72].

Kod zdravih osoba, intestinalni makrofagi se karakterišu nedostatkom ekspresije CD14 i u velikoj meri su refraktarni na inflamatorne stimulse crevne mikrobiote, iako zadržavaju sposobnost fagocitoze i odbrambene funkcije. CD14<sup>-</sup> makrofagi u lamini propriji doprinose zaštiti od invazivnih patogena, dok u isto vreme sprečavaju ekscesan imunski odgovor na sopstvenu mikrobiotu. Međutim u KB, pored ove, prisutna je u povećanom broju i druga populacija makrofaga koja eksprimira CD14, ali i druge markere makrofaga (CD33, CD68) i dendritskih ćelija (CD205, CD209) i produkuje brojne proinflamatorne citokine kao što su IL23, TNF i IL6. Ovi CD 14<sup>+</sup> makrofagi doprinose da mononuklearne ćelije u lamini propriji stvaraju IFN- $\gamma$ , a u manjoj meri i IL17, pri čemu je za taj proces neophodno prisustvo TNF i IL-23 [73]. Sa druge strane, CD14<sup>-</sup> makrofagi imaju sposobnost da produkuju antiinflamatorne molekule kao što su IL-10 koji doprinosi diferencijaciji određenih populacija CD4<sup>+</sup> Treg ćelija i suprimiraju dendritske ćelije čija je aktivnost stimulirana Th1 i Th17 ćelijama [74, 75]. O Treg i Th17 ćelijama i njihovoj ulozi u IBC biće više reči u sledećem poglavlju.

Moguće je da u nastanku IBC imaju ulogu i „nekonvencionalne“ populacije T-ćelija koje po nekim karakteristikama liče na ćelije urođene imunosti i koje su brojne u mukozi creva, kao što su  $\gamma\delta$  T-ćelije i nepromenjive NKT ćelije (*engl.* invariant NKT cells,

iNKT). Takođe, sve je više podataka koji ukazuju da i nedavno otkrivene urođene limfoidne ćelije (ILC) mogu da doprinesu nastanku i održavanju inflamacije u IBC [65].

### 1.3.5.2 Uloga stečene imunosti u inflamatornoj bolesti creva

Za razliku od urođenog imunskog odgovora, stečeni imunski odgovor je visoko specifičan i u njemu izlaganje antigenu dovodi do složenog procesa diferencijacije T i B-limfocita i nastanka efektorskih i memorijskih ćelija, što za rezultat ima efikasnu odbranu i dugotrajni imunitet. Važna karakteristika stečenog imunskog odgovora je brz, snažan i efikasan odgovor na ponovno izlaganje istom antigenu, nastalog aktivacijom memorijskih limfocita koji predstavljaju dugoživeće ćelije nastale tokom primarnog imunskog odgovora. Ovaj fenomen se naziva imunološka memorija i karakteristična je za sekundarni imunski odgovor [37].

Ključnu ulogu u stečenom imunskom odgovoru imaju T-ćelije.  $CD4^+$  pomoćničke T-ćelije mogu da se diferenciraju u različite subpopulacije efektorskih ćelija (Th1, Th2 i Th17 ćelije), proizvode mnogobrojne citokine i obavljaju različite funkcije [37, 76]. Osnovna uloga Th1 ćelija je eliminacija intracelularnih patogena. Th2 ćelije imaju protektivnu ulogu protiv parazita iz grupe helminata, ali posreduju i u alergijskim reakcijama, dok Th17 ćelije učestvuju u uništavanju ekstraćelijskih bakterija i gljivica [77, 78]. Svaka od navednih subpopulacija Th ćelija produkuje veći broj citokina, pri čemu su neki od njih karakteristični samo za određenu subpopulaciju ćelija. Tako Th1 ćelije produkuju  $IFN-\gamma$ , Th2 ćelije IL-4, IL-5 i IL-13, a Th17 ćelije IL-17 i IL-22. Takođe, citokini imaju presudnu ulogu i u diferencijaciji različitih subpopulacija Th ćelija, pri čemu su za nastanak Th1 ćelija najvažniji IL-12 i  $IFN-\gamma$ , Th2 ćelija prevashodno IL-4, a Th17 ćelija faktor transformacije rasta (*engl.* transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ), IL-23 i drugi citokini [37, 77]. Pored važne uloge u odbrani organizma od patogena, pomoćničke T-ćelije imaju značajnu ulogu i nastanku mnogih bolesti, kao što su autoimunske i hronične inflamatorne bolesti. U njima abnormalan T-ćelijski odgovor može dovesti do inflamacije i ekscesivnog oslobađanja citokina i hemokina koji potom imaju multiple patološke efekte na komponente i urođenog i stečenog imunskog sistema.

Postoje brojni dokazi koji potvrđuju ulogu T-ćelija, posebno  $CD4^+$  T-ćelija i njihovih citokina u pokretanju i održavanju inflamacije mukoze creva u IBC.  $CD4^+$  T-limfociti odgovaraju na antigen i kostimulaciju diferencijacijom u prethodno pomenute efektorske subpopulacije koje sekretuju brojne citokine. Ovi citokini mogu da imaju

različite funkcije u digestivnom traktu. Kontinuirana regulacija ovih subpopulacija u crevnoj sluznici je odgovorna za imunološku homeostazu u zidu digestivnog trakta. Preterana aktivnost i ekspanzija ovih ćelija, ili smanjena aktivnost CD4<sup>+</sup> Treg ćelija može da bude odgovorna za inflamaciju u zidu creva. Citokini koji su oslobođeni od strane različitih T-ćelija predstavljaju centralne medijatore koji dovode do lezija u inflamiranoj mukozi kod pacijenata sa IBC. Tako, IFN- $\gamma$  kojeg proizvode Th1 ćelije, indukuje apoptozu enterocita i pokreće oslobađanje TNF aktivacijom makrofaga u mukozi. Takođe, Th1 ćelije predstavljaju važan izvor TNF, koji indirektno može da dovede do apoptoze enterocita. TNF povezuje urođeni i stečeni imunski odgovor i ima važnu ulogu u patogenezi IBC, što je i pokazano terapijskim efektima bioloških lekova koji blokiraju TNF [79].

Prema tradicionalnom konceptu patogeneze IBC, dugo se smatralo da Th1 ćelije i IFN- $\gamma$ , koji one proizvode, imaju presudnu ulogu u nastanku KB, dok se UK povezivao sa povećanom produkcijom IL-13 i Th2 ćelijama. Brojne studije su pokazale da abnormalan Th1 imunski odgovor, koji je podstaknut povećanjem nivoa IL-12 i IL-18 u mukozi, najverovatnije dovodi do inflamacije u KB [80-82], pri čemu aktivirane T-ćelije u mukozi proizvode veće količine IL-2 i IFN- $\gamma$  u KB nego u UK ili kod zdravih osoba [83]. Sa druge strane, kod pacijenata sa UK, atipične NKT ćelije oslobađaju veću količinu IL-13, citokina karaktersitičnog za Th2 ćelije, u odnosu na T-ćelije kod pacijenata sa KB ili zdravih ispitanika [84, 85]. Stoga je zaključeno da u KB preovlađuje Th1 imunski odgovor, a da je u UK dominantno prisutna inflamacija posredovana Th2 ćelijama, sa povećanom proizvodnjom IL-13 i IL-5 [86]. Međutim, poslednjih godina je ovakva Th1/Th2 paradigma dovedena u pitanje, obzirom da je pokazano na bioptatima sluznice *ex vivo* da je sekrecija IFN- $\gamma$  podjednako povećana kod obe bolesti, dok je na eksperimentalnim modelima dokazana i antiinflamatorna uloga IL-13 kod obe bolesti [86].

Nedavno otkriće Th17 ćelija postavilo je ove ćelije i njihove citokine (od kojih je najvažniji IL-17A, koji se često naziva IL-17) u centar patogenetskih zbivanja u IBC. Th17 ćelije predstavljaju subpopulaciju T-ćelija za čiji su nastanak potrebni IL-6 i TGF $\beta$ , dok je IL-23 neophodan za njihovo preživljavanje i funkciju [87]. Th17 ćelije proizvode veliku količinu IL-17 i IL-22, kao i IL-21, koji povećava ekspresiju receptora za IL-23 (IL23R), čime pojačava stvaranje ove subpopulacije pozitivnom povratnom spregom [87]. Identifikovane su i ćelije koje imaju zajedničke karakteristike dve subpopulacije, Th1/Th17 ćelije koje mogu da istovremeno proizvode i IFN- $\gamma$  i IL-17. Danas se smatra da sve subpopulacije Th ćelija (uključujući i Th1/Th17 ćelije) mogu da imaju određeni značaj u različitim formama IBC i da doprinose razvoju patološkog procesa. Tako je pokazano da

lamina proprija pacijenata sa IBC sadrži više Th17 i Th1/Th17 ćelija nego sluznica zdravih ispitanika [88], dok u sluznici creva kod KB pacijenata dolazi do povećanog stvaranja Th17 i Th1 citokina, odnosno IL-17, IFN- $\gamma$  i TNF [89]. U UK obično postoji povišen nivo IL-17 i Th2 citokina. Kao što je pomenuto, za razvoj i održavanje Th17 ćelija potrebni su citokini (prevashodno IL23) koje proizvode makrofagi i dendritske ćelije i izgleda da IL-23 ima centralnu ulogu i u funkciji Th17 ćelija u IBC. Na značaj IL23, i njegovu posebnu ulogu u povezivanju urođenog i stečenog imunskog odgovora u IBC, po prvi put su ukazale genetske studije koje su identifikovale različite polimorfizme u većem broju gena koji su uključeni u IL23/Th17 osovinu [90, 91]. Ove studije su pokazale prisustvo istih polimorfizama u genu za IL-23R (*IL23R*) i kod KB i kod UK, ukazujući na zajedničku vezu u patogenezi hronične intestinalne inflamacije u IBC. Pored navedenog, IL-23 može da utiče i na ćelije urođenog imunskog odgovora, kao što su prethodno pomenute  $\gamma\delta$  T-ćelije i ILC [92]. Drugi geni koji su takođe uključeni u ovu IL23/IL17 osovinu, jesu *IL12B*, koji kodira IL12B, odnosno protein p40 koji predstavlja zajedničku subjedinicu za IL-12 i IL-23, zatim geni koji kodiraju proteine uključene u prenos signala za različite citokine, kao što su STAT3 i JAK2 [90]. Međutim, iako se na osnovu ovakvih rezultata generalno smatra da IL-23 i Th17 ćelija imaju patološku ulogu, neuspeh terapije usmeren na blokadu IL17A kod pacijenata sa IBC govori o njenoj kompleksnoj i nedovoljno poznatoj ulozi koje možda podrazumeva i protektivan efekat [58].

Pored abnormalne aktivacije efektorskih mehanizama, zapaljenje u IBC je najverovatnije pokrenuto i defektima u antiinflamatornim procesima koji normalno inhibiraju i ograničavaju inflamaciju i stečeni imunski odgovor. Jedan od važnih regulatornih mehanizama, predstavljaju već pomenute Treg ćelije, koje mogu da inhibiraju aktivaciju i funkciju Th ćelija i koje imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze intestinalne mukoze [93]. Uloga Treg u održavanje homeostaze u crevima podrazumeva supresiju abnormalnog imunskog odgovora usmerenog na komensalnu floru ili antigene hrane. Njihova uloga se ostvaruje proizvodnjom antiinflamatornih citokina, kao što su IL-10 i TGF- $\beta$ , koje na taj način mogu da ograniče aktivaciju i efektornu funkciju T-ćelija i drugih imunskih ćelija u mukozi creva [94]. Neke studije su pokazale postojanje smanjenog broja Treg ćelija u perifernoj krvi pacijenata sa aktivnom IBC, u odnosu na pacijente koji su u remisiji, ili zdrave osobe [95, 96]. Nasuprot tome, druge studije su pokazale povećanu količinu Treg ćelija u intestinalnoj mukozi pacijenata sa IBC [97]. Međutim, izgleda da efektorske T-ćelije u lamini propriji pacijenata sa IBC ne reaguju na signale poreklom od Treg ćelija [98]. Smanjena antiinflamatorna aktivnost Treg ćelija

može da bude podjednako važna u patogenezi IBC kao i pojačanje efektivnih mehanizama. Takođe je pokazano da Treg ćelije mogu i da stimulišu ekspresiju IL-17, što je važno u hroničnoj inflamaciji mukoze. Pretpostavlja se da neadekvatna funkcija Treg ćelija ili preterana aktivnost i ekspanzija efektorskih T-ćelija (prevažodno Th1 i Th17 subpopulacija) u odnosu na Treg ćelije dovodi do intestinalne inflamacije [35, 58].

## **1.4 KLINIČKA PREZENTACIJA INFLAMATORNE BOLESTI CREVA**

Klinička prezentacija IBC zavisi od brojnih faktora kao što su lokalizacija bolesti, ekstenzivnost bolesti, fenotipske karakteristike, stepen aktivnosti bolesti kao i prisustvo ekstracrevnih manifestacija. Najčešći simptomi kod bolesnika sa KB su učestale stolice, bolovi u truhu, gubitak u telesnoj masi (TM), malapsorpcija i malnutricija. Često se javlja i povišena temperatura, malaksalost i krvavo-sluzave stolice, mada one više karakterišu UK nego KB. Kod pacijenata sa UK, najčešći simptomi su učestale krvavo-sluzave stolice, urgentnost pražnjenja, tenezmi i bolovi u truhu u vidu grčeva [2, 3].

### **1.4.1 Ekstracrevne manifestacije inflamatorne bolesti creva**

Ekstracrevne ili ekstraintestinalne manifestacije (EIM) bolesti su česte kod bolesnika sa UK i KB i javljaju se kod približno 35% pacijenata. EIM se mogu javiti isključivo u sklopu aktivne bolesti ili mogu biti prisutne nezavisno od toka bolesti. U aktivnoj fazi javljaju se zglobne manifestacije (kao što su periferni artritis i artralije), *eritema nodosum*, aftozne ulceracije u usnoj duplji, episkleritis, venske tromboze i tromboembolije. Uveitis, *pioderma gangrenosum*, „Sweet“ sindrom, ankilozirajući spondilitis, primarni sklerozirajući holangitis, osteoporoza i kardiopulmonalne bolesti predstavljaju pridružene manifestacije i komplikacije bolesti koje se javljaju nezavisno od aktivnosti IBC. Smatra se da su artralije i artritis najčešće EIM u IBC i prema nekim istraživanjima češće su prisutne kod pacijenata koji imaju zahvaćen kolon [3, 99]. U novije vreme često se opisuju i kožne manifestacije bolesti, kao što su psorijazni ekcem, ekcem i kseroze, a koje nastaju kao komplikacije anti-TNF terapije i prisutne su čak u 22% slučajeva pacijenata na biološkoj terapiji. Ove komplikacije se javljaju nezavisno od aktivnosti bolesti i primenjenog leka [3, 99].

### 1.4.2 Dijagnoza i diferencijalna dijagnoza inflamatorne bolesti creva

Dijagnoza IBC se postavlja na osnovu anamnestičkih podataka, kliničke slike, laboratorijskih analiza, gornje i donje endoskopije sa biopsijama sluznice i patohistološkom verifikacijom, kao i drugim metodama vizuelizacije (CT/MR enterokliza/enterografija, CT/MR abdomena i male karlice, endovideo kapsula). Kod pacijenata kod kojih se postavi dijagnoza IBC, neophodno je, zbog primene adekvatne terapije, da se definišu određene karakteristike UK ili KB, kao što su procena aktivnosti bolesti, lokalizacija, tip i ekstenzivnost bolesti. Za procenu ovih karakteristika UK i KB danas se najčešće upotrebljava Montrealska klasifikacija [100].

UK i KB imaju slične karakteristike sa mnogim drugim bolestima digestivnog trakta. U svakodnevnoj kliničkoj praksi najčešće bolesti koje mogu predstavljati diferencijalno dijagnostičku dilemu su: infektivni kolitisi (izazvani uzročnicima kao što su *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Campilobacter jejuni*, *Salmonela enteritidis*, *Shigela sonnei*, *Entameba histolytica* i Citomegalovirus), ishemijski kolitis, enterokolitis uzrokovan lekovima, uključujući tu i kolitis izazvan upotrebom nesteroidnih antiinflamatornih antireumatika (tzv. „NSAID kolitis“), akutni apendicitis, postiradiacioni kolitis, mikroskopski kolitis, sindrom iritabilnog creva i divertikularna bolest creva [2, 3].

### 1.4.3 Procena aktivnosti inflamatorne bolesti creva

Procena aktivnosti bolesti kod bolesnika sa IBC je neophodna u kliničkoj praksi za određivanje terapije, praćenje efekata lečenja i prognoze bolesti. Iako je aktivnost bolesti u IBC istraživana u mnogim studijama i iz brojnih razloga, kao, na primer, zbog postavljanja dijagnoze, odnosno diferencijalne dijagnoze bolesti, prognoze, praćenja i predviđanja ishoda lečenja odnosno predviđanja nastanka relapsa, danas još uvek ne postoji zlatni standard za njenu procenu [101]. Najčešći pristup za procenu aktivnosti IBC podrazumeva korišćenje određenih kliničkih indeksa i skorova dobijenih na osnovu simptoma bolesti, kliničkih ispitivanja, laboratorijskih analiza, radiografskih i endoskopskih nalaza sa patohistološkom verifikacijom [102]. Za procenu kliničke aktivnosti bolesti kod pacijenata sa UK, danas se najčešće koristi Mayo skor, objavljen još 1987. godine, koji pored endoskopske procene aktivnosti bolesti uključuje i opšti utisak lekara o stanju bolesnika [103]. U proceni aktivnosti bolesti kod bolesnika sa KB, najčešće se upotrebljavaju Indeks aktivnosti Kronove bolesti (*engl.* Crohn's disease activity index – CDAI) koji se izračunava

na osnovu podataka iz dnevnika koji pacijent popunjava tokom sedam dana [104] i Bestov indeks koji je baziran na simptomima koje pacijent beleži u toku jednog dana [105].

## **1.5 TERAPIJSKI MODALITETI LEČENJA INFLAMATORNE BOLESTI CREVA**

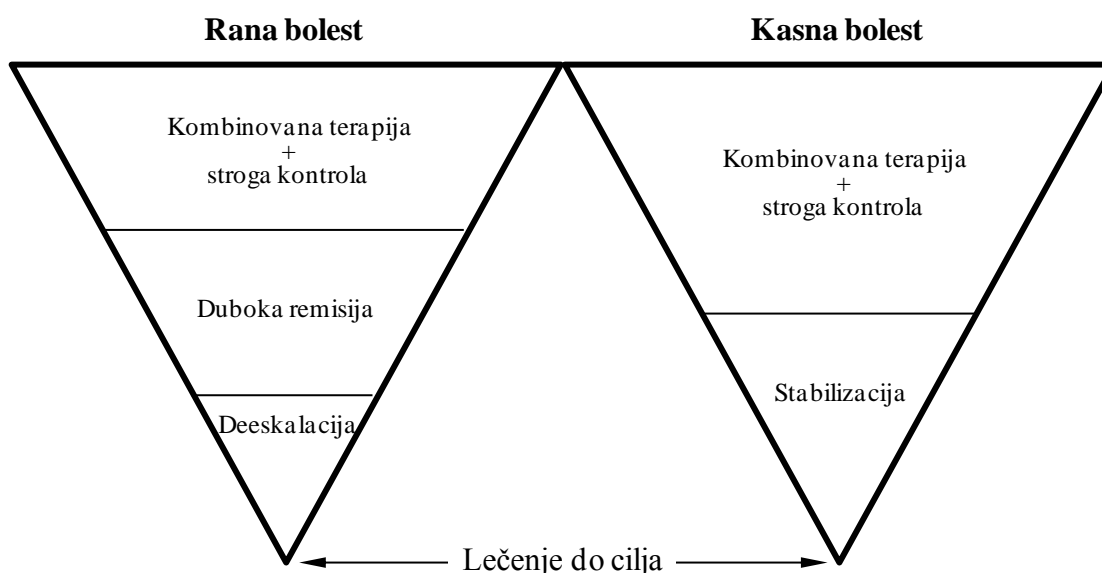
Lečenje bolesnika sa UK i KB danas podrazumeva strateški plan koji se donosi na osnovu karakteristika bolesti kao što su aktivnost bolesti, ekstenzivnost bolesti, lokalizacija i tip bolesti, kao i dosadašnji tok bolesti. Stoga je potrebno uzeti u obzir učestalost relapsa, težinu relapsa, odgovor na dosadašnju terapiju, neželjene efekte terapije, prisustvo EIM i komplikacija bolesti, godine kad je bolest nastala, kao i socio-epidemiološku anketu. Veoma je važno analizirati odgovor na dosadašnju terapiju, posebno kod pacijenata koji imaju egzacerbaciju bolesti. Naročito je značajno proceniti da li kod pacijenta postoji adekvatan odgovor na terapiju lekovima iz grupa kortikosteroida (KS) i imunosupresivnih lekova (imunomodulatornih lekova), ili se radi o kortikosteroid-zavisnoj bolesti, kortikosteroid-refraktarnoj bolesti ili imunomodulatorno-refraktarnoj bolesti. Kortikosteroid-refraktarna bolest podrazumeva aktivnu bolest kod pacijenta, koji je najmanje 4 nedelje na terapiji prednizolonom, u dozi od 0,75 mg/kg<sup>TM</sup>. Kortikosteroid-zavisna bolest podrazumeva pogoršanje simptoma pri smanjenju kortikosteroidne terapije do doze prednizolona od 10 mg/dan, pri čemu je pacijent prethodno bio na terapiji KS u poslednja tri meseca, odnosno pojavu relapsa u periodu do tri meseca od ukidanja KS. Imunomodulatorno-refraktarna bolest označava aktivnu bolest kod pacijenta koji je najmanje tri meseca na punoj dozi imunomodulatorne terapije (na primer azatioprin u dozi od 2-2,5 mg/kg/TM) [2, 3, 106].

Prvi terapijski cilj u lečenju bolesnika sa IBC jeste postizanje remisije bolesti, dok je drugi terapijski cilj održavanje remisije (prevencija relapsa bolesti) uz što manje neželjenih efekata. Stoga se danas predlaže individualizovani pristup u lečenju pacijenata sa UK i KB, pri čemu treba ohrabriti pacijenta da aktivno učestvuje u donošenju odluka o izboru terapije. Sa pojavom biološke terapije, koja prevashodno podrazumeva davanje monoklonskih antitela, došlo je do značajnog pomaka u lečenju pacijenata sa UK i KB. Konačan cilj lečenja je smanjenje i/ili prestanak zapaljenja na nivou sluznice digestivnog trakta, odnosno zaceljenje mukoze (*engl.* mucosa healing), što dovodi do povlačenja simptoma bolesti i dugotrajne remisije uz značajno smanjenje rizika za nastanak

komplikacija bolesti. U poslednjih nekoliko godina se često koristi izraz „duboka remisija“ koji podrazumeva postojanje kliničke remisije uz kompletno zaceljenje mukoze [107].

U kliničkoj praksi postoje dva pristupa u lečenju pacijenata sa IBC. „Step up“ pristup podrazumeva otpočinjanje lečenja sa manje potentnim lekovima, uz postepenu eskalaciju terapije ka potentnijim lekovima, dok, „top down“ pristup označava otpočinjanje lečenja sa najpotentnijim lekovima (monoklonskim antitelima) kao prvom linijom terapije. Pri svakom terapijskom izboru treba proceniti potencijalnu korist od planirane terapije u odnosu na moguće neželjene efekte [108]. Najnovija strategija u lečenju pacijenata sa IBC jeste lečenje do cilja (*engl.* „treat to target“), što podrazumeva da se kod pacijenata sa „ranom bolesti“ (bolest koja traje manje od 18 meseci) i bez komplikacija, kombinovanom terapijom sa više lekova (obično kombinacijom anti-TNF agensa i imunosupresiva) postigne duboka remisija uz istovremenu strogu kontrolu efikasnosti terapije (merenje nivoa leka odnosno antitela) i njene bezbednosti. Sa druge strane, kod pacijenata sa dugotrajnom bolesti („kasna bolest“) cilj lečenja kombinovanom terapijom je zaustavljanje progresije bolesti, odnosno stabilizacija i kontrola bolesti. U prvoj grupi pacijenata sa dostizanjem cilja, nakon postizanja duboke remisije, može se razmotriti i deeskalacija terapije [109]. Strategija „lečenje do cilja“ se može primeniti kod svih pacijenata sa IBC i prikazana je na Slici 2.

**Slika 2. Strategija „lečenje do cilja“ (Prerađeno iz [109])**



U budućnosti će nova otkrića verovatno dovesti do značajnih pomaka u lečenju bolesnika sa IBC, pre svega sa novim ciljevima, koji su već postavljeni kao što su



zaceľjenje mukoze i duboka remisija, kao i individualizovan pristup u lećenju i odgovorom voćena terapija. Terapija IBC koja je danas u upotrebi obuhvata sledeće lekove, odnosno grupe lekova: aminosalicilate, kortikosterioide, antibiotike, imunomodulatorne, odnosno imunosupresvne lekove i biološke agense (monoklonska antitela), a u nekim slućajevima je neophodno i hirurško lećenje.

### **1.5.1 Aminosalicilati**

Aminosalicilati obuhvataju 5-aminosalicilnu kiselinu (5-ASA), sulfasalazin i druge antiinflamatorne lekove iz grupe mesalazinskih preparata za sistemsku i topikalnu upotrebu i predstavljaju efikasnu terapiju u lećenju blage i umereno teške forme UK. Aminosalicilati se danas reće koriste u terapiji bolesnika sa KB, jer je pokazano da je njihova efikasnost u lećenju KB često jednaka placebo [2, 110].

### **1.5.2 Kortikosteroidna terapija**

Kortikosteroidi (KS) se koriste u lećenju IBC u poslednjih 50 godina, i dobro je poznato da ovi lekovi mogu da uvedu pacijente sa UK ili KB u remisiju. Mećutim, ovi lekovi nisu pogodni za odrćavanje remisije zbog gubitka svoje efikasnosti, kao i zbog brojnih neželjenih efekata kod dugotrajne terapije koji su često ireverzibilni [111, 112]. Budesinid predstavlja noviju generaciju nesistemskih kortikosteorida koji se koriste u lećenju KB terminalnog ileuma. Lek se oslobaća u terminalnom ileumu i desnom kolonu gde ostvaruje svoje puno antiinflamatorno dejstvo. Povoljan je za uvoćenje u remisiju blaćih klinićkih formi bolesti, navedene lokalizacije, obzirom da ima mali sistemski efekat. Do sada ne postoje jasne preporuke o korišćenju ovog leka u odrćavanju remisije [2, 110].

### **1.5.3 Antibiotici**

Antibiotici imaju svoje mesto u lećenju odrećenih pacijenata sa UK i KB. Glavna uloga antibiotika u terapiji aktivnog UK jeste lećenje superinfekcija, kao što je, na primer, istovremeno postojanje klostridijalne infekcije. Mećutim, u dosadašnjim istraćivanjima nije dokazano da antibiotici utiću na ishod lećenja teško aktivnog UK [2]. Ovi lekovi se uglavnom nisu pokazali efikasnim ni kod pacijenata sa KB [110]. Antibiotici, kao što su cirpofloksacin i metronidazol, najćešće su indikovani kod pacijenata sa perianalnom bolesti. Mećutim, iako ovi antibiotici mogu da poboljšaju simptome, retko mogu da

dovedu do zatvaranja fistule. I pored toga, uloga antibiotika u IBC ostaje nezamenjiva u određenim situacijama kao što su prisustvo apscesa i bakterijskih infekcija [3].

#### **1.5.4 Imunosupresivna terapija**

Imunosupresivna terapija tiopurinima kao što su azatioprin (AZA) i merkaptopurin (MP) su efikasni u održavanju remisije bolesti kod pacijenata sa KB kod kojih je remisija postignuta kortikosteroidnom terapijom, odnosno kod pacijenata sa UK koji imaju kortikosteroid-zavisnu i/ili kortikosteroid-refraktarnu bolest [2, 110]. Metotreksat (MTX) je efikasan u indukciji i održavanju remisije kod pacijenata sa KB, dok još uvek nema jasnih preporuka o njegovoj efikasnosti u UK [113, 114]. Imunosupresivni lek ciklosporin se koristi u teškim formama UK. Njegova primena kao terapija spasa (*engl.* „salvage therapy“) može sprečiti kolektomiju, mada je rizik od neželjenih efekata visok, uključujući rizik od smrtnog ishoda koji iznosi oko 3% [2, 110, 115].

#### **1.5.5 Hirurško lečenje**

Uprkos savremenim konzervativnim terapijskim modalitetima, hirurško lečenje je još uvek često zastupljeno kod pacijenata sa UK i KB, pri čemu ono može da dovede do brojnih fizičkih, ali i psihičkih posledica i komplikacija kod pacijenta [116]. Potrebe za hirurškim lečenjem kod bolesnika sa IBC su najčešće u korelaciji sa trajanjem i ekstenzivnošću bolesti, odnosno mestom zahvaćenosti inflamatornim procesom. Prema objavljenim podacima, više od 70% pacijenata sa KB doživi bar jednu operaciju u toku života, dok hirurško lečenje UK doživi približno 30% pacijenata i to su najčešće pacijenti kod kojih bolest traje preko jedne decenije [117]. Sa razvojem sekundarnih i tercijalnih generacija lekova koji se pokazuju veoma efikasnim u uvođenju i održavanju remisije bolesti kod pacijenata sa UK i KB, odnos prema potrebi za hirurškim lečenjem će se sve više menjati u budućnosti. Stoga se hirurško lečenje danas može smatrati tretmanom poslednjeg izbora [110, 118].

#### **1.5.6 Inhibitori TNF**

Sa otkrićem biološke terapije u poslednjih 15 godina značajno je promenjen prirodni tok bolesti kod pacijenata koji su imali teške forme bolesti refraktarne na konvencionalnu terapiju. Uvođenjem monoklonskih antitela i drugih preparata koje

blokiraju TNF (TNF inhibitora), smanjena je stopa hitnog hirurškog lečenja i skraćeno je vreme i učestalost hospitalizacija. Do danas je TNF inhibitorima lečeno više od 1,3 miliona pacijenata sa UK i KB. Najčešće se koriste anti-TNF monoklonska antitela, pri čemu je infliksimab prvi otkriven, a nakon njega na tržištu su se pojavili adalimumab, certolizumab i golimumab [119]. Na osnovu dosadašnjih rezultata, procenjuje se da je oko trećine pacijenata sa UK i KB primarno refraktarno na biološku terapiju, dok oko 30% pacijenata tokom vremena izgubi odgovor na terapiju (sekundarna refraktarnost) [120]. Anti-TNF terapija predstavlja prvi korak u „top-down“ strategiji lečenja IBC.

### 1.5.7 Nove terapijske mogućnosti

Danas su u toku brojne studije koje ispituju nove modalitete lečenja u IBC (Tabela 1). Monoklonsko antitelo pod generičkim imenom ustekinumab, usmereno na p40 protein koji čini zajedničku subjedinicu za citokine IL-12 i IL-23, pokazalo se efikasnim kod pacijenata sa KB koji su bili rezistentni na anti-TNF terapiju [121]. Takođe, novu grupu lekova predstavljaju i antitela specifična za adhezivne molekule čiji se mehanizam dejstva sastoji u tome da inhibiraju inflamaciju putem blokade migracije leukocita iz krvi u inflamirano tkivo. Prvi iz ove grupe lekova, natalizumab je monoklonsko antitelo specifično za  $\alpha 4$  integrin, koji između ostalog, ulazi i u sastav  $\alpha 4\beta 7$  integrina ili LPAM-1 (*engl.* Lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule 1), adhezivnog molekula na T-limfocitima koji je odgovoran za prelazak ovih ćelija iz krvi u limfna tkiva u mukozni creva. Natalizumab se pokazao efikasnim u indukciji i održavanju remisije kod pacijenata sa KB. Međutim, ubrzo je njegova primena povezana sa nastankom retke, ali često fatalne oportunističke infekcije, progresivne multifokalne leukoencefalopatije (PML), koja nastaje reaktivacijom JC virusa [122]. Natalizumab je odobren za lečenje KB od strane Američke agencije za hranu i lekove (Food and Drug Administration – FDA), dok je u Evropskoj uniji u toku razmatranje dozvole za njegovo korišćenje od strane Evropske agencije za lekove (European Medicines Agency – EMEA).

Druga generacija monoklonskih antitela specifičnih za adhezivne molekule predstavlja vedolizumab, antitelo koje selektivno blokira pomenuti  $\alpha 4\beta 7$  integrin, čime je obezbeđeno da anti-inflamatorno dejstvo ovog leka bude ispoljeno na nivou creva. Vedolizumab se pokazao posebno efikasan kod pacijenata sa UK [123]. Takođe, obećavajući nov lek je i humano monoklonsko antitelo specifično za adhezivni molekul MAdCAM-1 (*engl.* mucosal addressin cell adhesion molecule 1), koji se nalazi

ekspimiran na endotelu venula u crevima i koji reaguje sa  $\alpha 4\beta 7$  integrinom na leukocitima. Vezivanjem za MAdCAM, ovo antitelo blokira vezivanje i migraciju limfocita i posledičnu inflamaciju u GIT-u. U studijama koje su još uvek u toku, ovaj lek je pokazao veoma dobre rezultate u KB [124].

Nedavno je pokazano da i inhibitori enzima Janus kinaze (JAK) mogu da imaju povoljan terapijski efekat u IBD. Među njima je i tofacitinib, oralni preparat koji je selektivan za JAK-1 i JAK3, enzime odgovorne za prenos signala za više različitih receptora citokina koji su uključeni u regulaciju kako urođenog tako i stečenog imunskog odgovora. Za sada je ovaj mali molekul pokazao veoma dobre rezultate u UK, uz prednost zbog oralne primene i niže cene u odnosu na ostale preparate [125].

**Tabela 1.** Novi terapijski pristupi u IBC (preuzeto iz reference [126])

	<b>Citokini i faktori rasta</b>	<b>Adhezivni molekuli i hemokini</b>	<b>T-ćelije</b>	<b>Ostalo</b>
<b>Odobreni u SAD (i drugim zemljama)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Anti TNFmAt (IFX, ADA, certulizumab pegol, golimumab)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Anti-<math>\alpha 4</math> integrin mAt (natalizumab)</li> </ul>		
<b>Kliničke studije (u toku)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Anti-IL-12/23 mAt</li> <li>● Anti-IL-23 mAt</li> <li>● Anti-IL-17</li> <li>● Inhibitori IL-6</li> <li>● Ostali TNF inhibitori</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Anti-<math>\alpha 4\beta 7</math> mAt</li> <li>● Anti-<math>\beta 7</math> mAt</li> <li>● Anti-MAdCAM mAt</li> <li>● CCR9 antagonisti</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>● Matične ćelije</li> <li>● Autologna transplantacija kostne srži</li> <li>● Inhibitori JAK</li> <li>● Probiotici</li> <li>● Antibiotici</li> <li>● Inhibitori MAP kinaze</li> </ul>
<b>Kliničke studije (obustavljene)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● IL-10</li> <li>● IL-11</li> <li>● Solubilni TNF receptori</li> <li>● Antagonisti IL-1 receptora</li> <li>● Anti-IFN-<math>\gamma</math> mAt</li> <li>● GM-CSF</li> <li>● Faktor rasta keratinocita</li> <li>● Oralni IL-12 inhibitor</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>● CTLA-4 Ig</li> <li>● Anti-CD3 mAt</li> <li>● Anti-CD25 mAt</li> </ul>	

ADA – Adalimumab; GM-CSF – faktor stimulacije kolonija granulocita i monocita; IFN – interferon; IFX - Infliximab; Ig – imunoglobulin; IL – interleukin; mAt- monoklonsko antitelo; TNF – faktor nekroze tumora; JAK- enzim Janus kinaza

## 1.6 GENETSKI FAKTORI U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA

Dosadašnja istraživanja ukazuju da se IBC razvija kod genetski predisponirane osobe pod uticajem određenih faktora sredine, pri čemu dolazi do neadekvatnog imunskog odgovora na crevnu mikrobiotu i posledičnog hroničnog zapaljenja i oštećenja creva. IBC pripada kompleksnim genetskim bolestima, kod kojih do oboljevanja dolazi usled složenih interakcija između većeg broja gena i faktora spoljašnje sredine. U prilog važne uloge genetskih faktora govori i činjenica da u učestalosti IBC postoje izrazite etničke razlike, koje se ne mogu objasniti samo različitim faktorima spoljašnje sredine kojima su izložene različite populacije. Tako je IBC najzastupljenija kod belaca i jevreja, gde se javlja tri puta češće u odnosu na ostale rase i etničke grupe, pri čemu je rizik posebno velik kod Aškenazi Jevreja [127, 128]. Češća pojava bolesti unutar porodica i kod blizanaca jasno ukazuje na genetsku predispoziciju za nastanak IBC. Izgleda da je uticaj genetike izraženiji kod KB nego kod UK i procenjuje se da u KB iznosi 20-40%, u odnosu na 10-15% kod obolelih od UK [129]. Studije koje su ispitivale genetske faktore kod blizanaca to jasno potvrđuju. Ako jedan jednojajčani blizanac ima KB, drugi ima između 20-50% verovatnoću da dobije istu bolest, pri čemu je rizik znatno manji kod dvojajčanih blizanaca i ne prelazi 10%. Kod UK su stope poklapanja manje i iznose oko 16% za jednojajčane i oko 4% za dvojajčane blizance [8]. Slično tome, evidentno je da IBC može da se javi kod više članove iste porodice, pri čemu je relativan rizik da ostali članovi porodice u kojoj postoji osoba sa KB, takođe dobiju KB oko 5%, dok je rizik za UK manji i iznosi ispod 2% [8, 130]. Činjenica da se obe forme IBC, i KB i UK, mogu da jave unutar iste porodice ukazuje na mogućnost postojanja zajedničkih gena za obe bolesti. Primećena je i udruženost IBC i pojedinih HLA alela što je u skladu sa važnom ulogom imunskih mehanizama u patogenezi IBC, pri čemu je najjača veza uočena između DR lokusa koji kodira II klasu HLA molekula kod ljudi, i to DRB1\*0103 i UK, odnosno DRB3\*0301 i KB [131].

Sa razvojem molekularne genetike i rasvetljavanjem osnovnih sekvenci i strukture humanog genoma, u poslednjih desetak godina dolazi do dramatičnih promena u medicini što je neminovno doprinelo i do napretka u razumevanju etiopatogeneze IBC. Preteča ovih istraživanja je 2001. godina, kada je za *NOD2/CARD15* gen prvi put pokazano da postoji njegova udruženost sa KB. Tri različite varijante u sekvenci ovog gena (tj. tri polimorfizma) jasno su povezane sa specifičnim fenotipom KB, odnosno prisutne su češće kod KB koja zahvata terminalni ileum i kod stenozantne forme bolesti [68, 132]. Interesantno je da je ova udruženost ostala i do danas jedna od najačih kada je u pitanju

IBC. Naročito veliki doprinos u identifikaciji genetskih faktora odgovornih za razvoj IBC, dali su projekti kao što su „Hap Map“ projekat [133], kao i ispitivanje polimorfizama gena u celokupnom genomu i njihove udruženosti sa pojedinim bolestima (*engl.* genome-wide association studies, GWAS ili GWA studija) koji su potom sledili. Zahvaljujući njima, do danas je identifikovano preko 160 genskih lokusa koji se dovode u vezu sa nastankom IBC, od kojih su čak 110 lokusa zajednički za oba klinička entiteta, dok je 30 identifikovano kod KB, a 23 kod UK [134]. Interesantno, mnogi od tih lokusa sadrže gene sa važnim imunskim funkcijama. Pojedini geni su važni u diferencijaciji T-ćelija (*IL21*, *IL10*, *IFNG* i *IL7R*), drugi su važni u prenosu signala poreklom od receptora za IL-23, citokina važnog za preživaljavanje i funkciju Th17 ćelija (*IL23R*, *JAK2*, *STAT3*, *IL12B* i *PTPN2*), dok su pojedini geni važni u prenosu signala koji indukuje TNF (*TNFRSF9*, *TNFRSF14* i *TNFSF15*) [130]. Navedena istraživanja su pokazala da je IBC poligeniski poremećaj koji pokazuje da postoje multiple kliničke podgrupe unutar KB i UK. Okidač za aktivaciju ove genetski uslovljene predispozicije je najverovatnije jedan ili više faktora sredine. Postoji jasna povezanost između IBC i promena u sastavu i diverzitetu mikroorganizama koji nastanjuju creva, a nastanak IBC se dovodi u vezu i sa spoljašnjim faktorima kao što su pušenje, način ishrane, deficit vitamina D, upotreba antibiotika i različitih medikamenata.

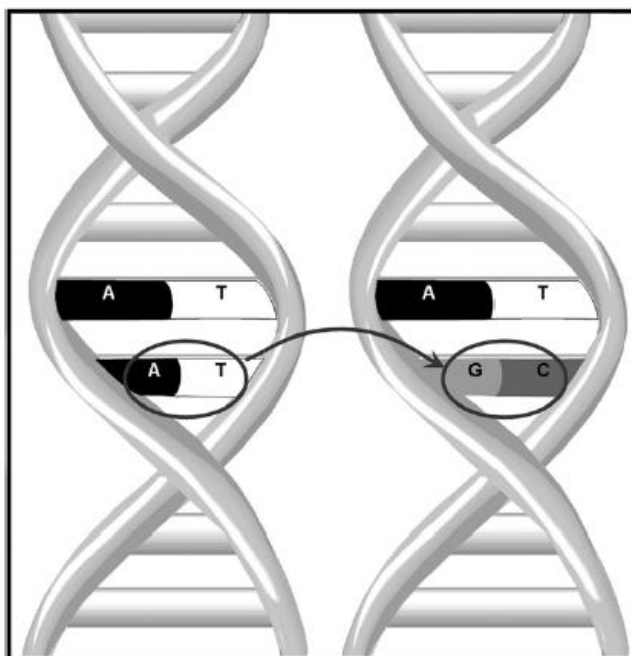
### **1.6.1 Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida**

Genski polimorfizam je pojam koji se odnosi na promenu unutar DNK sekvence koja može biti posledica zamene, insercije ili delecije nukleotida. Ljudski genom se sastoji od 3,3 milijardi parova baza, pri čemu su oko 99,9% genoma bilo koje dve jedinke identične. Međutim, DNK sekvence se razlikuju između jedinki. Postoji mnogo različitih tipova varijacija u DNK sekvencama i one se mogu klasifikovati na različite načine: prema prirodi sekvencijskih varijanti, prema efektu na sintezu proteina i prema riziku za nastanak bolesti [135]. Najbolje su opisana dva tipa polimorfizama sekvenci DNK i to su polimorfizmi sa različitim dužinama sekvenci i polimorfizmi sekvence koji su rezultat zamena nukleotida. Zamene na nivou nukleotida su veoma česte u populaciji i u zavisnosti od njihove učestalosti se različito klasifikuju. Ukoliko navedene varijacije imaju učestalost veću od 1% u populaciji, one se nazivaju polimorfizmima, dok se varijacija sa učestalošću manjom od 1% smatraju mutacijama [136]. Projekat „Genom čoveka“ (*engl.* Human Genome Project), kojim je po prvi put utvrđena celokupna sekvenca DNK kod čoveka,

pokazao je da su polimorfizmi na nivou jednog nukleotida, tzv. polimorfizmi pojedinačnih nukleotida ili SNP (*engl.* single nucleotide polymorphism, SNP) najčešći i da postoje unutar celog genoma kako u kodirajućim tako i nekodirajućim delovima DNK. SNP su pronađeni u svim do sada ispitivanim genima, u proseku se javljaju na svakih 250 baza i procenjuje se da ih u humanom genomu ima preko 10 miliona [136, 137].

