

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Borivoj D. Bijelić

**SPECIFIČNOSTI HUMORALNE
IMUNOSTI KOD OBOLELIH OD
REKURENTNIH ORALNIH ULCERACIJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF DENTAL MEDICINE

Borivoj D. Bijelić

**SPECIFICITY OF HUMORAL IMMUNE
RESPONSES IN PATIENTS WITH
RECURRENT ORAL ULCERATIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

MENTOR:

Prof. dr Ljiljana Janković

Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR:

dr sci. med. Slađana Andrejević

viši naučni saradnik
Klinika za alergologiju i imunologiju
Klinički centar Srbije

KOMISIJA ZA ODBRANU ZAVRŠENE DOKTORSKE DOKUMENTACIJE

Prof. dr Saša Čakić

Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Miloš Hadži Mihajlović

Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Irina Besu, naučni saradnik

Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

ZAHVALNOST

Mentoru – osobi koja me je učila, savetovala, usmeravala, znala da sasluša i trpela moje nestašluke svih ovih godina, veliko hvala.

Komentoru – za to što ste mi dali veru, znanje i što ste mi pokazali da sve može i drugačije, veliko hvala.

Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja – istraživanje je sprovedeno u okviru projekta ministarstva pod nazivom „*Modifikatori biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima*“. Posebnu zahvalnost dugujem nosiocu projekta.

Članovima stručne komisije – na svim korisnim savetima i trudu da unaprede kvalitet mog istraživanja.

Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu – hvala svim dragim ljudima za bezrezervnu podršku, druženje i sve ove divne godine.

Fakultetu medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu – zahvalan sam ustanovi u kojoj radim, prodekanu za stomatologiju i svim kolegama i prijateljima koji su prepoznali važnost ovog rada za mene i svesrdno mi pomagali u realizaciji istog.

Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije – hvala vam na korisnim savetima i ogromnom trudu da se istraživanje kvalitetno sprovede.

Klinici za alergologiju i imunologiju Kliničkog centra Srbije – zahvalnost dugujem svim zaposlenima koji su uložili vreme i trud kako bi se laboratorijske procedure uspešno realizovale.

Doktorat posvećujem svojim roditeljima u znak zahvalnosti za svu pomoć, ljubav i podršku svih ovih godina...

SPECIFIČNOSTI HUMORALNE IMUNOSTI KOD OBOLELIH OD REKURENTNIH ORALNIH ULCERACIJA

REZIME

UVOD. Humoralni imunitet predstavlja deo adaptivnog imunskog odgovora i sačinjavaju ga prevashodno B limfociti, čijom aktivacijom nastaju plazmociti, sposobni da produkuju antitela koja ujedno predstavljaju osnovni efektorski mehanizam humoralnog imuniteta. Poremećaj u produkciji antitela uočen je kod pacijenata sa različitim imuno-inflamatornim stanjima, u koja se svrstavaju i rekurentne oralne ulceracije (ROU), gluten senzitivna enteropatija (GSE) i inflamatorne bolesti creva (IBC). Rekurentne oralne ulceracije predstavljaju inflamatorno oboljenje koje se karakteriše pojavom ponavljanih epizoda solitarnih ili multiplih, bolnih ulceracija oralne sluzokože. One se javljaju u oko 20% opšte populacije. Precizna etiologija rekurentnih oralnih ulceracija je i dalje nepoznata, ali je dokazano da brojni etiološki faktori u koje se svrstavaju nasleđe, stres, trauma, preosetljivost na komponente hrane, nutritivni deficit i hormonski disbalans imaju značajnu ulogu u njihovom nastanku. Gluten senzitivna enteropatija ili celijakna bolest (CD) je imuno-posredovano oboljenje koje se javlja kod genetski predisponiranih osoba, izazvano unosom glutena, proteina koji se nalazi u mnogim žitaricama. Klinički se ispoljava klasičnim gastrointestinalnim simptomima, ali se može javiti i kao atipična, pritajena ili latentna forma kada je postavljanje dijagnoze GSE značajno otežano. Poslednjih godina, značajnu ulogu u dijagnostici imaju i antitela specifična za GSE kao što su antitela na nativni glijadin (GL), antitela specifična za tkivnu transglutaminazu (tTG), antitela specifična za deaminirane glijadinske peptide (DGP) i antitela specifična za fuzione peptide, glijadinske analoge (GAF-3X). Inflamatorne bolesti creva su imunski-posredovana, hronična, recidivirajuća oboljenja predstavljena kroz dve osnovne kliničke forme: Kronovu bolest (KB) i ulcerozni kolitis (UK). Pacijenti oboleli od IBC mogu imati širok spektar vancrevnih simptoma među koje se svrstavaju i oralne ulceracije. Kao pomoćni markeri u dijagnostici IBC koriste se antitela specifična za *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) i antitela specifična za citoplazmatske antigene neutrofilnih leukocita (ANCA). Poremećaji oralne tolerancije, mukoznog imuniteta i funkcionalnosti epitelne barijere se

nalaze u etiopatogenezi GSE, IBC, preosetljivosti na pojedine antigene hrane, a takođe mogu posredovati i u nastanku ROU. Imajući u vidu složenu imuno etiopatogenezu ROU, koja nije sasvim razjašnjena, kao ni povezanost ROU sa GSE i IBC, opravdano je sprovesti studiju koja bi ispitala prisustvo i koncentracije seroloških markera kod pacijenata sa ROU.

PACIJENTI I METODE. Istraživanje je podeljeno na klinički i laboratorijski deo. Eksperimentalnu grupu je sačinjavalo 73 odrasla pacijenta Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta u Beogradu koji su imali učestale epizode ROU. Kod svih pacijenata je na osnovu prihvaćenih kriterijuma postavljena dijagnoza afti minor kao jedne bitne podgrupe ROU. Kontrolnu grupu činilo je 89 zdravih ispitanika, koji nisu imali kliničke znakove rekurentnih oralnih ulceracija, niti su imali gastrointestinalne i alergijske tegobe. Klinički deo istraživanja je obuhvatao anamnezu i stomatološki pregled. Laboratorijskim ispitivanjima detektovana su prevalenca i koncentracija antitela visokospecifičnih za GSE (antitela protiv tkivne transglutaminaze, deaminiranog glijadina i fuzionih glijadinskih analoga) u serumu pacijenata sa ROU i kontrolnoj grupi primenom ELISA (engl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) testa. Antitela povezana sa IBC određivana su ELISA metodom (ASCA), odnosno metodom indirektno imunofluorescencije (IIF) kada su u pitanju ANCA. Takođe, analizirano je prisustvo antitela specifičnih za glijadin (GL) i ukupne proteine kravljeg mleka (CMP) IgM, IgG, IgA i IgE klase u serumu pacijenata sa ROU i kontrolnoj grupi. Svi prikupljeni rezultati su obrađeni odgovarajućim statističkim analizama.