Većina SNP može da ima samo dva moguća oblika, odnosno varijacije koje se nazivaju aleli (Slika 3). Postoje i troalelski SNP kod kojih se u populaciji mogu da nađu tri alelske varijante na istom lokusu. Svaki SNP se nalazi na određenom mestu (specifičnom lokusu) unutar gena i u zavisnosti od toga može da utiče na ekspresiju gena i sastav proteina, mada većina do sada otkrivenih SNP ne utiče na promenu fenotipa [138]. SNP koji se nalazi u regionu koji kodira protein može da bude sinonimni ili nesinonimni, zavisno od toga da li utiče na promenu u sekvenci aminokiselina u genskom produktu. Ako promena u SNP ne dovodi do izmena u polipeptidnoj sekvenci, takav SNP se obeležava kao sinonimni (sSNP). Ako SNP dovodi do promena u strukturi proteina, tada ima veći potencijal da izazove bolest, i naziva se nesinonimni (nsSNP). Sinonimni SNP su znatno češći u odnosu na nsSNP [136].

**Slika 3. Primer izmene u pojedinačnim bazama nukleotida** (Preuzeto iz [136])



Najveća pažnja istraživača usmerena je na funkcionalne SNP koji utiču na ekspresiju gena i/ili građu i funkciju proteina kojeg određeni gen kodira. SNP u

kodirajućim sekvencama gena mogu da menjaju sastav proteina tako što menjaju kodon i posledično menjaju aminokiselinu u proteinu, ili tako što uvedu STOP kodone i prerano zaustave translaciju. Ove promene mogu da utiču na konformaciju ili funkciju proteina. Promena ekspresije gena može da nastane i usled promena u drugim delovima gena, na primer u 5' i 3' regulatornim sekvencama koje utiču na nivo ekspresije gena ili u intronima čime se menja stabilnost ili način obrade primarnog transkripta RNK. Često SNP ne izaziva nijednu od navedenih promena, ali on može da bude udružen sa određenom bolešću zbog toga što se ta alelska varijanta nasleđuje zajedno sa nekom drugom varijantom u genomu koja je važna za patogenezu te bolesti. U takvim slučajevima kaže se da SNP predstavlja marker bolesti.

Poslednjih godina sve je više prisutan individualizovan pristup u lečenju različitih bolesti, usmeren na pojedinačnog pacijenta. U tom smislu, postoji velika potreba da se definišu biomarkeri koji bi mogli da pomognu u dijagnostici, klasifikaciji bolesti, prognozi i praćenju terapijskog odgovora. SNP, koji mogu relativno lako da se detektuju kod određenog pacijenta, mogli bi da budu pouzdani biomarkeri u IBC i zato su ispitivanja njihove povezanosti sa IBC neophodna. Do sada je opisan veliki broj polimorfizama koji se dovode u vezu sa razvojem KB i/ili UK. Od mnogobrojnih identifikovanih gena, od posebnog je interesa ispitivanje polimorfizama u genima koji kodiraju citokine ili njihove receptore, s obzirom na kompleksnu mrežu citokina koja je uključena u patogenezu IBC i dovodi do inflamacije i posledičnog oštećenja, a takođe predstavlja i potencijalno važnu terapijsku metu. Među njima se posebno ističu polimorfizmi u genima koji kodiraju proinflamatorne citokine (TNF), antiinflamatorne citokine (IL-10), kao i citokine važne za razvoj i funkcionisanje Th1 i Th17 ćelija sa pretpostavljenom važnom ulogom u patogenezi IBC, kao što su geni koji kodiraju IL-12 odnosno IL-23 i njihove receptore. Na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja, kao potencijalni kandidati za biomarkere u IBC identifikovani su sledeći polimorfizmi: rs1800629 (G-308A) u *TNFA* genu, tri polimorfizma u promotorskom regionu *IL10* gena, rs1800896 (G-1082A), rs1800871 (C-819T) i rs1800872 (C-592A), kao i rs3024505 (C/T) u 3' kraju *IL10* gena, zatim rs6887695 (G/C) u blizini *IL12B* gena i rs11209026 (G1142A) u genu za receptor za IL-23 (*IL23R*) [139]. Takođe, i polimorfizmi u *MDR1* genu koji kodira transporter P-glikoprotein (P-gp) 170, pre svega rs1128503 (C1236T), rs1045642 (C3435T) i trialelski rs2032582 (G2677T/A), takođe su povezani sa razvojem IBC, odnosno određenim fenotipskim karakteristikama bolesti [140].



### **1.6.1.1 Polimorfizmi u *TNFA* genu**

TNF, kao izrazito proinflamatorni citokin, ima važnu funkciju i u urođenom i stečenom imunskom odgovoru. TNF ima jednu od ključnih uloga u patogenezi IBC, na šta ukazuje i uspešnost terapije monoklonskim antitelima specifičnih za TNF, koja je usmerena na blokadu ovog citokina kod pacijenata sa IBC. Gen za ovaj citokin (*TNFA*) se nalazi na kratkom kraku hromozoma 6, u regionu III klase HLA kompleksa, na mestu koje je označeno kao predisponirajuće za nastanak IBC [141]. TNF i njemu srodan citokin limfotoksin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) su citokini koje proizvode aktivirane pomoćničke T-ćelije, monociti i makrofagi, ali i druge ćelije u organizmu. Ovi citokini predstavljaju podgrupu molekula koji su aktivni kao solubilni citokini koji se oslobađaju proteolizom. Pokazano je da kod pacijenata sa IBC (i KB i UK), u epitelnim ćelijama sluznice GIT-a postoji izražena indukcija ekspresije MHC molekula II klase, uz povećano preuzimanje antigena na nivou sluznice GIT-a, pri čemu su tokom aktivne faze bolesti, prisutne povišene vrednosti TNF u serumu, perifernim fagocitima, stolici i mukozi GIT-a, sugerišući esencijalnu ulogu ovog citokina u inicijaciji i propagaciji inflamacije kod ovih pacijenata [142].

Pored toga što postoje dnevne varijacije u kapacitetu za produkciju TNF, sve više je pokazatelja da postoji genetska predispozicija za sposobnost sinteze TNF koja može da varira i do 60% kod svakog pojedinca [143]. Genetskim istraživanjima otkriveno je više polimorfizama u genu za TNF kod pacijenata sa IBC. Jedan od najviše ispitivanih SNP je polimorfizam rs1800629 (G-308A) na poziciji -308 u promotoru *TNFA* gena u kojem je došlo do supstitucije G alela A alelom, pri čemu je pokazano da AA homozigoti proizvode veće količine TNF [144, 145]. Dosadašnja istraživanja o povezanosti ovog polimorfizma sa IBC dala su kontradiktorne rezultate. U pojedinim populacijama ovaj SNP je povezan sa povećanom osteljivošću na razvoj i KB i UK i sa komplikovanim formama bolesti, kao i sa odgovorom na anti-TNF terapiju, ali postoje i studije u kojima nije uočena udruženost navedenog polimorfizma sa IBC [146, 147].

### **1.6.1.2 Polimorfizmi u *IL10* genu**

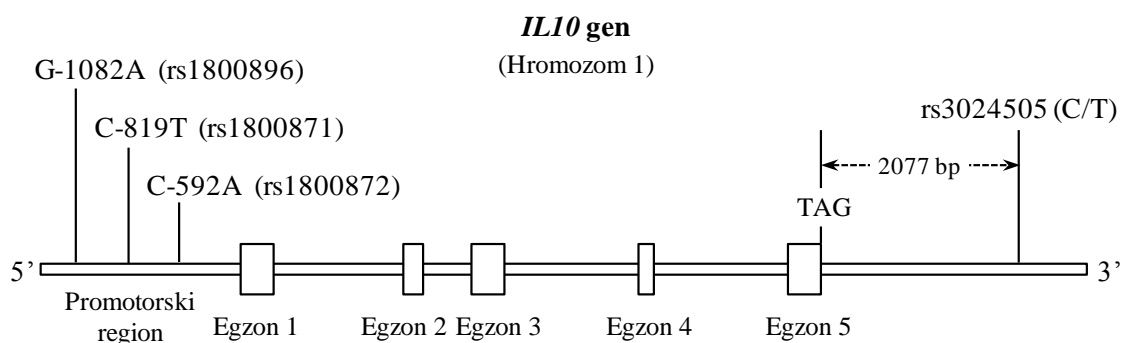
Nasuprot TNF, IL-10 predstavlja antiinflamatorni citokin sa važnim immunosupresivnim funkcijama. Značajnu ulogu u patogenezi IBC ima disbalans između proinflamatornih i antiinflamatornih citokina, pri čemu je pokazano da IL10 ima prominentnu regulatornu funkciju u održavanju homeostaze imunskog sistema digestivnog

trakta [148]. Imunosupresivna uloga IL-10 je pluripotentna i uključuje sprečavanje T-ćelijske proliferacije, nishodnu regulaciju ekspresije kostimulatornih proteina na APC i inhibiciju stvaranja proinflamatornih citokina (npr. IL-1 $\beta$ , TNF i IL-6), odnosno stimulaciju antiinflamatornih proteina kao što su IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) i solubilni TNF receptor. Iako je IL-10 prvi put opisan 1989. godine kao citokin kojeg proizvode Th2 ćelije [149], danas je poznato da mnoge ćelije mogu da proizvode ovaj citokin. Ipak, smatra se da su Treg ćelije verovatno najznačajniji njegov izvor, što dovodi do pretpostavke da inflamacija u IBC može nastati kao posledica poremećaja u Treg posredovanoj supresiji imunskog odgovora na komensalnu crevnu floru [148]. Eksperimentalni podaci dobijeni na miševima bez gena za IL-10 (ili njegovog receptora) koji razvijaju hronični enterokolitis koji po svojim karakteristikama najviše odgovara KB, kao i retke forme KB povezane sa mutacijama u receptoru za IL-10 kod ljudi, ukazuju na ključnu ulogu ovog citokina u kontroli intestinalne inflamacije i patogenezi IBC [35].

Prema istraživanjima koja su vršena na jednojačanim blizancima i rođacima u prvom kolenu, čak i do 75% proizvodnje IL-10 je genetski determinisano [150]. Izgleda da polimorfizmi u genu za IL-10 (*IL10*), koji se nalazi na hromozomu 1, ili u regionima koji se nalaze u njegovoj neposrednoj blizini, imaju važnu ulogu u genetskoj kontroli proizvodnje IL-10. U poslednje dve decenije, brojne studije su pokazale da određeni polimorfizmi u promoteru gena za IL-10 mogu da dovedu do promene nivoa serumskog IL-10 koja može biti odgovorna za hroničnu inflamaciju kod pacijenata sa IBC. Među njima najviše su ispitivana tri bialelska polimorfizma koji se nalaze u promotorskom regionu *IL10* gena (Slika 4), na pozicijama -1082 (G-1082A ili rs1800896), -819 (C-819T ili rs1800871) i -592 (C-592A ili rs1800872). Ova tri polimorfizma se nalaze u izrazitoj vezanoj neravnoteži (*engl.* linkage disequilibrium, LD), tako da se kod bele rase izdvajaju samo tri haplotipa GCC, ACC i ATA [151]. Veći broj studija *in vitro* i *in vivo*, ukazale su na funkcionalan značaj ovih polimorfizama, pri čemu je pokazano da je haplotip GCC udružen sa povećanom produkcijom IL-10, haplotip ACC sa umerenom, dok je haplotip ATA udružen sa sniženom produkcijom IL-10 [151-153]. Do sada sprovedene studije udruženosti ovih polimorfizama sa IBC dala su kontradiktorne rezultate, tako da njihova uloga u patogenezi IBC nije još uvek u potpunosti razjašnjena [154-156]. Sa druge strane, nedavno je u GWA studiji pokazano da je polimorfizam rs3024505 (C/T), koji se nalazi u neposrednoj blizini 3' kraja *IL10* gena, oko 2kb udaljen od TAG sekvence koja odgovara STOP kodonu u iRNK (Slika 4), takođe povezan sa povećanim rizikom od oboljevanja od KB i UK [157, 158]. Studije koje su usledile su potvrdile značaj ovog polimorfizma kao

potencijalnog biomarkera u IBC, ali su one sprovedene samo na populacijama iz Zapadne Evrope, Kanade, Australije i sa Novog Zelanda [158-160], pri čemu nema podataka o distribuciji i povezanosti ovog polimorfizma sa IBC u drugim regionima, kao što su zemlje Istočne Evrope, uključujući u i Srbiju.

**Slika 4. Shematski prikaz polimorfizama u *IL10* genu**



### 1.6.1.3 Polimorfizmi u *IL12B* i *IL23R* genima

IL-12 i IL-23 su proinflamatorni citokini koje prevashodno proizvode makrofagi i dendritske ćelije u odgovoru na mikroorganizme. Ovi citokini učestvuju u povezivanju urođenog i stečenog imunskog odgovora, kroz njihovu ulogu u diferencijaciji Th1, odnosno Th17 ćelija i smatra se da imaju važnu ulogu u patogenezi IBC [35, 58]. U prilog tome govori i činjenica da se terapija monoklonskim antitelom pod generičkim imenom ustekinumab, usmerenog na p40 protein koji čini zajedničku subjedinicu za citokine IL-12 i IL-23, pokazala efikasnom u indukciji i održavanju remisije kod pacijenata sa KB koji nisu reagovali na anti-TNF terapiju [121].

Različite studije su pokazale da varijacije u genima koji su odgovorni za stvaranje IL-12, odnosno IL-23 citokina i njihovih receptora, mogu da utiču na nastanak i razvoj inflamacije u IBC. Od preko 160 genskih lokusa udruženih sa IBC, preko 20 njih su u vezi sa IL-12/IL-23 osovinom i njihovi međusobni uticaji mogu da imaju važnu ulogu u patogenezi IBC [130]. Jedna od najjačih povezanosti (odmah posle *NOD2* gena) se odnosi na gen *IL23R* koji kodira protein koji je deo heterodimernog membranskog receptora za proinflamatorni citokin IL-23 (IL-23R). Takođe je uočena i jaka udruženost između IBC i gena *IL12B* koji kodira p40 protein (nazvan još i IL-12B) koji predstavlja zajedničku subjedinicu za IL12 i IL23 citokine (IL-12 čine protini p35 i p40, a IL-23 proteini p19 i p40) [161]. Pošto su IL-12 i IL-23 citokini ključni za diferencijaciju i funkciju Th1,

odnosno Th17 ćelija, a ove dve populacije efektorskih ćelija verovatno imaju ključnu ulogu u IBC, nije iznenađujuće da su polimorfizmi oba ova gena povezani sa osetljivošću za nastanak IBC, i to posebno KB, kao i određenim fenotipskim karakteristikama bolesti. Među njima se ističu dva polimorfizma, rs6887695 (G/C) u blizini *IL12B* gena [162], a naročito nsSNP rs11209026 (G1142A) na poziciji 1142 u egzonu 9 *IL23R* gena koji kodira promenu aminokiseline arginin u glutamin (Arg381Gln, odnosno R381Q) u transmembranskom delu receptora za IL-23.

Brojne pojedinačne studije, meta analize i GWA studije su ukazale na postojanje udruženosti polimorfizma rs6887695 *IL12B* sa KB kod evropskih populacija iz Nemačke, Danske, ali i drugih populacija sa udaljenih kontinenata, kao što su populacije Novog Zelanda i Kine [162-167]. Međutim, nema podataka o značaju ovog polimorfizma u patogenezi IBC u populacijama istočne Evrope, Srbije i regiona. Što se tiče rs11209026, postoje dokazi da protektivni A alel ovog polimorfizma dovodi do formiranja solubilnog IL-23R koji vezuje IL-23 i sprečava da se on veže za ćelije čime smanjuje diferencijaciju i funkcionalni kapacitet Th17 ćelija [168]. Polimorfizam u *IL23R*, posle polimorfizama u genu za NOD2 (*NOD2*), ispoljava najjaču povezanost sa KB, pri čemu glutamin na poziciji 318 približno tri puta smanjuje rizik za razvoj KB i u nešto manjoj meri za UK [169]. I mnoge druge studije su potvrdile značaj ovog polimorfizma u *IL23R* u patogenezi IBC u severozapadnoj Evropi, Americi i Novom Zelandu [91, 165, 170, 171]. Suprotno, studije koje su obuhvatile populacije Japana, Izraela i Indije nisu utvrdile povezanost ovog polimorfizma sa IBC [172-174]. Do sada su objavljene samo dve studije iz Istočne Evrope, sa oprečnim rezultatima [175, 176], a ne postoje podaci o distribuciji i povezanosti ovog polimorfizma sa IBC u Srbiji i regionu.

#### **1.6.1.4 Polimorfizmi u *MDR1* genu**

Pored gena za citokine i njihove receptore i polimorfizmi u drugim genima su povezani sa IBC. Među njima je i *MDR1* (*engl.* multidrug resistance 1, MDR1), koji se naziva još i *ABCBI* (*engl.* ATP-binding cassette, subfamily B 1 gene). Kod čoveka se *MDR1* nalazi na dugom kraku hromozoma 21 (7q) u lokusu koji je povezan za razvojem IBC [177]. *MDR1* kodira transmembranski protein od 170 kDa, nazvan P-glikoprotein (P-gp), koji predstavlja ATP-zavisnu transportnu (efluksnu) pumpu i ima ulogu u ograničavanju bioraspoloživosti i ćelijske toksičnosti velikog broja lekova i drugih ksenobiotika. Smatra se da varijacije u njegovoj ekspresiji utiču na farmakokinetiku

mnogih lekova, kao što su kortikosteroidi, imunosupresivni lekovi, digoksin, antihistaminici i antikonvulzivni lekovi [178]. P-gp je eksprimiran na mnogim ćelijama u organizmu, a naročito u epitelnim tkivima, uključujući i epitel GIT-a, pri čemu njegova ekspresije raste od želuca ka distalnim delovima creva [179]. Funkcija i anatomska lokalizacija P-gp sugerišu njegovu transportno-protektivnu ulogu u ekskreciji toksina u žuč, crevni lumen i urin, sprečavajući njihovo zadržavanje u organizmu. Moguće je da P-gp ima ključnu ulogu i u interakcijama između mikroorganizama i ćelija domaćina i uspostavljanju homeostaze na nivou creva. Pretpostavlja se da njegova neadekvatna funkcija može da poremeti preuzimanje toksina i ksenobiotika i posledično dovede do inflamacije i razvoja IBC [180, 181]. U skladu sa ovom pretpostavkom su rezultati istraživanja na miševima kod kojih je genetskom manipulacijom uklonjen gen za MDR1 (tzv. *Mdr1a*<sup>-/-</sup> miševi). Ako se ovi miševi drže u uslovima u kojima nema patogenih mikroorganizama, razvijaju kolitis koji histološki ima karakteristike ulceroznog kolitisa, a u manjoj meri i kolitisa koji se javlja kod pacijenata sa KB [182]. Studije su pokazale da je ekspresija *MDR1* gena u sluznici kolona značajno snižena kod pacijenata sa IBC, naročito kod UK [181, 183].

Do sada je identifikovano više od 50 SNP u *MDR1* genu i za neke je pokazano da mogu da menjaju ekspresiju i funkciju P-gp [184, 185]. Među njima se posebno ističu tri polimorfizma, od kojih su dva sinonimna, C1236T (rs1128503) na poziciji 1236 u egzonu 12 i C3435T (rs1045642) na poziciji 3435 u egzonu 26. Treći polimorfizam je nesinonimni, trialelski SNP G2677T/A (rs2032582) i dovodi do promene aminokiseline alanina u serin ili treonin (Ala893Ser/Thr, odnosno A893S/T) i nalazi se na poziciji 2677 u egzonu 21 *MDR1* gena [186]. Smatra se da pojedine varijante ovih SNP smanjuju ekspresiju P-gp i efikasnost efluks pumpe, zbog čega nagomilani ksenobiotici, mikroorganizmi (patogeni i komensali) i njihovi toksini mogu da dovedu do nastanka IBC. Prve studije koje su uključile pacijente sa IBC su ukazale da su T alel i TT genotip polimorfizma C3435T, odnosno G alel polimorfizma G2677T/A povezani sa IBC [187, 188]. Od tada je urađen veći broj studija, uključujući i nekoliko meta-analiza, u kojima je ispitivana povezanost ovih polimorfizma sa IBC, ali njihova uloga u patogenezi IBC za sada ostaje nedovoljno razjašnjena, obzirom na oprečne rezultate u različitim istraživanjima [140, 180, 189-191].

### 1.6.2 Značaj ispitivanja polimorfizama u inflamatornoj bolesti creva u Srbiji

Poslednjih godina postoji veoma izražena tendencija individualizovanog pristupa kompleksnim bolestima kao što je IBC. Ispitivanje polimorfizama pojedinih gena može da doprinese da se definišu biomarkeri koji bi mogli da pomognu u proceni rizika kod određene osobe da oboli od IBC, odnosno da pomognu kod obolelih u dijagnostici i klasifikaciji bolesti, prognozi toka bolesti i praćenju terapijskog odgovora. Pošto genski polimorfizmi, osim *NOD2*, nisu do sada analizirani kod pacijenata sa IBC u Srbiji, postoji potreba za studijom kojom bi ispitala povezanost polimorfizama određenih imunološki relevantnih gena u IBC. Od posebnog je interesa ispitivanje polimorfizama u genima koji kodiraju citokine ili njihove receptore, s obzirom da kompleksna mreža citokina koja dovodi do inflamacije u IBC predstavlja potencijalno važnu terapijsku metu. Na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja, među njima se posebno ističu polimorfizmi u genima za TNF (*TNFA*) i IL-10 (*IL10*), polimorfizmi u genu *IL12B* koji kodira protein p40 (IL-12B), zajedničku podjedinicu IL-12 i IL-23, odnosno polimorfizmi u *IL23R*, genu za receptor za IL-23. Takođe, i polimorfizmi u *MDR1* genu koji kodira transporter P-glikoprotein 170 su takođe povezani sa razvojem IBC, a nisu ispitivani kod pacijenata sa IBC u Srbiji.

Stoga je potrebno da se u jednom istraživanju po prvi put u populaciji Srbije odredi distribucija navedenih polimorfizama genskih alela koji kodiraju citokine i/ili njihove receptore, odnosno druge molekule sa pretpostavljenom važnom ulogom u patogenezi IBC (kao što je *MDR1*), što bi moglo da doprinese i upotpuni dosadašnja saznanja o značaju polimorfizama ispitivanih gena za nastanak IBC. Na taj način bi moglo da se utvrdi da li bi polimorfizmi u okviru ispitivanih gena mogli da se koriste kao potencijalni biomarkeri osetljivosti za nastanak IBC, odnosno razvoj određene fenotipske karakteristike KB ili UK. Takođe, do sada je pokazano da postoje etničke razlike u distribuciji alela i genotipova i u zdravoj populaciji Srbije za pojedine SNP, kao što je slučaj sa rs1800629 (G-308A) i tri polimorfizma u *MDR1* (C1236T, G2677T/A i C3435T), pri čemu podaci za preostale navedene polimorfizme u našoj populaciji ne postoje. Stoga bi naše istraživanje moglo da doprinese utvrđivanju postojanja određenih genetskih specifičnosti naše populacije u genima koji kodiraju IL-10, IL-12B i IL-23R u odnosu na druge populacije u Evropi i svetu.

## ***2. Ciljevi***

---

Osnovni cilj ovog istraživanja je da se utvrdi učestalost alelskih varijanti u polimorfizmima u genima *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* kod pacijenata sa IBC u Srbiji i ispita postojanje povezanosti ovih genskih varijanti i osetljivosti za razvoj UK i KB, kao i njihov uticaj na fenotipske karakteristike bolesti. Poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima drugih studija mogli bi se definisati genetske specifičnosti pacijenata sa IBC u Srbiji u odnosu na pacijente sa IBC u drugim zemljama. Takođe, analiza učestalosti alela i genotipova u populaciji dobrovoljnih davaoca krvi u Srbiji mogla bi da doprinese utvrđivanju učestalosti polimorfizama *IL10*, *IL12* i *IL23R* u opštoj populaciji zdravih osoba, obzirom da ovakvi podaci još uvek ne postoje za našu zemlju.

U ovom istraživanju postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Odrediti distribuciju alela i genotipova polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* u grupi pacijenata sa IBC
2. Utvrditi distribuciju alela i genotipova polimorfizama *IL10*, *IL12B* i *IL23R* u populaciji zdravih osoba na teritoriji Republike Srbije (dobrovoljni davaoci krvi)
3. Ustanoviti da li je neki od polimorfizmama ovih gena koji nastaju usled izmene pojedinačnih nukleotidnih baza faktor rizika za nastanak KB i UK i/ili utiče na kliničke manifestacije ovih bolesti
4. Proceniti da li se distribucije ispitivanih polimorfizama kod pacijenata sa KB i UK i dobrovoljnih davaoca krvi u ovoj studiji razlikuju u odnosu na studije u kojima su ovi polimorfizmi ispitivani u našoj zemlji, odnosno u drugim populacijama



### ***3. Materijal i metode***

---

### **3.1 DIZAJN STUDIJE**

Ovo istraživanje predstavlja studiju preseka koja je obavljena u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju, Kliničkog centra Srbije (KCS) i Institutu za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u periodu od maja 2014. godine do septembra 2015. godine. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (revidirana verzija iz 1983. godine) i u skladu sa pravilima Etičkih komiteta Kliničkog centra Srbije i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu koji su istraživanje i odobrili. Kriterijumi za uzimanje uzorka krvi podrazumevali su da ispitanici budu stariji od 18 godina i da su dobrovoljno potpisali pristanak za učešće u istraživanju.

### **3.2 SELEKCIJA ISPITANIKA**

U studiju je uključeno 206 odraslih pacijenata sa IBC koji su ispitivani i lečeni u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju, Kliničkog centra Srbije u prethodno navedenom. Kontrolnu grupu je sačinjavalo 255 dobrovoljnih davalaca krvi.

#### **3.2.1 Grupa pacijenata sa inflamatornom bolesti creva**

U grupi bolesnika sa IBC učestvovalo je 107 pacijenta sa KB i 99 pacijenta sa UK. Kod svih pacijenata sa IBC dijagnoza je postavljena u skladu sa savremenim preporukama Evropskog udruženja za Kronovu bolest i ulcerozni kolitis (*engl.* European Crohn's and Colitis Organisation – ECCO) [3, 118], na osnovu anamneze, fizikalnog pregleda, laboratorijskih analiza krvi i koproloških analiza, gornje i donje endoskopije sa biopsijama i patohistološkim pregledom, CT (MR) enterokliza (enterografija), a prema potrebi rađeni su i pregledi ultrasonografija abdomena, kompjuterizovana tomografija (CT) ili magnetna rezonanca (MR) abdomena i/ili male karlice, endovideo kapsula i endoanalna ultrasonografija.

#### **3.2.2 Karakteristike bolesnika sa inflamatornom bolesti creva**

Kod pacijenata sa KB i UK u sklopu anamnestičkih podataka evaluirani su podaci koji se odnose na demografske i epidemiološke karakteristike bolesnika kao što su pol, starost, dužina trajanja bolesti, lokalizacija i tip bolesti, laboratorijski i klinički parametri

aktivnosti bolesti, postojanje anemije, naslednost, pušenje, hirurško lečenje zbog osnovne bolesti, dužina trajanja bolesti do hirurškog lečenja, prisustvo ekstrakrevnih manifestacija bolesti (EIM), prisustvo komplikacija bolesti i postojanje komorbiditeta. Takođe su beleženi podaci koji se odnose na sadašnju i prethodnu terapiju korišćenu zbog osnovne bolesti kao i postojanje refraktarne bolesti (kortikosteroid-refraktarne i/ili zavisne bolesti i imunomodulatorno-refraktarne bolesti), odnosno neželjenih efekata terapije.

### **3.2.3 Laboratorijski parametri**

U laboratoriji Klinike za gastroenterologiju i hepatologiju Instituta za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije rađene su biohemijske analize kod svih ispitanika, na aparatu Vitros 350 Ortho-Clinical Diagnostics (Johnson and Johnson, SAD), a hematološke analize određivane su na hematološkom brojaču. Određivane su koncentracije sledećih parametara: hemoglobin, MCV, hematokrit, serumsko gvožđe (kolorimetrijska, bez deproteinizacije), TIBC (*engl.* total iron binding capacity) (kolorimetrijska, bez deproteinizacije), feritin, vitamin B12, folat, leukociti, trombociti, fibrinogen, laktat dehidrogenaza (LDH), haptoglobin, albumin (bromkrezol zeleno), ukupni proteini, sedimentacija eritrocita u prvom satu (SE), C-reaktivni protein (CRP) (imunohistohemijski-turbidimetrijsko merenje), aspartat- aminotrasferaza (AST), alanin aminotrasferaza (ALT), bilirubin ukupan i direktni, alkalna fosfataza, gama-glutamiltransferaza, amilaza, lipaza, protrombinsko vreme, D-dimer i parcijalno tromboplastinsko vreme. Kriterijumi patoloških vrednosti laboratorijskih parametara, bile su vrednosti izvan (iznad ili ispod) opsega referentnih vrednosti primenjenih testova.

### **3.2.4 Koprološke analize**

Kod svih ispitanika sa IBC urađen je mikrobiološki pregled stolice tokom tri uzastopna dana, počev od dana prijema u bolnicu, koji je podrazumevao koprokulturu i pregled stolice na protozoe, gljivice i jaja helminata, kao i brzi test na *Clostridium difficile*, toksin A i B.

### **3.2.5 Klasifikacija inflamatorne bolesti creva**

Na osnovu urađenih ispitivanja bolesnici su klasifikovani prema karakteristikama bolesti u skladu sa Montrealskom klasifikacijom [100]. Na taj način, bolesnici sa KB su

podeljeni na grupe na osnovu godina starosti kada je dijagnoza postavljena, na osnovu lokalizacije i prema tipu, odnosno formi bolesti (Tabela 2). Prema lokalizaciji bolesti, bolesnici sa KB su podeljeni u sledeće grupe: L1 - ileum, L2 - kolon, L3 - ileum + kolon i L4 - proksimalni segmenti gastrointestinalnog trakta. Prema tipu bolesti, pacijenti su podeljeni na inflamatorni (B1), stenozantni (B2) i penetrantni tip KB (B3).

**Tabela 2.** Montrealska klasifikacija za KB

Godine starosti (kad je dijagnoza postavljena)	A1	ispod 16 godina
	A2	između 17-40 godina
	A3	iznad 40 godina
Lokalizacija	L1	ileum
	L2	kolon
	L3	ileokolon
	L4*	izolovana bolest gornjih partija GIT-a
Forma	B1	inflamatorna
	B2	stenozantna
	B3	penetrantna
	p <sup>†</sup>	perianalna bolest

\* L4 je modifikovan tako da može biti pridružen L1-L3 kada je prisutna i bolest gornjih partija GIT-a

† p se dodaje B1-B3 kad je prisutna pridružena perianalna bolest

Na osnovu Montrealske klasifikacije, bolesnici sa UK su podeljeni prema ekstenzivnosti bolesti na tri grupe: E1 - proktitis, E2 - distalni kolitis (tzv. „left side“ kolitis) i E3 - ekstenzivni kolitis (promene do hepatičke fleksure i pankolitis) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Montrealska klasifikacija za UK

Nomenklatura	Ekstenzivnost	Opis
E1	Proktitis	Promene zahvataju rektum (distalno od rektosigmoidnog spoja)
E2	„Left-side“ kolitis	Promene zahvataju kolon distalno od lijenalne fleksure
E3	Ekstenzivni kolitis	Promene zahvataju kolon iznad, lijenalne fleksure uključujući i pankolitis

### 3.2.6 Klinički parametri aktivnosti bolesti

Kod svih pacijenata sa KB i UK određivani su klinički indeksi aktivnosti bolesti. U proceni aktivnosti bolesti kod bolesnika sa KB, korišćen je Indeks aktivnosti Kronove

bolesti (CDAI) [104], a za procenu kliničke aktivnosti bolesti kod pacijenata sa UK, korišćen je tzv. Mayo skor [103]. Kriterijumi gradacije aktivnosti bolesti za CDAI i Mayo skor, preuzeti su iz vodiča Evropskog udruženja za Kronovu bolest i ulcerozni kolitis [3, 118].

Računanje CDAI se bazira na različitim podacima iz dnevnika koji pacijent popunjava tokom sedam dana (Tabela 4) i vrednost skora određuje aktivnost bolesti na sledeći način:  $CDAI \leq 150$  – bolest u remisiji;  $150 < CDAI < 220$  – blaga aktivnost bolest;  $220 < CDAI < 450$  – umerena aktivnost bolesti i  $CDAI > 450$  – teška aktivnost bolesti.

**Tabela 4.** Kriterijumi za određivanje CDAI indeksa aktivnosti kod KB

Broj stolica (u toku 24h/tokom 7 dana)	Od 0 (nema) do 3 (teška)	x 2
Abdominalni bol (u toku 24h/tokom 7 dana)	Od 0 (bez bola) do 3 (veoma jak)	x 5
Opšte stanje (u toku 24h/tokom 7 dana)	Od 0 (dobro) do 4 (veoma loše)	x 7
Ekstraintestinalne manifestacije	artritis; iritis; aftozni stomatitis; fistule; $T > 37,8^{\circ}\text{C}$	x 20
Opijati	0 (ne); 1 (da)	x 30
Abdominalna masa	0 (nema); 2 (nesigurna); 5 (prisutna)	x 10
Hematokrit	Muškarci= 47- Hct; Žene = 42-Hct	x 6
Telesna težina (% ispod standardne)		x 1

Za bolesnike sa UK, vrednosti Mayo skora  $\leq 3$  ukazuju na remisiju bolesti, Mayo skor 4-6 predstavlja blaga aktivnost bolesti; Mayo skor 7-9 - umerena aktivnost bolesti; Mayo skor 10-12 - teška aktivnost bolesti (Tabela 5).

**Tabela 5:** Kriterijumi za određivanje Mayo skora aktivnosti kod UK

Broj stolica više od uobičajenog	normalan	0
	1-2	1
	3-4	2
	5 i više	3
Krv u stolici	nema	0
	tragovi krvi	1
	krv u manje od pola stolice	2
	uglavnom krv	3
Baron skor	uredan nalaz	0
	lako zamućen vaskularni crtež	1
	fragilna sluznica, krvvari na dodir	2
	spontano krvarenje	3
Klinička procena lekara	bolest u remisiji	0
	blaga bolest	1
	umerena bolest	2
	teška bolest	3

### 3.2.7 Ekstracrevne manifestacije i pridružene bolesti

Kod svih pacijenata sa IBC notirano je postojanje sledećih EIM: oligoartikularni i poliartikularni periferni artritis, *eritema nodosum*, „Sweet“ sindrom, oralne aftozne ulceracije, episkleritis, uveitis, pioderma gangrenosum i spondiloartropatije. Takođe je kod svih pacijenata beleženo i postojanje hepatobilijarnih i drugih udruženih bolesti (primarni sklerozirajući holangitis, autoimunski hepatitis) i komplikacija bolesti.

### 3.2.8 Procena uhranjenosti

Kod svih ispitanika određivan je indeks telesne mase (*engl.* Body mass index, BMI) na osnovu aktuelne telesne mase (TM) izmerene ujutru i telesne visine (TV). BMI je izračunavan po formuli sledećoj formuli:

$$\text{BMI} = \text{TM (kg)}/\text{TV}^2 \text{ (m}^2\text{)}$$

Prema podacima iz literature [192], za normalan BMI smatraju se vrednosti od 18,5 do 25, pri čemu vrednosti veće od 25 ukazuju na gojaznost, dok vrednosti manje od 18,5 ukazuju na postojanje podhranjenosti (Tabela 6).

**Tabela 6.** Definisane stepena pothranjenosti u odnosu na vrednost BMI

BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Uhranjenost
< 18,49	Pothranjenost
18,5 – 24,9	Normalna uhranjenost
25 – 29,9	Gojaznost
> 30	Morbidna gojaznost

### 3.2.9 Kriterijumi isključenja iz studije

Uslovi za isključenje iz studije za sve ispitanike bili su:

- Prisustvo ili ranije lečenja od maligniteta
- Postojanje displazije na sluznici gastrointestinalnog trakta
- Postojanje transplantiranog organa
- Psihijatrijsko oboljenje koje onemogućava pacijenta da samostalno donosi odluke
- Trudnoća ili period dojenja
- Želja ispitanika da ne učestvuje u istraživanju

### **3.2.10 Kontrolna grupa ispitanika**

Kontrolnu grupu sačinjavalo je 255 ispitanika, koji su bili dobrovoljni davaoci krvi, čija je krv uzimana u Institutu za transfuziju krvi Srbije i koji nisu oboleli od IBC ili drugih zapaljenskih bolesti.

## **3.3 GENETSKA ISPITIVANJA**

Polimorfizmi u genima *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* kod pacijenata sa IBC određivani su korišćenjem reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu (*engl.* Real-time PCR) iz DNK pacijenata koja je izolovana iz njihove periferne krvi. Na isti način određivani su i polimorfizmi za *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* kod ispitanika iz grupe dobrovoljnih davaoca krvi.

### **3.3.1 Uzimanje krvi**

Za određivanje genskih polimorfizama, svim ispitanicima je uzimano 5 ml periferne krvi u odgovarajuće epruvete (Becton Dickinson, SAD) sa antikoagulansom - EDTA i unutar 2 h, transportovano do Laboratorije za imunologiju, Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, gde je krv dalje obrađivana, i iz nje izolovana i čuvana genomska DNK.

### **3.3.2 Izolacija DNK**

Za izolaciju DNK iz periferne krvi pacijenata sa UK i KB i kontrolnih, zdravih osoba korišćene su odgovarajuće kolone (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas, Litvanija) prema uputstvu proizvođača. Pre procesa izolacije, u pufere za ispiranje (*engl.* Wash buffer) WB I i WB II dodata je adekvatna količina 100%-nog etanola. Iz svake epruvete sa krvi tipa „vacutainer“ (koje su prethodno promešane) uzimano je po 200 µl krvi i prenošeno u obeležene epruvete po tipu „ependorf“ zapremine 1,5 ml (Sarsted, SR Nemačka). Svakom uzorku dodavano je po 400 µl rastvora za liziranje i 20 µl proteinaze K. Uzorci su potom mešani na orbitalnoj mešalici (vorteksu) i inkubirani u vodenom kupatilu na temperaturi od 56°C uz povremeno mešanje (2-3 puta) okretanjem epruveta gore-dole u periodu od 10 minuta. Potom je u svaki uzorak dodavano po 200 µl 96%-nog etanola, i nakon mešanja, sadržaj je prebacivan u prethodno obeležene kolonice koje su

bile ubačene u „Eppendorf“ epruvete od 2ml sa odsečenim poklopcem (Sarsted). Sadržaj kolonica je centrifugiran na 6000g u trajanju od 1 minut, nakon čega su kolonice sa vezanom DNK prebacivane u kivete za otpad koje su sastavni deo GeneJet Genomic DNA Purification kompleta. DNK vezane za matriks kolona su ispirane dodavanjem po 500 µl WB I i centrifugiranjem kolona na 8000g u trajanju od 1 minut. Nakon odlivanja sadržaja kiveti za otpad, u kolone je dodavano po 500 µl WB II. Potom su kolone centrifugirane na 14 000g u periodu od 3 minuta, a ukoliko bi u njima ostalo još tečnosti, centrifugiranje je ponavljano još 1 minut na istoj brzini nakon pražnjenja kiveti za otpad. Kolone sa vezanom DNK su prebacivane u prethodno obeležene „Eppendorf Safe Lock“ epruvete od 1,5 ml (Eppendorf, SR Nemačka) i pristupalo se izdvajanju DNK vezane za matriks kolone. U svaku kolonu je dodavano 200 µl pufera za rastvaranje DNK, potom je vršena inkubacija kolona na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 minuta i centrifugirane na 8000 g u trajanju od 3 minuta.

### **3.3.3 Određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK**

Nakon izolacije DNK određivana je čistoća i količina prečišćene DNK. Uzorak od 5 µl izolovane DNK nanošen je u mikrokivetu Gene Quant Pro Calculatora (LKB Pharmacia, Švedska), a zatim su merene apsorbancije na 230, 260, 280 i 320 nm. Prihvatljivim su smatrane vrednosti količnika apsorpcija 260/280 između 1,65 i 1,85, odnosno vrednosti 260/230 veće od 1,2. U slučaju dobijanja vrednosti izvan navedenog opsega, ponavljana je procedura izolacije DNK iz uzoraka krvi. Uzorci izolovane i izmerene DNK su razblaženi sa vodom do koncentracije od 5 ng/µl i korišćeni za određivanje polimorfizama. Ostatak DNK je skladišten na temperaturi od -20°C.

### **3.3.4 Detekcija i analiza polimorfizama gena reakcijom lančanog umnožavanja u realnom vremenu**

Za detekciju i analizu polimorfizama gena za *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* korišćene su komercijalne optimizovane smeše specifičnih oligonukleotida i SNP TaqMan proba i to za *TNFA* rs1800629 (#C\_7514879\_10), *IL10* rs1800896 (#C\_1747360\_10), *IL10* rs1800871(C\_1747362\_10), *IL10* rs3024505 (#C\_15983681\_20), *IL12B* rs6887695 (#C\_1994992\_10), *IL23R* rs11209026 (#C\_1272298\_10), *MDR1* rs1128503 (#C\_7586662\_10), *MDR1* rs1045642 (#C\_7586657\_20) i troalelski SNP *MDR1* rs2032582 (#C\_11711720C\_30 i C\_11711720D\_40) (svi PE, Applied Biosystems, SAD). Podaci za



frekvenciju alela za *IL10* rs1800872 (C-592A) SNP kod svih ispitanika su izvedeni iz rezultata dobijenih za *IL10* rs1800871 (C-819T) SNP uz zamenu alela T alelom A, s obzirom da je pokazano da se ta dva polimorfizma nalaze u potpunoj vezanoj neravnoteži i nasleđuju se u paru [151], dok su podaci o frekvencijama alela za kontrolnu grupu ispitanika preuzeti iz literature i to u potpunosti za rs1800629 (G-308A) SNP [193], a delimično za rs1800896 (G-1082A) i rs1800871 (C-819T) SNP [194].

Amplifikacija fragmenata DNK Real-time PCR metodom vršena je prema preporukama proizvođača testova. Real-time PCR amplifikacija je vršena u Realplex<sup>2</sup> PCR mašini (Eppendorf) pomoću komercijalnog reagensa (Maxima<sup>TM</sup> Probe qPCR 2X Master Mix, Fermentas) u finalnoj zapremini od 10µl u optičkim pločama od 96 mesta (PE, Applied Biosystems), u koje su sipane reakcione smeše od 5 µl 2 x Real Master Mix Probe (Fermentas), 0,25 µl komercijalne smeše oligonukleotida za detekciju navedenih polimorfizama i 4,75 µl ispitivanog DNK uzorka. Ploče su potom zatvarane optičkim filmom (PE, Applied Biosystems), kratko centrifugirane na 1500g i potom smeštane u termoblok Realplex<sup>2</sup> PCR mašine. Ploče su inkubirane u termobloku u periodu od 4 minuta na temperaturi od 95°C da bi se aktivirala DNK polimeraza. Temperaturni profil amplifikacije se sastojao od faza denaturacije na 95°C tokom 15 sekundi, praćen fazom spajanja oligonukleotida i elongacije na 60°C u toku 1 minuta sa 39 ponavljanja identičnog ciklusa. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na temperaturi od 60°C. Po završetku amplifikacije određivani su aleli pomoću Realplex 2.0 softvera uz ručno podešavanje linije praga detekcije.

### 3.4 STATISTIČKA ANALIZA

Za statističku analizu je korišćen kompjuterski program „SPSS 20 for Windows“ (SPSS, SAD). Statistička analiza je urađena korišćenjem standardnih metoda deskriptivne statistike. Za numerička obeležja korišćeni su aritmetička sredina i standardna devijacija. Hardy-Weinberg ravnoteža (*engl.* Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) određivana je za sve ispitivane polimorfizme za zdrave ispitanike, kao i za obolele. Distribucije alela i genotipova određivane su kod pacijenata sa KB, UK, svih pacijenata sa IBC, kao i zdravih osoba (kontrolna grupa ispitanika). Procena frekvencija haplotipova i diplotipova (kombinacije haplotipova) za gene kod kojih je analiziran već broj polimorfizama (*IL10* i *MDR1*) korišćen je „Expectation-Maximization algorithm“ upotrebom odgovarajućeg programa Arlequin 3.5.1.3 [195]. Za utvrđivanje razlike u frekvenci i distribuciji alela,

genotipova, haplotipova i diplotipova različitih polimorfizama u ispitivanim grupama, kao i za poređenje povezanosti polimorfizama sa obolelim od KB i UK grupisanih na osnovu različitih karakteristika bolesti, primenjen je  $\chi^2$  test, odnosno Fisher-ov test tačne verovatnoće (gde je to bilo odgovarajuće). Za procenu efekata ispitivanih genskih polimorfizama i mogućih rizika za nastanak bolesti korišćen je odnos šansi (*engl.* odds ratio, OR) sa intervalom poverenja od 95% (*engl.* 95% confidence interval, CI) za svaki ispitivani polimorfizam. U svim testovima, vrednosti p manje od 0,05 smatrane su značajnim.

## ***4. Rezultati***

---

#### **4.1 PRIKAZ DEMOGRAFSKIH I KLINIČKIH KARAKTERISTIKA PACIJENATA**

U studiju je uključeno 206 pacijenata sa IBC i 255 zdravih ispitanika. U analiziranoj seriji je bilo 107 pacijenata sa KB (52%) i 99 ispitanika sa UK (48%) koji su ispitivani i lečeni u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od maja 2014. godine do septembra 2015. godine. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika sa IBC su prikazane u Tabeli 7 (pacijenti sa KB) i Tabeli 8 (pacijenti sa UK).

Grupu ispitanika sa KB, sačinjavalo je 62 osobe muškog pola (57,9%) i 45 osoba ženskog pola (42,1%), prosečnih godina starosti 40 (raspon 18-68 godina). Prosečna starost kada je postavljena dijagnoza KB bila je 32,5 godine (14-67), a bolest je u proseku trajala 6,6 godina (0-31). U odnosu na lokalizaciju, prema Montrealskoj klasifikaciji, najveći procenat pacijenata je imao bolest ileokolonske lokalizacije, L3 (45, odnosno 42,1%), dok je podjednaki broj pacijenata imalo bolest lokalizovanu u terminalnom ileumu ili u kolonu (L1 i L2), i to po 27 pacijenata (25,2%). Gornje partije GIT-a su bile zahvaćene kod 8 pacijenata (7,5%), uvek zajedno uz ostale lokalizacije bolesti, najčešće kod pacijenata sa ileokolonskom lokalizacijom (7 pacijenata), dok je jedan pacijent pored gornjih partija GIT-a imao lokalizaciju bolesti i u ileumu. U našoj seriji ispitanika nije bilo pacijenata koji su izolovano imali zahvaćenost gornjih partija GIT-a (L4). U odnosu na fenotipske karakteristike, najčešće je bila zastupljena stenožantna forma bolesti B2 (57 pacijenata, odnosno 53,3%), potom inflamatorna bolest B1 (34, odnosno 31,7%), dok je penetrantna bolest B3 bila prisutna kod 16 pacijenata (15%). Perianalnu bolest (p) je imalo 32 pacijenta (29,9%) i ona je bila zastupljena kod sva tri tipa bolesti u približno sličnom procentu. Prema CDAI, najveći broj pacijenata imao je kliničku remisiju bolesti 57 (54,3%), 32 pacijenata su imali blagu aktivnost bolesti (30,5%), dok je 16 pacijenata (15,2%) imalo umereno tešku aktivnost bolesti. U našoj grupi pacijenata sa KB, nije bilo ispitanika sa teško aktivnom bolesti prema CDAI. Ekstracrevne manifestacije (EIM) bolesti su bile prisutne kod 18 (16,8%) pacijenat u trenutku izvođenja studije, 16 pacijenata (15%) je ranije imalo neku od EIM, dok 73 pacijenta (68,2%) nikada nije imalo ni jednu EIM bolesti. Prema indeksu telesne mase (BMI), 36 pacijenata (33,6%) je bilo pothranjeno, dok je 71 pacijent (66,4%) imao adekvatnu uhranjenost. Ranu bolest (bolest koja je trajala do 18 meseci) je imalo 40 pacijenata (37,4%). Ispitivali smo odgovor na terapiju u našoj kohorti pacijenata. Više od pola pacijenata (54, odnosno 50,5%) je imalo kortikosteroid

(KS)-zavisnu formu bolesti, 14 pacijenata (13,1%) je imao KS-refraktarnu formu bolesti, dok je 45 pacijenata (42,1%) imalo imunomodulatorno-refraktarnu bolest, ili je razvila neželjene efekte na lek (azatioprin ili metotreksat). Trideset i šest pacijenata (33,7%) je aktuelno bilo na anti-TNF terapiji, dok je 6 pacijenata ranije bilo na terapiji inhibitorima TNF. Ranije hirurško lečenje je imalo 53 pacijenta (50%), u proseku u 35. godini života (19-66), sa trajanjem bolesti od 2,86 godina do hirurškog lečenja. Prema anamnestičkim podacima o pušenju 25 pacijenata su bili aktivni pušači (23,4%), 11 pacijenata su bili bivši pušači (10,3%), dok 71 pacijent (66,3%) nikada nije bio pušač. Pozitivnu porodičnu anamnezu za IBC je prijavilo 11 pacijenata (10,3%).

Grupu pacijenata sa UK sačinjavalo je 54 ispitanika muškog pola (54,5%) i 45 pacijenata ženskog pola (45,5%), prosečne godine starosti 42 (raspon 19-70). Bolest je u proseku trajala 5,5 godina (0-26), a starost pacijenata u trenutku postavljanja dijagnoze je u proseku iznosila 36,6 godina (2-67). Rana bolest koja je podrazumevala trajanje bolesti do 18 meseci je bila prisutna u 45 pacijenata sa UK (35,5%). U odnosu na lokalizaciju, većina naših pacijenata je imala ekstenzivnu bolest (59, odnosno 59,6%), 35 pacijenata je imalo levostrani kolitis (35,4%), 2 pacijenta su imali proktitis (2%) i 3 pacijenta su imali paučitis nakon operativnog lečenja (kolektomija sa ileo-pauč-analnom anastomozom – IPAA). Srednja vrednost kliničke aktivnosti bolesti prema Mayo skoruu je iznosila 6 (0-12), pri čemu je najveći procenat pacijenata imao umereno tešku aktivnost bolesti (35 odnosno 35,4%), blaga bolest je bila prisutna kod 32 pacijenta (32,3%), 19 pacijenata bilo u kliničkoj remisiji (19,2%), dok je 13 pacijenata imalo teško aktivnu bolest (13,1%).

U odnosu na terapiju, 32 pacijenata (32,2%) su imali KS-zavisnu formu bolesti, 4 pacijenta (4%) su imali KS-refraktarnu bolest, dok je 10 pacijenata (10,1%) imalo refraktarnu bolest na azatioprin, ili su razvili neželjene efekte na lek. Anti-TNF terapiju su koristili, u trenutku izvođenja studije, 3 pacijenta (3%) dok je 4 pacijenata (4%) prekinulo terapiju nakon 2 godine (prema aktuelnom Pravilniku Republičkog Fonda Zdravstvenog Osiguranja - RFZO Srbije). U ispitivanoj seriji, 3 pacijenta je bilo podvrgnuto hirurškom lečenju (3%) i kod svih je urađena kolektomija sa IPAA. Godine starosti u trenutku operativnog lečenja su u proseku iznosile 48,7 (30-65), a dužina trajanja bolesti do hirurškog lečenja je u proseku iznosila 2,3 godine. U ispitivanoj kohorti 27 pacijenata sa UK (27,3%) su imali jednu ili više ekstrakrevnih manifestacija bolesti u trenutku izvođenja studije (EIM), dok je 12 pacijenata ranije imalo neku od EIM (12,1%). Prema BMI, tj. indeksu telesne mase, 26 pacijenata (26,3%) su bili pothranjeni, dok je 73 pacijenta bilo

**Tabela 7.** Demografske i kliničke karakteristike ispitanika sa KB

<b>Karakteristike pacijenata sa KB</b>		
Broj	107	
Pol – Br. (%)	Muškarci	62 (57,9%)
	Žene	45 (42,1%)
Godine starosti (Medijana, Min-Max)	40 (18-68)	
Godine starosti kad je postavljena dijagnoza (Medijana, Min-Max)	32,5 (14-67)	
Lokalizacija – Br. (%)	L1 – Ileum+proksimalne partije GIT-a	27+1=28 (26,2%)
	L2 – Kolon+ proksimalne partije GIT-a	27+0=27 (25,2%)
	L3 – Ileokolon+ proksimalne partije GIT-a	45+7=52 (48,6%)
	L4 – Proksimalne partije GIT-a (samo)	0
	Proksimalne partije GIT-a (ukupno)	8 (7,5%)
Forma – Br. (%)	B1 – Inflamatorna+perianalna	22+12=34 (31,7%)
	B2 – Stenozantna+ perianalna	42+15=57 (53,3%)
	B3 – Penetrantna+perianalna	11+5=16 (15,0%)
	p – Perianalna (ukupno)	32 (29,9%)
Operacije – Br. (%)	53 (50%)	
Godine starosti kad je operisan (Medijana, Min-Max)	34,7 (19-66)	
Dužina trajanja bolesti do operacije (godine, Medijana)	2,86	
Ekstracrevne manifestacija – Br. (%)	Sada	18 (16,8%)
	Ranije	16 (15,0%)
	Nikada	73 (68,2%)
Pušenje – Br. (%)	Sada	25 (23,4%)
	Bivši pušač	11 (10,3%)
	Nikada	71 (66,3%)
Porodična anamneza za IBC – Br. (%)	IBC	11 (10,3%)
	UK	6
	KB	6
KS-zavisna bolest – Br. (%)	54 (50,5)	
KS-refraktarna bolest – Br. (%)	14 (13,1)	
Imunomodulatorno-refraktarna bolest – Br. (%)	45 (42,1%)	
Anti-TNF terapija – Br. (%)	Sada	36 (33,7%)
	Ranije	6 (5,6%)
	Nikada	65 (60,7%)
CDAI (Medijana, Min-Max)	151 (44-400)	
Rana bolest (do 18 meseci) – Br. (%)	40 (37,4%)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) – Br. (%)	<18,5	36 (33,6%)
	>18,5	71 (66,4%)
Dužina trajanja bolesti u godinama (Medijana, Min-Max)	6,6 (0-31)	

KS – kortikosteroidi; CDAI – Indeks aktivnosti Kronove bolesti; BMI – indeks telesne mase

**Tabela 8.** Demografske i kliničke karakteristike ispitanika sa UK

<b>Karakteristike pacijenata sa UK</b>		
Broj		99
Pol – Br. (%)	Muškarci	54 (54,5%)
	Žene	45 (45,5%)
Godine starosti (Medijana, Min-Max)		42 (19-70)
Godine starosti kad je postavljena dijagnoza (Medijana, Min-Max)		36,6 (2-67)
Ekstenzivnost – Br. (%)	Proktitis	2 (2,0%)
	Levostrani kolitis	35 (35,4%)
	Ekstenzivni kolitis	59 (59,6%)
	IPAA - Paučitis	3 (3,0%)
Operacije – Br. (%)		3 (3%)
Godine starosti kad je operisan (Medijana, Min-Max)		48,7 (30-65)
Dužina trajanja bolesti pre operacije (Godine, Medijana)		2,32
Ekstracrevne manifestacije – Br. (%)	Sada	27 (27,3%)
	Ranije	12 (12,1%)
	Nikada	60 (60,6%)
Pušenje – Br. (%)	Sada	10 (10,1%)
	Bivši pušač	19 (19,2%)
	Nikada	70 (70,7%)
Porodična anamneza za IBC – Br. (%)	IBC	5 (5,1%)
	UK	4
	KB	3
KS-zavisna bolest – Br. (%)		32 (32,3%)
KS-refraktarna bolest – Br. (%)		4 (4,1%)
Imunomodulatorno-refraktarna bolest – Br. (%)		10 (10,1%)
Anti-TNF Terapija – Br. (%)	Sada	3 (3,0%)
	Ranije	4 (4,1%)
	Nikada	92 (92,9%)
Mayo (Medijana, Min-Max)		6 (0-12)
Rana bolest (traje do 18 meseci) – Br. (%)		45 (45,5%)
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) – Br. (%)	<18,5	26 (26,3%)
	>18,5	73 (73,7%)
Dužina trajanja bolesti u godinama (Medijana, Min-Max)		5,5 (0-26)

IPAA – ileo-pauč analna anastomoza; KS – kortikosteroidi; BMI – indeks telesne mase

normalno uhranjeno (73,7%). Deset pacijenata sa UK su bili aktivni pušači (10,1%), dok je 19 pacijenata dalo podatak o ranijem pušenju (19,1%). Pozitivnu porodičnu anamnezu za postojanje IBC u prvom kolenu je prijavilo 5 pacijenata (5,1%).

## 4.2 DISTRIBUCIJA POLIMORFIZAMA *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* I *MDR1* GENA U ODNOSU NA HARDY-WEINBERG-OV MODEL RAVNOTEŽE

Svi ispitivani genotipovi polimorfizama u *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* genima su bili u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži, odnosno njihova distribucija se nije značajno razlikovala od očekivane distribucije (nijedna vrednost p nije bila manja od 0,05), kako u kontrolnoj grupi ispitanika, tako i u grupama pacijenata sa IBC, grupi pacijenata sa UK i grupi bolesnika sa KB. Model Hardy-Weinbergove ravnoteže u odnosu na ispitivane genotipove je prikazan u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Genotipovi polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u odnosu na Hardy-Weinberg-ovu ravnotežu, kod svih grupa ispitanika

Gen / Polimorfizam	Kontrolna grupa	KB	UK	IBC
<b><i>TNFA</i></b>				
rs1800629 (G-308A)	0,0945	0,2129	0,9041	0,3243
<b><i>IL10</i></b>				
rs 1800896 (G-1082A)	0,6051	0,8891	0,1162	0,3271
rs1800871 (C-819T)	0,8869	0,328	0,7041	0,669
rs1800872 (C-592A)	0,8869	0,328	0,7041	0,669
rs3024505 (C/T)	0,527	0,7318	0,8538	0,8512
<b><i>IL12B</i></b>				
rs6887695 (G/C)	0,0995	0,2729	0,8517	0,4832
<b><i>IL23R</i></b>				
rs 11209026 (G1142A)	0,3183	0,9223	0,8783	0,86
<b><i>MDR1</i></b>				
rs1128503 (C1236T)	0,1728	0,7174	0,8133	0,5775
rs2032582 (G2677T/A)	0,6202	0,8818	0,6185	0,6057
rs1045642 (C3435T)	0,4982	0,8002	0,2473	0,5655

## 4.3 ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA *TNFA* GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC

U grupama pacijenata sa KB, UK i IBC određivane su učestalosti alela i genotipova polimorfizma rs1800629 (G-308A) u *TNFA* genu i upoređivane su sa grupom zdravih ispitanika.



#### 4.3.1 Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs1800629 *TNFA* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KB, UK i IBC

U sve tri grupe pacijenata sa (KB, UK i IBC) i kontrolnoj grupi određeni su aleli i genotipovi za rs1800629 *TNFA* gena. Učestalost alela, genotipova i nosilaca alela ovog polimorfizma su prikazani u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Učestalost alela, genotipova i nosilaca alela polimorfizma rs1800629 *TNFA* gena kod ispitivanih grupa (kontrolna, KB, UK i IBC)

<i>TNFA</i> rs1800629		Kontrolna grupa (n=255)		KB (n=107)		UK (n=99)		IBC (n=206)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Aleli	<b>G</b>	447	87,6	191	89,3	177	89,4	368	89,3
	<b>A</b>	63	12,4	23	10,7	21	10,6	44	10,7
Genotipovi	<b>GG</b>	193	75,7	84	78,5	79	79,8	163	79,1
	<b>GA</b>	61	23,9	23	21,5	19	19,2	42	20,4
	<b>AA</b>	1	0,4	0	0	1	1,0	1	0,5
Nosioci*	<b>G</b>	254	99,6	107	100	98	99	205	99
	<b>A</b>	62	24,3	23	21,5	20	20,2	43	20,2

\*Nosioci G su osobe sa GG i GA genotipovima  
Nosioci A su osobe sa GA i AA genotipovima

Ispitivanjem distribucije alela, nosioca alela i genotipova polimorfizama rs1800629 *TNFA* gena kod analiziranih grupa pacijenata (KB, UK i svih IBC pacijenata) nije uočena značajna razlika u učestalosti u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika. Dobijene p vrednosti, odnosi šanse (OR) i intervali poverenja od 95% (95% CI) prikazani su u Tabeli 11.

#### 4.3.2 Klinički značaj polimorfizma rs1800629 *TNFA* gena kod pacijenata sa KB, UK i IBC

Kod pacijenata sa KB i UK, i u grupi svih pacijenata sa IBC, ispitivana je udruženost G-308A polimorfizma (alela, nosioca alela i genotipova) sa sledećim fenotipskim karakteristikama bolesti: pol, aktivnost bolesti, godine kad je postavljena dijagnoza, prethodne hirurške intervencije zbog osnovne bolesti, ekstenzivnost bolesti, lokalizacija bolesti, tip KB, terapija, prisustvo EIM, postojanje anemije, pušenje, pothranjenost i porodično opterećenje za IBC.

**Tabela 11.** Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs1800629 *TNFA* gena kod KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika

<i>TNFA</i> rs1800062		KB/Kontrole		UK/Kontrole		IBC/Kontrole	
		p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)
Aleli	<b>G</b>	0,54	1,17 (0,70-1,94)	0,52	1,18 (0,70-2,00)	0,43	1,17 (0,78-1,77)
	<b>A</b>		0,85 (0,51-1,41)		0,84 (0,49-1,42)		0,84 (0,56-1,27)
Genotipovi	<b>GG</b>	0,56	1,17 (0,68-2,01)	0,41	1,26 (0,71-2,23)	0,38	1,21 (0,78-1,89)
	<b>GA</b>	0,62	0,87 (0,50-1,49)	0,34	0,75 (0,42-1,34)	0,36	0,81 (0,52-1,27)
	<b>AA</b>	0,89 <sup>†</sup>	0,79 (0,03-19,60)	0,50 <sup>†</sup>	2,59 (0,16-41,84)	0,88 <sup>†</sup>	1,23 (0,07-19,93)
Nosioći	<b>G</b>	0,70	1,26 (0,05-31,35)	0,99	0,38 (0,02-6,22)	0,69	0,80 (0,05-12,98)
	<b>A</b>	0,56	0,14 (0,49-1,46)	0,41	0,79 (0,44-1,39)	0,38	0,82 (0,52-1,27)

\*Hi kvadrat test; <sup>†</sup>Fišerov test tačne verovatnoće; OR – odnos šansi; CI – Interval poverenja

Kod pacijenata sa KB, genotip GA rs1800629 bio je značajno ređe zastupljen kod pacijenata koji su bili refraktarni na azatioprin (Hi kvadrat,  $p=0,012$ ). Ostali klinički parametri pacijenata sa KB nisu bili udruženi sa ispitivanim polimorfizmom *TNFA*.

Kod pacijenata sa UK, kao i kod ukupne grupe pacijenata sa IBC, ni jedan od ispitivanih kliničkih parametara nije bio udružen sa ispitivanim polimorfizmom *TNFA* (alel, nosioc alela i genotip).

#### 4.4 ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA *IL10* U GRUPI ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC

U grupi pacijenata sa UK, KB i IBC određivane su učestalosti alela i genotipova tri polimorfizma *IL10* gena, i to rs1800896 (G-1082A), rs1800871 (C-819T) i rs3024505 (C/T) i upoređivana su sa grupom zdravih ispitanika. Analizom distribucije alela i genotipova sva tri SNP *IL10* gena u ispitivanim grupama, uočena je udruženost polimorfizma rs3024505 *IL10* gena sa pacijentima sa KB, odnosno svim pacijentima sa IBC, ali ne i sa pacijentima koji imaju UK. Analizirani aleli i genotipovi polimorfizama rs1800896 i rs1800871 u promotorskom regionu *IL10* gena nisu se značajno razlikovali u učestalosti u sve tri grupe pacijenata (sa KB, UK i IBC) u odnosu na kontrolnu grupu.

#### 4.4.1 Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs3024505 *IL10* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa UK, KB i IBC

U sve tri grupe pacijenata sa (KB, UK i IBC) i kontrolnoj grupu određeni su aleli i genotipovi za rs3024505 *IL10* gena. Učestalost alela, genotipova i nosilaca alela ovog polimorfizma su prikazani u Tabeli 12.

**Tabela 12.** Učestalost alela, genotipova i nosilaca alela polimorfizma rs3024505 *IL10* gena kod ispitivanih grupa (kontrolna, KB, UK i IBC)

<i>IL10</i> rs3024505		Kontrolna grupa (n=255)		KB (n=107)		UK (n=99)		IBC (n=206)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Aleli	<b>C</b>	440	86,3	166	77,6	162	81,8	328	79,6
	<b>T</b>	70	13,7	48	22,4	36	18,2	84	20,4
Genotipovi	<b>CC</b>	191	74,9	65	60,7	66	66,7	131	63,6
	<b>CT</b>	58	22,7	36	33,6	30	30,3	66	32,0
	<b>TT</b>	6	2,4	6	5,6	3	3,0	9	4,4
Nosioci*	<b>C</b>	249	97,6	101	94,4	96	97	197	95,6
	<b>T</b>	64	25,1	42	39,2	33	33,3	75	36,4

\*Nosioci C su osobe sa CC i CT genotipovima  
Nosioci T su osobe sa TT i CT genotipovima

Ispitivanjem distribucije alela, nosioca alela i genotipova polimorfizama rs3024505 *IL10* gena kod analiziranih grupa pacijenata (KB, UK i svih IBC pacijenata) uočene su sledeće statističke značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika: Minorni T alel bio je češće zastupljen kod pacijenata sa KB, a slična povezanost je uočena i za nosioce T alela. U skladu sa tim, oba genotipa koji sadrže T alel (genotipovi TT i CT), su bili češći u grupi pacijenata sa KB u odnosu na zdrave kontrole, mada je statistička značajnost dostignuta samo u slučaju heterozigota CT, verovatno zbog malog broja ispitanika sa TT genotipom u našoj kohorti (po 6 u grupi pacijenata sa KB i grupi zdravih kontrola). C alel i CC genotip su bili značajno češće prisutni kod zdravih kontrola u odnosu na pacijente sa KB. Slični rezultati su dobijeni i kada su se poredile grupe svih pacijenata sa IBC i zdravih ispitanika. Na suprot tome, nijedan alel ili genotip polimorfizma rs3024505 nije bio udružen sa UK kod naših pacijenata. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da bi T alel mogao da bude faktor rizika, a C alel protektivni faktor za razvoj KB, ali ne i UK. Sve dobijene p vrednosti, odnosi šanse (OR) i intervali poverenja od 95% (95% CI) prikazani su u Tabeli 13.

**Tabela 13.** Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs3024505 *IL10* gena kod KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika

<i>IL10</i> rs3024505		KB/Kontrole		UK/Kontrole		IBC/Kontrole	
		p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)
Aleli	C	<b>0,004</b>	0,55 (0,36-0,82)	0,13	0,71 (0,46-1,11)	<b>0,007</b>	0,62 (0,43 -0,87)
	T		1,81 (1,0-2,73)		1,39 (0,89-2,16)		1,81 (1,21-2,73)
Genotipovi	CC	<b>0,007</b>	0,51 (0,32-0,83)	0,12	0,67 (0,40-1,11)	<b>0,008</b>	0,58 (0,39-0,87)
	CT	<b>0,03</b>	1,72 (1,04-2,82)	0,14	1,47 (0,87-2,48)	<b>0,02</b>	1,60 (1,05-2,42)
	TT	0,12	2,46 (0,77-7,82)	0,71 <sup>†</sup>	1,29 (0,31-5,28)	0,23	1,89 (0,66 -5,41)
Nosioći	C	0,12	2,46 (0,78-7,82)	0,48	0,77 (0,19-3,14)	0,23	0,53 (0,18- 1,51)
	T	<b>0,007</b>	1,92 (1,92-3,12)	0,12	1,49 (0,90- 2,47)	<b>0,008</b>	1,71 (1,44-2,55)

\*Hi kvadrat test; <sup>†</sup>Fišerov test tačne verovatnoće; OR – odnos šansi; CI – Interval poverenja

#### 4.4.2 Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs1800896 *IL10* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa UK, KB i IBC

Analizirani aleli i genotipovi polimorfizama rs 1800896 *IL10* gena se nisu značajno razlikovali u učestalosti u sve tri grupe pacijenata sa KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu. Distribucija alela, nosioca alela i genotipova polimorfizama rs1800896 *IL10* gena kod analiziranih grupa ispitanika prikazana je u Tabeli 14, a dobijene p vrednosti, odnosi šanse (OR) i intervali poverenja od 95% (95% CI) u Tabeli 15.

**Tabela 14.** Učestalost alela, genotipova i nosilaca alela polimorfizma rs1800896 *IL10* gena kod ispitivanih grupa (kontrolna, KB, UK i IBC)

<i>IL10</i> rs 1800896		Kontrolna grupa (n=255)		KB (n=107)		UK (n=99)		IBC (n=206)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Aleli	G	207	40,6	94	43,9	84	42,4	178	43,2
	A	303	59,4	120	56,1	114	57,6	234	56,8
Genotipovi	GG	44	17,2	21	19,6	14	14,1	35	17,0
	GA	119	46,7	52	48,6	56	56,6	108	52,4
	AA	92	36,1	34	31,8	29	29,3	63	30,6
Nosioći*	G	163	63,9	73	68,2	70	70,7	143	69,4
	A	211	82,7	86	80,4	85	85,8	171	83,0

\*Nosioći G su osobe sa GG i GA genotipovima  
Nosioći A su osobe sa GA i AA genotipovima

**Tabela 15.** Distribucija alela i genotipova polimorfizama rs 1800896 *IL10* gena kod KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika

<i>IL10</i> rs 1800896		KB/Kontrole		UK/Kontrole		IBC/Kontrole	
		p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)
Aleli	<b>G</b>	0,40	0,87 (0,63- 1,20)	0,65	0,92 (0,66-1,29)	0,42	0,89 (0,69- 1,16)
	<b>A</b>		1,14 (0,83-1,58)		1,07 (0,77-1,50)		1,11 (0,85-1,44)
Genotipovi	<b>GG</b>	0,59	1,17 (0,65- 2,08)	0,47	0,78 (0,41-1,51)	0,94	0,98 (0,60-1,59)
	<b>GA</b>	0,73	1,08 (0,68-1,69)	0,09	1,48 (0,93-2,37)	0,21	1,25 (0,87-1,81)
	<b>AA</b>	0,31	0,78 (0,48-1,26)	0,22	0,73 (0,44-1,21)	0,21	0,78 (0,52-1,15)
Nosioći	<b>G</b>	0,43	12,12 (0,75-1,95)	0,22	1,36 (0,82- 2,25)	0,25	12,81 (0,86- 1,89)
	<b>A</b>	0,59	0,85 (0,47-1,52)	0,48	1,26 (0,65-2,43)	0,92	1,01 (0,62-1,65)

\*Hi kvadrat test; OR – odnos šansi; CI – Interval poverenja

#### 4.4.3 Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs1800871 *IL10* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa UK, KB i IBC

Analizirani aleli i genotipovi polimorfizma rs1800871 *IL10* gena nisu se značajno razlikovali u učestalosti u sve tri grupe pacijenata sa KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu. Učestalost alela i genotipova polimorfizma rs1800871 *IL10* gena kod analiziranih grupa ispitanika prikazana je u Tabeli 16.

**Tabela 16.** Učestalost alela, genotipova i nosilaca alela polimorfizma rs1800871 *IL10* gena kod ispitivanih grupa (kontrolna, KB, UK i IBC)

<i>IL10</i> rs 1800871		Kontrolna grupa (n=255)		KB (n=107)		UK (n=99)		IBC (n=206)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Aleli	<b>C</b>	380	74,5	159	74,3	139	70,2	298	72,3
	<b>T</b>	130	25,5	55	25,7	59	29,8	114	27,7
Genotipovi	<b>CC</b>	142	55,7	61	57,0	48	48,5	109	52,9
	<b>CT</b>	96	37,6	37	34,6	43	43,4	80	38,8
	<b>TT</b>	17	6,7	9	8,4	8	8,1	17	8,3
Nosioći*	<b>C</b>	238	93,3	98	91,6	91	91,9	189	91,7
	<b>T</b>	113	44,3	46	43	51	51,5	97	47,1

\*Nosioći C su osobe sa CC i CT genotipovima  
Nosioći T su osobe sa TT i CT genotipovima

Distribucija alela i genotipova polimorfizama rs1800871 *IL10* gena kod analiziranih grupa pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu prikazana je u Tabeli 17.

**Tabela 17.** Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs1800871 *IL10* gena kod KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika

<i>IL10</i> rs 1800871		KB/Kontrole		UK/Kontrole		IBC/Kontrole	
		p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)
Aleli	C	0,95	1,01 (0,70- 1,45)	0,24	1,24 (0,86- 1,78)	0,45	1,11 (0,83- 1,49)
	T		0,98 (0,68-1,42)		0,80 (0,56-1,15)		0,89 (0,66-1,19)
Genotipovi	CC	0,81	1,05 (0,66-1,66)	0,22	0,74 (0,47-1,19)	0,55	0,89 (0,61-1,29)
	CT	0,58	0,87 (0,54-1,40)	0,31	1,27 (0,79- 2,03)	0,79	1,05 (0,72-1,53)
	TT	0,45	1,37 (0,59- 3,19)	0,64	1,23 (0,51-2,95)	0,51	1,25 (0,62-2,53)
Nosioći	C	0,56	0,78 (0,33- 1,80)	0,64	0,81 (0,34- 1,95)	0,51	0,79 (0,39- 1,50)
	T	0,82	0,95(0,60- 1,49)	0,22	1,33 (0,83- 2,12)	0,55	1,12 (0,77- 1,61)

\*Hi kvadrat test; OR – odnos šansi; CI – Interval poverenja

#### 4.4.4 Distribucija haplotipova i diplotipova polimorfizama *IL10* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KB, UK i IBC

U cilju daljeg ispitivanja značaja SNP u *IL10* genu za IBC, i potencijalne uloge T alela kao faktora rizika za KB, izvršena je haplotipska analiza i određena distribucija haplotipova i diplotipova (kombinacije haplotipova) kod svih ispitanika. Pošto je ranije pokazano da se tri polimorfizma G-1082A, C-819T and C-592A) u promotorskom regionu nalaze u izrazitoj vezanoj neravnoteži [151], u većini studija oni se analiziraju zajedno kao trilokusni haplotipovi. Zbog toga smo odlučili da u našu haplotipsku analizu uključimo i C-592A SNP (rs1800872). Genotipovi za C-592A SNP su izvedeni iz rezultata dobijenih za *IL10* rs1800871 (C-819T) SNP uz zamenu alela T alelom A, s obzirom da je pokazano da se ta dva polimorfizma nalaze u potpunoj vezanoj neravnoteži i nasleđuju se u paru [151]. To nam je omogućilo da odredimo za naše ispitanike haplotipove sa četiri lokusa (G-1082A, C-819T, C-592A and rs3024505). Ukupno je identifikovano 6 haplotipova u našoj populaciji, ali su dva retka haplotipa (GTAT and ATAT), čija je frekvencija bila manja od 1%, isključeni iz statističke analize (Tabela 18). Frekvencija GCCT haplotipa, kao i učestalost nosilaca GCCT, bila je značajno veća u grupi pacijenata sa KB u odnosu na kontrole (p=0,003, OR=1,848 [1,227–2,783] za GCCT haplotip i p=0,0054, OR=1,969 [1,217–3,186] za nosioce GCCT). GCCT haplotip je bio takođe udružen sa grupom svih

pacijenata sa IBC. Distribucija haplotipova se nije razlikovala između pacijenata sa UK i zdravih kontrola (Tabela 18).

**Tabela 18.** Distribucija haplotipova polimorfizama *IL10* gena kod KB,UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika

<i>IL10</i> Haplotipovi <sup>†</sup>	Kontrolna grupa (n=255)		KB (n=107)		UK (n=99)		IBC (n=206)	
	n (%)		n (%)	p*	n (%)	p*	n (%)	p*
<b>G C C C</b>	138 (27,1)		46 (21,5)	0,117	48 (24,2)	0,446	94 (22,8)	0,140
<b>G C C T</b>	69 (13,5)		48 (22,4)	<b>0,003</b>	35 (17,7)	0,162	83 (20,2)	<b>0,007</b>
<b>A C C C</b>	173 (33,9)		65 (30,4)	0,354	56 (28,3)	0,150	121 (29,4)	0,141
<b>A T A C</b>	129 (25,3)		55 (25,7)	0,920	58 (29,3)	0,279	113 (27,4)	0,462
<b>G T A T</b>	0 (0,0)		0 (0,0)	N.P.	1 (0,5)	N.P.	1 (0,2)	N.P.
<b>A T A T</b>	1 (0,2)		0 (0,0)	N.P.	0 (0,0)	N.P.	0 (0,0)	N.P.
<b>Ukupno</b>	510 (100)		214 (100)		198 (100)		412 (100)	

\*Hi kvadrat test; <sup>†</sup> Redosled polimorfizama u haplotipu je -1082, -819, -592 i rs3024505 (C/T)

Detektovali smo 12 različitih diplotipova među našim ispitanicima (Tabela 19), ali nijedan od njih nije bio udružen sa KB, UK ili svim pacijentima sa IBC (nije prikazano).

**Tabela 19.** Distribucija diplotipova polimorfizama *IL10* gena kod ispitivanih grupa (kontrola, KB, UK i IBC)

<i>IL10</i> Diplotipovi <sup>†</sup>	Kontrolna grupa (n=255)		KB (n=107)		UK (n=99)		IBC (n=206)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>GCCC / GCCC</b>	21	8,2	5	4,7	3	3,0	8	3,9
<b>GCCC / GCCT</b>	17	6,7	10	9,3	7	7	17	8,3
<b>GCCC / ACCC</b>	48	18,8	15	14,0	19	19,2	34	16,5
<b>GCCC / ATAC</b>	31	12,2	11	10,3	15	15	26	12,6
<b>GCCC / GTAT</b>	0	0	0	0	1	1	1	0
<b>GCCT / GCCT</b>	6	2,4	6	5,6	3	3,0	9	4,4
<b>GCCT / ACCC</b>	23	9,0	16	15,0	9	9,1	25	12,1
<b>GCCT / ATAC</b>	17	7	10	9,3	13	13	23	11,2
<b>ACCC / ACCC</b>	27	10,6	9	8,4	7	7,1	16	7,8
<b>ACCC / ATAC</b>	48	19	16	15	14	14,1	30	14,6
<b>ATAC / ATAC</b>	16	6,3	9	8,4	8	8	17	8,3
<b>GCCC / ATAT</b>	1	0,4	0	0	0	0	0	0
<b>Ukupno</b>	255	100	107	100	99	100	206	100

<sup>†</sup> Redosled polimorfizama u haplotipu je -1082, -819, -592 i rs3024505 (C/T)

#### 4.4.5 Klinički značaj ispitivanih polimorfizama *IL10* gena kod pacijenata sa KB, UK i IBC

Kod pacijenata sa UK, KB i IBC ispitivana je udruženost polimorfizama rs1800896, rs1800871 i rs3024505 *IL10* gena sa sledećim demografskim i kliničkim karakteristikama bolesti: pol, aktivnost bolesti, godine kad je postavljena dijagnoza, prethodne hirurške intervencije zbog osnovne bolesti, ekstenzivnost bolesti, lokalizacija bolesti, tip Kronove bolesti, postojanje kortikosteroid zavisne/refraktarne bolesti i imunomodulatorno refraktarne bolesti, prisustvo EIM, prisustvo anemije, pušenje i porodično opterećenje za IBC.

Utvrđeno je postojanje udruženosti polimorfizama rs1800871 i rs3024505 sa prisustvom (ili odsustvom) anemije kod pacijenata sa KB, UK ili IBC. Nosiloci alela C rs3024505 imali su češće anemiju u KB (i IBC) grupi. TT genotip rs3024505 i rs1800871 su bili češće zastupljeni kod pacijenata bez anemije u KB i IBC grupi (rs3024505), odnosno UK grupi (rs1800871). Povezanost genotipova i nosioca alela sa prisustvom anemije prikazana je u Tabeli 20.

**Tabela 20.** Udruženost anemije i polimorfizama *IL10* gena

<i>IL10</i> SNP	Alel/Genotip	Grupa (KB/UK/IBC)	Prisustvo anemije	p*	OR (95% CI)
<b>rs1800871</b>	Genotip TT	UK	Ne	<b>0,019</b>	6,00 (1,33 –27,02)
	Genotip TT	IBC	Ne	<b>0,019</b>	5,03 (1,29 –19,62)
<b>rs3024505</b>	Nosilac C	IBC	Da	<b>0,019</b>	5,03 (1,29 –19,62)
	Genotip TT	KB	Ne	<b>0,036</b>	6,69 (1,15–38,92)
	Nosilac C	KB	Da	<b>0,036</b>	6,69 (1,15–38,92)

\*Hi kvadrat test; OR – odnos šansi; CI – Interval poverenja

Za polimorfizam rs3024505, utvrđeno je da postoji i povezanost sa tipom KB. Slično kao i kod anemije, nosioci alela C bili su udruženi sa stenozantnom ili penetrantnom formom bolesti, a genotip TT sa blažom inflamatornom formom KB (Tabela 21).

**Tabela 21.** Udruženost tipa KB i polimorfizma rs3024505 *IL10* gena

Alel/Genotip	Fenotip KB	p*	OR (95% CI)
Genotip TT	Češći kod inflamatorne forme	<b>0,012</b>	12,41 (1,39-110,91)
Nosilac C	Češći kod stenozantne/fistulozne forme	<b>0,012</b>	12,41 (1,39-110,91)

\*Hi kvadrat test; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja



#### 4.5 ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA *IL12B* GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC

U grupama pacijenata sa KB, UK i IBC određivane su učestalosti alela i genotipova polimorfizma rs6887695 (G/C) u neposrednoj blizini *IL12B* gena i upoređivane su sa grupom zdravih ispitanika.

##### 4.5.1 Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs6887695 *IL12B* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa UK, KB i IBC

U sve tri grupe pacijenata sa KB, UK i IBC i kontrolnoj grupi određeni su aleli i genotipovi za rs6887695 *IL12B* gena. Učestalost alela, genotipova i nosilaca alela ovog polimorfizma su prikazani u Tabeli 22.

**Tabela 22.** Učestalost alela, genotipova i nosilaca alela polimorfizma rs6887695 *IL12B* gena kod ispitivanih grupa (kontrolna, KB, UK i IBC)

<i>IL12B</i> rs 6887695		Kontrolna grupa (n=255)		KB (n=107)		UK (n=99)		IBC (n=206)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Aleli	<b>G</b>	366	71,8	141	65,9	137	69,2	278	67,5
	<b>C</b>	144	28,2	73	34,1	61	31,8	134	32,5
Genotipovi	<b>GG</b>	126	49,4	49	45,8	47	47,5	96	46,6
	<b>GC</b>	114	44,7	43	40,2	43	43,4	86	41,7
	<b>CC</b>	15	5,9	15	14,0	9	9,1	24	11,6
Nosioci*	<b>G</b>	240	94,1	92	86	90	90,9	182	88,3
	<b>C</b>	129	50,6	58	52,2	52	52,5	110	53,4

\*Nosioci G su osobe sa GG i GC genotipovima  
Nosioci C su osobe sa GC i CC genotipovima

Utvdili smo statistički značajnu razliku u učestalosti CC genotipa polimorfizma rs 6887695 *IL12B* gena između pacijenata sa KB i IBC i kontrolne grupe ispitanika, dok se genotipovi GG i GC nisu značajno razlikovali između grupa pacijenata i zdravih ispitanika. CC genotip ovog polimorfizma bio je značajno češće prisutan kod pacijenata sa KB (i IBC), u odnosu na kontrolnu grupu, sugerišući moguću ulogu genotipa CC i alela C u nastanku KB. Takođe, nosioci G alela su ređe bili zastupljeni u grupi pacijenata sa KB i IBC u odnosu na zdrave ispitanike. U skladu sa tim je i C alel bio češće zastupljen kod pacijanata sa KB (34,1%), u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika (28,2%), mada razlika

nije dostigla statističku značajnost, verovatno zbog ograničenog broja ispitanika u našoj studiji. Dobijene p vrednosti, odnosi šanse (OR) i intervali poverenja od 95% (95% CI) prikazani su u Tabeli 23.