REZULTATI. Analizirajući prikupljene podatke, utvrdili smo da je kod 79.5% pacijenata sa ROU na kliničkom pregledu evidentirano dve ili više ulceracija, da se kod 80.8% pacijenata u eksperimentalnoj grupi nove ulceracije pojavljuju više od 6 puta godišnje, kao i da prosečno vreme zarastanja ulceracija kod većine pacijenata (71.2%) iznosi više od 7 dana. IgA ili IgG anti-tTG seropozitivnost je bila prisutna kod 1.8%, dok je povišena koncentracija anti-GAF-3X detektovana kod 3.6% pacijenata u eksperimentalnoj grupi što nije bilo statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu. Seropozitivnost za IgA i/ili IgG anti-DGP utvrđena je kod 19.6% pacijanata sa ROU nasuprot 8.3% IgA-DGP i 13.3% IgG-DGP osoba u kontrolnoj grupi što takođe nije bilo

statistički značajno. Prevalenca IgA ASCA seropozitivnosti se nije značajno razlikovala između grupa (7.5% naspram 3.3%). Nasuprot tome prevalenca IgG ASCA seropozitivnosti je bila značajno viša u eksperimentalnoj grupi ($p=0.009$). Prevalenca ANCA se nije statistički značajno razlikovala između eksperimentalne i kontrolne grupe. Utvrđeno je da su koncentracije IgA i IgG anti-tTG kao i IgA anti-GAF antitela značajno više kod pacijenata sa ROU u poređenju sa kontrolnom grupom (Mann-Whitney test, $p=0.002$, $p=0.008$ i $p=0.04$). Takođe, uočena je značajno viša koncentracija IgG ASCA u eksperimentalnoj grupi (Mann-Whitney test, $p=0.005$). Serumaska imunoreaktivnost na nativni glijadin IgG tipa bila je značajno viša u grupi pacijenata sa ROU u poređenju sa kontrolnom grupom (Mann-Whitney test; $p<0.0001$). Nasuprot tome, evidentirana je značajno viša koncentracija IgM antitela specifičnih za glijadin u kontrolnoj grupi (Mann-Whitney test, $p<0.005$). Kada su u pitanju ukupni proteini kravljeg mleka detektovana je statistički značajno viša seropozitivnost IgA, IgG i IgE tipa u eksperimentalnoj u poređenju sa kontrolnom grupom (Mann-Whitney test; $p<0.0001$ za sva tri tipa).

ZAKLJUČAK. Poremećaj funkcije oralne mukoze i izloženost različitim antigenima može da bude razlog gubitka imunske tolerancije i povišene produkcije autoantitela. Čini se da su antitela pre markeri izmenjenog imunskog odgovora nego primarni etiološki faktor u nastanku ROU. Kod teških kliničkih formi ROU, refrakternih na standardnu terapiju, indikovano je uputiti pacijenta na dalja ispitivanja u smislu seroloških markera GSE i IBC, kao i preosetljivosti na proteine hrane, pre svega na mleko i glijadin.

Ključne reči: rekurentne oralne ulceracije, afte, glutensenzitivna enteropatija, inflamatorne bolesti creva, autoantitela, proteini hrane.

Naučna oblast: Stomatološke nauke

Uža naučna oblast: Oralna medicina

UDK: 616.31-002.44:577.27(043.3)

SPECIFICITY OF HUMORAL IMMUNE RESPONSES IN PATIENTS WITH RECURRENT ORAL ULCERATIONS

ABSTRACT

INTRODUCTION. Humoral immunity as a part of an adaptive immune response is primarily represented by B lymphocytes which differentiate into plasma cells, able to secrete antibodies, which are basic effector mechanism of humoral immunity. Alterations in antibody production has been observed in patients with different immune-inflammatory conditions including recurrent oral ulcerations (ROU), gluten sensitive enteropathy (GSE) and inflammatory bowel disease (IBD). Recurrent oral ulcerations represents an inflammatory disease characterized by appearance of repeated episodes of solitary or multiple painfully ulcerations of oral mucosa, affecting about 20% of the general population. Precise etiology of recurrent oral ulcerations is still unknown but it is proven that numerous etiological factors like heritage, stress, trauma, hypersensitivity to the food components, nutritional deficiency and hormonal imbalance, have important role in their occurrence. Gluten sensitive enteropathy or celiac disease (CeD) is a chronic small intestinal immune-mediated enteropathy precipitated by exposure to dietary gluten in genetically predisposed individuals. GSE can be presented with classical gastrointestinal symptoms but also as an atypical, silent and latent form with a wide spectrum of non-gastrointestinal symptoms. In recent years, antibodies against native gliadin (GL), tissue transglutaminase (tTG), deaminated gliadin peptides (DGP) and deaminated gliadin analogous fragments (GAF) play a key role in early diagnosis. Inflammatory bowel diseases (IBD) including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are chronic inflammatory diseases with primary intestinal involvement. IBD patients may exhibit a wide range of non-intestinal signs and symptoms, among which ROU is classified as well. Serologic markers for UC and CD are antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and antibodies against *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) respectively. Modifications in oral tolerance, mucosal immunity and in epithelial barrier functionality observed in GSE, IBC and food allergens hypersensitivity, could also influence occurrence of ROU. Based on the presumed

common etiopathogenesis of ROU, GSE and IBD which includes dysregulated mucosal immunity, the aim of our study was to investigate the presence and concentrations of new and accepted GSE-specific and IBD-related serologic markers in patients with ROU free of gastrointestinal symptoms.

PATIENTS AND METHODS. The study was divided in two parts: clinical and laboratory. Experimental group comprised 73 adult patients consecutively referred to the Clinic for periodontology and oral medicine, School of Dental Medicine, University of Belgrade who had frequent episodes of ROU. All patients were diagnosed with *Aphthae minor* as one of the most important ROU subgroup based on the accepted criteria. Control group consisted of 89 healthy adult subjects without clinical signs of recurrent oral ulceration, gastrointestinal or allergic symptoms. Clinical investigations included anamnesis and dental examinations. Laboratory analysis were performed in order to detect prevalence and concentrations of serum antibodies highly specific for GSE (antibodies against tTG, DGP and GAF) in a group of ROU patients and controls using the ELISA method (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay). Antibodies associated with IBC were determined by ELISA (ASCA) and indirectly immunofluorescence (IIF) method (ANCA). Also, we analyzed the presence of antibodies (IgM, IgG, IgA and IgE) specific for native gliadin (GL) and total cow's milk protein (CMP) in sera of ROU patients and controls. Data were analyzed using corresponding statistic methods.

RESULTS. Results obtained by clinical examinations revealed that two or more ulcerations were detected in 79.5% of the ROU patients. Also, in 80.8% of patients recurrence rate of ROU was higher than six time per year. Moreover, an average ulceration healing time was longer than seven days for the most of the patients (71.2%). Seropositivity for IgA or IgG anti-tTG was detected in 1.8% and anti-GAF-3X IgA in 3.6% of ROU patients which did not differ significantly comparing to control group. Seropositivity for IgA and/or IgG anti-DGP was found in 19.6% ROU patients comparing to 8.3% IgA-DGP and 13.3% IgG-DGP patients in control group which was also statistically insignificant. Prevalence of IgG ASCA was significantly higher in experimental group ($p=0.009$). Also, there was no difference in prevalence of ANCA

between experimental and control group. However, concentrations of IgA and IgG anti-tTG and also IgA anti-GAF antibodies were found to be significantly higher in ROU patients compared to control group (Mann-Whitney test, $p=0.002$, $p=0.008$ and $p=0.04$, respectively). Furthermore, significantly higher concentrations of IgG ASCA were found in experimental group (Mann-Whitney test, $p=0.005$). Serum IgG immuno reactivity to native gliadin was also significantly increased in a group of ROU patients in comparison to control group (Mann-Whitney test; $p<0.0001$). Contrary to that, it was recorded significant higher IgM antibodies concentration specific for the gliadin in control group (Mann-Whitney test; $p<0.005$). Significantly higher concentrations of IgA, IgG and IgE antibodies against cow's milk protein were detected in patients with ROU than in control group (Mann-Whitney test; $p<0.0001$ for all three Ig classes).