**Tabela 23.** Distribucija alela i genotipova polimorfizama rs6887695 *IL12B* gena kod KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika

<i>IL12B</i> rs 6887695		KB/Kontrole		UK/Kontrole		IBC/Kontrole	
		p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)
Aleli	<b>G</b>	0,11	0,75 (0,53-1,06)	0,49	0,88 (0,61-1,26)	0,15	0,81 (0,61-1,08)
	<b>C</b>		1,31 (0,93-1,85)		1,13 (0,79-1,61)		1,22 (0,92-1,62)
Genotipovi	<b>GG</b>	0,52	0,86 (0,55-1,36)	0,74	0,92 (0,58-1,47)	0,54	0,89 (0,61- 1,29)
	<b>GC</b>	0,42	0,83 (0,52-1,31)	0,82	0,94 (0,59-1,51)	0,52	0,88 (0,61-1,28)
	<b>CC</b>	<b>0,04</b>	2,20 (1,01- 4,77)	0,28	1,60 (0,67- 3,78)	<b>0,02</b>	2,10 (1,07-4,13)
Nosioći	<b>G</b>	<b>0,01</b>	0,38 (0,18- 8,81)	0,28	0,62 (0,26-1,47)	<b>0,03</b>	0,47 (0,24- 0,92)
	<b>C</b>	0,53	1,15 (0,73-1,82)	0,74	1,08 (0,68-1,72)	0,55	1,12 (0,77- 1,61)

\*Hi kvadrat test; †Fišerov test tačne verovatnoće; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja

#### 4.5.2 Klinički značaj polimorfizma rs6887695 *IL12B* gena kod pacijenata sa KB, UK i IBC

Kod pacijenata sa KB, UK i IBC ispitivana je udruženost navedenih polimorfizama (alela, nosioca alela i genotipova) sa sledećim fenotipskim karakteristikama bolesti: pol, aktivnost bolesti, godine kad je postavljena dijagnoza, prethodne hirurške intervencije zbog osnovne bolesti, ekstenzivnost bolesti, lokalizacija bolesti, tip KB, terapija, prisustvo EIM, postojanje anemije, pušenje, pothranjenost i porodično opterećenje za IBC,

Kod pacijenata sa KB postojanje perianalne fistule je bilo statistički značajno ređe kod pacijenata sa CC genotipom polimorfizma rs6887695 *IL12B* (Hi kvadrat test, p=0,034). U skladu sa navedenim, nosioći G alela su češće imali fistuloznu formu bolesti (Hi kvadrat test, p=0,022). Druge ispitivane fenotipske karakteristike pacijenata sa KB nisu bile udružene sa ispitivanim polimorfizmima rs6887695 *IL12B* gena. Takođe, ispitivane fenotipske karakteristike pacijenata sa UK nisu bile udružene sa ispitivanim genotipovima polimorfizma rs6887695 *IL12B* gena. Kada su pacijenti sa IBC posmatrani u celini, pacijenti koji su imali genotip CC imali su ređe EIM bolesti i uočena udruženost je bila na granici značajnosti (Hi kvadrat test, p=0,050).

#### 4.6 ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA *IL23R* GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC

U grupama pacijenata sa UK, KB i IBC određivane su učestalosti alela i genotipova polimorfizama rs11209026 (G1142A) *IL23R* gena i upoređivane su sa grupom zdravih ispitanika.

##### 4.6.1 Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KB, UK i IBC

U sve tri grupe pacijenata, sa KB, UK i IBC, i kontrolnoj grupi određeni su aleli i genotipovi za rs11209026 *IL23R* gena. Učestalost alela, genotipova i nosilaca alela ovog polimorfizma su prikazani u Tabeli 24.

**Tabela 24.** Učestalost alela, genotipova i nosilaca alela polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena kod ispitivanih grupa (kontrolna, KB i UK)

<i>IL23R</i> rs11209026		Kontrolna grupa (n=255)		KB (n=107)		UK (n=99)		IBC (n=206)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Aleli	<b>G</b>	480	94,1	212	99,1	195	98,5	407	98,8
	<b>A</b>	30	5,9	2	0,9	3	1,5	5	1,2
Genotipovi	<b>GG</b>	225	88,2	105	98,1	96	97,1	201	97,6
	<b>GA</b>	30	11,8	2	1,9	3	3,0	5	2,4
	<b>AA</b>	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Nosioci*	<b>G</b>	255	100	107	100	99	100	206	100
	<b>A</b>	30	11,8	2	1,9	3	30,3	5	2,4

\*Nosioci G su osobe sa GG i GA genotipovima  
Nosioci A su osobe sa GA i AA genotipovima

Poređenjem distribucije alela i genotipova, utvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti GG i GA genotipova polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena između svih ispitivanih kohorti pacijenata (UK, KB i IBC) i kontrolne grupe ispitanika. Genotip AA nije detektovan kako kod ispitivanih pacijenata tako ni u grupi zdravih ispitanika. G alel i GG genotip polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena bili su značajno češće prisutni kod svih ispitivanih grupa pacijenata sa KB, UK i IBC, u odnosu na kontrolnu grupu, sugerišući moguću predisponirajuću ulogu alela G, odnosno genotipa GG u nastanku bolesti. Nasuprot tome, GA genotip polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena je bio značajno ređe

prisutan kod svih ispitivanih grupa pacijenata (KB, UK i IBC) u odnosu na kontrolnu grupu, sugerišući protektivni ulogu A alela u nastanku IBC. Ispitivanjem učestalosti nosioca alela polimorfizama rs11209026 *IL23R* gena, utvrdili smo značajnu povezanost nosioca A alela sa grupom zdravih ispitanika, u odnosu na ređe prisustvo ovog alela kod pacijenata sa KB, UK i IBC, što ukazuje na protektivnu ulogu A alela u nastanku IBC. Rezultati poređenja učestalosti alela, genotipova i nosioca alela polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena u grupi pacijenata sa KB, UK, IBC i kontrolnoj grupi prikazani su u Tabeli 25.

**Tabela 25.** Distribucija alela i genotipova polimorfizama rs11209026 *IL23R* gena kod KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika

<i>IL23R</i> rs11209026		KB/Kontrole		UK/Kontrole		IBC/Kontrole	
		p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)
Aleli	<b>G</b>	<b>0,003<sup>†</sup></b>	6,62(1,56-27,97)	<b>0,013<sup>†</sup></b>	4,06 (1,22-13,46)	<b>0,0002<sup>†</sup></b>	5,08 (1,95-13,23)
	<b>A</b>		0,15 (0,03-0,63)		0,24 (0,07-0,81)		0,19 (0,07-0,51)
Genotipovi	<b>GG</b>	<b>0,0085</b>	7,00(1,64-29,84)	<b>0,02</b>	4,26 (1,27- 14,31)	<b>0,0007</b>	5,36 (2,04-14,07)
	<b>GA</b>	<b>0,0085</b>	0,14 (0,03-0,60)	<b>0,02</b>	0,23 (0,06- 0,78)	<b>0,0007</b>	0,18 (0,07- 0,49)
	<b>AA</b>	N. P.	N. P.	N. P.	N. P.	N. P.	N. P.
Nosioći	<b>G</b>	0,66	0,42 (0,01 -21,34)	0,64	0,38(0,01 - 19,76)	0,91	0,80 (0,01 -40,91)
	<b>A</b>	<b>0,003<sup>†</sup></b>	0,14 (0,03 -0,61)	<b>0,012<sup>†</sup></b>	0,23 (0,07 - 0,79)	<b>0,0001<sup>†</sup></b>	0,18 (0,07 -0,49)

\*Hi kvadrat test; <sup>†</sup>Fišerov test tačne verovatnoće; CI – interval poverenja; OR – odnos šansi;  
N. P. – nije primenjivo

#### 4.6.2 Klinički značaj polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena kod pacijenata sa KB, UK i IBC

Kod pacijenata sa KB, UK i IBC ispitivana je udruženost polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena (alela, nosioca alela i genotipova) sa sledećim fenotipskim karakteristikama bolesti: pol, aktivnost bolesti, godine kad je postavljena dijagnoza, prethodne hirurške intervencije zbog osnovne bolesti, ekstenzivnost bolesti, lokalizacija bolesti, tip KB, terapija, prisustvo EIM, postojanje anemije, pušenje, pothranjenost i porodično opterećenje za IBC. Ni jedan od navedenih fenotipskih karakteristika KB, UK i IBC nije bio udružen sa alelima, nosiocima alela i genotipovima polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena.

#### **4.7 ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA *MDR1* GENA KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA KB, UK I IBC**

U grupama pacijenata sa UK, KB i IBC određivane su učestalosti alela i genotipova tri polimorfizma *MDR1* gena, rs1128503 (C1236T), rs2032582 (G2677T/A) i rs1045642 (C3435T) i upoređivane su sa grupom zdravih ispitanika. Takođe su određivani i haplotipovi i diplotipovi sva tri polimorfizma *MDR1* gena i poređena je njihova distribucija u grupama pacijenata sa KB, UK i IBC u odnosu na grupu zdravih ispitanika.

##### **4.7.1 Distribucija alela i genotipova polimorfizama *MDR1* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa UK, KB i IBC**

U sve tri grupe pacijenata, sa KB, UK i IBC, i kontrolnoj grupi određeni su aleli i genotipovi za rs1128503 (C1236T), rs2032582 (G2677T/A) i rs1045642 (C3435T) polimorfizme *MDR1* gena. Utvrdili smo statistički značajnu razliku učestalosti svih ispitivanih alela/genotipova *MDR1* gena između pacijenata sa UK i kontrolne grupe ispitanika, dok ni jedan ispitivan polimorfizam nije bio udružen sa KB i sa grupom svih pacijenata sa IBC. Distribucije alela i genotipova sva tri polimorfizama *MDR1* gena kod analiziranih grupa ispitanika prikazana je u Tabeli 26.

##### **4.7.1.1 Poređenje distribucije alela i genotipova polimorfizma rs1128503 *MDR1* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KB, UK i IBC**

Kada su distribucije alela i genotipova polimorfizma rs1128503 (C1236T) *MDR1* gena poređena između različitih grupa pacijenata (KB, UK i IBC) i kontrolnih ispitanika, uočeno je da su alel T i genotip TT bili statistički značajno češće prisutni kod pacijenata sa UK u odnosu na kontrolnu grupu, što dovodi do pretpostavke da bi T alel i TT genotip ovog polimorfizma mogli da predstavljaju faktore rizika za nastanak UK. U grupi ispitanika sa KB, kao i u grupi svih ispitanika sa IBC, nije uočena razlika u distribuciji alela i genotipova u odnosu na zdravu kontrolnu grupu. Rezultati analize poređenja distribucija alela i genotipova za C1236T sa dobijenim p vrednostima, odnosima šanse (OR) i intervalima poverenja od 95% (95% CI) prikazani su u Tabeli 27.

**Tabela 26.** Učestalost alela i genotipova polimorfizma rs1128503, rs2032582 i rs1045642 MDR1 gena kod ispitivanih grupa (kontrola, KB, UK i IBC)

<i>MDR1</i> polimorfizmi		Kontrolna grupa (n=255)		KB (n=107)		UK (n=99)		IBC (n=206)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
<b>C1236T (rs1128503)</b>									
Aleli	<b>C</b>	285	55,9	126	58,9	81	40,9	207	50,2
	<b>T</b>	225	44,1	88	41,1	117	59,1	205	49,8
Genotipovi	<b>CC</b>	85	33,3	38	35,5	16	16,2	54	26,2
	<b>CT</b>	115	45,1	50	46,7	49	49,5	99	48,1
	<b>TT</b>	55	21,6	19	17,8	34	34,3	53	25,7
<b>G2677T/A (rs2032582)</b>									
Aleli	<b>G</b>	282	55,3	125	58,4	84	42,4	209	50,7
	<b>T</b>	221	43,3	85	39,7	113	57,1	198	48,1
	<b>A</b>	7	1,4	4	1,9	1	0,5	5	1,2
Genotipovi	<b>GG</b>	83	32,5	35	32,7	16	16,2	51	24,8
	<b>GT</b>	112	43,9	52	48,6	51	51,5	103	50,0
	<b>GA</b>	4	1,6	3	2,8	1	1,0	4	1,9
	<b>TT</b>	53	20,8	16	15,0	31	31,3	47	22,8
	<b>TA</b>	3	1,2	1	0,9	0	0,0	1	0,5
	<b>AA</b>	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>C3435T (rs1045642)</b>									
Aleli	<b>C</b>	262	51,4	94	43,9	79	39,9	213	51,7
	<b>T</b>	248	48,6	120	56,1	119	60,1	199	48,3
Genotipovi	<b>CC</b>	70	27,5	33	30,8	13	13,1	46	22,3
	<b>CT</b>	122	47,8	54	50,5	53	53,5	107	52,0
	<b>TT</b>	63	24,7	20	18,7	33	33,3	53	25,7

**Tabela 27.** Distribucija alela i genotipova polimorfizama rs1128503 *MDR1* gena kod KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika

<i>MDR1</i> C1236T rs1128503		KB/Kontrole		UK/Kontrole		IBC/Kontrole	
		p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)
Aleli	<b>C</b>	0,45	1,13 (0,81-1,56)	<b>0,0004</b>	0,55 (0,39-0,76)	0,08	0,80 (0,61-1,03)
	<b>T</b>		0,88 (0,64-1,22)		1,82 (1,31-2,55)		1,25 (0,96-1,62)
Genotipovi	<b>CC</b>	0,68	1,10 (0,68-1,76)	<b>0,001</b>	0,38 (0,21-0,69)	0,09	0,71 (0,47-1,06)
	<b>CT</b>	0,77	1,06 (0,67-1,67)	0,45	1,19 (0,74-1,89)	0,52	1,12 (0,77-1,62)
	<b>TT</b>	0,41	0,78 (0,44-1,40)	<b>0,01</b>	1,90 (1,14-3,17)	0,29	1,25 (0,81-1,94)

\*Hi kvadrat test; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja

#### 4.7.1.2 Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs2032582 *MDR1* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KB, UK i IBC

Poređenjem distribucija alela i genotipova troalelskog polimorfizma rs2032582 (G2677T/A), uočeno je da su alel T i genotip TT bili češće prisutni kod pacijenata sa UK, što može da ukaže da bi T alel i TT genotip G2677T/A polimorfizma mogli da budu predisponirajući faktori u nastanku UK. U grupi ispitanika sa KB, i u grupi svih ispitanika sa IBC, ni jedan od analiziranih polimorfizama se nije razlikovao u učestalosti u odnosu na zdravu kontrolnu grupu. Rezultati analize poređenja distribucija alela i genotipova za G2677T/A sa dobijenim p vrednostima, odnosima šanse (OR) i intervalima poverenja od 95% (95% CI) prikazani su u Tabeli 28.

**Tabela 28.** Distribucija alela i genotipova polimorfizama rs2032582 *MDR1* gena kod KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika

<i>MDR1</i> G2677T/A rs2032582	KB/Kontrole		UK/Kontrole		IBC/Kontrole	
	p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)
Aleli	<b>G</b>	0,44 1,13 (0,82-1,56)	<b>0,002</b>	0,59 (0,42-0,82)	0,16	0,83 (0,64-1,07)
	<b>T</b>	0,36 0,86 (0,62-1,19)	<b>0,001</b>	1,73 (1,24- 2,42)	0,15	1,20 (0,93-1,57)
	<b>A</b>	0,61 <sup>†</sup> 1,36 (0,39-4,72)	0,34 <sup>†</sup>	0,36 (0,04-2,98)	0,83	0,88 (0,27- 2,80)
Genotipovi	<b>GG</b>	0,97 1,00 (0,62-1,63)	<b>0,002</b>	0,39 (0,22- 0,72)	0,06	0,68 (0,45-1,02)
	<b>GT</b>	0,41 1,20 (0,76-1,89)	0,19	1,35 (0,85-2,16)	0,19	1,27 (0,88-1,84)
	<b>GA</b>	0,44 <sup>†</sup> 1,81 (0,39- 8,22)	0,69 <sup>†</sup>	0,64 (0,07- 5,80)	0,76 <sup>†</sup>	1,24 (0,30- 5,03)
	<b>TT</b>	0,19 0,67 (0,36 -1,23)	<b>0,04</b>	1,73 (1,03-2,92)	0,59	1,12 (0,72-1,75)
	<b>TA</b>	0,84 <sup>†</sup> 0,79 (0,08-7,70)	0,50 <sup>†</sup>	0,36 (0,01-7,08)	0,44 <sup>†</sup>	0,40 (0,04-3,96)

\*Hi kvadrat test; <sup>†</sup>Fišerov test tačne verovatnoće; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja

#### 4.7.1.3 Distribucija alela i genotipova polimorfizma rs1045642 *MDR1* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KB, UK i IBC

Poređenjem distribucije alela i genotipova rs1045642 (C3435T) *MDR1* gena među ispitivanim grupama, uočeno je da su alel C i genotip CC ovog polimorfizma bili značajno ređe prisutni kod pacijenata sa UK u odnosu na kontrolnu grupu, sugerišući moguću protektivnu ulogu C alela u nastanku UK. U grupi ispitanika sa KB, kao i u grupi svih ispitanika sa IBC, ni jedan od alela i genotipova C3435T se nije razlikovao u učestalosti u odnosu na zdravu kontrolnu grupu. Rezultati analize poređenja distribucija alela i

genotipova za C3435T sa svim dobijenim p vrednosti, odnosima šanse (OR) i intervalima poverenja od 95% (95% CI) prikazani su u Tabeli 29.

**Tabela 29.** Distribucija alela i genotipova polimorfizama rs1045642 *MDR1* gena kod KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika

<i>MDR1</i> C3435T rs1045642		KB/Kontrole		UK/Kontrole		IBC/Kontrole	
		p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)	p*	OR (95% CI)
Aleli	C	0,24	1,21 (0,87-1,66)	<b>0,006</b>	0,63 (0,45-0,88)	0,92	1,01 (0,78 -1,31)
	T		0,82 (0,60-1,14)		1,59 (1,14- 2,21)		0,98 (0,76-1,27)
Genotipovi	CC	0,51	1,17 (0,71-1,93)	<b>0,005</b>	0,39 (0,20- 0,76)	0,20	0,75 (0,49-1,16)
	CT	0,64	1,11 (0,70-1,74)	0,33	1,25 (0,78-2,00)	0,38	1,17 (0,81-1,70)
	TT	0,21	0,70 (0,39-1,23)	0,10	1,52 (0,91-2,52)	0,80	1,05 (0,69-1,61)

\*Hi kvadrat test; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja

#### 4.7.2 Poređenje učestalost nosioca alela polimorfizama *MDR1* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KB, UK i IBC

Upoređivali smo učestalost nosioca alela sva tri ispitivana polimorfizma *MDR1* gena u grupama pacijenata sa KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu. Utvrđena je značajna povezanost nosioca T alela kod svih ispitivanih polimorfizama *MDR1* gena (C1236T, G2677T/A i C3435T) i UK. U skladu sa navedenim, učestalost nosioca C alela polimorfizma C1236T (rs112503) je bila značajno manja kod pacijenata sa UK u odnosu na kontrolnu grupu. Nasuprot tome, nije uočena značajna razlika u distribuciji nosioca alela bilo kog ispitivanog polimorfizama *MDR1* gena između zdravih ispitanika i pacijenata sa KB (nije prikazano). Rezultati poređenja učestalosti nosioca alela u grupi pacijenata sa UK i kontrolnoj grupi sa dobijenim p vrednostima, odnosima šanse (OR) i intervalima poverenja od 95% (95% CI) prikazani su u Tabeli 30.

#### 4.7.3 Distribucija haplotipova i diplotipova polimorfizama *MDR1* gena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KB, UK i IBC

U našoj seriji ispitanika određivani su i haplotipovi i diplotipovi (kombinacije haplotipova) koji su izvedeni iz rezultata genotipizacije tri ispitivana polimorfizma *MDR1* gena. Identifikovano je 9 različitih trialelskih haplotipova (redosled polimorfizama C1236T, G2677T/A i C3435T). Među njima, haplotip TTT i haplotip CGC su bili najčešći



i kod pacijenata sa UK i kod pacijenata sa KB, dok su ostali haplotipovi pojedinačno u svim grupama ispitanika bili znatno manje zastupljeni sa manje od 5%, i nisu uključeni u

**Tabela 30.** Distribucija učestalosti nosioca alela polimorfizama *MDR1* gena kod pacijenata sa UK u odnosu na kontrolnu grupu

<i>MDR1</i> polimorfizmi	Kontrola (n=255)		UK (n=99)	
	n	n	p*	OR (95% CI)
<b>C1236T (rs1128503)</b>				
Nosilac C alela	200	65	<b>0,013</b>	0,526 (0,315 – 0,876)
Nosilac T alela	170	83	<b>0,001</b>	2,594 (1,430 – 4,703)
<b>G2677T/A (rs2032582)</b>				
Nosilac G alela	199	68	0,067	0,617 (0,368 – 1,036)
Nosilac T alela	168	82	<b>0,002</b>	2,498 (1,394 – 4,475)
Nosilac A alela	7	1	0,451 <sup>†</sup>	0,362 (0,044 – 2,977)
<b>C3435T (rs1045642)</b>				
Nosilac C alela	192	66	0,101	0,656 (0,396 – 1,088)
Nosilac T alela	185	86	<b>0,004</b>	2,503 (1,314 – 4,770)

\*Hi kvadrat test; <sup>†</sup>Fišerov test tačne verovatnoće; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja

statističku analizu (sa izuzetkom haplotipa CGT čije je učestalost bila od 5,9% do 6,5% u zavisnosti od ispitivane grupe). Poređenjem učestalosti haplotipova između grupa pacijenata i kontrolne grupe uočeno je da je haplotip 1236T /2677T/3435T (TTT) bio češće prisutan kod pacijenata sa UK (p=0,001, OR=1,707 [1,226–2,376]), što dovodi do pretpostavke da bi navedeni haplotip mogao da bude faktor rizika za nastanak UK. Haplotip 1236C /2677G/3435C (CGC) je bio značajno ređe zastupljen kod pacijenata sa UK u odnosu na kontrolnu grupu (p=0,003, OR=0,593 [0,422–0,834]), što sugerije mogući protektivan značaj ovog haplotipa u nastanku UK (Tabela 31). Nasuprot UK, nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti navedenih haplotipova u grupi pacijenata sa KB, odnosno svih pacijenata sa IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika.

Obzirom na jasnu povezanost haplotipova sa UK, ispitivani su diplotipovi koji su bili zastupljeni sa 5% ili više u našoj seriji ispitanika. Od ukupno 16 identifikovanih, najzastupljeniji diplotipovi koji su se izdvojili u ispitivanoj kohorti pacijenata i zdravih kontrola bili su CGC/CGC, CGC/TTT i TTT/TTT, dok su još tri bila zastupljena više od 5% u nekoj od ispitivanih grupa i to CGC/CGT, CGT/TTT i TTC/TTT (Tabela 31). Od svih ispitivanih diplotipova, diplotip CGC/CGC je bio značajno ređe zastupljen kod pacijenata sa UK u odnosu na kontrolnu grupu (p=0,013, OR=0,425 [0,213–0,848]), dok je diplotip TTC/TTT bio značajno češće zastupljen kod pacijenata sa UK (p=0,042,

OR=4,468 [1,047–19,364]). Ovi rezultati sugerišu mogući protektivni značaj CGC/CGC diplotipa, odnosno predisponirajuću ulogu TTC/TTT diplotipa u nastanku UK. Diplotip TTT/TTT je takođe češće bio zastupljen kod pacijenata sa UK, ali razlika nije dostigla statističku značajnost. Nije utvrđeno postojanje povezanosti između ostalih ispitivanih diplotipova i pacijenata sa UK, KB i IBC u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 31).

**Tabela 31.** Distribucija haplotipova i diplotipova polimorfizama *MDR1* gena kod KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika

<i>MDR1</i> Haplotip/Diplotip	Kontrole (n=255)	KB (n=107)		UK (n=99)		IBC (n=206)	
	n (%)	n (%)	p*	n (%)	p*	n (%)	p*
<b>Haplotip<sup>‡</sup></b>							
C G C	239 (46,9)	107 (50,0)	0,442	68 (34,3)	<b>0,003</b>	175 (42,5)	0,183
C G T	30 (5,9)	14 (6,5)	0,740	12 (6,1)	0,920	26 (6,3)	0,791
T T T	208 (40,8)	78 (36,4)	0,275	107 (54,0)	<b>0,001</b>	185 (44,9)	0,209
Ostali	33 (6,5)	15 (7,0)	N. P.	11 (5,6)	N. P.	26 (6,3)	N. P.
<b>Diplotip</b>							
CGC / CGC	58 (22,7)	26 (24,3)	0,752	11 (11,1)	<b>0,013</b>	37 (18,0)	0,207
CGC / CGT	15 (5,9)	8 (7,5)	0,572	2 (2,0)	0,169 <sup>†</sup>	10 (4,9)	0,631
CGC / TTT	89 (34,9)	39 (36,4)	0,777	42 (42,4)	0,188	81 (39,3)	0,327
CGT / TTT	11 (4,3)	6 (5,6)	0,597	5 (5,1)	0,778 <sup>†</sup>	11 (5,3)	0,610
TTC / TTT	3 (1,2)	2 (1,9)	0,635 <sup>†</sup>	5 (5,1)	<b>0,042<sup>†</sup></b>	7 (3,4)	0,119 <sup>†</sup>
TTT / TTT	48 (18,8)	14 (13,1)	0,186	26 (26,3)	0,122	40 (19,4)	0,862
Ostali	31 (12,2)	12 (11,2)	N. P.	8 (8,1)	N. P.	20 (9,7)	N. P.

\*Hi kvadrat test; <sup>‡</sup>Redosled polimorfizama u haplotipu je 1236, 2677 i 3435; <sup>†</sup>Fišerov test tačne verovatnoće; N. P. – nije primenjivo

#### 4.7.4 Klinički značaj ispitivanih polimorfizama *MDR1* gena kod pacijenata sa KB, UK i IBC

Kod pacijenata sa KB, UK i IBC ispitivana je udruženost alela, nosilaca alela, genotipova sva tri ispitivana polimorfizma *MDR1* gena (C1236T, G2677T/A i C3435T), haplotipova i diplotipova sa sledećim demografskim i kliničkim karakteristikama bolesti: pol, aktivnost bolesti, godine kad je postavljena dijagnoza, prethodne hirurške intervencije zbog osnovne bolesti, ekstenzivnost bolesti, lokalizacija bolesti, tip KB, kortikosteroid-zavisna/refraktarna bolest, imunomodulatorno-refraktarna bolest, prisustvo prisutvo EIM, postojanje anemije, pušenje i porodično opterećenje za IBC.

U našoj seriji ispitanika sa KB, čak 63% pacijenata je imalo kortikosteroid-zavisnu formu bolesti, dok je oko 42% pacijenata imalo imunomodulatorno-refraktarnu bolest ili su

razvili neželjene efekte na lek (azatioprin ili metotreksat). Biološku terapiju je primalo oko 34% pacijenata u trenutku izvođenja studije. U grupi pacijenata sa UK, 36% je imalo kortikosteroid zavisnu/refrakternu formu bolesti, 10% je imalo imunomodulatorno refrakternu bolest ili su razvili neželjene efekte na lek (azatioprin), dok je 7% pacijenata primalo biološku terapiju (antiTNF) u trenutku studije ili ranije.

Nakon urađenih statističkih analiza, utvrđena je povezanost između pojedinih alela, genotipova i haplotipova i pušenja kod pacijenata sa UK, kao i udruženost KB sa rizikom od hirurškog lečenja, dok je povezanost sa postojanjem EIM bolesti bila na granici statističke značajnosti. U Tabeli 32 su prikazani najznačajniji rezultati koji se odnose na povezanost genotipa i fenotipa za sve ispitivane polimorfizme kod naših pacijenata sa UK i KB.

**Tabela 32.** Udruženost fenotipskih karakteristika bolesti i polimorfizama *MDR1* gena kod pacijenata sa KB i UK

<i>MDR1</i> SNP	Alel/Genotip/Haplotip	KB/UK	Fenotip	p*	OR (95% CI)
<b>C1236T (rs1128503)</b>					
	Alel T	UK	Češći kod nepušača	<b>0,030</b>	3,26 (1,07-9,86)
	Genotip CT	UK	Češći kod nepušača	<b>0,024</b>	2,98 (1,15-7,73)
	Genotip CC	UK	Češći kod pušača	<b>0,036</b>	0,30 (0,10-0,92)
<b>C3435T (rs1045642)</b>					
	Alel T	UK	Češći kod nepušača	<b>0,025</b>	3,73 (1,12-2,40)
	Genotip CC	UK	Češći kod pušača	<b>0,031</b>	0,26 (0,08-0,88)
	Alel T	KB	Češći kod operisanih	<b>0,008</b>	0,30 (0,12-0,72)
	Alel C	KB	Niža incidenca EIM	0,057	0,38 (0,14-1,03)
<b>Sva tri SNP</b>					
	Haplotip TTT	UK	Češći kod nepušača	<b>0,020</b>	3,39 (1,17-1,81)

#### 4.8 POREĐENJE RASPODELE ALELA POLIMORFIZAMA *IL10*, *IL12B*, *IL23R* I *MDR1* GENA KOD ZDRAVIH OSOBA U SRBIJI SA DRUGIM POPULACIJAMA

Rezultati raspodele alela svih ispitivanih polimorfizama *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u populaciji zdravih osoba iz Srbije upoređeni su sa objavljenim podacima za druge populacije iz različitih zemalja i geografskih regija. Za to su korišćene studije u kojima je ispitivana povezanost tih polimorfizama sa IBC. Podaci za polimorfizam

rs1800629 u *TNFA* genu su ranije analizirani kod zdravih ispitanika u Srbiji [196], tako da nisu uključenu u ovu studiju.

#### 4.8.1 Poređenje raspodele alela polimorfizama *IL10* gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama

Raspodela alela polimorfizma *IL10* gena kod zdravih ispitanika u našoj studiji upoređena je sa objavljenim podacima u drugim populacijama da bi se utvrdilo da li postoje razlike u frekvencijama alela između zdravih osoba iz Srbije i iz drugih država.

##### 4.8.1.1 Poređenje raspodele alela polimorfizma rs3024505 *IL12B* gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama

Do sada je urađen veoma mali broj studija koji je ispitivao rs3024505 (C/T) polimorfizam i prema dostupnim rezultatima, frekvencije alela C i T u našoj populaciji se nisu statistički značajno razlikovale u odnosu na populaciju Novog Zelanda (Tabela 33).

**Tabela 33.** Raspodela alela rs3024505 polimorfizma *IL10* gena kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	T alel (%)	C alel (%)	p*
Ova disertacija	Srbija	255	13,7	86,3	N. P.
Wang i sar., 2011 [158]	Novi Zeland	1162	16,4	83,6	0,172

N. P. – nije primenjivo

##### 4.8.1.2 Poređenje raspodele alela polimorfizma rs1800896 *IL10* gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama

Rezultati raspodele alela polimorfizma rs1800896 (G-1082A) *IL10* gena, u populaciji zdravih osoba iz Srbije, upoređeni su sa objavljenim podacima za druge populacije da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija A i G alela između zdravih osoba iz Srbije i zdravih osoba iz drugih država. Frekvencije A i G alela u zdravoj populaciji Srbije nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na populacije Novog Zelanda, Australije Kanade, Španije, Turske i Indije. Statistički značajna razlika u frekvencijama alela postoji između zdrave populacije Srbije i Mađarske, Nemačke i Irske. Statistički visoko značajna razlika postoji između zdrave populacije Srbije i populacija Italije, Velike Britanije, Danske i Meksika. Ovi rezultati su prikazani u Tabeli 34.

**Tabela 34.** Raspodela alela rs1800896 polimorfizma *IL10* gena kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	G alel (%)	A alel (%)	p*
Ova disertacija	Srbija	255	40,6	59,4	N. P.
Tagore i sar., 1999 [153]	V.Britanija	330	51	49	<b>0,0004</b>
Klein i sar., 2000 [197]	Nemačka	400	47	53	<b>0,023</b>
Cantor i sar., 2005 [198]	Kanada	92	48	52	0,097
Klausz i sar., 2005 [199]	Mađarska	75	61	39	<b>0,030</b>
Tedde i sar., 2008 [200]	Italija	391	61,7	38,2	< <b>0,0001</b>
Balding i sar., 2004 [201]	Irska	389	41,9	58,1	<b>0,0102</b>
Fernandez i sar., 2005 [202]	Španija	572	36,1	63,9	0,7406
Fowler i sar., 2005 [203]	Australija	231	38,3	61,7	0,0543
Celik i sar., 2006 [204]	Turska	103	36,4	63,6	0,3003
Andersen i sar., 2010 [159]	Danska	779	51,7	48,3	< <b>0,0001</b>
Garza Gonzales i sar., 2010 [205]	Meksiko	75	8,7	91,3	< <b>0,0001</b>
Wang i sar., 2011 [158]	Novi Zeland	1162	50,9	49,1	0,15
Ahirwar i sar., 2012 [206]	Indija	207	37,7	62,3	0,3683

N. P. – nije primenjivo

#### 4.8.1.3 Poređenje raspodele alela polimorfizma rs1800871 *IL10* gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama

Raspodela alela polimorfizma rs1800871 (C-819T) *IL10* gena u populaciji zdravih osoba iz Srbije upoređena je sa podacima za druge populacije da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija C i T alela između kontrola iz Srbije i zdravih osoba sa drugih geografskih područja. Ovi rezultati su prikazani u Tabeli 35.

**Tabela 35.** Raspodela alela rs1800871 polimorfizma *IL10* gena kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	C alel (%)	T alel (%)	p*
Ova disertacija	Srbija	255	25,5	74,5	N. P.
Cantor i sar., 2005 [198]	Kanada	92	21	79	0,27
Tedde i sar., 2008 [200]	Italija	391	23,8	76,2	0,4859
Amre i sar., 2009 [207]	Kanada	336	28	72	0,2808
Fernandez i sar., 2005 [202]	Španija	572	67,4	32,6	0,8739
Andersen i sar., 2010 [159]	Danska	779	78,6	21,4	0,0532
Wang i sar., 2011 [158]	Novi Zeland	1162	22,3	77,7	0,17
Ahirwar i sar., 2012 [206]	Indija	207	55,1	44,9	< <b>0,0001</b>

N. P. – nije primenjivo

Frekvencije C i T alela u zdravoj populaciji Srbije nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na populacije Italije, Španije, Novog Zelanda i Kanade. Razlika u frekvencijama alela je na granici statističke značajnosti kada su poređene zdrave populacije Srbije i Danske, dok je statistički visoko značajna razlika postojala između zdrave populacije Srbije i populacija Indije.

#### 4.8.2 Poređenje raspodele alela polimorfizma rs6887695 *IL12B* gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama

Rezultati raspodele alela polimorfizma rs6887695 (G/C) *IL12B* gena u populaciji zdravih osoba iz Srbije upoređeni su sa objavljenim podacima za druge populacione grupe da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija G i A alela ovog polimorfizma gena za *IL12B* između kontrola iz Srbije i zdravih osoba iz drugih država. Ovi rezultati su prikazani u Tabeli 36.

**Tabela 36.** Raspodela alela rs6887695 polimorfizma *IL12B* gena kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	G alel (%)	C alel (%)	p*
Ova disertacija	Srbija	255	71,8	28,2	N. P.
Marquez i sar., 2008 [208]	Španija	547	67,3	32,7	0,0747
Ferguson i sar., 2010 [163]	Novi Zeland	724	64,8	35,2	<b>0,0099</b>
Wang i sar., 2015 [209]	Kina	500	60,4	39,6	<b>&lt; 0,0001</b>
Bank i sar., 2015 [165]	Danska	750	70,9	29,1	0,6992

N. P. – nije primenjivo

Frekvencije G i C alela u zdravoj populaciji Srbije nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na populacije Španije i Danske. Statistički visoko značajna razlika postoji između zdrave populacije Srbije i populacija Kine i Novog Zelanda.

#### 4.8.3 Poređenje raspodele alela polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama

Rezultati raspodele alela polimorfizma rs11209026 (G1142A) *IL23R* gena u populaciji zdravih osoba iz Srbije upoređeni su sa objavljenim podacima za druge populacije da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija G i A alela ovog polimorfizma gena za *IL23R* između kontrola iz Srbije i zdravih osoba iz drugih država. Ovi rezultati su prikazani u Tabeli 37.

**Tabela 37.** Raspodela alela rs11209026 polimorfizma *IL23R* gena kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	G alel (%)	A alel (%)	p*
Ova disertacija	Srbija	255	94,1	5,9	N. P.
Glas i sar., 2007 [210]	Nemačka	1381	93,2	6,8	0,4715
Newman i sar., 2009 [211]	Kanada	1005	84,9	15,1	<b>0,0013</b>
Weersma i sar., 2008 [171]	Holandija	893	93,5	6,5	0,6425
Venegas i sar., 2008 [212]	Čile	116	97,4	2,6	0,1635
Marquez i sar., 2008 [208]	Španija	547	94,3	5,7	0,8630
Latiano i sar., 2008 [213]	Italija	726	94,0	6,0	0,9715
Ferguson i sar., 2010 [163]	Novi Zeland	633	93,3	6,7	0,5196
Lacher i sar., 2010 [214]	Nemačka	253	92,9	7,1	0,4262
Kanaan i sar., 2012 [215]	SAD	320	96,5	3,5	0,0724

N. P. – nije primenjivo

Frekvencije G i C alela u zdravoj populaciji Srbije nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na populacije Nemačke, Holandije, Španije, Italije, Novog Zelanda, SAD i Čilea, dok postoji visoko statistički značajna razlika u frekvenci G i C alela između zdrave populacije u Srbiji i Kanadi.

#### **4.8.4 Poređenje raspodele alela polimorfizama *MDR1* gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama**

Raspodela alela polimorfizma *MDR1* gena kod zdravih ispitanika u našoj studiji upoređena je sa objavljenim podacima u drugim populacijama da bi se utvrdilo da li postoje razlike u frekvencijama alela između zdravih osoba iz Srbije i iz drugih država.

##### **4.8.4.1 Poređenje raspodele alela polimorfizma rs1128503 *MDR1* gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama**

Rezultati raspodele alela polimorfizma rs1128503 (C1236T) *MDR1* gena u populaciji zdravih osoba iz Srbije upoređeni su sa objavljenim podacima za druge populacijeda bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija C i T alela ovog polimorfizma *MDR1* gena između kontrola iz Srbije i zdravih osoba iz drugih država. Ovi rezultati su prikazani u Tabeli 38.

**Tabela 38.** Raspodela alela rs1128053 polimorfizma *MDR1* gena kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	T alel (%)	C alel (%)	p*
Ova disertacija	Srbija	255	44,1	55,9	N. P.
Ho i sar., 2006 [216]	Škotska	260	45,0	55,0	0,7240
Huebner i sar., 2009 [217]	Novi Zeland	200	45,5	54,5	0,6826
Krupoves i sar., 2009 [218]	Kanada	336	46,3	53,7	0,5086
Juyal i sar., 2009 [219]	Indija	274	56,9	37,4	< <b>0,0001</b>
Milojkovic i sar., 2011 [220]	Srbija	158	46	54	0,6194

N. P. – nije primenjivo

Frekvencije C i T alela u zdravoj populaciji Srbije nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na drugi region naše zemlje (Niš i okolina), kao i populacije Škotske, Kanade i Novog Zelanda. Statistički visoko značajna razlika postoji između zdrave populacije Srbije i populacije Indije.

#### **4.8.4.2 Poređenje raspodele alela polimorfizma rs2032582 *MDR1* gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama**

Dobijeni rezultati raspodele alela u populaciji zdravih osoba troalelskog polimorfizma rs2032582 (G2677T/A) *MDR1* gena iz Srbije upoređeni su sa objavljenim podacima za druge populacione grupe da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija G, A i T alela ovog polimorfizma *MDR1* gena između zdravih osoba iz Srbije i zdravih osoba iz drugih država. Frekvencije G, A i T alela u zdravoj populaciji Srbije nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na drugi region naše zemlje (Niš i okolina), kao i populacije Mađarske, Nemačke, Španije, Velike Britanije, Italije, Turske, Kanade, Škotske i Novog Zelanda. Uočena je značajna razlika između populacija Srbije i Hrvatske, a statistički visoko značajna razlika postoji između zdrave populacije Srbije i populacije Indije. Ovi rezultati su prikazani u Tabeli 39.

#### **4.8.4.3 Poređenje raspodele alela polimorfizma rs1045642 *MDR1* gena kod zdravih osoba u Srbiji sa drugim populacijama**

Raspodela alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije upoređena je sa podacima za druge populacije da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija C i T alela



rs1045642 polimorfizma *MDR1* gena (C3435T) između kontrola iz Srbije i zdravih osoba sa drugih geografskih područja.

**Tabela 39.** Raspodela alela rs2032582 polimorfizma *MDR1* gena kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	G alel (%)	A alel (%)	T alel (%)	p
Ova disertacija	Srbija	255	55,3	1,4	43,3	N. P.
Palmieri i sar., 2005 [221]	Italija	450	55,6	2,1	42,3	0,8033
Ho i sar., 2005 [222]	Škotska	370	51,2	0	49,8	0,0842
Urcelay i sar., 2006 [223]	Španija	352	62,8	0,7	36,5	0,0741
Onnie i sar., 2006 [189]	V. Britanija	285	57,9	-	39,6	0,2997
Fischer i sar., 2007 [224]	Mađarska	146	52,4	2,8	44,8	0,5529
Fiedler i sar., 2007 [225]	Nemačka	1005	56,2	2,0	41,8	0,6000
Sapmaz i sar., 2008 [226]	Turska	70	53,0	0	47,0	0,4998
Krupoves i sar., 2009 [218]	Kanada	336	53,7	-	46,3	0,4856
Huebner i sar., 2009 [217]	Novi Zeland	200	51,8	1,8	46,4	0,3225
Juyal i sar., 2009 [219]	Indija	274	41,6	3,3	55,1	<b>&lt; 0,0001</b>
Milojkovic i sar., 2011 [220]	Srbija	158	53	4	43	0,7930
Brinar i sar., 2013 [227]	Hrvatska	120	64,2	-	35,8	<b>0,0372</b>

N. P. – nije primenjivo

**Tabela 40.** Raspodela alela rs1045642 polimorfizma *MDR1* gena kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	T alel (%)	C alel (%)	p*
Ova disertacija	Srbija	255	48,6	51,4	N. P.
Palmieri i sar., 2005 [221]	Italija	450	47,8	52,2	0,7590
Urcelay i sar., 2006 [223]	Španija	352	49	51	0,5621
Onnie i sar., 2006 [189]	V. Britanija	280	53,9	46,1	0,0833
Ho i sar., 2006 [216]	Škotska	260	52,3	47,7	0,2377
Fischer i sar., 2007 [224]	Mađarska	146	49,3	50,7	0,8513
Fiedler i sar., 2007 [225]	Nemačka	1005	53,2	46,8	0,0660
Krupoves i sar., 2009 [218]	Kanada	336	52,6	47,4	0,1317
Huebner i sar., 2009 [217]	Novi Zeland	200	55,9	44,1	<b>0,0307</b>
Juyal i sar., 2009 [219]	Indija	274	59,9	40,1	<b>0,0001</b>
Milojkovic i sar., 2011 [220]	Srbija	158	53	47	0,2208
Dudarewicz i sar., 2012 [228]	Poljska	137	56,7	43,43	<b>0,0341</b>
Brinar i sar., 2013 [227]	Hrvatska	120	44,5	55,5	0,2969

N. P. – nije primenjivo

Frekvencije C i T alela rs1045642 polimorfizma *MDR1* gena u zdravoj populaciji Srbije nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na drugi region naše zemlje (Niš i okolina), kao i populacije Velike Britanije, Italije, Hrvatske, Kanade, Mađarske, Nemačke, Španije i Škotske. Statistički značajna razlika u frekvencijama alela postoji između zdrave populacije Srbije i Poljske i Novog Zelanda. Statistički visoko značajna razlika postoji između zdrave populacije Srbije i populacije Indije. Ovi rezultati su prikazani u Tabeli 40.