CONSLUSION. Mucosal barrier dysfunction and the exposure to various antigens can lead to modified mucosal immunity and loss of humoral tolerance to self and microbiota antigens resulting in autoantibody production. It seems likely that antibodies are markers of aberrant immune response, rather than key effectors involved in the pathogenesis of the ROU. In severe forms of ROU, refractory to standard therapy is recommended to refer a patient for a further examinations including testing for serological markers of GSE and IBD and food hypersensitivity first of all to milk and gliadin.

Key words: recurrent oral ulcerations, apthae, glutensensitive enteropathy, inflammatory bowel disease, autoantibodies, food proteins.

Scientific areas: Dental Sciences

Special topics: Oral Medicine

UDK: 616.31-002.44:577.27(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Rekurentne oralne ulceracije	1
1.1.1. Etiološki faktori nastanka ROU.....	1
1.1.2. Etiopatogenetski mehanizmi nastanka ROU	6
1.1.3. Klinička slika rekurentnih oralnih ulceracija.....	8
1.1.4. Udruženost ROU sa drugim oboljenjima	9
1.2. Gluten senzitivna enteropatija (GSE).....	10
1.2.1. Etiopatogenetski mehanizmi nastanka GSE.....	11
1.2.2. Klinička slika i dijagnostika GSE.....	12
1.2.3. GSE-specifični serološki markeri.....	13
1.3. Inflammatorne bolesti creva (IBC).....	14
1.3.1. Etiopatogenetski mehanizmi nastanka IBC.....	15
1.3.2. Klinička slika i dijagnostika IBC	15
1.3.3. Serološki markeri povezani sa IBC	16
1.4. Preosetljivost na komponentne hrane	18
1.5. Radna hipoteza	19
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	20
3. PACIJENTI, MATERIJAL I METODE	21
3.1. Klinička ispitivanja.....	21
3.2. Laboratorijska ispitivanja	31
3.2.1. Određivanje prisustva i koncentracije antitela specifičnih za tkivnu transglutaminazu (t-TG) IgG i IgA klase	31
3.2.2. Određivanje prisustva i koncentracije antitela specifičnih za deaminirane glijadinske peptide (DGP) IgG i IgA klase	32
3.2.3. Određivanje prisustva i koncentracije antitela specifičnih za fuzione peptide, glijadinske analoge (GAF-3X) IgA klase.....	32

3.2.4. Određivanje prisustva i koncentracije antitela specifičnih za <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ASCA) IgG i IgA klase.....	33
3.2.5. Određivanje prisustva antitela specifičnih za citoplazmatske antigene neutrofila (ANCA).....	34
3.2.6. Određivanje koncentracije antitela specifičnih za glijadin.....	36
3.2.7. Određivanje koncentracije antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka .	37
3.3. Statistička analiza dobijenih podataka.....	38
4. REZULTATI.....	39
4.1. Demografski podaci.....	39
4.2. Klinička ispitivanja.....	41
4.2.1. Učestalost javljanja recidiva rekurentnih oralnih ulceracija	44
4.2.2. Broj rekurentnih oralnih ulceracija.....	45
4.2.3. Vreme zarastanja rekurentnih oralnih ulceracija	46
4.3. Ispitivanje humoralne imunosti pacijenata sa ROU	47
4.3.1. Prevalenca i koncentracija antitela visoko specifičnih za celijakiju.....	47
4.3.2. Prevalenca i koncentracija antitela koja su karakteristična za inflamatornu bolest creva.....	52
4.3.3. Humoralna imunost specifična za mleko i glijadin	54
4.3.4. Korelacije između antitela na proteine hrane i seroloških markera GSE.....	61
4.5. Dijagnostički postupci i kliničko praćenje pacijenta sa utvrđenim pozitivnim serološkim markerima za GSE	62
5. DISKUSIJA.....	64
5.1. GSE-specifični serološki markeri.....	66
5.2. IBC-povezani serološki markeri.....	75
5.3. Hipersenzitivnost na antigene hrane.....	81
6. ZAKLJUČCI.....	85
REFERENCE	87

1. UVOD

Humoralni imunitet je deo adaptivnog imunskog odgovora. Predstavljen je B limfocitima, čija aktivacija, a potom i sazrevanje do plazmocita uz pomoć T-pomoćničkih ćelija i njihovih citokina, ima za posledicu produkciju antitela. Pored antitela, u humoralnom imunskom odgovoru učestvuju i drugi činioci kao što je sistem komplementa, opsonini, hemokini i ostali medijatori neophodni za aktivaciju B limfocita, kao i za ispoljavanje efektorske funkcije antitela. Antitela mogu direktno neutralisati patogene i njihove toksine, a takođe mogu posredovati u uništavanju mikroorganizama pomažući fagocitozu i dejstvo komplementa na obložena strana tela. Kod patološkog, autoimunskog odgovora dolazi do stvaranja antitela na sopstvene antigene. Neka od autoantitela u određenim oboljenjima imaju dijagnostički, a ponekad i prognostički i prediktivni značaj u praćenju i lečenju pacijenata. Poremećaj humoralog imuniteta se manifestuje i kod pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama ^{1,2}.

1.1. Rekurentne oralne ulceracije

Rekurentne oralne ulceracije (engl. *Recurrent oral ulcerations*, ROU) predstavljaju inflamatorno, hronično oboljenje koje karakterišu ponavljane epizode ulceracija oralne mukoze. One se svrstavaju u najčešće promene na sluzokoži usne duplje ³. Javljaju se u oko 20% opšte populacije, često počinju u detinjstvu, a sa godinama se obično ove epizode proređuju. Mogu se javljati u vidu solitarnih ili multiplih lezija, a simptomatologija i klinički tok variraju od blagih do teških i upornih formi koje su veoma neprijatne za pacijente. Osim kao izolovana patologija, ROU mogu biti i deo simptomatologije sistemskih bolesti, koje su najčešće imunski-posredovane etiopatogeneze, što čini etiologiju i dijagnozu ROU još kompleksnijom ⁴.

1.1.1. Etiološki faktori nastanka ROU

Etiologija ROU je multifaktorijalna i nije u potpunosti razjašnjena. Ispitivanja su utvrdila niz predisponirajućih i protektivnih faktora vezanih za pojavu oralnih ulceracija koji utiču na integritet epitelne barijere i mukozni imunitet ^{2,5}. Najčešći etiološki faktori za nastanak ROU su lokalna trauma ⁶, nutritivni deficit ⁷, različiti alergeni iz hrane, mikroorganizmi ⁸ i drugi činioci koji utiču na epitelni integritet i imunološku

homeostazu oralne mukoze. Nijedan od ovih faktora nije samostalan i dovoljan za nastajanje rekurentnih oralnih ulceracija, već postoji izvesna predispozicija koja čini pacijente sa ROU sklonijim za razvoj lezije prilikom dejstva nekog od navednih etioloških činilaca. Familijarna udruženost ROU je uočena u oko 40% pacijenata, što govori u prilog genetske predispozicije ⁹. Imajući u vidu multifaktorijalnost i genetsku predispoziciju, može se reći da su pacijenti sa ROU skloniji da razviju ulceracije oralne mukoze prilikom dejstva lokalne traume ili nekog drugog faktora u odnosu na individue bez genetske predispozicije.