## *5. Diskusija*

---

U ovom istraživanju, ispitana je učestalost polimorfizama pojedinačnih nukleotida u *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* genima u populaciji zdravih osoba i u grupi pacijenata sa IBC u Srbiji. Analizirano je postojanje povezanosti KB, UK, i svih pacijenata sa IBC, sa nekim od 9 polimorfizama, i to rs1800629 (G-308A) u promotoru *TNFA* gena, rs1800896 (G-1082A) i rs1800871 (C-819T) u promotorskom regionu i rs3024505 (C/T) na 3' kraju *IL10* gena, rs6887695 (G/C) u blizini *IL12B* gena, rs11209026 (G1142A) u genu za receptor za IL-23 (*IL23R*) i tri polimorfizma u *MDR1* genu koji kodira transporter P-glikoprotein, rs1128503 (C1236T), rs1045642 (C3435T) i trialelski rs2032582 (G2677T/A). U našoj kohorti, alel G i genotip GG polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena su bili statistički značajno povezani sa nastankom i KB i UK. Polimorfizam rs3024505 *IL10* gena (alel T i genotip CT), i polimorfizam rs6887695 *IL12B* gena (genotip CC) su bili značajno povezani sa nastankom KB, dok su neke varijante ovih polimorfizama bile povezane sa određenim fenotipskim karakteristikama bolesti (anemijom, prisustvom stenoza, fistula i/ili EIM) . Polimorfizmi rs1128503, rs2032582 i rs1045642 u *MDR1* genu su bili statistički značajno povezani sa nastankom UK (T alel sva tri SNP, kao i TT genotip rs1128503 i rs2032582). Genotipsko-fenotipska analiza je utvrdila povezanost nekih od *MDR1* polimorfizama sa pušenjem i rizikom od hirurškog lečenja. Takođe su i haplotipovi polimorfizama u *IL10* i *MDR1* genu povezani sa nastankom KB (haplotip GCCT *IL10* gena), i sa nastankom UK (haplotip TTT *MDR1* gena), što je potvrdilo važnu ulogu ispitivanih polimorfizama u nastanku IBC. U našoj studiji nije uočena povezanost polimorfizma rs1800896 *TNFA* gena sa nastankom KB i UK. Ovakvi rezultati ukazuju na značaj polimorfizama *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena kao potencijalnih biomarkera IBC u srpskoj populaciji.

## **5.1 EPIDEMIOLOŠKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE PACIJENATA SA INFLAMATORNOM BOLESTI CREVA**

Poznato je da IBC ima različitu učestalost javljanja u raznim geografskim područjima i među različitim rasama i etničkim grupama. Tako je bolest više zastupljena u razvijenim delovima sveta, kod belaca i Aškanazi jevreja, nego kod drugih rasa i etničkih grupa [8]. U našoj seriji ispitanika sa IBC, učestalost bolesnika sa UK i KB je bila približno ista, ali smo imali nešto veću učestalost pacijenata sa KB u odnosu na UK ( $\approx 52\%$  bolesnika sa KB u odnosu na  $\approx 48\%$  UK). Na ovim prostorima do sada su rađene dve epidemiološke studije o IBC i one ukazuju na sličnu učestalost javljanja UK i KB, sa

neznatno većom zastupljenosti UK (51-55%) [12, 13], tako da su rezultati u našoj studiji uporedivi sa rezultatima te dve studije. Rezultati drugih studija o IBC ukazuju da učestalost KB i UK varira u zavisnosti od regije, odnosno ispitivane populacije. Studije rađene u SAD, Severnoj Evropi, Australiji i Južnoj Americi ukazuju na nešto veću učestalost javljanja UK u odnosu na KB [30, 229], dok je studija koja je obuhvatila kanadsku populaciju objavila do sada najveću incidencu i prevalencu javljanja KB u odnosu na UK [16].

Distribucija prema polu je u našoj seriji ispitanika bila slična kod obe grupe pacijenata, pri čemu je bila neznatno veća zastupljenost muškog pola ( $\approx 58\%$  kod KB i  $\approx 54\%$  kod UK). Slični rezultati objavljeni su i u našoj jedinoj nacionalnoj epidemiološkoj studiji (53,8% kod KB i 54,7% kod UK) [13]. Prema epidemiološkim studijama u SAD, distribucija prema polu je približno ista kod pacijenata sa IBC, pri čemu je UK nešto češće prisutan kod muškaraca, dok žene više obolevaju od KB [9].

Prosečna starosna dob naših pacijenata u trenutku postavljanja dijagnoze je bila  $\approx 32$  godine za KB i  $\approx 36$  godina za UK. U nacionalnoj epidemiološkoj studiji koja je rađena u našoj zemlji objavljeni su slični podaci, pri čemu je starosna dob pacijenata sa KB iznosila  $\approx 31$  godinu, dok su pacijenti sa UK u trenutku postavljanja dijagnoze u proseku bili starosne dobi od  $\approx 37$  godina [13]. Desetogodišnja studija praćenja koja je obuhvatila pacijente sa IBC iz jednog univerzitetskog centra u Beogradu, pokazala je slične rezultate, pri čemu je starosna dob pacijenata sa KB iznosila  $28 \pm 1$  godinu, a kod UK je iznosila  $36 \pm 2,3$  godina [12]. U većini epidemioloških studija, vrhunac („pik“) javljanja IBC je period od druge do četvrte decenije života, dok je drugi pik javljanja koji je ređe zastupljen, u šestoj i sedmoj deceniji života [8, 11, 30, 66, 230].

Prema podacima iz literature, KB je najčešće lokalizovana u tankom crevu i kolonu, zatim samo u terminalnom ileumu, dok manji procenat bolesnika ima bolest lokalizovanu samo u kolonu ili, najređe, samo u proksimalnim segmentima digestivnog trakta. Perianalna bolest je zastupljena u oko 1/3 bolesnika sa KB [1]. U našoj seriji, najveći procenat ispitanika je imao bolest lokalizovanu u tankom crevu i kolonu ( $\approx 49\%$ ), a približno 1/3 pacijenata je imala perianalnu bolest, dok je procenat bolesnika koji su imali bolest lokalizovanu u terminalnom ileumu manji (26%) u odnosu na literaturne podatke (30-40%) [1]. Takođe, 25% bolesnika je imalo bolest lokalizovanu samo u kolonu, što je u skladu sa podacima iz literature prema kojima se bolest ove lokalizacije javlja u proseku u 10-25% slučajeva [1]. U nacionalnoj epidemiološkoj studiji iz Srbije, učestalost lokalizacija KB je bila slična našim rezultatima i to: najčešće bila zastupljena ileokolonska lokalizacija (47,5%), potom kolonska lokalizacija (31,7%) i lokalizacija u terminalnom

ileumu (23,6%), dok je fistuloznu formu bolesti je imalo 25,6% pacijenata [13]. Međutim, druga studija iz Srbije je za KB pokazala najveću učestalost kolonske lokalizacije (60%), dok je ileokolonska lokalizacija bila zastupljena u svega 21% pacijenata, a fistuloznu formu bolesti je imalo 22% pacijenata [12]. Moguće razlike u učestalosti određenih lokalizacija KB kod naših bolesnika u odnosu na podatke iz literature, mogu da budu posledica malog uzorka ili stvarne različitosti ove bolesti u našoj populaciji.

Kod bolesnika sa UK, približno 40-50% pacijenata ima bolest ograničenu na rektum i rektosigmoidni kolon, kod 30-40% bolesnika bolest je proširena iznad sigmoidnog kolona, ali ne zahvata ceo kolon, a 20% bolesnika ima pankolitis [1]. Lokalizacija bolesti u našoj seriji ispitanika sa UK se razlikovala u odnosu na literaturne podatke, obzirom da je oko 60% naših pacijenata sa UK imalo ekstenzivni kolitis i to najčešće pankolitis. Međutim epidemiološka analiza jednog univerzitetskog centra u Beogradu je takođe objavila najveću učestalost ekstenzivnog kolitisa, čak 82% [12]. Sa druge strane prva nacionalna epidemiološka studija u Srbiji je imala učestalost ekstenzivnog kolitisa od 40% [13]. Ovakve razlike u odnosu na postojeće svetske podatke, ali i podatke iz naše zemlje, se mogu objasniti činjenicom da je naša serija ispitanika obuhvatila pacijente koji su lečeni u tercijalnoj ustanovi gde se upućuju najteži pacijenti iz zemlje i regiona, te je naša kohorta pacijenata sa IBC podrazumevala često najkompleksnije pacijente po karakteristikama, aktivnosti i toku bolesti, dok su pacijenti sa blažom formom bolesti bili manje zastupljeni. Potrebne su veće epidemiološke studije u našoj sredini da bi se sa pouzdanošću utvrdile karakteristike IBC kod nas.

IBC su udružene sa različitim EIM, pri čemu više od trećine pacijenata ima bar jednu EIM tokom života [1]. U našoj seriji ispitanika u trenutku izvođenja studije EIM (jednu ili više) je imalo 17% bolesnika, odnosno 32% pacijenata je nekada u životu imalo EIM sa KB, dok 27% bolesnika sa UK je aktuelno imalo EIM, odnosno ukupno 39% pacijenata je dalo anamnestički podatak o ranijem postojanju EIM. Najčešća EIM podrazumevala je različite oblike artropatija, što je u skladu sa dostupnim podacima da se EIM najčešće javljaju na skeletomuskularnom sistemu, pre svega perifernim i aksijalnim zglobovima [231]. Multicentrična epidemiološka studija iz Srbije i epidemiološka studija iz jednog centra u Beogradu su pokazale slične rezultate [12, 13].

Prema literaturnim podacima, više od 70% pacijenata sa KB doživi bar jednu operaciju tokom života, dok se hirurškom lečenju podvrgne približno 30% pacijenata sa UK i to su najčešće pacijenti kod kojih bolest traje više od deset godina [117]. Sa razvojem biološke terapije, iako se očekivalo značajno smanjenje potrebe za hirurškim lečenjem,

preliminarni rezultati ne ukazuju na povećan trend ukupnog smanjenja rizika za elektivnim hirurškim lečenjem, dok je neznatno smanjen rizik od hitnih hirurških indikacija [232, 233]. U našoj seriji ispitanika, u grupi bolesnika sa KB,  $\approx 50\%$  pacijenata su imali bar jednu operaciju zbog osnovne bolesti tokom života, najčešće zbog stenozantne forme bolesti ileokolonske lokalizacije. Ovi rezultati odgovaraju podacima koje je objavila epidemiološka studija iz jedne univerzitetske klinike iz Srbije, sa približno 54% operisanih pacijenata sa KB [12]. Sa druge strane, nacionalna epidemiološka analiza iz Srbije je pokazala manji procenat operisanih bolesnika sa KB (43%) [13]. U našem istraživanju, kod pacijenata sa UK, 3% pacijenata je tokom života operativno lečeno zbog osnovne bolesti, kod svih je urađena kolektomija sa IPAA, a razlog operacije kod svih pacijenata je bio teško aktivni UK, refraktan na postojeću terapiju (svi pacijenti su pre operacije dobijali visoke doze *i.v.* kortikosteroida). U epidemiološkim studijama iz Srbije, učestalost hirurškog lečenja pacijenata sa UK je bila veća u odnosu na naše podatke i iznosila je od 9 do 11% [12, 13]. Učestalost hirurškog lečenja KB u našoj seriji je nešto veća u odnosu na svetske podatke i potvrđuje prethodno navedenu činjenicu, da su pacijenti u ovoj studiji lečeni u tercijarnoj ustanovi gde se upućuju najkompleksniji pacijenti iz naše zemlje i regiona. To je verovatni razlog zašto su su naši podaci o učestalosti hirurškog lečenja u KB slični studiji iz univerzitetskog centra KBC Zvezdara iz Srbije. Obrnuto, u kohorti pacijenata sa UK, procenat hirurškog lečenja je bio manji u odnosu na literaturne podatke i može se objasniti činjenicom, da su seriju naših pacijenata činili najčešće bolesnici koji su stacionarno lečeni, a operisani pacijenti sa UK, kod kojih je urađena kolektomija, ređe su imali indikacije za hospitalizaciju.

U našoj seriji ispitanika, beleženi su terapijski modaliteti lečenja, a na osnovu odgovora na terapiju, u odnosu na ispitivane polimorfizme upoređivane su sledeće kategorije: KS-zavisna i/ili KS-refraktarna bolest, azatioprin-zavisna i/ili refraktarna bolest i pacijenti na biološkoj terapiji. U grupi pacijenata sa KB, oko 63% pacijenata je imalo KS-zavisnu i/ili KS-refraktarnu bolest, 42% pacijenata je imalo imunomodulatorno-refraktarnu bolest ili neželjene efekte na imunomodulatornu terapiju (AZA ili MTX), dok je 39% pacijenata koristilo biološku terapiju u trenutku izvođenja studije ili u prošlosti pre nje. U grupi pacijenata sa UK, oko 36% pacijenata je imalo KS-zavisnu i/ili KS-refraktarnu bolest, dok je 10% pacijenata imao azatioprin-refraktarnu bolest ili je razvilo neželjene efekte na lek, odnosno oko 7% pacijenata je koristilo biološku terapiju u trenutku izvođenja studije ili u prošlosti. Naši rezultati se mogu uporediti sa rezultatima epidemiološke studije iz univerzitetske ustanove KBC Zvezdara u Beogradu, dok se

značajno razlikuju u odnosu na nacionalne epidemiološke podatke iz Srbije kojom je obuhvaćeno 7 univerzitetskih centara [12, 13]. Ovi podaci ukazuju da je naša serija ispitanika podrazumevala visok procenat pacijenata sa KS-zavisnom ili KS-refraktarnom bolešću, pa čak i visok procenat pacijenata koji su imali imunomodulatorno-refraktarnu bolest i kod pacijenata sa UK i KB, što još jednom potvrđuje činjenicu da je naša kohorta pacijenata sa IBC podrazumevala često bolesnike sa težim kliničkim formama bolesti i komplikacijama.

Na osnovu navedenog, epidemiološke i kliničke karakteristike naše serije ispitanika, ne razlikuju se značajno u odnosu na karakteristike IBC u drugim područjima sveta, ali su potrebne veće studije koje bi obuhvatile i etnički slične populacije u cilju dobijanja sveobuhvatnijih epidemioloških podataka o IBC u našoj zemlji.

## **5.2 ZNAČAJ POLIMORFIZMA rs1800629 *TNFA* GENA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA**

TNF je proinflamatorni citokin koji ima veoma važnu ulogu u IBC. Dosadašnje studije su pokazale povišen nivo ovog citokina u serumu, stolici i crevnoj mukozi kod pacijenata sa KB [142]. Takođe je dobro poznata uloga terapije anti-TNF antitelima kod pacijenata koji ne reaguju na standardnu terapiju i kod pacijenata sa klinički težim formama bolesti [234]. Međutim, pokazano je da jedna trećina pacijenata sa IBC ne postiže remisiju na inicijalnu terapiju antagonistima TNF, što se objašnjava individualnim razlikama u proizvodnji TNF [107, 234-238]. Ove individualne varijacije u proizvodnji TNF izgleda da su uzrokovane regulatornim polimorfizmima u genu za TNF, ili u njegovoj blizini, a jedan takav kandidat jeste i polimorfizam rs1800629 na poziciji -308 (G-308A) u promotorskom regionu TNF. Poznato je da ovaj polimorfizam ima funkcionalan kapacitet i da je A alel (nazvan još i TNF2 alel) udružen sa povećanom transkripcijom TNF u poređenju sa G alelom (TNF1 alelom). Takođe je pokazano da homozigoti za TNF2 proizvode znatno više nivoa TNF u odnosu na osobe koji su homozigoti za TNF1, dok heterozigoti imaju srednje visok nivo TNF u serumu [83, 141, 142]. Naša studija nije utvrdila povezanost između polimorfizma G-308A *TNFA* gena sa KB i UK. Slični rezultati dobijeni su i u populaciji iz Nemačke i Španije, gde nije utvrđena povezanost navedenog polimorfizma sa KB, UK, odnosno IBC [239, 240]. Takođe, nekoliko drugih studija nije utvrdilo postojanje značajne udruženosti ispitivanog polimorfizma kod pacijenata sa KB, UK, odnosno svih pacijenata sa IBC [144, 241-245]. Sa druge strane, nedavna studija iz



Maroka je utvrdila postojanje povezanosti A alela -308A sa UK, kao i sa svim pacijentima sa IBC [246]. Nasuprot tome, danska studija je pokazala da su AA homozigot i GA heterozigot genotipa G-308A povezani sa smanjenim rizikom za nastanak UK, a pri čemu nije uočena povezanost sa KB [247]. Druge studije su takođe pokazale postojanje povezanosti polimorfizma G-308A i UK, a u nekim od njih i sa KB [141, 230, 248-252]. Meta analiza koja je obuhvatila istraživanja iz Evrope pokazala je da je genotip AA faktor rizika za nastanak UK (OR=2,04, 95%CI [1,261–3,301]), ali i za nastanak KB (OR=1,73, 95%CI [1,261–3,301]) [146]. U nedavno objavljenoj studiji koja je, koliko je autoru poznato, jedina studija koja je ispitivala polimorfizam G-308A u Srbiji do sada, alel A je bio češći kod pacijenata sa KB u odnosu na zdrave osobe, ali ta razlika nije dostigla statističku značajnost ( $p=0,06$ ), dok je alel G bio udružen sa UK ( $p=0,04$ ) [253]. U našem istraživanju nije uočena ta povezanost, a razlozi za različite rezultate između pomenute i naše studije mogli bi da budu relativno mali broj ispitanika u obe studije (u našoj studiji 206 pacijenata sa IBC, u odnosu na 167), kao i različita metodologija koja je korišćena (u našoj studiji su polimorfizmi identifikovani TaqMan probama u odnosu na određivanje polimorfizma na osnovu dužine fragmenata nastalih restrikcijom digestijom u drugoj studiji).

Korelacijom polimorfizama sa fenotipskim karakteristikama bolesti, u studiji Fergusona i saradnika, koja je uključila stanovnike Novog Zelanda bele rase, G-308A polimorfizam nije bio udružen sa rizikom za nastanak UK ili KB, ali je pokazan povećan rizik za nastanak pankolitisa i za operativno lečenje kod pacijenata sa UK koji su bili nosioci A alela ovog polimorfizma [254]. U našoj studiji, ispitivali smo udruženost G-308A polimorfizma (alela, nosioca alela i genotipova) kod pacijenata sa KB i UK sa sledećim fenotipskim karakteristikama bolesti: pol, aktivnost bolesti, godine kad je postavljena dijagnoza, prethodne hirurške intervencije zbog osnovne bolesti, ekstenzivnost bolesti, lokalizacija bolesti, tip KB, terapija, pušenje, prisustvo EIM, postojanje anemije, pothranjenost i porodično opterećenje za IBC. Kod pacijenata sa KB, genotip GA rs1800629 je bio značajno ređe zastupljen kod pacijenata koji su bili refraktarni na azatioprin, dok ostale fenotipske karakteristike KB i UK nisu korelisale sa ispitivanim polimorfizmom. S obzirom da relativno ograničen broj pacijenata refraktarnih na azatioprin u našoj kohorti, realan značaj ovakvog nalaza nije moguće proceniti bez njegove potvrde u nekom budućem istraživanju.

Iako je moguće da genske varijacije u promotorskom regionu *TNFA* gena doprinose promenama u produkciji TNF i posledično utiču na inflamatornu kaskadu koja dovodi do

povećanja rizika za nastanak IBC, naši rezultati sugerišu da polimorfizam rs1800629 (G-308A) u promotorskom regionu *TNFA* gena nema ključnu ulogu u nastanku IBC i da nema potencijal da se korsiti kao biomarker IBC u populaciji Srbije. Obzirom na brojne dosadašnje studije sa oprečnim rezultatima, postoji velika potreba za replikacionim studijama i meta-analizama koje će obuhvatiti veće grupe ispitanika i više različitih populacija, kao i dodatnim predkliničkim funkcionalnim ispitivanjima kojima će se razjasniti mehanizmi ekspresije i produkcije TNF. Do tada, i pored jasne uloge proinflatarnog citokina TNF, uloga polimorfizma rs1800629 *TNFA* gena u patogenezi IBC, mada verovatna, ostaje nedovoljno razjašnjena.

### **5.3 ZNAČAJ POLIMORFIZAMA *IL10* GENA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA**

Nekoliko polimorfizama gena za IL-10 (*IL10*) koji se nalazi na hromozomu 1, je do sada dovedeno u vezu sa KB i/ili UK, kao i sa određenim kliničkim karakteristikama bolesti. Među njima su najvažniji polimorfizam rs3024505 (C/T) koji se nalazi u neposrednoj blizini 3' kraja *IL10* gena, kao i polimorfizmi koji se nalaze u promotorskom regionu *IL10* gena (G-1082A ili rs1800896, C-819T ili rs1800871 i C-592A ili rs1800872) [157, 158]. Međutim, studije koje su obuhvatile različite populacije i tri meta-analize koje su ispitivale udruženost SNP rs1800896, rs1800871 i rs1800872 u promotoru *IL10* gena sa IBC, donele su oprečne zaključke [154-158]. Stoga je uloga ova tri SNP u *IL10* genu u patogenezi IBC još uvek nedovoljno jasna. Sa druge strane, poveznost rs3024505 sa IBC je prilično jasno pokazana. Ovaj polimorfizam je prvi put identifikovan u GWA studiji, kada je pokazana njegova udruženost sa UK, ali i sa KB, mada u manjoj meri [157]. Potom su usledile studije koje su potvrdile udruženost ovog polimorfizma sa KB [158], UK [160], ili obe forme IBC [159], potvrđujući značaj rs3024505 kao potencijalnog biomarkera u patogenezi IBC.

U našoj studiji, određivali smo alele i genotipove tri SNP u *IL10* genu (G-1082A ili rs1800896, C-819T ili rs1800871 i rs3024505) kod pacijenata sa KB, UK i IBC i poredili njihovu učestalost u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika iz Srbije. U ovom istraživanju, nismo analizirali polimorfizam C-592A ili rs1800872, obzirom da je pokazano da su polimorfizmi C-819T i C-592A u jakoj genetskoj povezanosti (LD, vezanoj neravnoteži) prilikom nasleđivanja i da se nasleđuju u paru u skoro 100% slučajeva u većini dosadašnjih studija [151]. Stoga su zaključci vezano za polimorfizam C-592A doneti na osnovu

rezultata za polimorfizam C-819T. Polimorfizam rs3024505 koji se nalazi u blizini 3' kraja *IL10* gena je bio statistički značajno povezan sa KB, pri čemu je T alel identifikovan kao potencijalni faktor rizika za KB. Takođe, haplotip koji je sadržao T alel ovog polimorfizma, GCCT, je takođe bio češće prisutan kod pacijenata sa KB u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Nasuprot navedenom, polimorfizmi u promotorskom regionu *IL10* gena (G-1082A i C-819T) nisu bili udruženi sa KB, UK i sa grupom koja je uključila sve pacijente sa IBC.

IL-10 se smatra ključnim akterom u regulaciji imunološkog odgovora, obzirom na njegovu veoma važnu imunosupresivnu i antiinflamatornu ulogu koja je pokazana u brojnim dosadašnjim istraživanjima [255]. Poznato je da poremećaji u ekspresiji i funkciji IL-10, imaju važnu ulogu u autoimunskim bolestima i hroničnim inflamatornim bolestima kao što je IBC [148, 255]. Moguće je da u osnovi postoji poremećaj u kapacitetu za proizvodnju IL-10, zbog funkcionalnih polimorfizama u promotorskom regionu *IL10* gena, kao što su G-1082A, C-819T i C-592A zbog čega dolazi do razvoja IBC ili određenih fenotipskih karakteristika bolesti kod pojedinaca sa specifičnom kombinacijom alela. Tako je pokazano da je ATA haplotip udružen sa nižom proizvodnjom IL-10 *in vitro* i kod zdravih ispitanika [151, 256] i kod pacijenata sa IBC [153], odnosno *in vivo*, kod kenijske dece koja su zaražena parazitom *Plasmodium falciparum* [152]. ATA haplotip je povezan i sa povećanim bazalnim serumskim nivoom IL-10 kod zdravih osoba, ali ne i kod pacijenata sa KB [158]. Pokazano je da G alel polimorfizma G-1082A ima ključnu ulogu u regulaciji visokog nivoa konstitutivne *IL10* iRNK kod zdravih osoba [257]. Druge studije su pokazale da A alel polimorfizma C-592A može da dovede do formiranja mesta za vezivanje ETS familije transkripcionih faktora (koji su odsutni kod nosioca -592C alela), što dovodi do poremećaja transkripcije i proizvodnje IL-10 [258]. Dosadašnja istraživanja o značaju navedenih polimorfizama u patogenezi IBC, koja su uključila pacijente sa IBC su pokazala oprečne rezultate. Prva studija koja je obuhvatila malu kohortu pacijenata sa IBC iz V. Britanije je utvrdila da je G-1082A udružen sa UK [153]. U studijama koje su usledile, polimorfizmi *IL10* gena su sporadično bili udruženi sa IBC. Polimorfizam G-1082A je bio češće prisutan kod UK i/ili KB u studijama iz Španije, Australije, Novog Zelanda, Italije i Meksika, pri čemu su rezultati bili nekonzistentni, pokazujući udruženost sa G ili A alelom ili različitim genotipovima [158, 202, 203, 205, 259, 260]. Polimorfizam C-592A je češće bio udružen sa KB u studiji koja je uključila pedijatrijske pacijente iz Kanade [207]. Međutim, brojna istraživanja nisu pokazala udruženost polimorfizama IL10 i IBC [159, 160, 197-199, 201, 204, 206, 239, 247, 256, 261, 262]. Tri meta analize koje su

do sada ispitivale navedena tri SNP kod pacijenata sa IBC, su pokazale oprečne rezultate, odnosno svaka je ukazala na postojanje udruženosti sa različitim polimorfizmima kod KB, UK ili IBC [154-156]. U GWA studijama nije pokazana povezanost navedenih SNP *IL10* gena sa UK i KB [90, 154-157]. Naši rezultati, u kojima takođe nije utvrđena povezanost polimorfizama G-1082A i C-819T sa IBC, su u skladu sa prethodnim istraživanjima. Na osnovu dobijenih rezultata za C-819T, indirektno smo zaključili da ne postoji ni udruženost polimorfizma C-592A sa KB, UK i IBC u ovom istraživanju. Nema jasnih objašnjenja za ovakve diskrepance u rezultatima dosadašnjih istraživanja, ali moguće je da su navedene razlike posledica etničkog diverziteta. Ovo se može potvrditi i činjenicom, da su se frekvence alela polimorfizama G-1082A i C-819T značajno razlikovale (naročito za prvi) u našoj seriji zdravih ispitanika u odnosu na zdrave ispitanike u drugim geografskim područjima zapadne Evrope, što sugeriše određene genske specifičnosti naše populacije u odnosu na ispitivane polimorfizme. Takođe, razlike se mogu delom objasniti razlikama u dizajnu studija, selekciji pacijenata i kontrolne populacije, kao i malim grupama ispitanika. Stoga je moguće da zbog malog broja ispitanika, nisu detektovane potencijalne udruženosti u našoj populaciji.

Nasuprot navedenim polimorfizmima koji nisu pokazali povezanost sa IBC u našem istraživanju, polimorfizam rs3024505 je bio udružen sa KB i sa IBC, i kada su posmatrani aleli i kada smo analizirali nosioce alela i genotipove. Alel T, nosilac alela T i genotip CT su bili češće prisutni kod obolelih od KB, i kod svih pacijenata sa IBC. Sličan trend je pokazan i kod genotipa TT, ali ova povezanost nije bila statistički značajna. Kada su posmatrani haplotipovi četiri lokusa (-1082, -819, -592 i rs3024505), pokazano je da je haplotip koji je sadržao T alel (GCCT) češće bio prisutan kod pacijenata sa KB, dok haplotip GCCC nije pokazao značajnu povezanost u našoj studiji. U multicentričnoj GWA studiji koja je obuhvatila 5 evropskih zemalja, Nemačku, V. Britaniju, Belgiju, Holandiju i Grčku, polimorfizam rs3024505 je bio povezan sa UK [157], dok je ista studija utvrdila i povezanost rs3024505 sa KB u Nemačkoj populaciji. Potom su objavljene GWA studije koje su jasno pokazale udruženost rs3024505 i sa KB i sa UK, i povezanost sa fenotipskim karakteristikama kao što je rani nastanak bolesti i kod KB i kod UK [263-265]. Usledile su studije replikacije koje su utvrdile povezanost T alela i TT (i/ili CT) genotipa polimorfizma rs3024505 sa KB i/ili UK u populacijama Danske, Holandije, Novog Zelanda, Australije i severne Indije [159, 160, 247, 266, 267]. Dve studije nisu utvrdile povezanost polimorfizma rs3024505 sa KB u populaciji Danske i pedijatrijskoj populaciji Kanade [207, 247]. Jedina do sada objavljena meta analiza koja je obuhvatila i polimorfizam

rs3024505, uključila je dve publikacije sa ukupno 1652 pacijenta sa UK iz zapadne Evrope i Australije, i pokazala je udruženost rs3024505 sa UK [160]. Na osnovu navedenog, dosadašnji rezultati nedvosmisleno potvrđuju da je rs3024505 potencijalni kandidat podložnosti kod pacijenata sa IBC u zemljama zapadne Evrope, severne Amerike, Australije i pojedinim zemljama azijskog kontinenta, dok ovakve studije nisu do sada rađene u istočnoj Evropi i u našoj zemlji. Stoga, rezultati ovog istraživanja, po prvi put ukazuju na značaj polimorfizma rs3024505 kod pacijenata sa KB u Srbiji. Naši rezultati ukazuju na veliku razliku u učestalosti minornog alela (*engl.* minor allele frequency, MAF) kod KB (22,4%) u odnosu na 13,7% kod zdravih ispitanika, sa neobično visokim vrednostima odnosa šansi za ovakve vrste istraživanja (OR=1,82; 95%CI [1,21–2,73]). U našoj studiji nismo uočili povezanost rs3024505 polimorfizma sa UK, ali T alel i nosioci T alela su takođe bili češće prisutni kod pacijenata sa UK u odnosu na zdrave ispitanike, pri čemu je razlika bila blizu statističke značajnosti ( $p=0,13$  i  $p=0,12$ ). Moguće je da ta udruženost postoji, ali da je, zbog malog uzorka i niske statističke snage studije, nismo dokazali kod pacijenata sa UK.

Biološki značaj polimorfizma rs3024505 kod pacijenata sa IBC ostaje nedovoljno poznat. Polimorfizam rs3024505 je lokalizovan u blizini 3' kraja *IL10* gena, 2077 nukleotida nishodno od TAG sekvence koja odgovara stop kodonu u iRNK. Nije u potpunosti jasno da li ova pozicija ukazuje na direktnu ulogu ovog polimorfizma u regulaciji produkcije IL-10, ali je poznato da je ekspresija *IL10* gena regulisana na posttranskripcionom nivou. U blizini polimorfizma rs3024505, lokalizovana je sekvenca DNK za koju se vezuje AP-1, transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju gena pod uticajem različitih stimulusa kao što su citokini, faktori rasta i infekcije [157, 160, 268]. Nedavno su u blizini polimorfizma rs3204505 identifikovana još dva mesta za vezivanje transkripcionih faktora, i to jedan za Sp1 (Specifični protein-1) a drugi za USF (Ushodni stimulatívni faktor) [160]. Moguće je da navedeni region sadrži regulatorne sekvence koji utiču na ekspresiju *IL10* gena. Dosadašnje studije nisu pokazale uticaj polimorfizma rs3024505 na serumski nivo IL-10 kod zdravih osoba i kod pacijenata sa IBC [158]. Moguće je da T varijanta rs3024505 može da ima uticaj na ekspresiju *IL10*, odnosno da smanji njegovu produkciju i antiinflamatornu aktivnost, što može da doprinese razvoju IBC. Alternativno, polimorfizam rs3024505 možda predstavlja marker koji je povezan i nasleđuje se zajedno sa nekim drugim, za sada nepoznatim uzročnim faktorom ili faktorima. Stoga su potrebna dalja sekvenciranja i funkcionalni eksperimenti kako bi se rasvetlila uloga ovog regiona i njegov uticaj na produkciju IL-10 kod pacijenata sa IBC.

U našoj studiji smo takođe ispitivali udruženost polimorfizama G-1082A (rs1800896), C-819T (rs1800871) i rs3024505 IL10 gena i kliničkih karakteristika pacijenata sa KB i UK. Ispitivane su sledeće fenotipske karakteristike pacijenata: pol, aktivnost bolesti, godine kad je postavljena dijagnoza, prethodne hirurške intervencije zbog osnovne bolesti, ekstenzivnost bolesti, lokalizacija bolesti, tip KB, terapija, pušenje, prisustvo EIM, postojanje anemije, pothranjenost i porodično opterećenje za IBC. Utvrdili smo češće postojanje anemije kod pacijenata sa polimorfizmima G-1082A (rs1800896) i rs3024505 IL10 gena u KB. Takođe, postojala je i udruženost polimorfizma rs3024505 i stenozantnog/penetrantnog tipa bolesti kod pacijenata sa KB. U dosadašnjim istraživanjima nije pokazana povezanost polimorfizama *IL10* gena sa nastankom anemije kod pacijenata sa IBC. Takođe, do sada nije ispitivana uloga citokina IL-10 u nastanku anemije kod pacijenata sa IBC, ali je registrovano da tokom terapijske primene IL-10 kod pacijenata sa KB može da dođe do pojave anemije [269]. Izgleda da postoji uticaj ovog citokina na nastanak anemije, ali patogenetski mehanizam u dosadašnjim istraživanjima nije razmatran. U našem istraživanju, može se pretpostaviti da C alel polimorfizma rs3024505 povećava ekspresiju *IL10* gena, što dovodi do povećane produkcije citokina IL-10 koja utiče na pojavu anemije kod pacijenata sa KB. Takođe, pokazano je da je C alel polimorfizma rs3024505 povezan sa agresivnijim fenotipom KB, što je iznenađujuće, obzirom da navedeni polimorfizam nije bio udružen sa KB u našem istraživanju, kao i u drugim studijama [159]. Međutim, u studiji sa Novog Zelanda, T alel ovog polimorfizma (a ne C alel) je bio češće prisutan kod pacijenata sa stenozantnom formom KB [158]. Ovakve razlike između dve studije se mogu delom objasniti i etničkim specifičnostima između populacija, kao i razlikama u karakteristikama kohorti u navedenim studijama. U našem istraživanju, češće su bili zastupljeni ispitanici sa težim formama bolesti i komplikacijama. Tako je u našem istraživanju 53,3% pacijenata imalo stenozantnu formu KB, dok je u studiji sa Novog Zelanda stenozantnu formu bolesti imalo 30,4% pacijenata. Poznato je da IL-10 ima brojne funkcije u ljudskom organizmu, i da pored dobro poznate antiinflamatorne uloge, može da ima i proinflamatornu funkciju u imunskom sistemu [270]. Pokazano je da IL-10, kada se primenjuje kao terapija pacijentima sa KB, stimuliše proizvodnju proinflamatornih medijatora, kao što je IFN- $\gamma$  [271]. Jedno od mogućih objašnjenja povezanosti anemije i polimorfizma rs3024505 koju smo uočili u našem istraživanju jeste dobro poznati poremećaj metabolizma gvožđa u hroničnoj inflamaciji, što dovodi do hiperferitinemije i smanjene raspoloživosti gvožđa za potrebe eritropoeze u kostnoj srži [269]. Može se pretpostaviti da je ova imunostimulatorna uloga IL-10

odgovorna za udruženost i sa težim formama bolesti i sa prisustvom anemije. Obzirom na mogućnost postojanja i lažno pozitivnih rezultata u našoj studiji (multipla testiranja nisu rađena u ovom istraživanju), potrebne su replikacione studije na etnički sličnim kohortama kako bi se pojasnile povezanosti na koje ukazuju rezultati ovog ispitivanja.

U zaključku, ovo je prva studija koja se bavila analizom značaja polimorfizama *IL10* gena kod pacijenata sa IBC u Srbiji, a za rs3024505 je ovo ujedno i prva studija u istočnoj Evropi. Polimorfizam rs3024505 *IL10* gena je bio udružen sa rizikom za nastanak KB u srpskoj populaciji. Takođe je uočena udruženost ovog polimorfizma sa postojanjem anemije i stenozantne/penetrantne forme KB kod naših ispitanika. Nasuprot navedenom, ni jedan od polimorfizama u promotorskom regionu *IL10* gena nije bio udružen sa KB ili UK. Naši rezultati ukazuju na važnu ulogu polimorfizma rs3024505 u KB, i mogu biti korisni za buduće meta analize koje će se baviti istraživanjem uloge IL-10 i drugih potencijalnih biomarkera u patogenezi IBC.

#### **5.4 ZNAČAJ POLIMORFIZMA rs6887695 *IL12B* GENA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA**

*IL12B* gen je lokalizovan na hromozomu 5q31 i kodira 40 kDa teški lanac, p40 (ili IL12p40), koji sačinjava zajedničku subjedinicu za dva citokina IL-12 i IL-23. Ovi citokini imaju veoma važnu ulogu u povezivanju urođenog i stečenog imunskog odgovora u IBC [212]. Subjedinica p40 se povezuje sa p35 subjedinicom (IL12p35) u heterodimer i formira IL-12, odnosno sa p19 subjedinicom (IL23p19) i tako formira IL-23. Proinflamatorna funkcija citokina IL-12 i IL-23 je dobro dokumentovana [272]. Ove citokine proizvode aktivirane dendritske ćelije i makrofagi u odgovoru na mikrobne stimulse. IL-12 podstiče diferencijaciju naivnih CD4<sup>+</sup> T-ćelija u zrele efektorske Th1 ćelije koje proizvode IFN- $\gamma$ , a takođe stimuliše i NK ćelije i CD8<sup>+</sup> T-ćelije [273]. Sa druge strane, IL-23 je ključan za funkciju Th17 ćelija, a deluje i na memorijske T-ćelije. Th17 ćelije proizvode citokine, kao što su IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 i IL-26, kao i hemokin CCL20 i smatra se da ovi citokini imaju poseban značaj u intestinalnoj inflamaciji u KB [274, 275]. Th1 i Th17 mogu da proizvode i druge proinflamatorne citokine, kao što je TNF [272]. Uloga IL-12 i IL-23 u patogenezi hronične inflamacije u KB prvo je pokazana na eksperimentalnom nivou na miševima [276, 277]. Potom su usledile kliničke studije istraživanja efikasnosti humanog monoklonskog antitela specifičnog za IL12/23 p40 subjedinicu (Ustekinumab), koje se pokazao korisnim kod pacijenata sa umereno do teško aktivnom KB [121].

Nedavne pojedinačne studije, kao i meta analize i GWA studije su ukazale na postojanje određenih polimorfizama gena *IL12B* koji su udruženi sa KB kod evropskih populacija bele rase iz Nemačke, Danske, ali i udaljenih kontinenata kao što su populacije Novog Zelanda i Kine [162-167]. Istraživanja iz istočne Evrope, Srbije i regiona do danas nisu rađene. Stoga smo ispitivali genetske varijante *IL12B* i njegov značaj u nastanku KB i UK u populaciji Srbije, kao i udruženost genotipa sa određenim fenotipskim karakteristikama bolesti. U tom cilju, u grupi pacijenata sa KB, UK i IBC određivane su učestalosti alela i genotipova polimorfizma rs6887695 (G/C) *IL12B* i upoređivane su sa grupom zdravih ispitanika. Ispitivanjem ovog polimorfizma *IL12B* gena, utvrdili smo statistički značajnu razliku u učestalosti CC genotipa kod pacijenata sa KB i IBC, u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika, pri čemu je CC genotip češće bio zastupljen u grupi obolelih od KB i IBC u odnosu na zdrave kontrole. Ovi rezultati sugerišu moguću ulogu CC genotipa (C alela) u nastanku bolesti. U skladu sa navedenim, nosioci G alela su značajno ređe bili zastupljeni kod pacijenata sa KB i kod svih pacijenata sa IBC, sugerišući protektivnu ulogu G alela u razvoju IBC. Naši rezultati potvrđuju rezultate studije iz Nemačke, koja je na 913 pacijenata sa KB i 318 pacijenata sa UK, takođe utvrdila udruženost *IL12B* SNP rs6887695 sa IBC [162]. U ovoj studiji, postojao je trend povezanosti rs6887695 i sa KB ( $p=0,066$ ) i u manjoj meri sa UK ( $p=0,092$ ), ali nije dobijena statistička značajnost. U nedavnom istraživanju koje je sprovedeno u Danskoj, ispitivano je 17 SNP kod 624 pacijenata sa KB i 411 UK pacijenata. Ova studija je potvrdila povezanost SNP rs6887695 sa KB, i to kombinacije homo i heterozigota GC i CC [165]. Rezultati naše studije su takođe u skladu i sa japanskom studijom u kojoj su Yamazaki i saradnici u seriji od 484 bolesnika sa KB (studija nije uključila pacijente sa UK), utvrdili povezanost rs6887695 sa KB [278]. Studije koje su ispitivale kohorte Aškenazi jevreja i ispitanika iz Švedske sa IBC, nisu utvrdile postojanje udruženosti polimorfizama *IL12B* sa KB [279, 280]. Marquez i saradnici su u velikoj kohorti od 344 KB i 363 UK, utvrdili povezanost CC genotipa SNP rs6887695 sa UK u španskoj populaciji [208]. Obzirom da smo u našem istraživanju, utvrdili povezanost CC genotipa sa KB ali i CC genotipa sa svim pacijentima sa IBC, moguće je da u našoj populaciji postoji udruženost i sa UK, ali zbog male serije ispitanika ova razlika nije dostigla statističku značajnost ( $p=0,28$ ; OR=1,60 [95%CI 0,67-3,78]). Međutim, u studiji koja je obuhvatila 339 pacijenta sa KB sa Novog Zelanda (nisu uključeni pacijenti sa UK) nije utvrđeno postojanje korelacije rs6887695 *IL12B* sa KB [163]. Song i saradnici su u Kineskoj populaciji određivali polimorfizme *IL12B*, ali i analizirali ekspresiju iRNK i serumsku koncentraciju IL-12 i pronašli su povišene serumske nivoe IL-12B kod



pacijenata sa UK, kao i povišen nivo IL12p40 u lokalnom tkivu pacijenata sa UK u odnosu na zdrave ispitanike, ali ti nivoi nisu korelisali sa genotipom rs6887695 *IL12B* gena [164]. Druga studija takođe iz Kine, je pokazala povezanost SNP rs6887695 *IL12B* i kod pacijenata sa KB i kod UK, pri čemu je izraženija povezanost utvrđena kod bolesnika sa KB, što je u skladu sa našim rezultatima [209]. Takođe je i ova studija ispitivala ekspresiju iRNK za *IL12B*, i ona je bila veća kod pacijenata sa KB u odnosu sa UK ( $p < 0,001$ ) i u odnosu na zdrave ispitanike ( $p < 0,001$ ). Zamimljivo je da je u navedenoj studiji određivana i serumska koncentracija IL12p40 ELISA testom, i da je bila značajno viša kod pacijenata sa KB u odnosu na UK i zdrave ispitanike, sa visokom statističkom značajnošću od  $p < 0,001$ . U ovoj studiji, u suprotnosti sa prethodnom studijom gde nije uočena korelacija genotipa rs6887695 *IL12B* gena sa produkcijom IL12p40 u UK [164], serumski nivoi IL12p40 proteina su korelisali sa genotipom rs6887695 kod pacijenata sa KB [209]. Polimorfizam rs6887695 se nalazi u blizini *IL12B* gena i za sada nije poznato da li ima funkcionalni potencijal, odnosno da li utiče na ekspresiju i produkciju IL12p40 proteina, a samim tim i na produkciju IL-12 i IL-23. Ipak, prethodno navedeni podaci o korelaciji genotipa ovog polimorfizma sa serumskim nivoima IL12p40 sugerišu da bi rs6887695 mogao da utiče na varijacije u nivoima ovih citokina i posledično na razvoj i fenotipske karakteristike IBC. Obzirom na oskudne i oprečne podatke, neophodno je da buduće studije to i potvrde.