1.1.1.1. Genetski faktor

Kod pacijenata sa ROU dokazano je češće prisustvo HLA-B51 alela, koje je variralo u odnosu na etničku pripadnost ¹⁰. Pored toga, uočena je pojava DNK polimorfizama vezanih za kontrolu mnogobrojnih citokina ¹¹. Buno i sar. ¹² su sprovedli studiju u kojoj su iz uzoraka bioptata ROU pacijenata određivali nivo mRNK za više proinflamatornih citokina i za anti-inflamatorni citokin IL-10. Na osnovu rezultata su zaključili da kod pacijenata sa ROU postoji funkcionalna deficijencija IL-10 što onemogućava suprimiranje inflamatorne reakcije izazvane nekim drugim faktorom.

1.1.1.2. Lokalna trauma

Wray i sar. ⁶ su još 1981. godine, uočili da je lokalna trauma čest inicirajući faktor za nastanak ROU. Trauma epitela oralne sluzokože može biti izazvana oštrom ivicom zuba, tvrdom hranom, četkicom prilikom održavanja oralne higijene, za vreme stomatoloških intervencija i na brojne druge načine. Ovakve povrede mogu inicirati dalju lokalnu inflamaciju, koja kod određenih individua može završiti kao ulceracija.

1.1.1.3. Nutritivni deficit

Smanjenje nivoa gvožđa, folata, vitamina B12 i nekih drugih nutritienata, narušava pravilnu epitelizaciju, čineći mukožu atrofičnom, vulnerabilnom sa smanjenim odbrambenim sposobnostima ¹³. Uočeno je da pacijenti sa ROU češće imaju poremećaj u hematinskom metabolizmu u odnosu na zdrave kontrole ^{7,14}. Objašnjenje za ovo može biti i činjenica da su ROU ne tako retko udružene sa gastrointestinalnim patološkim

stanjima, poput celijakije i infekcija *Helicobacter pylori*, koje prati malnutricija i anemija. Terapijski učinak primene suplemenata vitamina B12, gvožđa i folata je bio različit u kliničkim studijama i nije uvek dovodio do remisije ROU^{15,16,17}. Ipak, mnogi autori se slažu da primena vitamina B12 može imati terapijski učinak, čak i ako nije prethodno utvđen deficit ovog vitamina kod pacijenta sa ROU^{18,19}.

1.1.1.4. Hormonski disbalans

Istraživanja su dokazala da je hormonski uticaj u vezi sa epitelnim integritetom i njegovom funkcijom. Naime, lutealna faza menstrualnog ciklusa, koja je praćena padom progesterona, je u nekim studijama oznaćena kao period nešto ućestalijeg javljanja ROU u grupi ispitanica²⁰. Progesteron utiće na stepen keratinizacije i samim tim debljinu epitela, kao i na funkcije mukoze. U prilog tome, postoje i podaci da se ROU reće javljaju u trudnoći, kao i prilikom upotrebe kontraceptivnih pilula⁴. Na osnovu pregleda ranije objavljenih studija, McCartan i sar.²¹ su izneli kritićki stav da rezultati prethodnih istraživanja nisu sa sigurnošću mogli da potvrde uticaj ovarijalnih hormona na pojavu ROU.

1.1.1.5. Duvan

Smatra se da pušenje duvana smanjuje rizik za nastanak ROU. Shapiro i sar.,²² kao i Axell i Hendricsson²³ su uoćili da je pojava ROU reća kod pušaća. Takoće, u navedenoj studiji²³, je utvrćeno da se ROU kod nepušaća javljaju u težioj formi u odnosu na pušaće. Prekid pušenja je udružen sa pogoršanjem simptomatologije ROU²⁴, a ponovo zapoćinjanje pušenja sa remisijom²⁵. Iako nije u potpunosti jasno da li je nikotin glavni efektor, jedno od obrazloženja za ovu pojavu je stvaranje otpornijeg epitela, u smislu pojaćane keratinizacije kao odgovora na pušenje. Efekat duvana uoćen je i kod pacijenata sa inflamatornim bolestima creva, i to kao protektivni faktor kod pacijenata sa ulceroznim kolitisom, odnosno kao predisponirajući faktor za nastanak ulceracija crevne sluzokože kod pacijenata sa Kronovom boleću²⁶. Ispitivani su mnogobrojni efekti i naćini administracije nikotina kao i nekih drugih sastojaka koji se mogu naći u duvanskom dimu, kako bi se pomoglo boljem shvatanju etiopatogeneze ovih inflamatornih stanja^{27,28}. Nije jasno dokazano da li je moguće ostvariti protektivni

efekat i kroz druge vidove administracije nikotina, osim kroz onaj u vidu duvanskog dima koji je empirijski uočen.

1.1.1.6. Mikroorganizmi

Danas preovlađuje mišljenje da ROU nisu infektivne etiologije i da ne predstavljaju kontagiozno oboljenje. Brojne studije su ispitivale uticaj mikrobnih činilaca kod pacijenata sa ROU, među kojima su virusi *Herpes simplex*, *Herpes zoster*, *Epstein-Barr* i *Citomegalovirus*, ali i bakterijske uzročnike kao što su različiti sojevi *Streptococcus*-a, najčešće *Streptococcus oralis*, kao i *Helicobacter pylori* ^{29,30,31,32}.

ROU se značajno češće javljaju kod pacijenata koji su HIV pozitivni ^{33,34}. Naime, kod ovih pacijenata u okviru osnovne bolesti postoji poremećen odnos CD4+ T limfocita (Ly) naspram CD8+ T Ly, u korist CD8+, koji se kod nekih pacijenata održava iako im se uz anti-virusnu terapiju normalizuje ukupan broj CD4+ T Ly. Za ovu subkategoriju pacijenata je uočen lošiji terapijski odgovor, veći morbiditet, ali i češća pojava ROU ³⁵.

Određeni sojevi *Streptococcus*-a mogu da indukuju imunski odgovor kroz ukrštnu reakciju sa epitelnim antigenima, što je ispitivano u studiji sprovedenoj kod pacijenata sa oralnim ulceracijama i Behčetovom bolešću ³⁶. Ipak, streptokokni antigeni, kao ni ukrštena reakcija sa oralnom mukozom, nisu pronađeni kod većeg broja pacijenata sa ROU tako da se ovaj mehanizam ne može smatrati glavnim i nezavisnim etiološkim faktorom ³⁷. Hasan i sar. ³⁸ su kod pacijenata sa ROU ispitivali homologne antigene mikrobnih i humanih tzv. "heat-shock" proteina (HSP) koji stimulišu određene subpopulacije T limfocita i zaključili su da prisustvo mikroba na oralnoj mukozici inicira imunski odgovor tako što posredstvom mikrobnog 65kD HSP vrši snažno proliferativno dejstvo na T ćelije, što potom dovodi do ukrštene reakcije sa homolognim humanim epitelnim 60kD HSP.

Više studija je ispitivalo povezanost pojave ROU i bakterije *Helicobacter pylori* (HP), koja je inače poznat uzročnik inflamatornih i ulceroznih lezija želuca. Studija koju su sproveli Birek i sar. ³⁹ je pronašla DNK HP u uzorcima briseva uzetih sa mesta ulceracija kod većine pacijenata sa ROU. Tas i sar. ⁴⁰ su 2013. godine u kliničkoj studiji utvrdili poboljšanje kliničke slike ROU, kao i više vrednosti vitamina B12 u serumu, kod pacijenata kojima je uspešno sprovedena eradikaciona terapija za HP u odnosu na one koji su i nakon eradikacione terapije imali pozitivan izdisajni ureaza test. Međutim,

Fritscher i sar. ⁴¹ nisu uočili značajnu povezanost ROU sa HP infekcijom.