U našem istraživanju ispitivali smo i udruženost polimorfizma rs6887695 *IL12B* gena (alela i genotipova) sa sledećim fenotipskim karakteristikama bolesti kod pacijenata sa KB, UK i IBC: pol, aktivnost bolesti, godine kad je postavljena dijagnoza, prethodne hirurške intervencije zbog osnovne bolesti, ekstenzivnost bolesti, lokalizacija bolesti, tip KB, postojanje anemije, terapija, pušenje, pothranjenost i porodično opterećenje za IBC. Postojanje perianalne fistule kod KB je bilo statistički značajno ređe kod pacijenata sa CC genotipom polimorfizma rs6887695 *IL12B*, dok su nosioci G alela češće imali fistuloznu formu bolesti. U studiji sa Novog Zelanda, osobe sa KB terminalnog ileuma su značajno ređe bili nosioci C alela rs6887695 *IL12B* [163]. Takođe, kod ove grupe ispitanika sa KB ređe je bila zastupljena stenozantna forma bolesti. Suprotno navedenim rezultatima, u studiji iz Japana, kohorta pacijenata sa KB koja je imala izolovanu bolest terminalnog ileuma ( $n=70$ ) bila je češće udružena sa C alelom i sa CC i CG genotipom polimorfizma rs6887695 [278]. Pojedine studije nisu utvrdile povezanost između ispitivanih genotipova rs6887695 *IL12B* i fenotipskih karakteristika (pol, lokalizacija i tip bolesti) kod pacijenata sa KB i UK [208]. Ovakve razlike u povezanosti genotipskih i fenotipskih karakteristika

koje su dobijene u različitim istraživanjima, mogu se delom objasniti etničkim specifičnostima različitih populacija, kao i razlikama u karakteristikama kohorti pacijenata. U našem istraživanju svi pacijenti potiču iz tercijarne ustanove, i češće su bili zastupljeni ispitanici sa težim formama bolesti i komplikacijama. U studiji Songa i saradnika ispitivana je koncentracija IL12p40 u serumu i nije utvrđena povezanost nivoa IL12p40 u odnosu na kliničke i epidemiološke karakteristike bolesti, kao što su pol, godine starosti, pušenje i porodično opterećenje za IBC [164]. U našem istraživanju, druge ispitivane fenotipske karakteristike pacijenata sa KB nisu bile udružene sa ispitivanim polimorfizmom rs6887695 *IL12B* gena. Ispitivane fenotipske karakteristike pacijenata sa UK nisu bile povezane sa polimorfizmom rs6887695 *IL12B* gena. Kada su pacijenti sa IBC posmatrani u celini, pacijenti sa genotipom CC rs6887695 *IL12B* gena su imali značajno ređe EIM bolesti. U dosadašnjim dostupnim studijama koje su korelisale genotip i fenotip, nije utvrđena udruženost EIM sa polimorfizmom rs6887695 *IL12B*. Međutim, poznata je povezanost serumskog nivoa IL12p40 (i IL-23) sa nastankom autoimunskog artritisa i drugih koštanih EIM koje se mogu javiti i u IBC [281].

U zaključku, ovo je prva studija koja se bavila analizom značaja polimorfizama *IL12B* gena kod pacijenata sa IBC u istočnoj Evropi i u Srbiji. Polimorfizam rs6887695 *IL12B* gena je bio udružen sa rizikom za nastanak KB i IBC u srpskoj populaciji. Dobijeni rezultati, iako na maloj seriji ispitanika, su u skladu sa rezultatima brojnih studija iz zapadne Evrope i pojedinih populacija drugih kontinenata. Takođe je uočena udruženost ovog polimorfizma *IL12B* gena sa postojanjem perianalne fistule kod KB i sa prisustvom EIM kod svih pacijenata sa IBC. Nasuprot navedenom, polimorfizmi rs6887695 *IL12B* gena nisu bili udruženi sa UK i fenotipskim karakteristikama UK. Naši rezultati ukazuju na važnu ulogu polimorfizma rs6887695 u KB, i mogu biti korisni za buduće meta analize koje će se baviti pronalaženjem potencijalnih biomarkera u IBC i istraživanjem uloge IL-12B u patogenezi te bolesti.

## **5.5 ZNAČAJ POLIMORFIZMA rs11209026 *IL23R* GENA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA**

IL-23 je citokin koje proizvode ćelije urođene imunosti (prevažodno dendritske ćelije i makrofagi) i ima važnu ulogu u regulisanju stečenog imunskog odgovora [282]. IL-23 je ključan za proliferaciju, preživljavanje i funkciju Th17 ćelija koje proizvode IL-17 i dovode do inflamacije, pri čemu se između IL-23 i Th17 citokina ostvaruje koordinisana i

precizno balansirana ravnoteža [283]. Th17 ćelija su važne u odbrani domaćina od infekcija, naročito onih na površini sluzokoža izazvanih ekstracelularnim bakterijama i gljivicama [284]. Smatra se da IL-23 ima presudnu ulogu i u razvoju hronične inflamacije u inflamatornim i/ili autoimunskim bolestima kao što su ankilozirajući spondilitis, reumatoidni artritis, psorijaza, autoimunski tiroiditis i astma [167, 283, 285, 286]. Dosadašnja saznanja ukazuju da je uloga IL-23 važnija od uloge IL-12 u pokretanju i održavanju hronične inflamacije [282]. Sve je više podataka koji ukazuju i na važnu ulogu IL-23 u patogenezi IBC [287]. Predkliničke studije su pokazale da blokiranjem p40 subjedinice IL-12 i IL-23 mogu da se spreče simptomi na eksperimentalnim modelima kolitisa indukovano hemijskim putem [163, 288]. U kliničkim studijama je takođe pokazan značaj humanog monoklonskog antitela specifičnog za IL12/23p40 subjedinicu (Ustekinumab) kod pacijenata sa umereno do teško aktivnom KB [121].

Brojna genetska istraživanja koja su sprovedena do danas, doprinela su razjašnjavanju veoma važne uloge osovine IL-23/Th17 u autoimunskim bolestima i u IBC [277, 289]. Jedna od ključnih istraživanja jeste GWA studija koja je otkrila povezanost varijanti u genu za receptor za IL-23 (*IL23R*) sa nastankom KB [91]. Ovi rezultati su potvrđeni u studiji koja je ispitivala pedijatrijsku populaciju obolelih od KB [290]. Potom je usledila velika studija koja je analizirala 7 različitih bolesti (inflamatorne, autoimunske i hronične nezarazne bolesti) na 17000 pacijenata i 3000 zdravih ispitanika iz V. Britanije, od strane konzorcijuma „Wellcome Trust Case Control Consortium“ (WTCCC), u kojoj je ispitivano 500 000 SNP i pri tom je identifikovano više genskih lokusa koji mogu biti udruženi sa nastankom KB, uključujući i varijante *IL23R* gena. Pored toga, u ovoj studiji, KB je imala najviše detektovanih genskih lokusa u odnosu na druge ispitivane bolesti [291]. *IL23R* gen je lokalizovan na hromozomu 1 (1p31) i kodira subjedinicu receptora za IL-23. Vezivanjem IL-23 za IL-23R kompleks pokreće se prenos signala preko JAK/STAT osovine i dolazi do ekspresije većeg broja gena [292]. Pokazano je da određeni polimorfizmi *IL23R* gena mogu da utiču na vezivanje IL-23 i efekat koji on izaziva u imunskom odgovoru. Među njima se posebno ističe funkcionalni nesinonimni SNP rs11209026 (G1142A), koji je lociran u egzonu 9 *IL23R* gena i koji kodira promenu aminokiseline arginin u glutamin (Arg381Gln, odnosno R381Q) u transmembranskom delu receptora za IL-23. Na osnovu dosadašnjih saznanja, smatra se da ovaj polimorfizam *IL23R* gena ima važnu ulogu u patogenezi IBC. Pokazano je da je frekvencija minornog A alela rs11209026 značajno veća kod zdravih osoba u odnosu na osobe sa IBC, što ukazuje na moguću protektivnu ulogu A alela u nastanku intestinalne inflamacije [91]. Postoje

dokazi da promena amino kiseline usled prisustva A alela utiče na funkciju IL-23R, modifikujući interakciju između IL-23R i JAK2 kinaze zbog oštećenog udruživanja JAK2 sa citoplazmatskim produžetkom receptora i posledično dovodi do smanjenja kapaciteta za aktivaciju STAT proteina [66, 282]. Takođe je moguće i da A alel dovodi do formiranja solubilnog IL-23R koji vezuje IL-23 i sprečava da se veže za ćelije čime smanjuje diferencijaciju i funkcionalni kapacitet Th17 ćelija [168]. U skladu sa tim, nedavne studije su pokazale da A alel rs11209026 u *IL23R* genu dovodi do smanjenja produkcije IL-17 zavisne od IL-23 [286, 293]. Redukovano stvaranje IL-17 od strane Th17 ćelija kod osoba koje imaju protektivnu *IL23R* varijantu (A alel) u odnosu na nosioce „divljeg tipa“ (*engl.* wild type, WT), odnosno G alela u ovom polimorfizmu *IL23R* gena, potvrđuju navedeno [66]. Međutim, pokazano je da koncentracija i aktivnost cirkulišućih Th17 ćelija ne koreliše ni sa nosiocima G alela, niti sa nosiocima protektivnog A alela [282]. Na osnovu navedenog, izgleda da rs11209026 polimorfizam u *IL23R* genu ima važnu ulogu u razvoju inflamacije u IBC, a možda i u drugim autoimunskim bolestima kao što su psorijaza, ankolizirajući spondilitis, astma i reumatoidni artritis, ali su potrebne nove studije da to i potvrde.

I pored brojnih istraživanja o povezanosti rs11209026 *IL23R* gena i IBC u svetu, do sada ovakva istraživanja nisu rađena u Srbiji i u regionu, dok je svega dve studije objavljeno u Istočnoj Evropi. U našoj studiji, određivali smo alele i genotipove rs11209026 polimorfizma u *IL23R* kod pacijenata sa KB, UK i IBC u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika iz Srbije. Polimorfizam rs11209026 je bio statistički značajno udružen i sa KB, i sa UK, i sa svim pacijentima sa IBC, pri čemu su A alel i heterozigotni GA genotip (homozigoti AA nisu ni detektovani među našim ispitanicima) bili češće zastupljeni u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika, sugerišući protektivnu ulogu A alela u nastanku IBC. U našoj seriji ispitanika A alel je bio prisutan kod 5,9% zdravih ispitanika, dok je u grupi pacijenata bio značajno manje zastupljen i to u 0,9% pacijenata sa KB, 1,5% pacijenata sa UK, odnosno u 1,2% svih pacijenata sa IBC. Ovakvi rezultati su u skladu sa dosadašnjim objavljenim rezultatima. U GWA studiji pokazano je da je protektivni alel prisutan u oko 7% zdravih osoba, dok je u KB bio zastupljen između 2 i 3% [91]. Kasnije studije koje su analizirale različite populacije su pokazale učestalost ovog alela između 0 i 25% kod zdravih ispitanika različitih populacija. Naši rezultati o povezanosti rs11209026 sa obe forme IBC, su u skladu sa mnogim drugim studijama koje su pokazale udruženost navedenog polimorfizma sa IBC u populacijama severne Amerike [170], Kanade [211], Novog Zelanda [294], Italije [213], Holandije i Belgije [165, 171]. Takođe je u nekoliko

istraživanja potvrđena protektivna uloga A alela u pedijatrijskim populacijama Severne Amerike [290], Nemačke [214], Škotske [295] i V. Britanije u kojoj su bili uključeni samo pacijenti sa KB [296]. Neke studije su utvrdile povezanost rs11209026 SNP *IL23R* gena sa KB (i IBC), ali ne i sa UK, što je pokazano u populacijama V. Britanije [297], Severne Amerike [298], Nemačke [210], Belgije [299], Španije [208, 300], Čilea (nisu ispitivani pacijenti sa UK) [301], Finske [302], Kanade [303], Novog Zelanda [163] i Portorika [304]. Među njim je i jedna od dve studije iz istočne Evrope, u kojoj su Lakatoš i saradnici pokazali jasnu povezanost protektivnog A alela u nastanku KB i IBC u mađarskoj populaciji [175]. Druga od dve objavljene studije iz istočne Evrope, nije pokazala udruženost navedenog polimorfizma sa KB, UK i IBC u populaciji iz Litvanije [176]. U ovoj studiji je distribucija protektivnog alela bila slična drugim evropskim studijama i identična sa našim rezultatima (5,9%), ali je protektivan alel bio zastupljen kod pacijenata sa KB i UK u većoj meri (KB 3,6% i UK 4,5%) nego u većini navedenih studija koje su imale pozitivne rezultate. Studije iz Izraela, Indije i Japana, kao i jedna studija iz SAD, nisu utvrdile udruženost polimorfizama rs11209026 *IL23R* gena sa KB [172-174, 215]. Interesantno je da su Venegas i saradnici prijavili veoma visoku učestalost protektivnog A alela R381Q u Čileu od 6% kod pacijenata sa KB i čak 25% kod zdravih kontrola, koja je znatno viša u odnosu na rezultate većine evropskih zemalja [212]. I pored toga što se učestalost protektivnog alela razlikovala između pacijenata sa KB i zdravih ispitanika, razlika nije dostigla statističku značajnost. Međutim, kada su navedeni istraživači ispitivali učestalost ove varijante *IL23R* izdvojeno kod pacijenata sa KB evropskog porekla, dobili su slične rezultate kao i u drugim evropskim populacijama, odnosno učestalost A alela je iznosila 1,9% u KB, u odnosu na 7% kod zdravih osoba. Analizom učestalosti varijanti rs11209026 polimorfizma kod Aškenazi jevreja, pokazano je da je A alel zastupljen kod 2% pacijenata sa KB, dok je isti alel imalo 7% zdravih ispitanika [212]. Sa druge strane, A alel nije uopšte identifikovan u Kineskoj populaciji u jednoj studiji koja je ispitivala različite *IL23R* polimorfizme [305].

Nema jasnih objašnjenja za ovakve diskrepance u rezultatima dosadašnjih istraživanja, ali se može zaključiti da su razlike uočene pre svega u većini dalekih populacija azijskog kontinenta iz Japana, Kine, Indije, Izraela i takođe iz Čilea, i u samo jednoj istočnoevropskoj studiji. Naši rezultati su u saglasju sa većinom studija iz zapadne Evrope i severne Amerike i u skladu sa tim, raspodela alela u zdravoj populaciji u našem istraživanju nije se razlikovala u odnosu na geografska područja zapadne Evrope. Moguće je da su uočene razlike posledica etničkog diverziteta dalekih geografskih područja Južne

Amerike i Azije. Ovo se može potvrditi i činjenicom, da su se frekvence alela polimorfizma rs11209026 *IL23R* značajno razlikovale u našoj seriji zdravih ispitanika u odnosu na zdrave ispitanike Čilea, što sugerira određene genske specifičnosti ispitivanih populacija. Uočene razlike se mogu delom objasniti i razlikama u dizajnu studija, selekciji pacijenata i kontrolne populacije, kao i relativno malim grupama ispitanika u mnogim studijama.

Kod pacijenata sa KB, UK i IBC ispitivali smo i udruženost navedenih polimorfizama (alela, genotipova i nosioca alela) sa sledećim fenotipskim karakteristikama bolesti: pol, aktivnost bolesti, godine kad je postavljena dijagnoza, prethodne hirurške intervencije zbog osnovne bolesti, ekstenzivnost bolesti, lokalizacija bolesti, tip KB, terapija, postojanje anemije, pušenje, pothranjenost i porodično opterećenje za IBC. Ni jedan od navedenih fenotipskih karakteristika KB, UK i IBC nije bio udružen sa polimorfizmom rs11209026 *IL23R* gena. Većina dostupnih studija takođe nije pokazala udruženost navedenog polimorfizma sa fenotipskim karakteristikama bolesti [91, 171, 172, 208, 211, 214, 215, 294, 295, 297, 301-303]. Međutim, u manjem broju istraživanja je pokazana genotipsko-fenotipska povezanost. U studiji Lakatoša i saradnika inflamatorna forma KB je češće bila zastupljena kod pacijenata koji su imali heterozigot GA [175]. Studija iz Italije je pokazala nižu zastupljenost protektivnog A alela kod pacijenata koji su rano oboleli od KB. U ovoj studiji je A alel rs11209026 je bio zastupljen u 2,8% slučajeva kod pacijenata mlađih od 16 godina, dok je isti alel imalo čak 6,7% pacijenata koji su prvi atak KB imali posle 40. godine života [213]. Studija Fergusona i saradnika je takođe pokazala da su pacijenti sa protektivnim A alelom imali manji rizik za razvoj stenozične forme KB ileokolonske lokalizacije [163]. Ovakve razlike u nalazima se mogu objasniti različitim etničkim i genetskim specifičnostima određenih populacija, ali i različitim fenotipskim karakteristikama ispitivanih pacijenata.

U zaključku, ovo je prva studija iz Srbije koja se bavila ispitivanjem polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena kod pacijenata sa KB, UK i kod zdravih ispitanika. Naši rezultati su u skladu sa većinom dosadašnjih studija iz Evrope i Severne Amerike, i potvrđuju prethodna saznanja o značaju polimorfizma rs11209026 kao genetske determinante u patogenezi IBC. Naša studija nije utvrdila postojanje korelacije između genotipa i fenotipskih karakteristika pacijenata sa IBC i ovi rezultati su u skladu sa rezultatima većine studija koje su do sada rađene. Iako je moguće, obzirom na relativno malu kohortu pacijenata, da naši rezultati ne reprezentuju genetske i fenotipske determinante cele populacije, saglasnost naših rezultata sa velikom većinom dosadašnjih studija govori u

prilog važne uloge rs11209026 polimorfizma u *IL23R* genu u patogenezi KB i UK i u populaciji Srbije.

## 5.6 ZNAČAJ POLIMORFIZAMA *MDR1* GENA U INFLAMATORNOJ BOLESTI CREVA

*MDR1* gen se nalazi na dugom kraku hromozoma 21, kodira P-glikoprotein (P-gp), koji predstavlja ATP-zavisnu efluksnu pumpu i verovatno ima transportno-protektivnu ulogu u ekskreciji toksina u žuč, crevni lumen i urin, sprečavajući njihovo zadržavanje u organizmu. Smatra se da P-gp ima važnu ulogu i u interakcijama između mikroorganizama i ćelija domaćina i uspostavljanju homeostaze na nivou creva i da njegova neadekvatna funkcija može da poremeti preuzimanje toksina i ksenobiotika i posledično dovede do inflamacije i razvoja IBC [180, 181]. Stoga, polimorfizmi u *MDR1* genu koji mogu da menjaju ekspresiju i funkciju P-gp takođe mogu da imaju poseban značaj u IBC, a među njima se posebno ističu polimorfizmi rs1128503 (C1236T), rs1045642 (C3435T) i trialelski SNP rs2032582 (G2677T/A). U našoj studiji smo utvrdili značajnu povezanost sva tri polimorfizma, kao i povezanost pojedinih haplotipova i diplotipova *MDR1* gena, sa UK u srpskoj populaciji. Suprotno, ni jedan ispitivan polimorfizam nije bio udružen sa KB u našoj kohorti.

Prema dosadašnjim saznanjima, postoje oprečni stavovi o značaju *MDR1* gena u patogenezi IBC u svetu. Prve objavljene studije su ispitivale polimorfizam C3435T *MDR1* gena kod pacijenata sa IBC u više centara u SAD i u Nemačkoj i pokazale su povezanost ovih polimorfizama sa UK [187, 188]. Potom su se brojni autori bavili ispitivanjem udruženosti ovog polimorfizma i IBC, sa kontradiktornim rezultatima [140, 180, 191]. Novije studije iz Nemačke, Škotske, Japana i Irana su potvrdile značaj C3435T polimorfizma u patogenezi UK, dok nisu pokazale povezanost sa KB [222, 306-308]. Studija iz regiona na populaciji Hrvatske, genetski bliska našoj populaciji, utvrdila je postojanje udruženosti T alela i TT genotipa C3435T polimorfizma *MDR1* gena sa nastankom UK, ali ne i sa KB [227]. Međutim, suprotno ovim rezultatima, brojne studije na raznolikim populacijama nisu našle nikakvu povezanost navedenih polimorfizama sa IBC [187, 189, 190, 216, 217, 219, 221, 224-226, 228, 309-317]. Posebno treba naglasiti negativne rezultate slovenačke studije u kojoj nije utvrđeno postojanje udruženosti navedenih polimorfizama i IBC [318]. Kanadska studija je ukazala na povezanost T alela i KB, što nisu utvrdile druge studije [319]. Španska studija je čak ukazala na korelaciju CC

genotipa sa nastankom KB, ali ove rezultate treba tumačiti u svetlu činjenice da distribucija genotipova u ovoj studiji nije bila u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži [223]. I pored ovako velikih razlika u objavljenim rezultatima koji se odnose na C3435T polimorfizam *MDR1* gena, preovlađuju podaci koji ukazuju da bi T alel mogao da bude faktor rizika za nastanak UK. Od postojećih pet meta analiza koje analiziraju navedeni polimorfizam u IBC, četiri meta analize potvrđuju da je T alel C3435T verovatno faktor rizika za nastanak UK, dok nije pokazana veza ovog polimorfizma sa nastankom KB [140, 180, 189, 190]. Suprotno, meta analiza Wanga i saradnika, nije pokazala ovu udruženost sa nastankom UK [191]. U našoj studiji T alel polimorfizma C3435T je bio udružen sa nastankom UK u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika (60,1% u odnosu na 48,6%). TT genotip je bio češće zastupljen u grupi pacijenata sa UK, u odnosu na zdrave ispitanike (33,3% prema 24,7%), ali ova razlika nije dostigla statističku značajnost ( $p=0,101$ ). Međutim nosioci T alela su visoko statistički značajno bili češće prisutni u grupi pacijenata sa UK, nego kod zdravih ispitanika ( $p=0,004$ ). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima većine meta analiza, koje sugerišu ulogu T alela polimorfizma C3435T, kao faktora rizika za nastanak UK, ali ne i KB. U skladu sa navedenim rezultatima, su i naši rezultati koji se odnose na CC genotip, koji je bio značajno češće zastupljen u grupi zdravih ispitanika u odnosu na UK, što može da ukaže na protektivnu ulogu ovog genotipa u patogenezi UK.

Slično objavljenim rezultatima za polimorfizam C3435T, u poslednjih deset godina intenzivno je ispitivana povezanost trialelskog polimorfizma G2677T/A i IBC, sa oprečnim zaključcima [187, 189, 216, 224, 225, 313]. U našoj studiji, T alel i TT genotip polimorfizma G2677T/A *MDR1* gena, su bili udruženi sa UK, dok su G alel i GG genotip bili češće prisutni kod zdravih ispitanika. Ovi rezultati sugerišu moguću ulogu T alela kao faktora rizika za nastanak UK, dok G alel i GG genotip mogu imati protektivnu ulogu za nastanak bolesti. Pretpostavku o patogenetskoj ulozi T alela u nastanku UK dodatno potvrđuje i povezanost nosilaca T alela sa grupom pacijenata sa UK u našoj studiji. Sličnu udruženost nosilaca T alela polimorfizma G2677T/A *MDR1* sa UK je utvrdila i anglosaksonska studija [189]. Poseban značaj imaju studije u regionu u kojima su u hrvatskoj i slovenačkoj populaciji dobijene slične povezanosti T alela polimorfizma G2677T/A *MDR1* gena i UK [227, 318]. U skladu sa navedenim, studija iz severne Indije za čije stanovništvo je pokazano da je srodnije sa kavkaskom rasom u odnosu na populaciju ostalih delova Indije, utvrdila je povezanost T alela i TT genotipa sa UK, kao i nižu učestalost G alela kod pacijenata sa UK [219]. Suprotno, u studiji sa Novog Zelanda, pokazano je da je GT genotip povezan sa manjim rizikom za nastanak UK u odnosu na GG



genotip [217]. U skladu sa navedenim, američka multicentrična studija je ukazala na udruženost G alela sa IBC, potvrđujući moguću ulogu ovog alela kao faktora rizika za nastanak IBC [187]. Sa druge strane, Yang i saradnici su dobili da je isti genotip protektivan faktor za nastanak KB [317]. Ostale studije nisu pokazale udruženost polimorfizma G2677T/A sa UK, KB i IBC [221-226, 308, 313, 314]. Takođe, dve meta analize nisu pokazale udruženost ovog *MDR1* polimorfizma sa nastankom IBC [140, 180].

Polimorfizam C1236T *MDR1* gena nije do sada puno ispitivan u IBC, za razliku od prethodno analiziranih polimorfizama C3435T i G2677T/A *MDR1* gena. Međutim, u našoj studiji dobili smo značajnu povezanost ovog polimorfizma sa UK. T alel i TT genotip su bili značajno češće prisutni kod pacijenata sa UK, dok su C alel i CC genotip bili značajno češći kod zdravih ispitanika, ukazujući na moguću ulogu T alela kao faktora rizika za nastanak UK, odnosno protektivnu ulogu C alela u nastanku ove bolesti. Takođe, analizom nosilaca C i T alela, još jednom su potvrđene ove pretpostavke, obzirom da su dobijene visoko značajne povezanosti nosilaca T alela sa UK, odnosno nosilaca C alela sa zdravim ispitanicima. Takođe, u studiji u severnoj Indiji dobijeni su slični rezultati. Alel T polimorfizma C1236T je bio češće prisutan u grupi pacijenata sa UK [219]. Slično, u marokanskoj populaciji je TT genotip bio udružen sa nastankom UK [190]. Međutim istraživanje koje je obuhvatilo manji broj ispitanika u Kini, utvrdilo je češću udruženost C alela i CC genotipa sa nastankom UK [316]. U studiji Huebnera i saradnika, koja je analizirala ispitanike sa Novog Zelanda, nosioci heterozigota za C1236T su imali manji rizik za nastanak UK u odnosu na CC genotip [217, 316]. U pojedinim studijama polimorfizam C1236T je bio udružen sa KB i to sa ranim nastankom bolesti i stenozantnom i penetrantnom formom bolesti [217, 218]. Nekoliko istraživanja nije utvrdilo povezanost C1236T ni sa UK ni sa KB [216, 308, 311, 317]. U našem regionu, studija koja je analizirala slovenačku populaciju, nije pokazala povezanost između ovog polimorfizma i IBC [318]. Prema našim saznanjima, do sada su objavljene dve meta analize koje takođe nisu utvrdile udruženost ovog polimorfizma sa IBC [140, 190].

Bolesti kao što su IBC, u kojima postoje veoma složeni etiološki patogenetski mehanizmi, genetska ispitivanja koja obuhvataju analize haplotipova mogu biti od velikog značaja, obzirom da se u ovakvim genetskim studijama analiziraju kombinovani međusobni uticaji svih potencijalnih polimorfizama, kao i međusobni uticaji i regionalne varijacije koje mogu doprineti zajedničkom efektu na nastanak bolesti. Stoga smo u našoj studiji ispitivali značaj trolokusnih haplotipova svih ispitivanih polimorfizama (1236, 2677, 3435) za nastanak IBC u našoj kohorti. Naši rezultati su ukazali da je haplotip (TTT)

potencijalno faktor rizika za nastanak UK, odnosno da je haplotip (CGC) protektivni u nastanku UK. Alel T se pokazao kao predisponirajući faktor za nastanak UK za svaki od tri ispitivana polimorfizma pojedinačno, a sva tri T alela udružena unutar istog haplotipa bili su visoko značajno povezani sa nastankom UK. U skladu sa navedenim, mogući protektivni aleli u nastanku UK za sva tri polimorfizma (C1236, G2677 and C3435), kada su bili prisutni u obliku haplotipa (CGC) bili su takođe značajno češće prisutni kod zdravih osoba. Potvrda navedene pretpostavke u našoj studiji je i analiza diplotipova. CGC/CGC diplotip je u našem istraživanju bio značajno češće prisutan kod zdravih ispitanika, dok je diplotip TTC/TTT bio značajno češće prisutan kod pacijenata sa UK. Takođe je i diplotip TTT/TTT bio češće prisutan u grupi ispitanika sa UK, ali ova razlika nije dostigla statističku značajnost u ovom istraživanju. Prema literaturnim podacima, veoma je ograničen broj studija koje su ispitivale značaj trilokusnog haplotipa (1236, 2677, 3435) u nastanku IBC. Prva objavljena studija koja se bavila ovakvim istraživanjem je rađena u Sloveniji, i pokazala je veću učestalost TTT haplotipa u grupi pacijenata sa UK u odnosu na zdrave kontrole, KB i IBC [318]. Potom su slični rezultati objavljeni u studiji iz Japana, u kojoj je TTT haplotip bio češće zastupljen kod pacijenata sa UK u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika, mada ova razlika nije dostigla statističku značajnost [308]. U studiji u Indiji, TTT haplotip ali i TGT haplotip su bili češće zastupljeni kod pacijenata sa UK [219]. Pojedine studije su ispitivale dvolokusne haplotipove, 1236T/2677T, G2677/3435T i 2677T/3435T, i pokazale su da su navedeni TT haplotipovi za sva tri polimorfizma češće bili prisutni kod pacijenata sa UK [219, 222, 225]. Slične rezultate su objavili i u regionu Brinar i saradnici, u istraživanju koje je obuhvatilo populaciju iz Hrvatske [227]. Međutim, pojedine studije nisu utvrdile postojanje udruženosti navedenih haplotipova i UK [217, 218, 317]. Nedavno objavljeno istraživanje u Kini, pokazalo je udruženost CTC haplotipa kao faktora rizika za nastanak KB, dok je TTT haplotip bio značajno češće prisutan u grupi zdravih ispitanika, ukazujući na moguću protektivnu ulogu ovog haplotipa u nastanku KB [317].

Analizirajući dosadašnje rezultate koji se odnose na ulogu C1236T, G2677T/A i C3435T polimorfizama u patogenezi IBC, uočavaju se jasne razlike u zastupljenosti pojedinih polimorfizama kod pacijenata sa IBC u različitim geografskim područjima. Ove razlike se najverovatnije mogu objasniti etničkim specifičnostima različitih populacija. Drugi razlozi kojima se mogu objasniti postojeće razlike u zastupljenosti pojedinih polimorfizama, ili oprečni rezultati između pojedinih istraživanja, jeste činjenica da je većina objavljenih studija do sada obuhvatila relativno mali broj pacijenata. Takođe su

prisutne razlike i u dizajnu studija kao i selekciji kontrolne grupe ispitanika. Značaj kontrolne grupe je jasno pokazan u nemačkoj studiji u kojoj su rezultati u velikoj mjeri zavisili od karakteristika kontrolne grupe ispitanika koja je definisana od strane istraživača [307]. Takođe učestalost minornih alela polimorfizama *MDRI* gena mogu značajno da se razlikuju u različitim populacijama [180, 220, 227]. Obzirom da su razlike u polimorfizmima *MDRI* gena između pacijenata i zdravih kontrola u nekim studijama velike, moguće je da je kontrolna grupa zdravih ispitanika i postojanje razlika u učestalosti minornih alelskih varijanti u njima, razlog za razlike u rezultatima u pojedinim istraživanjima [227]. U našoj studiji, distribucija učestalosti alela i genotipova u kontrolnoj grupi ispitanika se nije značajno razlikovala u odnosu na rezultate većine drugih evropskih zemalja, uključujući i rezultate iz regiona, obzirom da se može pretpostaviti da populacije iz istog regiona imaju verovatno zajedničko poreklo [220, 318]. Izuzetak je bila razlika u učestalosti alela G2677T/A kod zdravih ispitanika u Hrvatskoj studiji u odnosu na našu [227].

Na osnovu navedenog, naši rezultati jasno ukazuju na značajnu povezanost pojedinih polimorfizama C1236T, G2677T/A i C3435T sa UK u našoj populaciji, u kojoj T aleli ispitivanih polimorfizama imaju predisponirajuću ulogu za nastanak UK. Nije jasno koji su mehanizmi kojim navedene genske varijante mogu da doprinesu nastanku UK, odnosno zbog čega ovakva predispozicija ne postoji za KB. Jedno od mogućih objašnjenja bi mogla da bude pretpostavka da izmenjena ekspresija P-gp i/ili njegova izmenjena funkcija koja je uzrokovana polimorfizmima *MDRI* gena dovodi do poremećenog transporta potencijalno toksičnih ksenobiotika kod osoba sa specifičnim genskim varijantama, što čini ove osobe podložnim za nastanak UK. Ipak, ne može se isključiti da postoje i drugi polimorfizmi u *MDRI* genu, za sada nepoznati, koji su povezani sa polimorfizmima koje smo mi analizirali i koji imaju uticaj na ekspresiju i funkciju P-gp. U skladu sa tim, u škotskoj studiji je rs3789243 polimorfizam u intronu 3 *MDRI* gena bio značajno češće prisutan kod pacijenata sa UK [216]. Slično, u studiji iz Slovenije, polimorfizmi u intronu 13 (rs2235035) i intronu 16 (rs1922242) su bili češće prisutni kod pacijenata sa UK [318].

Dobro je poznato da su KB i UK dve bolesti koje imaju različite kliničke karakteristike. Često nije moguće predvideti tok bolesti kao i odgovor na terapiju i pored brojnih raspoloživih laboratorijskih biomarkera, kao i kliničkih, endoskopskih i patohistoloških kriterijuma i parametara aktivnosti bolesti. Obzirom da do danas ne postoji zlatni standard kojim bi se mogao predvideti tok bolesti, a koji je dovoljno pouzdan,

jednostavan, brz i lako dostupan lekaru i pacijentima, ispitivani su i brojni polimorfizmi uključujući i polimorfizme *MDR1* gena, kao potencijalni parametri procene aktivnosti bolesti ili prediktori odgovora na terapiju. I pored činjenice da su pojedine studije ukazale na postojanje ovakvih genotipsko-fenotipskih korelacija, većina dosadašnjih istraživanja nije uspela da potvrdi pravi klinički značaj dobijenih rezultata. Tako je studija Hoa i saradnika ukazala da su T alel i TT genotip polimorfizma C3435T češće zastupljeni kod pacijenata sa ekstenzivnom formom UK, odnosno Osuga i saradnici su pokazali da su navedeni alel i genotip povezani sa kasnijim nastankom UK [222, 308]. Takođe, u drugim studijama je T alel i/ili TT genotip bio povezan sa stenozantnom formom KB terminalnog ileuma [217, 320]. G alel polimorfizma G2677T/A je korelisao sa niskim rizikom za nastanak inflamatorne forme ileokolonske lokalizacije KB [317]. U studiji Oostenbrugha i saradnika, heterozigot G2677T je bio češće prisutan kod pacijenata sa KB koji nisu imali EIM [311], dok je u drugoj studiji T alel G1236T/A bio udružen sa ranim nastankom KB [217], odnosno sa stenozantnom i penetrantnom formom KB [218]. Takođe je nekoliko haplotipova bilo povezano sa fenotipskim karakteristikama IBC. Haplotip 2677T/3435T je bio udružen sa kasnijim nastankom UK (nakon 35 godine života) [308], dok je haplotip 1236T/2677T bio češće povezan sa levostranim UK [219]. Haplotip G2677/3435T i haplotip 1236T/2677T/3435T su češće bili prisutni kod pacijenata kod kojih je postojao rani početak UK i teži klinički tok bolesti [219, 225]. U našem istraživanju, ispitivali smo postojanje korelacija polimorfizama *MDR1* gena i fenotipskih karakteristika KB i UK. Upoređivali smo sledeće kliničke karakteristike naše serije pacijenata sa polimorfizmima *MDR1* gena: godine kad je bolest nastala, lokalizacija bolesti, ekstenzivnost bolesti, lokalizacija i tip KB, aktivnost bolesti, odgovor na terapiju i postojanje KS zavisne i KS refrakterne forme bolesti, kao i imunomodulatorno refrakterne forme bolesti, prisustvo EIM, hirurške intervencije zbog osnovne bolesti, postojanje anemije i pušenje. U ovom istraživanju, T alel polimorfizma C3435T je korelisao sa povećanim rizikom za hirurško lečenje KB. Naša kohorta pacijenata reprezentuje uzorak populacije pacijenata sa IBC iz Srbije, ali obzirom da su kohortu činili pacijenti koji su lečeni u tercijarnoj zdravstvenoj ustanovi gde gravitiraju bolesnici sa najtežim i najsloženijim formama bolesti, potrebno je da se i rezultati koje smo dobili tumače u skladu sa ovim činjenicama.

Obzirom na dobro poznatu ulogu P-gp, pretpostavlja se da izmenjena ekspresija P-gp kod pacijenata sa IBC može da utiče na odgovor na kortikosteroidnu terapiju [321]. Prethodne studije su kod pacijenata sa KB pokazale povezanost TT genotipa polimorfizma C3435T i CC genotipa polimorfizma C1236T sa kortikosteroid-zavisnom formom bolesti

[317, 320]. U studiji Onnie i saradnika, genotip 2677TT je bio udružen sa kortikosteroid-zavisnom formom bolesti kod pacijenata sa UK [189]. U istraživanjima koja su obuhvatile haplotipove, pokazano je da su TTT i TTC haplotipovi češće udruženi sa kortikosteroid-refraktarnom formom bolesti, dok su dvolokusni haplotipovi češće povezani sa parcijalnim odgovorom na kortikosteroidnu terapiju kod KB [219, 318]. U ovom istraživanju, nismo utvrdili postojanje korelacije genotipova i haplotipova i odgovora na kortikosteroidnu ili imunomodulatornu terapiju (azatioprin ili metoreksat), odnosno anti-TNF terapiju, kako kod pacijenata sa UK tako i kod pacijenata sa KB. Međutim, utvrdili smo visoko značajnu povezanost C1236T i C3453T polimorfizama i pušenja kod pacijenata sa UK. T alel, TT genotip i TTT haplotip koji su se u ovoj studiji pokazali kao potencijalni faktori rizika za nastanak UK, su češće bili prisutni kod pacijenata koji su nepušači ili koji su bivši pušači, dok je potencijalno zaštitini alel C u nastanku UK, za oba polimorfizma bio češće prisutan kod pacijenata sa UK koji su pušači. Prema našim saznanjima, do sada nema objavljenih podataka o udruženosti pušenja i polimorfizama *MDR1* gena. Naši rezultati se mogu objasniti saznanjima iz epidemioloških studija koja ukazuju da pušenje povećava rizik za nastanak KB, dok može da ima suprotan efekat na UK. Pokazano je da bivši pušači i nepušači imaju teži klinički tok bolesti u odnosu na pacijente pušače sa UK [8]. Mehanizam kojim se ovo zapažanje može objasniti nije do danas u potpunosti razjašnjen, ali je poznato da prekid pušenja često dovodi do relapsa bolesti u toku godinu dana, kao i da pušači sa UK imaju ređe potrebu za imunosupresivnom terapijom, blaži klinički tok bolesti i ređe operacije zbog osnovne bolesti [8]. Navedene epidemiološke studije su jasno pokazale i povezanost teže forme KB sa pušenjem. U našem istraživanju nije utvrđena povezanost polimorfizama *MDR1* gena i pušenja u KB, kao ni korelacije drugih ispitivanih fenotipskih karakteristika KB sa polimorfizmima *MDR1* gena.

U zaključku, naša studija je prva studija iz Srbije koja se bavila ispitivanjem prevalencije polimorfizama *MDR1* gena, kod pacijenata sa IBC. Postoji samo nekoliko studija rađenih u Istočnoj Evropi koje su se bavile ovakvim istraživanjima. Naše istraživanje je jedino, koliko je nama poznato, koje je utvrdilo postojanje povezanosti sva tri ispitivana *MDR1* polimorfizma (C1236T, G2677T/A i C3435T) sa UK, od kojih su neke udruženosti visoko statistički značajne sa visokim *p* vrednostima i odnosom šansi (OR), kao što je pokazano za T alel polimorfizma C1236T. Takođe smo utvrdili postojanje mogućih protektivnih haplotipova, kao i haplotipova koji predstavljaju potencijalne faktore rizika za nastanak UK u našoj kohorti. Međutim, kao što je već ranije naglašeno, naša grupa ispitanika je relativno mala s većim udelom pacijenata sa težim formama bolesti što

je moglo da utiče na dobijene rezultate. Stoga su neophodne replikativne studije na većem broju ispitanika u etnički sličnim populacijama kako bi ovi rezultati mogli adekvatno da se tumače. I pored navedenog, naše istraživanje može značajno da doprinese budućim genetskim ispitivanjima polimorfizama *MDR1* gena, kao potencijalnih biomarkera u patogenezi IBC.

## 5.7 ZNAČAJ I OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA

U ovoj doktorskoj disertaciji je u populaciji zdravih osoba u Srbiji i u grupi pacijenata sa IBC ispitana učestalost polimorfizama pojedinačnih nukleotida u genima za citokine, TNF, IL-10 i IL-12B koji čini zajedničku komponentu IL-12 i IL-23 i genu koji kodira receptor za IL-23 (*IL23R*), kao i u *MDR1* genu koji kodira protein P-gp koji se nalazi eksprimiran na epitelnim ćelijama digestivnog trakta i učestvuje u transportu ksenobiotika i toksina. Dobro je poznato da je u poslednjih 15 godina došlo do velikog napretka u razvoju molekularne genetike i rasvetljavanja osnovnih sekvenci i strukture humanog genoma kojim su otkriveni brojni genski lokusi koji su udruženi sa nastankom IBC. Međutim, do danas postoje oprečni podaci o ulozi polimorfizama pojedinih gena u patogenezi IBC kod različitih populacija. Obzirom da u našoj zemlji do sada nije rađeno ovakvo istraživanje, smatrali smo da je ispitivanje učestalosti alela gena koji kodiraju inflamatorne i druge molekule uključene u patogenezu IBC od velikog značaja za populaciju pacijenata sa IBC iz Srbije. Takođe je upoređivanje distribucije alela i genotipova zdrave populacije iz Srbije sa drugim populacijama važno, kako bi se utvrdile genetske karakteristike naše populacije. Ovo istraživanje predstavlja prvu genetsku studiju kojom se procenjivala udruženost alela i genotipova polimorfizama *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena kod pacijenata sa IBC u Srbiji. U ovom istraživanju su po prvi put ispitani polimorfizmi rs3024505 *IL10* gena, rs6887695 *IL12B* gena i rs11209026 *IL23R* gena u zdravoj populaciji iz Srbije. Svi ispitivani genotipovi polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena su bili u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži kako kod zdravih ispitanika, tako i u grupi pacijenata sa UK, KB i IBC. U našem istraživanju pokazana je značajna povezanost pojedinih polimorfizama ovih gena sa UK, KB i/ili IBC. Takođe smo pokazali značajnu povezanost pojedinih haplotipova u *IL10* genu sa KB (i IBC), odnosno haplotipova i diplotipova u *MDR1* genu sa UK (i IBC), što je do sada pokazano u malom broju studija u svetu. Poseban značaj naše studije je u rezultatima koji se odnose na utvrđivanje povezanosti između pojedinih polimorfizama i kliničkih manifestacija bolesti,

kao što su povezanost sa težim formama bolesti, odgovorom na terapiju, povećanom riziku za operativnim lečenjem, kao i moguće postojanje udruženosti genetskih faktora sa faktorima sredine kao što je pušenje. Takođe, utvrdili smo razlike u distribuciji pojedinih alela i genotipova između zdravih ispitanika iz Srbije i zdravih ispitanika iz drugih populacija, što ukazuje na postojanje određenih genskih specifičnosti naše populacije. Međutim, postoje i određena ograničenja ovog istraživanja. Naša grupa ispitanika je relativno mala, a svi pacijenti koji su uključeni u studiju su lečeni u tercijarnoj zdravstvenoj ustanovi što podrazumeva najkompleksnije kliničke forme bolesti. Stoga su pacijenti sa blagim tokom bolesti i lokalizovanom bolesti bili manje zastupljeni u ovom istraživanju. Zbog toga postoji mogućnost da povezanosti između nekih polimorfizama i fenotipskih karakteristika IBC nisu detektovane u našoj studiji, iako možda postoje u srpskoj populaciji. Takođe u našoj studiji nisu rađene korekcije za multipla testiranja, što daje mogućnost dobijanja i lažno pozitivnih rezultata. Zbog svega navedenog, neophodne su replikativne studije na većem broju ispitanika u etnički sličnim populacijama kako bi naši rezultati bili potvrđeni. I pored navedenih ograničenja, rezultati naše studije mogu da budu korisni za buduća genetska ispitivanja polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDRI* gena, kao potencijalnih biomarkera u IBC i da značajno doprinesu razjašnjavanju kompleksne patogeneze ove bolesti. Takođe, obzirom da mnoge bolesti dele zajedničke gene podložnosti, rezultati dobijeni u ovom istraživanju mogli bi da predstavljaju osnovu za dalja ispitivanja značaja ovih genetskih markera i kod pacijenata obolelih od drugih autoimunskih i/ili hroničnih inflamatornih bolesti.

## ***6. Zaključci***

---



Na osnovu dobijenih rezultata, a u skladu sa postavljenim ciljevima studije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Učestalost alela i genotipova polimorfizma rs1800629 (G-308A) *TNFA* gena se nije značajno razlikovala između zdravih ispitanika i pacijenata sa KB i UK.
2. Polimorfizam rs3024505 (C/T) na 3' kraju *IL10* gena je bio udružen sa KB, dok polimorfizmi u promotorskom regionu *IL10* gena, rs1800896 (G-1082A) i rs1800871 (C-819T) nisu bili povezani ni sa KB ni sa UK.
  - Alel T rs3024505 je identifikovan kao faktor rizika za nastanak KB, pošto su T alel, nosioci T alela, genotip CT i haplotip GCCT (koji sadrži T alel) bili značajno češće prisutni kod pacijenata sa KB u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika.
  - C alel i CC genotip rs3024505 bi mogli da imaju protektivnu ulogu u nastanku KB, jer su bili značajno ređe prisutni kod pacijenata sa KB u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika.
  - Nosioci C alela rs3024505 su imali češće anemiju i stenozičnu/fistuloznu formu KB.
3. Polimorfizam rs6887695 (G/C) *IL12B* gena koji kodira p40, zajedničku komponentu IL-12 i IL-23 bio je udružen sa KB.
  - CC genotip bio je značajno češće prisutan kod pacijenata sa KB u odnosu na kontrolnu grupu, sugerišući moguću ulogu ovog genotipa u nastanku KB.
  - Nosioci G alela su značajno ređe bili prisutni kod pacijenata sa KB, ali su bili povezani sa fistuloznom formom bolesti i ekstraintestinalnim manifestacijama bolesti.
4. Polimorfizam rs11209026 u genu za receptor za IL-23 (*IL23R*) bio je udružen i sa KB i sa UK.
  - A alel, nosioci A alela i GA genotip su bili značajno češće prisutni kod zdravih ispitanika u odnosu na KB i UK, sugerišući protektivnu ulogu A alela u nastanku obe forme IBC.

5. Svi ispitivani polimorfizmi *MDR1* gena, rs1128503 (C1236T), rs2032582 (G2677T/A) i rs1045642 (C3435T) bili su udruženi sa UK.
- T alel, nosioci T alela i TT genotip sva tri polimorfizma (sa izuzetkom TT genotipa C3435T) bili su češće prisutni kod pacijenata sa UK u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika, što ukazuje na važnu predisponirajuću ulogu T alela *MDR1* polimorfizama u patogenezi UK.
  - C alel i CC genotip C1236T i C3435T, kao i G alel i GG genotip G2677T/A su bili značajno češće prisutni kod zdravih ispitanika u odnosu na pacijente sa UK, ukazujući na protektivnu ulogu C i G alela ovih polimorfizama u nastanku UK.
  - U našoj populaciji su identifikovani protektivni haplotipovi i diplotipovi, CGC i CGC/CGC, kao i oni koji nose podložnost za razvoj UK, TTT i TTC/TTT.
  - T alel i TT genotip polimorfizama C1236T i C3435T, i TTT haplotip su češće bili prisutni kod pacijenata sa UK koji su bili nepušači, dok je potencijalno zaštitni alel C, za oba polimorfizma bio češće prisutan kod pacijenata sa UK koji su pušači.
6. Distribucije ispitivanih polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena kod zdravih ispitanika u Srbiji bile su slične kao i kod većine drugih populacija u regionu i Evropi (sa izuzetkom rs1800896), dok su se značajno razlikovale u odnosu na populacije zdravih osoba na geografski udaljenim teritorijama i različitog etničkog porekla.

## ***7. Literatura***

---

1. Friedmann S, Blumberg RS: **Inflammatory Bowel Disease**. In: *Harrison's principles of internal medicine*. 18th edition edn. Edited by Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. New York: McGraw-Hill; 2012: 2477-2495.
2. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, Mantzaris G, Reinisch W, Colombel JF, Vermeire S *et al*, 2012. **Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis**. *Journal of Crohn's & colitis* 6, 965-990. [[PubMed](#)]
3. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, Ochsenuhn T, Orchard T, Rogler G, Louis E *et al*, 2010. **The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis**. *Journal of Crohn's & colitis* 4, 7-27. [[PubMed](#)]
4. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF, 2006. **The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications**. *Gut* 55, 749-753. [[PubMed](#)]
5. Carvalho RS, Abadom V, Dilworth HP, Thompson R, Oliva-Hemker M, Cuffari C, 2006. **Indeterminate colitis: a significant subgroup of pediatric IBD**. *Inflamm Bowel Dis* 12, 258-262. [[PubMed](#)]
6. Price AB, 1978. **Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'**. *Journal of clinical pathology* 31, 567-577. [[PubMed](#)]
7. M'Koma AE, 2013. **Inflammatory bowel disease: an expanding global health problem**. *Clinical medicine insights Gastroenterology* 6, 33-47. [[PubMed](#)]
8. Ananthakrishnan AN, 2015. **Epidemiology and risk factors for IBD**. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 12, 205-217. [[PubMed](#)]
9. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ, Finkelstein JA, 2007. **The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States**. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 5, 1424-1429. [[PubMed](#)]
10. Jacobsen BA, Fallingborg J, Rasmussen HH, Nielsen KR, Drewes AM, Puho E, Nielsen GL, Sorensen HT, 2006. **Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002**. *European journal of gastroenterology & hepatology* 18, 601-606. [[PubMed](#)]
11. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW *et al*, 2012. **Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review**. *Gastroenterology* 142, 46-54 e42; quiz e30. [[PubMed](#)]
12. Gligorijevic V, Bojic D, Nedeljkovic-Protic M, Svorcan P, Maksimovic B, Markovic S, Jović N, 2011. **Epidemiological study of inflammatory bowel disease in single tertiary centre – First report from Serbia**. *Epidemiology*, P339.

13. Krstic M, Tarabar D, Bojic D, Nagorni A, Hadnadjev L, Dugalic P, Nikolic G, Brocic T, Milenkovic Z, Gligorijevic V *et al*, 2012. **Epidemiological study of occurrence, clinical course and treatment options of IBD in Serbia. Results of ESCAPE study.** *Epidemiology*, P421.
14. Pezerovic D, Klarin I, Zulj M, Majnaric L, Khaznadar E, Vcev A, 2014. **Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Vukovarsko-Srijemska County, Croatia, 1991-2000 and 2001-2010: a population-based study.** *Coll Antropol* 38, 115-123. [[PubMed](#)]
15. Sincic BM, Vucelic B, Persic M, Brncic N, Erzen DJ, Radakovic B, Micovic V, Stimac D, 2006. **Incidence of inflammatory bowel disease in Primorsko-goranska County, Croatia, 2000-2004: A prospective population-based study.** *Scand J Gastroenterol* 41, 437-444. [[PubMed](#)]
16. Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, MacKenzie A, Koehoorn M, Jackson M, Fedorak R, Israel D, Blanchard JF, 2006. **The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study.** *Am J Gastroenterol* 101, 1559-1568. [[PubMed](#)]
17. Gunesh S, Thomas GA, Williams GT, Roberts A, Hawthorne AB, 2008. **The incidence of Crohn's disease in Cardiff over the last 75 years: an update for 1996-2005.** *Aliment Pharmacol Ther* 27, 211-219. [[PubMed](#)]
18. Molinie F, Gower-Rousseau C, Yzet T, Merle V, Grandbastien B, Marti R, Lerebours E, Dupas JL, Colombel JF, Salomez JL *et al*, 2004. **Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999).** *Gut* 53, 843-848. [[PubMed](#)]
19. Ott C, Obermeier F, Thieler S, Kemptner D, Bauer A, Scholmerich J, Rogler G, Timmer A, 2008. **The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study.** *European journal of gastroenterology & hepatology* 20, 917-923. [[PubMed](#)]
20. Loftus CG, Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ, 3rd, Sandborn WJ, 2007. **Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000.** *Inflamm Bowel Dis* 13, 254-261. [[PubMed](#)]
21. Yapp TR, Stenson R, Thomas GA, Lawrie BW, Williams GT, Hawthorne AB, 2000. **Crohn's disease incidence in Cardiff from 1930: an update for 1991-1995.** *European journal of gastroenterology & hepatology* 12, 907-911. [[PubMed](#)]
22. Chouraki V, Savoye G, Dauchet L, Vernier-Massouille G, Dupas JL, Merle V, Laberenne JE, Salomez JL, Lerebours E, Turck D *et al*, 2011. **The changing pattern of Crohn's disease incidence in northern France: a continuing increase in the 10- to 19-year-old age bracket (1988-2007).** *Aliment Pharmacol Ther* 33, 1133-1142. [[PubMed](#)]
23. Ahuja V, Tandon RK, 2010. **Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area: a comparison with developed countries and regional differences.** *J Dig Dis* 11, 134-147. [[PubMed](#)]

24. Sood A, Midha V, Sood N, Bhatia AS, Avasthi G, 2003. **Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Punjab, North India.** *Gut* 52, 1587-1590. [[PubMed](#)]
25. Thia KT, Loftus EV, Jr., Sandborn WJ, Yang SK, 2008. **An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia.** *Am J Gastroenterol* 103, 3167-3182. [[PubMed](#)]
26. Hanauer SB, 2006. **Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities.** *Inflamm Bowel Dis* 12 Suppl 1, S3-9. [[PubMed](#)]
27. Bernstein CN, Kraut A, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N, Walld R, 2001. **The relationship between inflammatory bowel disease and socioeconomic variables.** *Am J Gastroenterol* 96, 2117-2125. [[PubMed](#)]
28. Eckburg PB, Relman DA, 2007. **The role of microbes in Crohn's disease.** *Clin Infect Dis* 44, 256-262. [[PubMed](#)]
29. Weinstock JV, 2006. **Helminths and mucosal immune modulation.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1072, 356-364. [[PubMed](#)]
30. Loftus EV, Jr., 2004. **Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences.** *Gastroenterology* 126, 1504-1517. [[PubMed](#)]
31. Abdul-Baki H, ElHajj I, El-Zahabi LM, Azar C, Aoun E, Zantout H, Nasreddine W, Ayyach B, Mourad FH, Soweid A *et al*, 2007. **Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease in Lebanon.** *Inflamm Bowel Dis* 13, 475-480. [[PubMed](#)]
32. Vind I, Riis L, Jess T, Knudsen E, Pedersen N, Elkjaer M, Bak Andersen I, Wewer V, Norregaard P, Moesgaard F *et al*, 2006. **Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: a population-based study from the Danish Crohn colitis database.** *Am J Gastroenterol* 101, 1274-1282. [[PubMed](#)]
33. Canavan C, Abrams KR, Mayberry JF, 2007. **Meta-analysis: mortality in Crohn's disease.** *Aliment Pharmacol Ther* 25, 861-870. [[PubMed](#)]
34. Winther KV, Jess T, Langholz E, Munkholm P, Binder V, 2003. **Survival and cause-specific mortality in ulcerative colitis: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County.** *Gastroenterology* 125, 1576-1582. [[PubMed](#)]
35. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS, 2010. **Inflammatory bowel disease.** *Annual review of immunology* 28, 573-621. [[PubMed](#)]
36. Maloy KJ, Powrie F, 2011. **Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease.** *Nature* 474, 298-306. [[PubMed](#)]
37. Abbas A, Lichtman A, Pillai S: **Osnovna imunologija: Funkcionisanje i poremećaji imunskog sistema**, Četvrto izdanje edn: Data Status, Beograd; 2013.
38. Human Microbiome Project C, 2012. **Structure, function and diversity of the healthy human microbiome.** *Nature* 486, 207-214. [[PubMed](#)]

39. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R, 2012. **Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota.** *Nature* 489, 220-230. [[PubMed](#)]
40. Round JL, Mazmanian SK, 2009. **The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease.** *Nature reviews Immunology* 9, 313-323. [[PubMed](#)]
41. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP *et al*, 2009. **A core gut microbiome in obese and lean twins.** *Nature* 457, 480-484. [[PubMed](#)]
42. Lopez-Serrano P, Perez-Calle JL, Perez-Fernandez MT, Fernandez-Font JM, Boixeda de Miguel D, Fernandez-Rodriguez CM, 2010. **Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study.** *Scand J Gastroenterol* 45, 1464-1471. [[PubMed](#)]
43. Ng SC, Tang W, Leong RW, Chen M, Ko Y, Studd C, Niewiadomski O, Bell S, Kamm MA, de Silva HJ *et al*, 2015. **Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific.** *Gut* 64, 1063-1071. [[PubMed](#)]
44. Timm S, Svanes C, Janson C, Sigsgaard T, Johannessen A, Gislason T, Jogi R, Omenaas E, Forsberg B, Toren K *et al*, 2014. **Place of upbringing in early childhood as related to inflammatory bowel diseases in adulthood: a population-based cohort study in Northern Europe.** *European journal of epidemiology* 29, 429-437. [[PubMed](#)]
45. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D, 2014. **The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead.** *Gastroenterology* 146, 1489-1499. [[PubMed](#)]
46. Manichanh C, Borrueal N, Casellas F, Guarner F, 2012. **The gut microbiota in IBD.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 9, 599-608. [[PubMed](#)]
47. Nagalingam NA, Lynch SV, 2012. **Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases.** *Inflamm Bowel Dis* 18, 968-984. [[PubMed](#)]
48. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF, 2004. **High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease.** *Gastroenterology* 127, 412-421. [[PubMed](#)]
49. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Dore J, 2009. **Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota.** *Inflamm Bowel Dis* 15, 1183-1189. [[PubMed](#)]
50. Martin R, Chain F, Miquel S, Lu J, Gratadoux JJ, Sokol H, Verdu EF, Bercik P, Bermudez-Humaran LG, Langella P, 2014. **The commensal bacterium Faecalibacterium prausnitzii is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models.** *Inflamm Bowel Dis* 20, 417-430. [[PubMed](#)]
51. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G *et al*, 2008. **Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut**

- microbiota analysis of Crohn disease patients.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16731-16736. [[PubMed](#)]
52. Turner JR, 2006. **Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application.** *Am J Pathol* 169, 1901-1909. [[PubMed](#)]
53. Dahan S, Roda G, Pinn D, Roth-Walter F, Kamalu O, Martin AP, Mayer L, 2008. **Epithelial: lamina propria lymphocyte interactions promote epithelial cell differentiation.** *Gastroenterology* 134, 192-203. [[PubMed](#)]
54. Johansson C, Kelsall BL, 2005. **Phenotype and function of intestinal dendritic cells.** *Semin Immunol* 17, 284-294. [[PubMed](#)]
55. Taupin D, Podolsky DK, 2003. **Trefoil factors: initiators of mucosal healing.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 721-732. [[PubMed](#)]
56. Bevins CL, Salzman NH, 2011. **Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis.** *Nat Rev Microbiol* 9, 356-368. [[PubMed](#)]
57. Cho JH, Abraham C, 2007. **Inflammatory bowel disease genetics: Nod2.** *Annu Rev Med* 58, 401-416. [[PubMed](#)]
58. Cader MZ, Kaser A, 2013. **Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation.** *Gut* 62, 1653-1664. [[PubMed](#)]
59. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S, 2003. **Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells.** *Gastroenterology* 125, 47-57. [[PubMed](#)]
60. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL, 2008. **Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease.** *Gut* 57, 903-910. [[PubMed](#)]
61. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R *et al*, 2005. **Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18129-18134. [[PubMed](#)]
62. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY, 2004. **Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells.** *Immunity* 21, 527-538. [[PubMed](#)]
63. Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Roseblatt M, Von Andrian UH, 2003. **Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells.** *Nature* 424, 88-93. [[PubMed](#)]
64. Robinson A, Keely S, Karhausen J, Gerich ME, Furuta GT, Colgan SP, 2008. **Mucosal protection by hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition.** *Gastroenterology* 134, 145-155. [[PubMed](#)]
65. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A, 2014. **Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease.** *Autoimmun Rev* 13, 3-10. [[PubMed](#)]
66. Abraham C, Cho JH, 2009. **Inflammatory bowel disease.** *The New England journal of medicine* 361, 2066-2078. [[PubMed](#)]



67. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W, 1996. **Disparate CD4+ 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.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 157, 1261-1270. [[PubMed](#)]
68. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH *et al*, 2001. **A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.** *Nature* 411, 603-606. [[PubMed](#)]
69. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhaes JG, Yuan L, Soares F, Chea E, Le Bourhis L *et al*, 2010. **Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry.** *Nat Immunol* 11, 55-62. [[PubMed](#)]
70. Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, Lee HK, Shen C, Cojocaru G, Shenouda S *et al*, 2006. **Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells.** *Nat Cell Biol* 8, 1327-1336. [[PubMed](#)]
71. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R, 2004. **Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis.** *Cell* 118, 229-241. [[PubMed](#)]
72. Lorenz RG, Newberry RD, 2004. **Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1029, 44-57. [[PubMed](#)]
73. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K *et al*, 2008. **Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis.** *J Clin Invest* 118, 2269-2280. [[PubMed](#)]
74. Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B, 2007. **Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses.** *Nat Immunol* 8, 1086-1094. [[PubMed](#)]
75. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD, 2005. **Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity.** *J Clin Invest* 115, 66-75. [[PubMed](#)]
76. Izcue A, Coombes JL, Powrie F, 2006. **Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation.** *Immunol Rev* 212, 256-271. [[PubMed](#)]
77. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, 2009. **IL-17 and Th17 Cells.** *Annual review of immunology* 27, 485-517. [[PubMed](#)]
78. Romagnani S, 1994. **Lymphokine production by human T cells in disease states.** *Annual review of immunology* 12, 227-257. [[PubMed](#)]
79. MacDonald TT, Biancheri P, Sarra M, Monteleone G, 2012. **What's the next best cytokine target in IBD?** *Inflamm Bowel Dis* 18, 2180-2189. [[PubMed](#)]

80. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Lizza F, Pallone F, 1997. **Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells.** *Gastroenterology* 112, 1169-1178. [[PubMed](#)]
81. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Lizza F, Fusco A, Pallone F, 1999. **Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 163, 143-147. [[PubMed](#)]
82. Podolsky DK, 2002. **Inflammatory bowel disease.** *The New England journal of medicine* 347, 417-429. [[PubMed](#)]
83. Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, Walker-Smith JA, MacDonald TT, 1994. **Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology* 106, 1455-1466. [[PubMed](#)]
84. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS *et al*, 2004. **Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis.** *J Clin Invest* 113, 1490-1497. [[PubMed](#)]
85. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Burgel N, Fromm M *et al*, 2005. **Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution.** *Gastroenterology* 129, 550-564. [[PubMed](#)]
86. Di Sabatino A, Biancheri P, Rovedatti L, MacDonald TT, Corazza GR, 2012. **New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease.** *Inflamm Bowel Dis* 18, 368-371. [[PubMed](#)]
87. Zhou L, Ivanov, II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR, 2007. **IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways.** *Nat Immunol* 8, 967-974. [[PubMed](#)]
88. Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, Corazza GR, Monteleone G, Di Sabatino A, Macdonald TT, 2009. **Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease.** *Gut* 58, 1629-1636. [[PubMed](#)]
89. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K *et al*, 2008. **IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease.** *Gut* 57, 1682-1689. [[PubMed](#)]
90. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM *et al*, 2008. **Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease.** *Nat Genet* 40, 955-962. [[PubMed](#)]
91. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A *et al*, 2006. **A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene.** *Science* 314, 1461-1463. [[PubMed](#)]

92. Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JK, Doherty JM, Mills JC, Colonna M, 2009. **A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity.** *Nature* 457, 722-725. [[PubMed](#)]
93. O'Garra A, Vieira P, 2004. **Regulatory T cells and mechanisms of immune system control.** *Nat Med* 10, 801-805. [[PubMed](#)]
94. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE, 2006. **TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells.** *Blood* 108, 253-261. [[PubMed](#)]
95. Chamouard P, Monneaux F, Richert Z, Voegeli AC, Lavaux T, Gaub MP, Baumann R, Oudet P, Muller S, 2009. **Diminution of Circulating CD4+CD25 high T cells in naive Crohn's disease.** *Dig Dis Sci* 54, 2084-2093. [[PubMed](#)]
96. Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H, Powrie F, 2001. **Control of intestinal inflammation by regulatory T cells.** *Immunol Rev* 182, 190-200. [[PubMed](#)]
97. Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S, 2010. **Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease.** *J Clin Immunol* 30, 80-89. [[PubMed](#)]
98. Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Sarra M, Stolfi C, Becker C, Macdonald TT, Pallone F, Neurath MF *et al*, 2009. **Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression.** *Gastroenterology* 136, 1308-1316, e1301-1303. [[PubMed](#)]
99. Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B, Danese S, Gionchetti P, Moser G, Beaugerie L, Gomollon F, Hauser W, Herrlinger K *et al*, 2013. **Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations.** *Journal of Crohn's & colitis* 7, 1-33. [[PubMed](#)]
100. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K *et al*, 2005. **Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology.** *Can J Gastroenterol* 19 Suppl A, 5A-36A. [[PubMed](#)]
101. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P, 2006. **Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys?** *Gut* 55, 426-431. [[PubMed](#)]
102. Schoepfer AM, Trummel M, Seeholzer P, Seibold-Schmid B, Seibold F, 2008. **Discriminating IBD from IBS: comparison of the test performance of fecal markers, blood leukocytes, CRP, and IBD antibodies.** *Inflamm Bowel Dis* 14, 32-39. [[PubMed](#)]
103. Tanaka M, Masuda T, Yao T, Saito H, Kusumi T, Nagura H, Kudo H, 2001. **Observer variation of diagnoses based on simple biopsy criteria differentiating among Crohn's disease, ulcerative colitis, and other forms of colitis.** *J Gastroenterol Hepatol* 16, 1368-1372. [[PubMed](#)]
104. Harvey RF, Bradshaw JM, 1980. **A simple index of Crohn's-disease activity.** *Lancet* 1, 514. [[PubMed](#)]

105. Best WR, Bectel JM, Singleton JW, Kern F, Jr., 1976. **Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study.** *Gastroenterology* 70, 439-444. [[PubMed](#)]
106. Panaccione R, Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan B, Schreiber S, Ghosh S, 2008. **Review article: treatment algorithms to maximize remission and minimize corticosteroid dependence in patients with inflammatory bowel disease.** *Aliment Pharmacol Ther* 28, 674-688. [[PubMed](#)]
107. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, Schreiber S, Byczkowski D, Li J, Kent JD *et al*, 2007. **Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial.** *Gastroenterology* 132, 52-65. [[PubMed](#)]
108. Aloï M, Nuti F, Stronati L, Cucchiara S, 2014. **Advances in the medical management of paediatric IBD.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 11, 99-108. [[PubMed](#)]
109. Colombel JF, 2014. **Decade in review-IBD: IBD-genes, bacteria and new therapeutic strategies.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 11, 652-654. [[PubMed](#)]
110. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lemann M, Soderholm J, Colombel JF, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollon F *et al*, 2010. **The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management.** *Journal of Crohn's & colitis* 4, 28-62. [[PubMed](#)]
111. Malchow H, Ewe K, Brandes JW, Goebell H, Ehms H, Sommer H, Jesdinsky H, 1984. **European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment.** *Gastroenterology* 86, 249-266. [[PubMed](#)]
112. Summers RW, Switz DM, Sessions JT, Jr., Bectel JM, Best WR, Kern F, Jr., Singleton JW, 1979. **National Cooperative Crohn's Disease Study: results of drug treatment.** *Gastroenterology* 77, 847-869. [[PubMed](#)]
113. Candy S, Wright J, Gerber M, Adams G, Gerig M, Goodman R, 1995. **A controlled double blind study of azathioprine in the management of Crohn's disease.** *Gut* 37, 674-678. [[PubMed](#)]
114. Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR, 1995. **Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis.** *Ann Intern Med* 123, 132-142. [[PubMed](#)]
115. Moskovitz DN, Van Assche G, Maenhout B, Arts J, Ferrante M, Vermeire S, Rutgeerts P, 2006. **Incidence of colectomy during long-term follow-up after cyclosporine-induced remission of severe ulcerative colitis.** *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 4, 760-765. [[PubMed](#)]
116. Faubion WA, Jr., Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ, 2001. **The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study.** *Gastroenterology* 121, 255-260. [[PubMed](#)]
117. Hwang JM, Varma MG, 2008. **Surgery for inflammatory bowel disease.** *World J Gastroenterol* 14, 2678-2690. [[PubMed](#)]

118. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, Windsor A, Colombel JF, Allez M, D'Haens G, D'Hoore A, Mantzaris G, Novacek G *et al*, 2012. **Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management.** *Journal of Crohn's & colitis* 6, 991-1030. [[PubMed](#)]
119. Danese S, 2012. **New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside.** *Gut* 61, 918-932. [[PubMed](#)]
120. Nielsen OH, Ainsworth MA, 2013. **Tumor necrosis factor inhibitors for inflammatory bowel disease.** *The New England journal of medicine* 369, 754-762. [[PubMed](#)]
121. Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, Blank MA, Johanns J, Guzzo C, Sands BE, Hanauer SB, Targan S, Rutgeerts P *et al*, 2012. **Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease.** *The New England journal of medicine* 367, 1519-1528. [[PubMed](#)]
122. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, Lee S, Plavina T, Scanlon JV, Sandrock A *et al*, 2012. **Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy.** *The New England journal of medicine* 366, 1870-1880. [[PubMed](#)]
123. Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel JF, Sandborn WJ, Van Assche G, Axler J, Kim HJ, Danese S *et al*, 2013. **Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis.** *The New England journal of medicine* 369, 699-710. [[PubMed](#)]
124. Vermeire S, Ghosh S, Panes J, Dahlerup JF, Luegering A, Sirotiakova J, Strauch U, Burgess G, Spanton J, Martin SW *et al*, 2011. **The mucosal addressin cell adhesion molecule antibody PF-00547,659 in ulcerative colitis: a randomised study.** *Gut* 60, 1068-1075. [[PubMed](#)]
125. Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Vranic I, Su C, Rousell S, Niezychowski W, Study AI, 2012. **Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis.** *The New England journal of medicine* 367, 616-624. [[PubMed](#)]
126. Plevy SE, Targan SR, 2011. **Future therapeutic approaches for inflammatory bowel diseases.** *Gastroenterology* 140, 1838-1846. [[PubMed](#)]
127. Birkenfeld S, Zvidi I, Hazazi R, Niv Y, 2009. **The prevalence of ulcerative colitis in Israel: a twenty-year survey.** *J Clin Gastroenterol* 43, 743-746. [[PubMed](#)]
128. Zvidi I, Hazazi R, Birkenfeld S, Niv Y, 2009. **The prevalence of Crohn's disease in Israel: a 20-year survey.** *Dig Dis Sci* 54, 848-852. [[PubMed](#)]
129. Cho JH, Weaver CT, 2007. **The genetics of inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology* 133, 1327-1339. [[PubMed](#)]
130. Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J, 2014. **The history of genetics in inflammatory bowel disease.** *Annals of gastroenterology : quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology* 27, 294-303. [[PubMed](#)]
131. Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ, 1999. **HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis.** *Gut* 45, 395-401. [[PubMed](#)]



132. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M *et al*, 2001. **Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.** *Nature* 411, 599-603. [[PubMed](#)]
133. International HapMap C, 2005. **A haplotype map of the human genome.** *Nature* 437, 1299-1320. [[PubMed](#)]
134. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA *et al*, 2012. **Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease.** *Nature* 491, 119-124. [[PubMed](#)]
135. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL, 2005. **Key concepts in genetic epidemiology.** *Lancet* 366, 941-951. [[PubMed](#)]
136. Reid-Lombardo KM, Petersen GM, 2010. **Understanding genetic epidemiologic association studies Part 1: fundamentals.** *Surgery* 147, 469-474. [[PubMed](#)]
137. LaFramboise T, 2009. **Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances.** *Nucleic Acids Res* 37, 4181-4193. [[PubMed](#)]
138. Emmert-Streib F, Dehmer M, 2013. **Enhancing systems medicine beyond genotype data by dynamic patient signatures: having information and using it too.** *Frontiers in genetics* 4, 241. [[PubMed](#)]
139. Neuman MG, Nanau RM, 2012. **Single-nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease.** *Transl Res* 160, 45-64. [[PubMed](#)]
140. Zintzaras E, 2012. **Is there evidence to claim or deny association between variants of the multidrug resistance gene (MDR1 or ABCB1) and inflammatory bowel disease?** *Inflamm Bowel Dis* 18, 562-572. [[PubMed](#)]
141. Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, Von Blomberg BM, Meuwissen SG, Pena AS, 1996. **Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD).** *Clin Exp Immunol* 103, 391-396. [[PubMed](#)]
142. Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, MacDonald TT, Stephens S, 1992. **Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation.** *The Lancet* 339, 89-91. [[PubMed](#)]
143. Allen RD, 1999. **Polymorphism of the human TNF-alpha promoter--random variation or functional diversity?** *Mol Immunol* 36, 1017-1027. [[PubMed](#)]
144. Gonzalez S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Lopez-Vazquez A, Fuentes D, Nino P, Cadahia V, Saro C, Dieguez MA, Lopez-Larrea C, 2003. **TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease.** *Am J Gastroenterol* 98, 1101-1106. [[PubMed](#)]
145. Smith AJ, Humphries SE, 2009. **Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality.** *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 43-59. [[PubMed](#)]

146. Fan W, Maoqing W, Wangyang C, Fulan H, Dandan L, Jiaojiao R, Xinshu D, Binbin C, Yashuang Z, 2011. **Relationship between the polymorphism of tumor necrosis factor-alpha-308 G>A and susceptibility to inflammatory bowel diseases and colorectal cancer: a meta-analysis.** *Eur J Hum Genet* 19, 432-437. [[PubMed](#)]
147. Tong Q, Zhao L, Qian XD, Zhang LL, Xu X, Dai SM, Cai Q, Zhao DB, 2013. **Association of TNF-alpha polymorphism with prediction of response to TNF blockers in spondyloarthritis and inflammatory bowel disease: a meta-analysis.** *Pharmacogenomics* 14, 1691-1700. [[PubMed](#)]
148. Kole A, Maloy KJ, 2014. **Control of intestinal inflammation by interleukin-10.** *Current topics in microbiology and immunology* 380, 19-38. [[PubMed](#)]
149. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR, 1989. **Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.** *J Exp Med* 170, 2081-2095. [[PubMed](#)]
150. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, Vandenbroucke JP, 1997. **Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease.** *Lancet* 349, 170-173. [[PubMed](#)]
151. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV, 1997. **An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter.** *Eur J Immunogenet* 24, 1-8. [[PubMed](#)]
152. Ouma C, Davenport GC, Were T, Otieno MF, Hittner JB, Vulule JM, Martinson J, Ong'echa JM, Ferrell RE, Perkins DJ, 2008. **Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production.** *Hum Genet* 124, 515-524. [[PubMed](#)]
153. Tagore A, Gonsalkorale WM, Pravica V, Hajeer AH, McMahon R, Whorwell PJ, Sinnott PJ, Hutchinson IV, 1999. **Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease.** *Tissue Antigens* 54, 386-390. [[PubMed](#)]
154. Lv H, Jiang Y, Li J, Zhang M, Shang Z, Zheng J, Wu X, Liu P, Zhang R, Yu H, 2014. **Association between polymorphisms in the promoter region of interleukin-10 and susceptibility to inflammatory bowel disease.** *Molecular biology reports* 41, 1299-1310. [[PubMed](#)]
155. Zhu H, Lei X, Liu Q, Wang Y, 2013. **Interleukin-10-1082A/G polymorphism and inflammatory bowel disease susceptibility: a meta-analysis based on 17,585 subjects.** *Cytokine* 61, 146-153. [[PubMed](#)]
156. Zou L, Wang L, Gong X, Zhao H, Jiang A, Zheng S, 2014. **The association between three promoter polymorphisms of IL-10 and inflammatory bowel diseases (IBD): a meta-analysis.** *Autoimmunity* 47, 27-39. [[PubMed](#)]
157. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D *et al*, 2008. **Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility.** *Nat Genet* 40, 1319-1323. [[PubMed](#)]
158. Wang AH, Lam WJ, Han DY, Ding Y, Hu R, Fraser AG, Ferguson LR, Morgan AR, 2011. **The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels**

- on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population.** *Hum Immunol* 72, 431-435. [[PubMed](#)]
159. Andersen V, Ernst A, Christensen J, Ostergaard M, Jacobsen BA, Tjonneland A, Krarup HB, Vogel U, 2010. **The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohn's disease in a Danish case-control study.** *BMC Med Genet* 11, 82. [[PubMed](#)]
160. Doecke JD, Simms LA, Zhao ZZ, Huang N, Hanigan K, Krishnaprasad K, Roberts RL, Andrews JM, Mahy G, Bampton P *et al*, 2013. **Genetic susceptibility in IBD: overlap between ulcerative colitis and Crohn's disease.** *Inflamm Bowel Dis* 19, 240-245. [[PubMed](#)]
161. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K *et al*, 2000. **Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12.** *Immunity* 13, 715-725. [[PubMed](#)]
162. Glas J, Seiderer J, Wagner J, Olszak T, Fries C, Tillack C, Friedrich M, Beigel F, Stallhofer J, Steib C *et al*, 2012. **Analysis of IL12B gene variants in inflammatory bowel disease.** *PLoS One* 7, e34349. [[PubMed](#)]
163. Ferguson LR, Han DY, Fraser AG, Huebner C, Lam WJ, Morgan AR, 2010. **IL23R and IL12B SNPs and Haplotypes Strongly Associate with Crohn's Disease Risk in a New Zealand Population.** *Gastroenterol Res Pract* 2010, 539461. [[PubMed](#)]
164. Song L, Zhou R, Huang S, Zhou F, Xu S, Wang W, Yi F, Wang X, Xia B, 2013. **High intestinal and systemic levels of interleukin-23/T-helper 17 pathway in Chinese patients with inflammatory bowel disease.** *Mediators Inflamm* 2013, 425915. [[PubMed](#)]
165. Bank S, Andersen PS, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, Ydegaard Turino S, Brodersen JB, Rashid S, Kaiser Rasmussen B *et al*, 2015. **Polymorphisms in the Toll-Like Receptor and the IL-23/IL-17 Pathways Were Associated with Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease in a Danish Cohort.** *PLoS One* 10, e0145302. [[PubMed](#)]
166. Wang K, Zhang H, Kugathasan S, Annese V, Bradfield JP, Russell RK, Sleiman PM, Imielinski M, Glessner J, Hou C *et al*, 2009. **Diverse genome-wide association studies associate the IL12/IL23 pathway with Crohn Disease.** *American journal of human genetics* 84, 399-405. [[PubMed](#)]
167. Wang X, Lin Z, Wei Q, Jiang Y, Gu J, 2009. **Expression of IL-23 and IL-17 and effect of IL-23 on IL-17 production in ankylosing spondylitis.** *Rheumatol Int* 29, 1343-1347. [[PubMed](#)]
168. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J, 2011. **New IBD genetics: common pathways with other diseases.** *Gut* 60, 1739-1753. [[PubMed](#)]
169. Cho JH, Brant SR, 2011. **Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology* 140, 1704-1712. [[PubMed](#)]
170. Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, Kim CE, Glessner JT, Casalunovo T, Frackelton EC, Otieno FG, Kanterakis S, Shaner JL *et al*, 2007. **Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with susceptibility to pediatric**



- Crohn's disease.** *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 5, 972-976. [[PubMed](#)]
171. Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM, Lefebvre C, Rioux JD, Mulder F, van Dullemen HM, Kleibeuker JH, Wijmenga C, Dijkstra G, 2008. **ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands.** *Am J Gastroenterol* 103, 621-627. [[PubMed](#)]
  172. Leshinsky-Silver E, Karban A, Dalal I, Eliakim R, Shirin H, Tzofi T, Boaz M, Levine A, 2007. **Evaluation of the interleukin-23 receptor gene coding variant R381Q in pediatric and adult Crohn disease.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 45, 405-408. [[PubMed](#)]
  173. Mahurkar S, Banerjee R, Rani VS, Thakur N, Rao GV, Reddy DN, Chandak GR, 2011. **Common variants in NOD2 and IL23R are not associated with inflammatory bowel disease in Indians.** *J Gastroenterol Hepatol* 26, 694-699. [[PubMed](#)]
  174. Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, Kubo M, Nakamura Y, Hata A, 2007. **Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients.** *J Hum Genet* 52, 575-583. [[PubMed](#)]
  175. Lakatos PL, Szamosi T, Szilvasi A, Molnar E, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Tulassay Z *et al*, 2008. **ATG16L1 and IL23 receptor (IL23R) genes are associated with disease susceptibility in Hungarian CD patients.** *Dig Liver Dis* 40, 867-873. [[PubMed](#)]
  176. Sventoraityte J, Zvirbliene A, Franke A, Kwiatkowski R, Kiudelis G, Kupcinskas L, Schreiber S, 2010. **NOD2, IL23R and ATG16L1 polymorphisms in Lithuanian patients with inflammatory bowel disease.** *World J Gastroenterol* 16, 359-364. [[PubMed](#)]
  177. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L, Fu Y, Mann JS *et al*, 1998. **Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7502-7507. [[PubMed](#)]
  178. Farrell RJ, Kelleher D, 2003. **Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease.** *J Endocrinol* 178, 339-346. [[PubMed](#)]
  179. Fricker G, Drewe J, Huwyler J, Gutmann H, Beglinger C, 1996. **Relevance of p-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation.** *British journal of pharmacology* 118, 1841-1847. [[PubMed](#)]
  180. Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A, 2006. **Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis.** *World J Gastroenterol* 12, 3636-3644. [[PubMed](#)]
  181. Ho GT, Moodie FM, Satsangi J, 2003. **Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease?** *Gut* 52, 759-766. [[PubMed](#)]
  182. Panwala CM, Jones JC, Viney JL, 1998. **A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdr1a,**

- spontaneously develop colitis.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 161, 5733-5744. [PubMed]
183. Langmann T, Moehle C, Mauerer R, Scharl M, Liebisch G, Zahn A, Stremmel W, Schmitz G, 2004. **Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes.** *Gastroenterology* 127, 26-40. [PubMed]
184. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M *et al*, 2000. **Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3473-3478. [PubMed]
185. Ishikawa T, Onishi Y, Hirano H, Oosumi K, Nagakura M, Tarui S, 2004. **Pharmacogenomics of drug transporters: a new approach to functional analysis of the genetic polymorphisms of ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1).** *Biol Pharm Bull* 27, 939-948. [PubMed]
186. Kimchi-Sarfaty C, Marple AH, Shinar S, Kimchi AM, Scavo D, Roma MI, Kim IW, Jones A, Arora M, Gripar J *et al*, 2007. **Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene.** *Pharmacogenomics* 8, 29-39. [PubMed]
187. Brant SR, Panhuysen CI, Nicolae D, Reddy DM, Bonen DK, Karaliukas R, Zhang L, Swanson E, Datta LW, Moran T *et al*, 2003. **MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease.** *American journal of human genetics* 73, 1282-1292. [PubMed]
188. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M *et al*, 2003. **Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis.** *Gastroenterology* 124, 26-33. [PubMed]
189. Onnie CM, Fisher SA, Pattni R, Sanderson J, Forbes A, Lewis CM, Mathew CG, 2006. **Associations of allelic variants of the multidrug resistance gene (ABCB1 or MDR1) and inflammatory bowel disease and their effects on disease behavior: a case-control and meta-analysis study.** *Inflamm Bowel Dis* 12, 263-271. [PubMed]
190. Senhaji N, Kassogue Y, Fahimi M, Serbati N, Badre W, Nadifi S, 2015. **Genetic Polymorphisms of Multidrug Resistance Gene-1 (MDR1/ABCB1) and Glutathione S-Transferase Gene and the Risk of Inflammatory Bowel Disease among Moroccan Patients.** *Mediators Inflamm* 2015, 248060. [PubMed]
191. Wang J, Guo X, Yu S, Zhang J, Song J, Ji M, Cao Z, Wang J, Liu Y, Dong W, 2014. **MDR1 C3435T polymorphism and inflammatory bowel disease risk: a meta-analysis.** *Molecular biology reports* 41, 2679-2685. [PubMed]
192. **World Health Organization. "BMI Classification". Global Database on Body Mass Index.** [[http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)]
193. Popadic S, Savic E, Markovic M, Ramic Z, Medenica L, Pravica V, Spuran Z, Trajkovic V, Popadic D, 2015. **TNF, IL12B, and IFNG Gene Polymorphisms in Serbian Patients with Psoriasis.** *Annals of dermatology* 27, 128-132. [PubMed]