Osim patoloških mikrobnih sojeva, zahvaljujući novim nekultivacionim tehnologijama identifikacije mikroba, uočeno je da nepatogene, komensalne mikrobnе vrste naseljavaju mukoze u mnogo većem broju nego što se to ranije mislilo ⁴². U tom smislu, gastrointestinalni trakt predstavlja značajno prebivalište ovih komensala koji zajedno sa domaćinom učestvuju u digestivnim, metaboličkim i imunološkim procesima ^{43,44}. Uočeno je da su mnoga patološka stanja udružena sa poremećenim mikrobnim sastavom komensala. Studija koju su sproveli Bankvall i sar. ⁴⁵ 2014. godine je utvrdila da postoji drugačiji mikrobnі sastav oralne mukoze kod pacijenata sa ROU u odnosu na zdravu kontrolnu grupu i to sa uzoraka koji nisu zahvaćeni inflamatornim i ulkusnim promenama. Oni su uočili drugačiji mikrobnі sastav sa neinflamiranih regija oralne mukoze naročito kod pacijenata koji su u tom trenutku imali ulcerativne promene u ustima, te su zaključili da izmenjena mikroflora može biti jedan od uzroka nastanka ulcerativnih lezija, ali i posledica u sklopu inflamacije oralne sluzokože. Ovakva razmatranja postoje i kad su u pitanju inflamatorne bolesti creva ⁴⁶, a od nedavno i kod gluten-senzitivne enteropatije ⁴⁷.

1.1.1.7. Antigeni hrane

Preosetljivost na antigene hrane je takođe jedan od mogućih faktora u nastanku ROU. U više studija je dokazano da prekid unošenja određenih namirnica može dovesti do smanjivanja tegoba ⁴⁸. Izvor alergijskih reakcija je veoma širok i raznovrstan, ali se proteini kravljeg mleka i žitarica smatraju najznačajnijim antigenima kod pacijenata sa ROU ⁴⁹.

Taylor i sar. ⁵⁰ su još 1964. godine istraživali učestalost povišenog nivoa antitela u humanom serumu, na proteine mleka i gluten, kod pacijenata sa oboljenjima gastrointestinalnog trakta. Uočili su povećanu incidencu povišenog nivoa antitela u humanom serumu, kod pacijenata sa aftoznim ulceracijama, major tipa, dok su Tomas i sar. ⁵¹ 1973. godine ustanovili značajno češće prisustvo antitela na proteine kravljeg mleka kod pacijenata sa aftama minor. Po prvi put u naučnoj literaturi, Besu i sar. ⁵² u svojoj studiji iz 2009. godine, objavljuju podatak da je u pacijenata sa rekurentnim aftoznim ulceracijama (RAU) nepoznate etiologije, ustanovljena statistički značajno veća učestalost povišene koncentracije antitela (IgA, IgG i IgE tipa) na proteine kravljeg

mleka u odnosu na zdrave kontrole.

Osim hrane, i druge supstance koje se unose oralnim putem mogu biti izvor hipersenzitivnosti i ROU, kao što je uočeno za natrijum-lauret-sulfat, hemijsko jedinjenje tipa surfaktanta koji se nalazi u pastama za zube ⁵³.

1.1.2. Etiopatogenetski mehanizmi nastanka ROU

Poremećaj humoralog imuniteta koji se manifestuje kod pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama je posledica neadekvatnog T ćelijskog odgovora i mukoznog imuniteta. U osnovi imunopatogeneze ROU, centralnu ulogu ima disregulisan ćelijski imunitet, u smislu disbalansa između aktivacije mukoznog T-helper (Th) imunskog odgovora i T regulatornog imuniteta ⁵⁴. Pored T-ćelijski posredovanog odgovora, mnogi drugi medijatori mukoznog imuniteta i oralne tolerancije imaju učešća u ovoj disregulaciji ⁵⁵.

1.1.2.1. Mukozni imunitet i oralna tolerancija

Oralna mukoza predstavlja deo gastrointestinalnog trakta i učestvuje u početnim fazama enzimskog obrađivanja hrane, ali i u kompleksnim procesima stvaranja tolerancije na oralno unete antigene iz spoljašnje sredine, antigene hrane i neinvazivne mikroorganizme ⁵⁶.

Epitelnu barijeru oralne mukoze čini više slojeva epitelnih ćelija, između kojih se nalaze transmembranski proteini, među kojima su zonulini, okludini, kladini i drugi, koji kontrolišu protok makromolekula i nutrienata između ćelija i funkcionalnu permeabilnost epitelne barijere. Oralna mukoza je, kao i mukoza digestivnog trakta, izložena različitim etiološkim faktorima značajnim za nastanak ulceracija kao što su trauma, mikrobi i neke komponente iz hrane, koji mogu uticati na oštećenje epitelne barijere, čime se stvaraju uslovi za aktivaciju mukoznog imuniteta i inflamaciju ⁵⁷.

Mukozni imunitet čine epitelne i druge ćelije mukoze specijalizovane za ekspresiju mnogobrojnih receptora koji vrše prepoznavanje antigena koji dospevaju na sluzokožu. Oni zajedno sa različitim ćelijama urođenog imuniteta, među kojima su i antigenprezentujuće ćelije, učestvuju u pokretanju imunskog odgovora. Više subpopulacija T ćelija raspoređeno je u različitim slojevima mukoze, a na samoj mukozi se nalaze

imunoglobulini klase A, mucini i anti-mikrobni peptidi koji predstavljaju direktan zaštitini film za prodor stranih antigena. Sve ove ćelije i njihovi proizvodi učestvuju u održavanju izbalansiranog mukoznog imuniteta ⁵⁸.

Oralna tolerancija predstavlja jedan od vidova periferne imunske tolerancije koji se sprovodi u mukozama, posebno gastrointestinalnog trakta, nad antigenima koji su oralno uneti, kao što su antigeni iz hrane i nepatogeni, komensalni mikrobi ⁵⁹. Cilj imunske tolerancije je da se izbegne inflamatorni odgovor na sopstvene i neinvazivne antigene ⁶⁰. U procesu oralne tolerancije učestvuju različite ćelije mukoznog imuniteta, a među najvažnijima su CD4+ CD25+ T regulatorne ćelije ⁵⁴.

1.1.2.2. T-ćelijski odgovor i polarizacija Th1 odgovora kod pacijenata sa ROU

Imunski odgovor posredovan T ćelijama je u osnovi patogeneze ROU. U prilog tome govori nalaz T ćelijskih subpopulacija u oralnim ulceracijama. Imajući u vidu kliničku progresiju oralnih ulceracija koja podrazumeva prodromalni, pre-ulcerativni, ulcerativni i isceljujući stadijum, Savage i sar. ⁶¹ su sproveli studiju u kojoj su analizirali zastupljenost T ćelijskih subpopulacija. Naime, oni su uzimali uzorke biopsije sa mesta lezije oralne mukoze u vreme sva četiri klinička stadijuma kako bi ispitali površinske T ćelijske antigene. Imunohistohemijski nalaz je ukazao da se u fazi pre-ulceracije nalazi veći broj CD4+ T ćelija uz manji broj CD8+ T ćelija, u odnosu 2:1. U fazi ulceracije, u histološkom nalazu je uočen veliki broj CD8+ T ćelija, a tek mali broj CD4+ T ćelija, u odnosu CD4:CD8 T ćelija 1:10. U fazi zaceljenja, u ćelijskom infiltratu je uočeno da su opet dominirale CD4+ T ćelije, uz veoma mali broj CD8+T ćelija, uz odnos CD4:CD8 ćelija približno 10:1. Autori su zaključili da limfotoksičnost ima glavnu ulogu u patogenezi ROU i potencijalnu ulogu lokalnog imunoregulatornog disbalansa. U narednoj studiji, isti autori su pokazali redukciju indukovanih supresorskih T ćelija, koje su značajne za održavanje mukoznog regulatornog imuniteta ⁶².