194. Perovic D, Perovic V, Pravica V, Bonaci-Nikolic B, Mijanovic R, Bunjevacki V, 2016. **Evaluation of cytokine genetic polymorphisms in adult patients with common variable immunodeficiency: A single-center study.** *Immunology letters* 176, 97-104. [[PubMed](#)]
195. Excoffier L, Lischer HE, 2010. **Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.** *Mol Ecol Resour* 10, 564-567. [[PubMed](#)]
196. Popadic S: **Genetski markeri inflamacije kod pacijenata sa psoriasis vulgaris (Doktorska disertacija).** Beograd: Univerzitet u Beogradu; 2014. [[Link](#)]
197. Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Runte M, Epplen JT, 2000. **The IL-10 gene is not involved in the predisposition to inflammatory bowel disease.** *Electrophoresis* 21, 3578-3582. [[PubMed](#)]
198. Cantor MJ, Nickerson P, Bernstein CN, 2005. **The role of cytokine gene polymorphisms in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease.** *Am J Gastroenterol* 100, 1134-1142. [[PubMed](#)]
199. Klausz G, Molnar T, Nagy F, Gyulai Z, Boda K, Lonovics J, Mandi Y, 2005. **Polymorphism of the heat-shock protein gene Hsp70-2, but not polymorphisms of the IL-10 and CD14 genes, is associated with the outcome of Crohn's disease.** *Scand J Gastroenterol* 40, 1197-1204. [[PubMed](#)]
200. Tedde A, Laura Putignano A, Bagnoli S, Congregati C, Milla M, Sorbi S, Genuardi M, Papi L, 2008. **Interleukin-10 promoter polymorphisms influence susceptibility to ulcerative colitis in a gender-specific manner.** *Scand J Gastroenterol* 43, 712-718. [[PubMed](#)]
201. Balding J, Livingstone WJ, Conroy J, Mynett-Johnson L, Weir DG, Mahmud N, Smith OP, 2004. **Inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms.** *Mediators Inflamm* 13, 181-187. [[PubMed](#)]
202. Fernandez L, Martinez A, Mendoza JL, Urcelay E, Fernandez-Arquero M, Garcia-Paredes J, Diaz-Rubio M, de la Concha EG, 2005. **Interleukin-10 polymorphisms in Spanish patients with IBD.** *Inflamm Bowel Dis* 11, 739-743. [[PubMed](#)]
203. Fowler EV, Eri R, Hume G, Johnstone S, Pandeya N, Lincoln D, Templeton D, Radford-Smith GL, 2005. **TNFalpha and IL10 SNPs act together to predict disease behaviour in Crohn's disease.** *Journal of medical genetics* 42, 523-528. [[PubMed](#)]
204. Celik Y, Dagli U, Kilic MY, Toruner M, Ozen SC, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A *et al*, 2006. **Cytokine gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease.** *Scand J Gastroenterol* 41, 559-565. [[PubMed](#)]
205. Garza-Gonzalez E, Perez-Perez GI, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Bosques-Padilla FJ, 2010. **Genetic risk factors for inflammatory bowel disease in a North-eastern Mexican population.** *Int J Immunogenet* 37, 355-359. [[PubMed](#)]
206. Ahirwar DK, Kesarwani P, Singh R, Ghoshal UC, Mittal RD, 2012. **Role of tumor necrosis factor-alpha (C-863A) polymorphism in pathogenesis of**

- inflammatory bowel disease in Northern India.** *J Gastrointest Cancer* 43, 196-204. [PubMed]
207. Amre DK, Mack DR, Morgan K, Israel D, Lambrette P, Costea I, Krupoves A, Fegury H, Dong J, Grimard G *et al*, 2009. **Interleukin 10 (IL-10) gene variants and susceptibility for paediatric onset Crohn's disease.** *Aliment Pharmacol Ther* 29, 1025-1031. [PubMed]
208. Marquez A, Mendoza JL, Taxonera C, Diaz-Rubio M, De La Concha EG, Urcelay E, Martinez A, 2008. **IL23R and IL12B polymorphisms in Spanish IBD patients: no evidence of interaction.** *Inflamm Bowel Dis* 14, 1192-1196. [PubMed]
209. Wang X, Wu T, Zhou F, Liu S, Zhou R, Zhu S, Song L, Zhu F, Wang G, Xia B, 2015. **IL12p40 regulates functional development of human CD4+ T cells: enlightenment by the elevated expressions of IL12p40 in patients with inflammatory bowel diseases.** *Medicine (Baltimore)* 94, e613. [PubMed]
210. Glas J, Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Torok HP, Schmechel S, Tonenchi L, Grassl C, Dambacher J, Pfennig S *et al*, 2007. **rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants.** *PLoS One* 2, e819. [PubMed]
211. Newman WG, Zhang Q, Liu X, Amos CI, Siminovitch KA, 2009. **Genetic variants in IL-23R and ATG16L1 independently predispose to increased susceptibility to Crohn's disease in a Canadian population.** *J Clin Gastroenterol* 43, 444-447. [PubMed]
212. Venegas M, Beltran CJ, Alvarez L, Castro A, Torres T, Leal AD, Lahsen FM, Hermoso MA, Quera R, 2008. **IL-23R Arg381Gln polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease.** *Eur Cytokine Netw* 19, 190-195. [PubMed]
213. Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, D'Inca R, Cucchiara S, Riegler G, Staiano AM, Ardizzone S, Accomando S, de Angelis GL *et al*, 2008. **Replication of interleukin 23 receptor and autophagy-related 16-like 1 association in adult- and pediatric-onset inflammatory bowel disease in Italy.** *World J Gastroenterol* 14, 4643-4651. [PubMed]
214. Lacher M, Schroepf S, Helmbrecht J, von Schweinitz D, Ballauff A, Koch I, Lohse P, Osterrieder S, Kappler R, Koletzko S, 2010. **Association of the interleukin-23 receptor gene variant rs11209026 with Crohn's disease in German children.** *Acta Paediatr* 99, 727-733. [PubMed]
215. Kanaan Z, Ahmad S, Bilchuk N, Vahrenhold C, Pan J, Galandiuk S, 2012. **Perianal Crohn's disease: predictive factors and genotype-phenotype correlations.** *Dig Surg* 29, 107-114. [PubMed]
216. Ho GT, Soranzo N, Nimmo ER, Tenesa A, Goldstein DB, Satsangi J, 2006. **ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach.** *Human molecular genetics* 15, 797-805. [PubMed]

217. Huebner C, Browning BL, Petermann I, Han DY, Philpott M, Barclay M, Gearry R, McCulloch A, Demmers P, Ferguson LR, 2009. **Genetic analysis of MDR1 and inflammatory bowel disease reveals protective effect of heterozygous variants for ulcerative colitis.** *Inflamm Bowel Dis* 15, 1784-1793. [[PubMed](#)]
218. Krupoves A, Seidman EG, Mack D, Israel D, Morgan K, Lambrette P, Costea I, Deslandres C, Grimard G, Law L *et al*, 2009. **Associations between ABCB1/MDR1 gene polymorphisms and Crohn's disease: a gene-wide study in a pediatric population.** *Inflamm Bowel Dis* 15, 900-908. [[PubMed](#)]
219. Juyal G, Midha V, Amre D, Sood A, Seidman E, Thelma BK, 2009. **Associations between common variants in the MDR1 (ABCB1) gene and ulcerative colitis among North Indians.** *Pharmacogenetics and genomics* 19, 77-85. [[PubMed](#)]
220. Milojkovic M, Stojnev S, Jovanovic I, Ljubisavljevic S, Stefanovic V, Sunder-Plassman R, 2011. **Frequency of the C1236T, G2677T/A and C3435T MDR1 gene polymorphisms in the Serbian population.** *Pharmacol Rep* 63, 808-814. [[PubMed](#)]
221. Palmieri O, Latiano A, Valvano R, D'Inca R, Vecchi M, Sturniolo GC, Saibeni S, Bossa F, Latiano T, Devoto M *et al*, 2005. **Multidrug resistance 1 gene polymorphisms are not associated with inflammatory bowel disease and response to therapy in Italian patients.** *Aliment Pharmacol Ther* 22, 1129-1138. [[PubMed](#)]
222. Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A, Fennell J, Drummond H, Mowat C, Arnott ID, Satsangi J, 2005. **Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis.** *Gastroenterology* 128, 288-296. [[PubMed](#)]
223. Urcelay E, Mendoza JL, Martin MC, Mas A, Martinez A, Taxonera C, Fernandez-Arquero M, Diaz-Rubio M, de la Concha EG, 2006. **MDR1 gene: susceptibility in Spanish Crohn's disease and ulcerative colitis patients.** *Inflamm Bowel Dis* 12, 33-37. [[PubMed](#)]
224. Fischer S, Lakatos PL, Hungarian IBD SG, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Szilvasi A, Tulassay Z *et al*, 2007. **ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) variants are not associated with disease susceptibility, disease phenotype response to medical therapy or need for surgery in Hungarian patients with inflammatory bowel diseases.** *Scand J Gastroenterol* 42, 726-733. [[PubMed](#)]
225. Fiedler T, Buning C, Reuter W, Pitre G, Gentz E, Schmidt HH, Buttner J, Ockenga J, Gerloff T, Meisel C *et al*, 2007. **Possible role of MDR1 two-locus genotypes for young-age onset ulcerative colitis but not Crohn's disease.** *Eur J Clin Pharmacol* 63, 917-925. [[PubMed](#)]
226. Sapmaz A, Ozen Karatayli SC, Dagli U, Kilic ZM, Toruner M, Celik Y, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A *et al*, 2008. **Effects of polymorphism in G2677T/A triallelic region of MDR1 gene in Turkish patients with inflammatory bowel disease.** *Turk J Gastroenterol* 19, 168-173. [[PubMed](#)]
227. Brinar M, Cukovic-Cavka S, Bozina N, Ravic KG, Markos P, Ladic A, Cota M, Krznaric Z, Vucelic B, 2013. **MDR1 polymorphisms are associated with**



- inflammatory bowel disease in a cohort of Croatian IBD patients.** *BMC Gastroenterol* 13, 57. [[PubMed](#)]
228. Dudarewicz M, Baranska M, Rychlik-Sych M, Trzcinski R, Dziki A, Skretkowicz J, 2012. **C3435T polymorphism of the ABCB1/MDR1 gene encoding P-glycoprotein in patients with inflammatory bowel disease in a Polish population.** *Pharmacol Rep* 64, 343-350. [[PubMed](#)]
229. Russel MG, Dorant E, Volovics A, Brummer RJ, Pop P, Muris JW, Bos LP, Limonard CB, Stockbrugger RW, 1998. **High incidence of inflammatory bowel disease in The Netherlands: results of a prospective study. The South Limburg IBD Study Group.** *Diseases of the colon and rectum* 41, 33-40. [[PubMed](#)]
230. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A, 2011. **Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases.** *Gastroenterology* 140, 1785-1794. [[PubMed](#)]
231. Levine JS, Burakoff R, 2011. **Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease.** *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 7, 235-241. [[PubMed](#)]
232. Peyrin-Biroulet L, Lemann M, 2011. **Review article: remission rates achievable by current therapies for inflammatory bowel disease.** *Aliment Pharmacol Ther* 33, 870-879. [[PubMed](#)]
233. Strong SA, 2012. **Inflammatory bowel disease surgery in the biologic therapy era.** *Curr Opin Gastroenterol* 28, 349-353. [[PubMed](#)]
234. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ, 1997. **A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group.** *The New England journal of medicine* 337, 1029-1035. [[PubMed](#)]
235. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W *et al*, 2002. **Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial.** *Lancet* 359, 1541-1549. [[PubMed](#)]
236. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, Panaccione R, Wolf D, Pollack P, 2006. **Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial.** *Gastroenterology* 130, 323-333; quiz 591. [[PubMed](#)]
237. Sandborn WJ, Feagan BG, Stoinov S, Honiball PJ, Rutgeerts P, Mason D, Bloomfield R, Schreiber S, Investigators PS, 2007. **Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease.** *The New England journal of medicine* 357, 228-238. [[PubMed](#)]
238. Schreiber S, Khaliq-Kareemi M, Lawrance IC, Thomsen OO, Hanauer SB, McColm J, Bloomfield R, Sandborn WJ, Investigators PS, 2007. **Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease.** *The New England journal of medicine* 357, 239-250. [[PubMed](#)]
239. Lopez-Hernandez R, Valdes M, Campillo JA, Martinez-Garcia P, Salama H, Bolarin JM, Martinez H, Moya-Quiles MR, Minguela A, Sanchez-Torres A *et al*, 2015. **Pro- and anti-inflammatory cytokine gene single-nucleotide**

- polymorphisms in inflammatory bowel disease.** *Int J Immunogenet* 42, 38-45. [PubMed]
240. Martin K, Radlmayr M, Borchers R, Heinzlmann M, Folwaczny C, 2002. **Candidate genes colocalized to linkage regions in inflammatory bowel disease.** *Digestion* 66, 121-126. [PubMed]
241. Louis E, Peeters M, Franchimont D, Seidel L, Fontaine F, Demolin G, Croes F, Dupont P, Davin L, Omri S *et al*, 2000. **Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism in Crohn's disease (CD): influence on disease behaviour?** *Clin Exp Immunol* 119, 64-68. [PubMed]
242. Mittal RD, Manchanda PK, Bid HK, Ghoshal UC, 2007. **Analysis of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in inflammatory bowel disease: study from northern India.** *J Gastroenterol Hepatol* 22, 920-924. [PubMed]
243. Negoro K, Kinouchi Y, Hiwatashi N, Takahashi S, Takagi S, Satoh J, Shimosegawa T, Toyota T, 1999. **Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene.** *Gastroenterology* 117, 1062-1068. [PubMed]
244. van Heel DA, 2002. **Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF-kappaB transcription factors.** *Human molecular genetics* 11, 1281-1289. [PubMed]
245. Zipperlen K, Peddle L, Melay B, Hefferton D, Rahman P, 2005. **Association of TNF-alpha polymorphisms in Crohn disease.** *Hum Immunol* 66, 56-59. [PubMed]
246. Senhaji N, Serrano A, Badre W, Serbati N, Karkouri M, Zaid Y, Nadifi S, Martin J, 2016. **Association of inflammatory cytokine gene polymorphisms with inflammatory bowel disease in a Moroccan cohort.** *Genes and immunity* 17, 60-65. [PubMed]
247. Bank S, Skytt Andersen P, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, Ydegaard Turino S, Brodersen JB, Rashid S, Kaiser Rasmussen B *et al*, 2014. **Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort.** *PLoS One* 9, e98815. [PubMed]
248. Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, Canani RB, D'Inca R, Guariso G, Vieni G, De Venuto D, Riegler G, De'Angelis GL *et al*, 2007. **Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 44, 171-179. [PubMed]
249. Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Fukuda Y, Tamura K *et al*, 2002. **Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively.** *Immunogenetics* 53, 1020-1027. [PubMed]

250. Song Y, Wu KC, Zhang L, Hao ZM, Li HT, Zhang LX, Qiao TD, Li CN, Fan DM, 2005. **Correlation between a gene polymorphism of tumor necrosis factor and inflammatory bowel disease.** *Chin J Dig Dis* 6, 170-174. [[PubMed](#)]
251. Sykora J, Subrt I, Didek P, Siala K, Schwarz J, Machalova V, Varvarovska J, Pazdiora P, Pozler O, Stozicky F, 2006. **Cytokine tumor necrosis factor-alpha A promoter gene polymorphism at position -308 G-->A and pediatric inflammatory bowel disease: implications in ulcerative colitis and Crohn's disease.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 42, 479-487. [[PubMed](#)]
252. Vatay A, Bene L, Kovacs A, Prohaszka Z, Szalai C, Romics L, Fekete B, Karadi I, Fust G, 2003. **Relationship between the tumor necrosis factor alpha polymorphism and the serum C-reactive protein levels in inflammatory bowel disease.** *Immunogenetics* 55, 247-252. [[PubMed](#)]
253. Stankovic B, Dragasevic S, Popovic D, Zukic B, Kotur N, Sokic-Milutinovic A, Alempijevic T, Lukic S, Milosavljevic T, Nikcevic G *et al*, 2015. **Variations in inflammatory genes as molecular markers for prediction of inflammatory bowel disease occurrence.** *J Dig Dis* 16, 723-733. [[PubMed](#)]
254. Ferguson LR, Huebner C, Petermann I, Gearry RB, Barclay ML, Demmers P, McCulloch A, Han DY, 2008. **Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk.** *World J Gastroenterol* 14, 4652-4661. [[PubMed](#)]
255. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG, 2011. **Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease.** *Annual review of immunology* 29, 71-109. [[PubMed](#)]
256. Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP, 2000. **Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies.** *Genes and immunity* 1, 185-190. [[PubMed](#)]
257. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C, 2003. **Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms.** *Transplantation* 75, 711-717. [[PubMed](#)]
258. Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ, O'Brien TR, Vlahov D, Buchbinder S, Giorgi J *et al*, 2000. **Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14467-14472. [[PubMed](#)]
259. Castro-Santos P, Suarez A, Lopez-Rivas L, Mozo L, Gutierrez C, 2006. **TNFalpha and IL-10 gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. Association of -1082 AA low producer IL-10 genotype with steroid dependency.** *Am J Gastroenterol* 101, 1039-1047. [[PubMed](#)]
260. Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW, 2008. **IL4, IL10, IL16, and TNF polymorphisms in New Zealand Caucasian Crohn's disease patients.** *Int J Colorectal Dis* 23, 335-337. [[PubMed](#)]
261. Kim TH, Kim BG, Shin HD, Kim JW, Kim CG, Kim JS, Jung HC, Song IS, 2003. **[Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in**



- Korean patients with inflammatory bowel disease].** *The Korean journal of gastroenterology = Taehan Sohwagi Hakhoe chi* 42, 377-386. [[PubMed](#)]
262. Sanchez R, Levy E, Costea F, Sinnott D, 2009. **IL-10 and TNF-alpha promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location.** *World J Gastroenterol* 15, 3776-3782. [[PubMed](#)]
263. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, Lee JC, Goyette P, Imielinski M, Latiano A *et al*, 2011. **Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47.** *Nat Genet* 43, 246-252. [[PubMed](#)]
264. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees CW, Balschun T, Lee J, Roberts R *et al*, 2010. **Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci.** *Nat Genet* 42, 1118-1125. [[PubMed](#)]
265. Imielinski M, Baldassano RN, Griffiths A, Russell RK, Annesse V, Dubinsky M, Kugathasan S, Bradfield JP, Walters TD, Sleiman P *et al*, 2009. **Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease.** *Nat Genet* 41, 1335-1340. [[PubMed](#)]
266. Festen EA, Stokkers PC, van Diemen CC, van Bodegraven AA, Boezen HM, Crusius BJ, Hommes DW, van der Woude CJ, Balschun T, Verspaget HW *et al*, 2010. **Genetic analysis in a Dutch study sample identifies more ulcerative colitis susceptibility loci and shows their additive role in disease risk.** *Am J Gastroenterol* 105, 395-402. [[PubMed](#)]
267. Juyal G, Prasad P, Senapati S, Midha V, Sood A, Amre D, Juyal RC, Bk T, 2011. **An investigation of genome-wide studies reported susceptibility loci for ulcerative colitis shows limited replication in north Indians.** *PLoS One* 6, e16565. [[PubMed](#)]
268. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M, 2004. **AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings.** *Journal of cell science* 117, 5965-5973. [[PubMed](#)]
269. Tilg H, Ulmer H, Kaser A, Weiss G, 2002. **Role of IL-10 for induction of anemia during inflammation.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 169, 2204-2209. [[PubMed](#)]
270. Groux H, Cottrez F, 2003. **The complex role of interleukin-10 in autoimmunity.** *Journal of autoimmunity* 20, 281-285. [[PubMed](#)]
271. Tilg H, van Montfrans C, van den Ende A, Kaser A, van Deventer SJ, Schreiber S, Gregor M, Ludwiczek O, Rutgeerts P, Gasche C *et al*, 2002. **Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma.** *Gut* 50, 191-195. [[PubMed](#)]
272. Moon CM, Shin DJ, Son NH, Shin ES, Hong SP, Kim TI, Kim WH, Cheon JH, 2013. **Genetic variants in the IL12B gene are associated with inflammatory bowel diseases in the Korean population.** *J Gastroenterol Hepatol* 28, 1588-1594. [[PubMed](#)]
273. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Beccchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S, 1997. **Type 1 T-helper cell**

- predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease.** *Am J Pathol* 150, 823-832. [[PubMed](#)]
274. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y, 2003. **Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease.** *Gut* 52, 65-70. [[PubMed](#)]
275. Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Del Vecchio Blanco G, Caruso R, Tersigni R, Alessandrini L, Biancone L, Naccari GC *et al*, 2005. **Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease.** *Gastroenterology* 128, 687-694. [[PubMed](#)]
276. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W, 1995. **Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice.** *J Exp Med* 182, 1281-1290. [[PubMed](#)]
277. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ, 2006. **Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation.** *J Exp Med* 203, 2473-2483. [[PubMed](#)]
278. Yamazaki K, Takahashi A, Takazoe M, Kubo M, Onouchi Y, Fujino A, Kamatani N, Nakamura Y, Hata A, 2009. **Positive association of genetic variants in the upstream region of NKX2-3 with Crohn's disease in Japanese patients.** *Gut* 58, 228-232. [[PubMed](#)]
279. Peter I, Mitchell AA, Ozelius L, Erazo M, Hu J, Doheny D, Abreu MT, Present DH, Ullman T, Benkov K *et al*, 2011. **Evaluation of 22 genetic variants with Crohn's disease risk in the Ashkenazi Jewish population: a case-control study.** *BMC Med Genet* 12, 63. [[PubMed](#)]
280. Torkvist L, Halfvarson J, Ong RT, Lordal M, Sjoqvist U, Bresso F, Bjork J, Befrits R, Lofberg R, Blom J *et al*, 2010. **Analysis of 39 Crohn's disease risk loci in Swedish inflammatory bowel disease patients.** *Inflamm Bowel Dis* 16, 907-909. [[PubMed](#)]
281. Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, Thompson C, Joyce-Shaikh B, Stepankova R, Robinson N, Buonocore S, Tlaskalova-Hogenova H, Cua DJ *et al*, 2006. **Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology.** *Immunity* 25, 309-318. [[PubMed](#)]
282. Abdollahi E, Tavasolian F, Momtazi-Borojeni AA, Samadi M, Rafatpanah H, 2016. **Protective role of R381Q (rs11209026) polymorphism in IL-23R gene in immune-mediated diseases: A comprehensive review.** *J Immunotoxicol* 13, 286-300. [[PubMed](#)]
283. Capon F, Di Meglio P, Szaub J, Prescott NJ, Dunster C, Baumber L, Timms K, Gutin A, Abkevic V, Burden AD *et al*, 2007. **Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis.** *Hum Genet* 122, 201-206. [[PubMed](#)]
284. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, 2007. **T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity.** *Nat Immunol* 8, 345-350. [[PubMed](#)]
285. Kim HR, Kim HS, Park MK, Cho ML, Lee SH, Kim HY, 2007. **The clinical role of IL-23p19 in patients with rheumatoid arthritis.** *Scand J Rheumatol* 36, 259-264. [[PubMed](#)]

286. Guan Q, Ma Y, Aboud L, Weiss CR, Qing G, Warrington RJ, Peng Z, 2012. **Targeting IL-23 by employing a p40 peptide-based vaccine ameliorates murine allergic skin and airway inflammation.** *Clin Exp Allergy* 42, 1397-1405. [[PubMed](#)]
287. Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Marth T, Zeuzem S, Meuer SC, Stallmach A, 2005. **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* 11, 16-23. [[PubMed](#)]
288. Becker C, Dornhoff H, Neufert C, Fantini MC, Wirtz S, Huebner S, Nikolaev A, Lehr HA, Murphy AJ, Valenzuela DM *et al*, 2006. **Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 177, 2760-2764. [[PubMed](#)]
289. Sivanesan D, Beauchamp C, Quinou C, Lee J, Lesage S, Chemtob S, Rioux JD, Michnick SW, 2016. **IL23R (Interleukin 23 Receptor) Variants Protective against Inflammatory Bowel Diseases (IBD) Display Loss of Function due to Impaired Protein Stability and Intracellular Trafficking.** *J Biol Chem* 291, 8673-8685. [[PubMed](#)]
290. Dubinsky MC, Wang D, Picornell Y, Wrobel I, Katzir L, Quiros A, Dutridge D, Wahbeh G, Silber G, Bahar R *et al*, 2007. **IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease.** *Inflamm Bowel Dis* 13, 511-515. [[PubMed](#)]
291. Wellcome Trust Case Control C, 2007. **Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls.** *Nature* 447, 661-678. [[PubMed](#)]
292. Pidasheva S, Trifari S, Phillips A, Hackney JA, Ma Y, Smith A, Sohn SJ, Spits H, Little RD, Behrens TW *et al*, 2011. **Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q.** *PLoS One* 6, e25038. [[PubMed](#)]
293. Di Meglio P, Di Cesare A, Laggner U, Chu CC, Napolitano L, Villanova F, Tosi I, Capon F, Trembath RC, Peris K *et al*, 2011. **The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans.** *PLoS One* 6, e17160. [[PubMed](#)]
294. Roberts RL, Geary RB, Hollis-Moffatt JE, Miller AL, Reid J, Abkevich V, Timms KM, Gutin A, Lanchbury JS, Merriman TR *et al*, 2007. **IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease.** *Am J Gastroenterol* 102, 2754-2761. [[PubMed](#)]
295. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Drummond HE, Smith L, Davies G, Anderson NH, Gillett PM, McGrogan P, Hassan K *et al*, 2007. **IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland.** *Gut* 56, 1173-1174. [[PubMed](#)]
296. Taylor KD, Targan SR, Mei L, Ippoliti AF, McGovern D, Mengesha E, King L, Rotter JI, 2008. **IL23R haplotypes provide a large population attributable risk for Crohn's disease.** *Inflamm Bowel Dis* 14, 1185-1191. [[PubMed](#)]

297. Cummings JR, Ahmad T, Geremia A, Beckly J, Cooney R, Hancock L, Pathan S, Guo C, Cardon LR, Jewell DP, 2007. **Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype.** *Inflamm Bowel Dis* 13, 1063-1068. [[PubMed](#)]
298. Lin Z, Poritz L, Franke A, Li TY, Ruether A, Byrnes KA, Wang Y, Gebhard AW, MacNeill C, Thomas NJ *et al*, 2010. **Genetic association of nonsynonymous variants of the IL23R with familial and sporadic inflammatory bowel disease in women.** *Dig Dis Sci* 55, 739-746. [[PubMed](#)]
299. Libioulle C, Louis E, Hansoul S, Sandor C, Farnir F, Franchimont D, Vermeire S, Dewit O, de Vos M, Dixon A *et al*, 2007. **Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4.** *PLoS Genet* 3, e58. [[PubMed](#)]
300. Oliver J, Rueda B, Lopez-Nevot MA, Gomez-Garcia M, Martin J, 2007. **Replication of an association between IL23R gene polymorphism with inflammatory bowel disease.** *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 5, 977-981, 981 e971-972. [[PubMed](#)]
301. Baptista ML, Amarante H, Picheth G, Sdepanian VL, Peterson N, Babasukumar U, Lima HC, Kugathasan S, 2008. **CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population.** *Inflamm Bowel Dis* 14, 674-679. [[PubMed](#)]
302. Lappalainen M, Halme L, Turunen U, Saavalainen P, Einarsdottir E, Farkkila M, Kontula K, Paavola-Sakki P, 2008. **Association of IL23R, TNFRSF1A, and HLA-DRB1\*0103 allele variants with inflammatory bowel disease phenotypes in the Finnish population.** *Inflamm Bowel Dis* 14, 1118-1124. [[PubMed](#)]
303. Okazaki T, Wang MH, Rawsthorne P, Sargent M, Datta LW, Shugart YY, Bernstein CN, Brant SR, 2008. **Contributions of IBD5, IL23R, ATG16L1, and NOD2 to Crohn's disease risk in a population-based case-control study: evidence of gene-gene interactions.** *Inflamm Bowel Dis* 14, 1528-1541. [[PubMed](#)]
304. Ballester V, Guo X, Vendrell R, Haritunians T, Klomhaus AM, Li D, McGovern DP, Rotter JI, Torres EA, Taylor KD, 2014. **Association of NOD2 and IL23R with inflammatory bowel disease in Puerto Rico.** *PLoS One* 9, e108204. [[PubMed](#)]
305. Yu P, Shen F, Zhang X, Cao R, Zhao X, Liu P, Tu H, Yang X, Shi R, Zhang H, 2012. **Association of single nucleotide polymorphisms of IL23R and IL17 with ulcerative colitis risk in a Chinese Han population.** *PLoS One* 7, e44380. [[PubMed](#)]
306. Farnood A, Naderi N, Moghaddam SJ, Noorinayer B, Firouzi F, Aghazadeh R, daryani NE, Zali MR, 2007. **The frequency of C3435T MDR1 gene polymorphism in Iranian patients with ulcerative colitis.** *Int J Colorectal Dis* 22, 999-1003. [[PubMed](#)]
307. Glas J, Torok HP, Schiemann U, Folwaczny C, 2004. **MDR1 gene polymorphism in ulcerative colitis.** *Gastroenterology* 126, 367. [[PubMed](#)]

308. Osuga T, Sakaeda T, Nakamura T, Yamada T, Koyama T, Tamura T, Aoyama N, Okamura N, Kasuga M, Okumura K, 2006. **MDR1 C3435T polymorphism is predictive of later onset of ulcerative colitis in Japanese.** *Biol Pharm Bull* 29, 324-329. [[PubMed](#)]
309. Croucher PJ, Mascheretti S, Foelsch UR, Hampe J, Schreiber S, 2003. **Lack of association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and inflammatory bowel disease in two independent Northern European populations.** *Gastroenterology* 125, 1919-1920; author reply 1920-1911. [[PubMed](#)]
310. Gazouli M, Zacharatos P, Gorgoulis V, Mantzaris G, Papalambros E, Ikononopoulos I, 2004. **The C3435T MDR1 gene polymorphism is not associated with susceptibility for ulcerative colitis in a Greek population.** *Gastroenterology* 126, 367-369. [[PubMed](#)]
311. Oostenbrug LE, Dijkstra G, Nolte IM, van Dullemen HM, Oosterom E, Faber KN, de Jong DJ, van der Linde K, te Meerman GJ, van der Steege G *et al*, 2006. **Absence of association between the multidrug resistance (MDR1) gene and inflammatory bowel disease.** *Scand J Gastroenterol* 41, 1174-1182. [[PubMed](#)]
312. Lee BI, Choi KY, Lee KM, Chung WC, Kim BW, Choi H, Cho SH, Kang HJ, Lee JS, Kim MS *et al*, 2006. **[Is C3435T polymorphism of MDR1 related to inflammatory bowel disease or colorectal cancer in Korean?].** *The Korean journal of gastroenterology = Taehan Sohwagi Hakhoe chi* 47, 22-29. [[PubMed](#)]
313. Ardizzone S, Maconi G, Bianchi V, Russo A, Colombo E, Cassinotti A, Penati C, Tenchini ML, Bianchi Porro G, 2007. **Multidrug resistance 1 gene polymorphism and susceptibility to inflammatory bowel disease.** *Inflamm Bowel Dis* 13, 516-523. [[PubMed](#)]
314. Ostergaard M, Ernst A, Labouriau R, Dagiliene E, Krarup HB, Christensen M, Thorsgaard N, Jacobsen BA, Tage-Jensen U, Overvad K *et al*, 2009. **Cyclooxygenase-2, multidrug resistance 1, and breast cancer resistance protein gene polymorphisms and inflammatory bowel disease in the Danish population.** *Scand J Gastroenterol* 44, 65-73. [[PubMed](#)]
315. Bonyadi MJ, Gerami SM, Somi MH, Khoshbaten M, 2013. **Effect of the C3435T polymorphism of the multidrug resistance 1 gene on the severity of inflammatory bowel disease in Iranian Azeri Turks.** *Saudi J Gastroenterol* 19, 172-176. [[PubMed](#)]
316. Cao Y, Qu C, Chen Y, Li L, Wang X, 2015. **Association of ABCB1 polymorphisms and ulcerative colitis susceptibility.** *International journal of clinical and experimental pathology* 8, 943-947. [[PubMed](#)]
317. Yang QF, Chen BL, Zhang QS, Zhu ZH, Hu B, He Y, Gao X, Wang YM, Hu PJ, Chen MH *et al*, 2015. **Contribution of MDR1 gene polymorphisms on IBD predisposition and response to glucocorticoids in IBD in a Chinese population.** *J Dig Dis* 16, 22-30. [[PubMed](#)]
318. Potocnik U, Ferkolj I, Glavac D, Dean M, 2004. **Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis.** *Genes and immunity* 5, 530-539. [[PubMed](#)]

319. Lal S, Stempak JM, Law C, Elkadri AA, Steinhart AH, Silverberg MS, 2006. **Association between the C3435T polymorphism of the MDR1 gene and Crohn's disease.** *Inflamm Bowel Dis* 12, 1006-1007. [[PubMed](#)]
320. Farrell RJ, Murphy A, Long A, Donnelly S, Chirikuri A, O'Toole D, Mahmud N, Keeling PW, Weir DG, Kelleher D, 2000. **High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy.** *Gastroenterology* 118, 279-288. [[PubMed](#)]
321. Carvalho AT, Froes RS, Esberard BC, Santos JC, Rapozo DC, Grinman AB, Simao TA, Nicolau Neto P, Luiz RR, Carneiro AJ *et al*, 2014. **Multidrug resistance 1 gene polymorphisms may determine Crohn's disease behavior in patients from Rio de Janeiro.** *Clinics (Sao Paulo)* 69, 327-334. [[PubMed](#)]



## LISTA SKRAĆENICA

- A – Nukleotidna baza adenin
- ADA – Adalimumab
- AP-1 – Aktivatorski protein 1 (*engl.* Activator protein 1)
- APĆ – Antigen-prezentujuća ćelija
- AZA – Azatioprin
- BMI – Indeks telesne mase (*engl.* Body mass index)
- C – Nukleotidna baza citozin
- CDAI – Indeks aktivnosti Kronove bolesti (*engl.* Crohn's disease activity index)
- CRP – C-reaktivni protein
- CT – Kompjuterizovana tomografija
- DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina
- EDTA – Etilendiamin tetrasirćetna kiselina
- EIM – Ekstracrevne manifestacije
- ETS – Familija transkripcionih faktora (*engl.* E26 transformation-specific family)
- G – Nukleotidna baza guanin
- GALT – Imunski sistem mukoze creva (*engl.* gut-associated lymphoid tissue)
- GIT – Gastrointestinalni trakt
- GM-CSF – Faktor stimulacije kolonija granulocita i monocita
- GWAS – Studija ispitivanja polimorfizama gena u celokupnom genomu (*engl.* Genome-wide association study)
- HLA – Humani leukocitni antigen
- HWE – Hardy-Weinberg-ova ravnoteža (*engl.* Hardy-Weinberg equilibrium)
- IBC – Inflamatorna bolest creva
- IEĆ – Intestinalne epitelne ćelije
- IFN- $\gamma$  – Interferon- $\gamma$
- IFX – Infliksimab
- Ig – Imunoglobulin
- IL – Interleukin
- IL10* – Gen za interleukin-10
- IL12B* – Gen za IL12B (p40)
- IL-1Ra – Antagonista receptora za IL-1 (*engl.* IL-1 receptor antagonist)

*IL23R* – Gen za IL-23R  
IL-23R – Receptor za interleukin-23  
ILC – Urođene limoidne ćelije (*engl.* Innate lymphoid cells)  
iNKT – Nepromjenjive NKT ćelije (*engl.* Invariant NKT cells)  
IPAA – Ileo-pauč-analna anastomoza  
JAK – Enzim Janus kinaza  
KB – Kronova bolest  
KS – Kortikosteroid(i)  
LD – Vezana neravnoteža (*engl.* Linkage disequilibrium)  
LPAM-1 – Adhezivni molekul (*engl.* Lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule 1)  
LT- $\alpha$  – Limfotoksin- $\alpha$   
MAdCAM-1 – Adhezivni molekul (*engl.* Mucosal addressin cell adhesion molecule 1)  
MAF – Učestalost minornog alela (*engl.* Minor allele frequency)  
MALT – Mukozni imunski sistem čoveka (*engl.* Mucosa-associated lymphoid tissue)  
mAt – Monoklonsko antitelo  
*MDR1* – *MDR1* gen (*engl.* Multidrug resistance 1)  
MHC – Glavni kompleks tkivne podudarnosti (*engl.* Major histocompatibility complex)  
MP – Merkaptopurin  
MR – Magnetna rezonanca  
MTX – Metotreksat  
NF- $\kappa$ B – Nuklearni faktor  $\kappa$ B  
N-IBC – Neklasifikovana IBC  
NK ćelije – Urođenoubilačke ćelije (*engl.* Natural killer cells)  
NLR – Receptori slični NOD-u (*engl.* NOD-like receptors)  
NOD – NOD receptor za prepoznavanje obrazaca (*engl.* Nucleotide-binding oligomerization domain)  
PAMP – Molekularni obrazac patogena (*engl.* Pathogen-associated molecular pattern)  
PCR – Reakcija lančane polimerizacije (*engl.* Polymerase chain reaction)  
P-gp – P-glikoprotein  
PML – Progresivna multifokalna leukoencefalopatija  
PRR – Receptori za prepoznavanje obrazaca (*engl.* Pattern recognition receptors)  
SE – Brzina sedimentacije eritrocita u prvom satu  
SNP – Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (*engl.* Single nucleotide polymorphism)  
Sp-1 – Specifični protein 1 (*engl.* Specificity protein-1)



T – Nukleotidna baza timin

TCR – T-ćelijski receptor

TGF- $\beta$  – Faktor transformacije rasta  $\beta$  (*engl.* Transforming growth factor beta)

Th – Pomoćnička T-ćelija (*engl.* T helper cell)

TLR – Receptori slični Tollu (*engl.* Toll-like receptors)

TM – Telesna masa

*TNFA* – Gen za TNF

TNF – Faktor nekroze tumora (*engl.* Tumor necrosis factor)

Treg – Regulatorna T-ćelija

UK – Ulcerozni kolitis

USF – Ushodni stimulativni faktor (*engl.* Upstream stimulatory factor)

## **BIOGRAFIJA**

**Mr. sci. med. dr Dragana Mijač**

### **Osnovni biografski podaci**

Rođena sam 17.10.1974. godine u Beogradu. Doktor sam medicine, specijalista interne medicine, magistar medicinskih nauka, specijalista gastroenterohepatologije i klinički asistent za užu naučnu oblast Interna medicina. Zaposlena sam u Klinici za gastroenterologiju, Kliničkog centra Srbije od 2000. godine.

### **Stručna biografija, diplome i zvanja**

Osnovnu školu i gimnaziju završila sam u Beogradu sa odličnim uspehom i Vukovom diplomom. Upisala sam Medicinski fakultet u Beogradu 1993. i diplomirala 1999. godine, sa prosečnom ocenom 9,97. Poslediplomske studije (magisterijum) na Medicinskom fakultetu u Beogradu iz digestivnih bolesti upisala sam 2000. godine i 14.7.2008. godine odbranila sam magistarsku tezu pod nazivom „Procena nutritivnog statusa kod bolesnika sa inflamatornom bolesti creva“ pred komisijom u sastavu Prof. dr Miodrag Krstić, Prof. dr Njegica Jojić i Prof. dr Jagoda Jorga, a 15.06.2011. godine i rad iz uže specijalizacije iz gastroenterohepatologije pod nazivom „Značaj kliničkih, laboratorijskih i endoskopskih pokazatelja aktivnosti bolesti kod bolesnika sa inflamatornom bolesti creva“ pred komisijom u sastavu Prof. dr Miodrag Krstić, Prof. dr Dragan Tomić i Prof. dr Goran Janković. Mentor oba rada bio je Prof. dr Goran Janković.

U periodu od 2001-2006. godine obavila sam specijalistički staž iz interne medicine i 04.07.2006. godine položila specijalistički ispit sa odličnim uspehom pred komisijom Medicinskog fakulteta u Beogradu. Takođe sam u periodu specijalističkog staža obavila deo prakse na odeljenju gastroenterologije, New Haven YALE University Hospital, New Haven, SAD u periodu od 4 meseca 2003. godine.

Izabrana sam u zvanje kliničkog asistenta za užu naučnu oblast Interna medicina (gastroenterologija) na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu dana 17.11.2011. godine.

Autor sam i koautor više radova objavljenih u celini u domaćim i međunarodnim časopisima, kao i većeg broja saopštenja na stručnim kongresima u zemlji i inostranstvu.

Mr. sci. med. dr Dragana Mijač

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a \_\_\_\_\_ Dragana Mijač \_\_\_\_\_

broj upisa \_\_\_\_\_ 61206-5683/4-14 \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

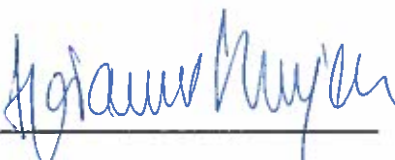
da je doktorska disertacija pod naslovom

„Značaj polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u inflamatornoj bolesti 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 doktoranda**

U Beogradu, 15.07.2016.

  
\_\_\_\_\_

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Dragana Mijač

Broj upisa 61206-5683/4-14

Naslov rada „Značaj polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u inflamatornoj bolesti creva“

Mentor Prof. dr Miloš Marković

Komentor Prof. dr Đorđe Čulafić

Potpisani Dragana Mijač

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 doktoranda**

U Beogradu, 15.07.2016.



**Prilog 3.**

## **Izjava o korišćenju**

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

„Značaj polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u inflamatornoj bolesti 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 poleđini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 15.07.2016.