Još jedna važna subpopulacija T ćelija koja naseljava mukozu gastrointestinalnog trakta su gama-delta T ćelije ($\gamma\delta$ -T ćelije). One predstavljaju malu, ali veoma važnu subpopulaciju T ćelija koja prepoznaje mikrobne antigene i vrlo brzim odgovorom učestvuje u održavanju imunske homeostaze mukoza. Kod ROU je uočeno da je proporcija $\gamma\delta$ -T ćelija u mukozu i perifernoj krvi viša nego kod zdravih kontrola, a da po stimulaciji proizvode IFN- γ i TNF- α ^{63,64}.

Kod pacijenata sa ROU je ustanovljeno da je Th1 dominantan tip adaptivnog imunskog odgovora ^{65,66}. Ova polarizacija se manifestuje produkcijom Th1 citokinskog profila, među kojima su IL-12 i TNF- α . U prilog tome govori i nalaz povišenih vrednosti TNF- α kod pacijenata sa ROU, te se on smatra možda i glavnim proinflamatornim citokinom kod ovih pacijenata. TNF- α je detektovan u značajno višim koncentracijama u samim ulcerativnim lezijama pacijenata sa ROU u odnosu na kontrole, a takođe i TNF- α mRNA je prisutna u značajno većem stepenu kod ROU u odnosu na druge vrste ulceracija ¹².

Uočeno je da faktori koji predisponiraju nastanak ROU (hematinski deficit, stres, neki lekovi) promovišu Th1 odgovor ⁶⁷, dok protektivni faktori za ROU, kao što su pušenje i trudnoća, upravo stimulišu Th2/Treg odgovor ⁶⁸.

1.1.2.3. Humoralni imunitet kod pacijenata sa ROU

Pacijenti sa ponavljajućim oralnim ulceracijama imaju naglašen i celularni i humoralni adaptivni imunski odgovor. Disregulisana produkcija citokina, hiperreaktivnost neutrofila i povećana koncentracija komplementa su samo neki od mehanizama zaslužni za povećan broj B limfocita koji se sreće kod pacijenata sa ROU. U nekim studijama se navodi i značaj Th-2 ćelijskog odgovora, koji karakteriše povećano prisustvo citokina IL-4, IL-5 i IL-13, i koji se povezuje sa većom sklonošću ka stvaranju autoantitela ^{2,69}.

U serumima pacijenata sa ROU ispitivano je prisustvo različitih antitela, usmerenih kako na egzogeno unete antigene (anti-glijadinska antitela, antitela na proteine kravljeg mleka) ⁵⁰ tako i na komponente sopstvenog tkiva (antitela na tkivnu-transglutaminazu, endomizijalna antitela). Značaj pomenutih antitela kod pacijenata sa ROU nije u potpunosti razjašnjen, a i rezultati studija o njihovoj prevalenci su raznovrsni ^{70,71,72,73}.

Zbog toga je neophodno sprovesti više studija koje će ciljano ispitivati etiopatogenetski i klinički značaj različitih antitela kod pacijenata sa ROU.

1.1.3. Klinička slika rekurentnih oralnih ulceracija

Jedan od najčešćih oblika ROU jesu afte. Afte se javljaju u tri klinička podtipa: minor, major i herpetiformne afte ².

Afte minor (*Aphtae minor*, MiRAS), su najčešće (75-85%) i javljaju se u formi aftoznih ulceracija manjih od 1 cm, u broju obično manjem od 10 koje zarastaju u periodu od 7-10 dana bez ožiljka.

Afte major (*Aphtae major*, *Periadenitis mucosa necroticans*, MARAS) su dublje i obično veće od 1 cm, a javljaju se kod manjeg broja pacijenata (10-15%). Pojava ovakvih ulceracija je praćena bolom, otežanom ishranom, a u nekim slučajevima i povišenom telesnom temperaturom i groznicom. Zarastanje je ožiljno i traje do 6 nedelja.

Herpetiformne afte (*Aphtae herpetiformis*) su plitke ulceracije koje liče na afte minor, ali su daleko brojnije (10-100 afti), zarastaju za dve nedelje bez ožiljka i sreću se u 5-10% pacijenata².

Kada je na oralnoj mukozi prisutno više od jedne aftozne lezije govorimo o **rekurentnom aftoznom stomatitisu** (engl. *Recurrent aphthous stomatitis*, RAS), a ukoliko je prisutna jedna promena onda se ona naziva solitarna afta.

1.1.4. Udruženost ROU sa drugim oboljenjima

Ne mogu se sve rekurentne oralne ulceracije shvatati kao rekurentni aftozni stomatitis jer se mogu javiti i u sklopu nekih drugih patoloških stanja, kada su to aftama-slične ulceracije. Takođe, moguće je i istovremeno prisustvo RAS i drugih oboljenja koja kao jedan od simptoma mogu dati oralne ulceracije⁷⁴. Zbog toga se u literaturi mogu naći termini kao što je “pravi RAS” koji podrazumeva isključenje svih drugih mogućih uzroka za pojavu oralnih ulceracija.

Kada su u pitanju druga patološka stanja koja imaju sličnu etiopatogenezu ili na neki drugi način mogu izazvati oralne ulceracije, najčešće se u literaturi navode Behčetova bolest, različita imunodeficientna stanja, sistemske i reumatološke bolesti, gluten-senzitivna enteropatija, inflamatorne bolesti creva i malnutricija⁷⁵. Ono što je zajedničko za ova oboljenja je da takođe zahvataju mukoze i da im je etiopatogeneza imuno-inflamatorna, a često i multifaktorijalna. Osim ovih patoloških stanja, dokazano je da se ROU mogu javiti i kao toksična manifestacija na neke lekove, najčešće nesteroidne anit-inflamatorne lekove (NSAIL) i nikoradil^{76,77}. Pored toga, i mnogobrojne kožne bolesti (*Lichen planus*, *Pemphigus vulgaris*, *Pemphigoid*, *Erythema exsudativum*, *Epidermolysis bullosa*, *Dermatitis herpetiformis Duhring*) takođe mogu

zahvatati oralnu mukozu. Postoje slučajevi da se ulceracije oralne mukoze pogrešno dijagnostikuju kao RAS, a da se zapravo radi o nekom drugom mukokutanom oboljenju⁷⁸.

Oralne ulceracije se često javljaju u sklopu imunodeficientnih stanja, kako urođenih kao što je ciklična neutropenija⁷⁹, tako i stečenih, kao što je AIDS³⁴. Pored toga, kod dece je uočena pojava aftoznih ulceracija oralne mukoze u sklopu PFAPA sindroma (engl. *periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis*)⁸⁰.

Takođe, oralne ulceracije su jedna od manifestacija više opisanih sistemskih imunoposredovanih sindroma i oboljenja, kao što su *Sweet-ov* sindrom, MAGIC (engl. "*Mouth And Genital ulcers with Inflamed Cartilages*") sindrom, Reiter-ov sindrom (engl. *Reiter syndrome*), sistemski lupus eritematodus (engl. *Systemic Lupus Erythematosus*, SLE) i Behčetova bolest⁸¹. U navedenim multisistemskim stanjima se javljaju različite muko-kutane lezije, između ostalog i oralne ulceracije, koje je diferencijalno dijagnostički teško razlikovati. Kada su u pitanju teške forme ROU, refrakterne na konzervativnu terapiju, javljaju se sumnje da se zapravo radi o lakšoj formi Behčetove bolesti⁸². Rogers⁸³ je ustanovio da je ovo slučaj kod pacijenata iz područja Azije i Bliskog istoka, u kom se inače češće javlja Behčetova bolest. Međutim, u ostalim delovima sveta kao što su Evropa i Severna Amerika, to nije bio slučaj i svega kod 10% pacijenata sa kompleksim ROU se ispostavilo da imaju Behčetovu bolest.

Gastroenterološka oboljenja se takođe mogu manifestovati ulceracijama na oralnoj mukozu, pa čak i da to bude jedan od prvih simptoma tih oboljenja⁸⁴.

1.2. Gluten senzitivna enteropatija (GSE)

Gluten-senzitivna enteropatija (engl. *Gluten-Sensitive Enteropathy*, GSE) ili celijačna bolest (engl. *Celiac disease*, CD) je imuno-posredovano oboljenje koje se javlja kod genetski predisponiranih osoba, a izazvano unosom glutena, proteina koji se nalazi u mnogim žitaricama⁸⁵. Glijadin je imunogena komponenta glutena, a reakcija na glijadin se može javiti bilo kada u toku života⁸⁶.

GSE se češće javlja u Severnoj Americi i Evropi, gde se žitarice više upotrebljavaju u ishrani, ali je u poslednje vreme učestalost ovog oboljenja povećana i u azijskim zemljama zbog promena u načinu ishrane. Učestalost javljanja GSE za Severnu Ameriku i Evropu iznosi oko 1%⁸⁷, s tim da postoje regioni, poput Finske i Švedske, u

kojima je učestalost i nešto preko 2%, dok je u Nemačkoj svega 0.2% ⁸⁸. Razlog za ove razlike među zemljama sa sličnim dijetalnim navikama i sa sličnim genetskim faktorom, nije razjašnjen. Pored toga, uočava se globalni porast učestalosti javljanja GSE, što se jednim delom može pripisati boljim dijagnostičkim procedurama i većim postojanjem svesti o ovom stanju ⁸⁹. Rezultati studije koje su objavili Catassi i sar. ⁹⁰ 2007. godine pokazali su da je ciljano ispitivanje populacije na serološke markere specifične za GSE dalo veću učestalost GSE, koja je iznosila 2.25% na grupi od 976 ispitanika koji su imali neke od tegoba koje se mogu povezati sa GSE. Međutim, smatra se da na ovaj trend, osim dijagnostičkih testova koji su na raspolaganju, utiču i drugi faktori, kao što su kvalitet i kvantitet unosa glutenskih komponenti, način ishrane novorođenčadi, promene u crevnoj flori itd. ⁹¹.

Podaci o učestalosti celijakije u našoj populaciji nisu dovoljno precizni, obzirom da nisu sprovedene adekvatne studije. Jedno istraživanje je ukazalo de je zastupljenost manifestne GSE oko 1:1000 dece uzrasta do 15 godina na treitoriji Republike Srbije ⁹².

1.2.1. Etiopatogenetski mehanizmi nastanka GSE

Etiopatogeneza GSE podrazumeva T ćelijski odgovor u intestinalnoj mukozi koji nastaje usled prezentacije glutenskih antigena od strane HLA-DQ2 i HLA-DQ8 antigen-prezentujućih ćelija ⁹³. Ova imunska reakcija je praćena dominacijom Th1 i Th17 imunskog odgovora, uz produkciju odgovarajućeg seta citokina i aktivacije drugih efektoru u mukozi creva ⁹⁴. Takođe, uočen je poremećaj intestinalne epitelne barijere, čime je narušena regulacija prolaza antigena i drugih molekula između epitelnih ćelija ⁹⁵. U etiopatogenezi GSE, značaj dobija i crevna mikroflora zbog interakcije sa epitelnim i imunskim ćelijama mukoze creva i uticajem na integritet epitelne barijere ⁶⁷. Celijakija je oboljenje sa snažnom genetskom osnovom. Oko 97% pacijenata sa celijakijom nosioci su HLA-DQ alela i to 90-95% DQ2 dok se HLA-DQ8 nalazi kod preostalih pacijenata. Međutim, specifičnost za ove alele je prilično niska i kreće se od 36-53%, odnosno svega 2-5% osoba koje nose HLA-DQ2 i/ili HLA-DQ8 zaista obole od celijakije ⁹⁶.

1.2.2. Klinička slika i dijagnostika GSE

Pacijenti sa GSE razvijaju inflamatorne promene na mukozi tankog creva, prevashodno duodenuma i jejunuma, i takvo patološko stanje je okarakterisano kao enteropatija koja je praćena malapsorpcijom i malnutricijom. Osim toga, kod pacijenata sa GSE se mogu naći i vancrevne manifestacije, koje uglavnom nastaju kao posledica malapsorpcije i malnutricije, kao i usled patološkog adaptivnog imunskog odgovora ⁹⁷.

U kliničkom smislu, GSE se može prezentovati kao klasična, atipična, pritajena i latentna forma.

Klasična forma GSE podrazumeva gastrointestinalne simptome kao što su hronična dijareja, nadutost, konstipacija i gubitak telesne težine. Ovi simptomi se mogu preklapati i ličiti na mnoge druge funkcionalne poremećaje digestivnog trakta, kao što su dispepsija, sindrom iritabilnog kolona, ali i različite intolerancije na hranu i neka druga inflamatorna oboljenja digestivnog trakta. Kada se uz ove digestivne simptome nađu neki poremećaji u laboratorijskim parametrima, koji mogu biti znak malapsorpcije i malnutricije, indikovano je dalje serološko i endoskopsko ispitivanje u pravcu GSE ⁹⁸.

Atipična forma GSE se može manifestovati različitim ekstraintestinalnim poremećajima kao što su hronična malaksalost, sideropenijska anemija sa sniženim folatima i vitaminom B12, osteoporoza, hipoplazija zubne gleđi, oralne ulceracije, poremećaj u hepatogramu, hronični hepatitis, neuropatije, idiopatska cerebelarna ataksija, dermatitis herpetiformis, zastoj u rastu uz odložen pubertet, rekurentni pobačaji i problemi sa fertilitetom ⁹⁹.

Pritajena forma GSE podrazumeva pozitivan serološki nalaz GSE-specifičnih markera, pozitivan endoskopski nalaz za GSE, ali odsustvo bilo kakvih klasičnih ili atipičnih kliničkih simptoma GSE.

Latentna forma GSE se karakteriše pozitivnim serološkim nalazom GSE-specifičnih markera, ali bez kliničkih simptoma i endoskopskih znakova GSE, iako pacijenti unose hranu koja sadrži gluten.

I pritajena i latentna forma GSE mogu u nekom momentu preći u manifestnu formu, pa se ovim pacijentima preporučuju redovne kontrole kao i dijeta bez glutena ¹⁰⁰.

Obzirom da je simptomatologija kod pacijenata sa GSE raznovrsna i da postoje različiti stadijumi glutenske enteropatije, dijagnoza se mora zasnivati na preporučenim algoritmima koji imaju za cilj da pomognu u pravilnom korišćenju i tumačenju

seroloških markera u odnosu na histološki i endoskopski nalaz ¹⁰¹. Prilikom endoskopskog pregleda, normalan izgled sluzokože ne može uvek isključiti postojanje GSE. Stoga je za postavljanje dijagnoze GSE naročito važno da se uzimaju politopske biopsije iz predela bulbosa i distalnog dela duodenuma. Histološki nalaz biopsije duodenuma ne može zameniti ni serologija ni sama endoskopija. Endoskopski i histološki pregled se rade dok je pacijent na normalnoj ishrani koja sadrži gluten. Terapijski odgovor na dijetu bez glutena, u smislu poboljšanja kliničkih simptoma, laboratorijskih analiza ili endoskopskog nalaza koji su prethodili primeni dijete, potvrđuje dijagnozu GSE ili drugih glutenom-izazvanih poremećaja ⁹⁸.

1.2.3. GSE-specifični serološki markeri

Pokušaj da se identifikuju određeni serološki markeri koji bi pomogli u dijagnostici GSE su započeti još 1958. godine, kada su Berger i sar. ¹⁰² otkrili anti-glijadinska antitela, koja su počela da se koriste u dijagnostičke svrhe od 1970. godine. Nakon toga su detektovana anti-retikulinska antitela, anti-jejunalna i anti-endomizijalna antitela ¹⁰³. Dieterich i sar. ¹⁰⁴ su ustanovili da je komponenta endomizijuma na koju su usmerena anti-endomizijalna antitela zapravo tkivna transglutaminaza (tTG) tako da se u dijagnostičke svrhe uključuju i anti-transglutaminska antitela.

Anti-glijadinska antitela klase IgA su pokazala veću specifičnost dok su u klasi IgG ova antitela imala veću senzitivnost ¹⁰⁵. Iako se upotrebna vrednost ovog testa može povećati istovremenom primenom obe klase antitela, senzitivnost i specifičnost je niža u odnosu na druge, novije serološke markere. Osim što se ova antitela mogu koristiti u cilju potvrde o primeni apsolutne dijete bez glutena, dijagnostička vrednost ovih antitela je pokazala izvesne slabosti. Naime, kod nekih pacijenata sa GSE se javlja IgA deficijencija ili selektivna deficijencija IgA antitela na glijadin, kada se ovaj serološki test prikazuje kao lažno negativan. S druge strane, dijagnostički problem predstavljaju i lažno pozitivni rezultati koji obuhvataju zdrave pacijente ili neka druga gastrointestinalna patološka stanja. Stoga su se prvobitno korišćena anti-glijadinska antitela na nativni glijadin pokazala nedovoljno specifična i senzitivna, te nisu više preporučena za dijagnostiku GSE ¹⁰⁶.

U cilju podizanja specifičnosti testa na anti-glijadinska antitela, dizajnirani su novi deamidovani glijadinski antigeni, u koje spadaju deaminirani glijadinski peptidi (DGP) i

rekombinantni “glijadin-analogni fuzioni peptid” (GAF-3X) . Ovim “prečišćavanjem” su uklonjeni mnogi nespecifični imunoreaktivni antigeni koji su bili razlog za lažno pozitivne rezultate i na taj način su se premostili neki od problema u specifičnosti testa ^{107,108}.

Pored ovih novih deamidovanih anti-glijadinskih antitela u dijagnostici GSE koriste se i antitela na komponente sopstvenog tkiva kao što su anti-endomizijalna antitela (EMA) i antitela na tkivnu transglutaminazu (anti-tTG antitela). EMA se određuju metodom IIF, imaju izuzetno visoku specifičnost, uz nešto nižu senzitivnost ¹⁰⁹, sa niskim stepenom lažno pozitivnih rezultata ¹¹⁰. Jedna studija je pronašla pozitivan nalaz EMA kod slučajeva sa latentnom, histološki normalnom, formom glutenske senzitivnosti, i time ukazali na dijagnostički značaj EMA kod ove podgrupe pacijenata ¹¹¹.

Naknadno je otkriveno da je glavni antigen anti-endomizijalnih antitela, zapravo enzim t-TG, koja se nalazi u mukozi tankog creva i vrši proces deamidacije glijadina iz glutena, čime nastaju deamidovani fragmenti glijadina. Procesom deamidacije se otkrivaju potentni glijadinski peptidi koji stimulišu T ćelije koje se nalaze u lamini propriji mukoze creva, uz posledičnu produkciju antitela na fragmente glijadina ¹¹². Istovremeno se dešava i ukrštena reakcija, što ima za posledicu stvaranje autoantitela na t-TG ¹¹³. Studija koju su sprovedi Baudon i sar. ¹¹⁴ 2004. godine je pokazala da je test na humanu tTG pouzdan za dijagnozu i za praćenje GSE kod dece i kod odraslih. Specifičnost u ovoj studiji je iznosila 98-99%, a senzitivnost od 91.5 - 98%.

1.3. Inflamatorne bolesti creva (IBC)

Inflamatorne bolesti creva su imunski-posredovana, hronična, recidivirajuća oboljenja predstavljena kroz dve osnovne kliničke forme: Kronovu bolest (KB) i ulcerozni kolitis (UK). Oba pomenuta oboljenja imaju svoj specifičan endoskopski i patohistološki nalaz, a u diferencijalnoj dijagnozi od pomoći mogu biti i serološki markeri ^{115,116}.

Procenjeno je da u SAD oko 1.4 miliona ljudi boluje od IBC, a u Evropi oko 2.2 miliona ljudi. Najviša godišnja incidenca u Evropi iznosi za KB 12.7/100.000 osoba-godina i za UK 24.3/100.000, dok je u Aziji i na Bliskom istoku incidenca za KB 5.0/100.000 osoba-godina, i za UK 6.3/100.000 osoba-godina. Prevalence za IBC su najviše u Evropi (ulcerozni kolitis 505/100,000 osoba; Kronova bolest 322/100,000 osoba) i SAD (UK 249/100,000 osoba; KB 319/100,000 osoba) ¹¹⁷. Pored već opisane

više prevalence za IBC u Severnoj Americi i Evropi, u ovim područjima se uočava porast u incidenci i prevalenci IBC u drugoj polovini XX veka. Takođe, uočava se porast prevalence i u drugim delovima sveta koji su do sada smatrani oblastima manjeg rizika za IBC, kao što su Japan i Indija. Smatra se da pored genetskog faktora, veliki značaj na razvoj IBC imaju i spoljna sredina, način ishrane i uslovi života ¹¹⁸.

1.3.1. Etiopatogenetski mehanizmi nastanka IBC

Etiologija IBC je složena, a uključuje neadekvatan imuno-inflamatorni odgovor crevne mukoze, uz sadejstvo nekog od spoljašnjih faktora, kod imunogenetski predisponiranih individua ¹¹⁹. Spoljni faktori za koje je uočeno da imaju najznačajniju ulogu u nastanku IBC su mikrobi, dijetetske i higijenske navike, kao i stres ¹²⁰. Patogenetski mehanizam IBC podrazumeva disregulisan imunski odgovor, koji se odlikuje prekomernom i neadekvatnom produkcijom proinflamatornih citokina, koji su glavni efektori za nastanak hroničnih zapaljenskih promena i lezija mukoze. Kod KB je uočena dominacija Th-1 ćelijskog imunskog odgovora, dok se UK karakteriše Th-2 imunskim odgovorom. Ipak, kako pokazuju novije studije, citokinski profil ovih kliničkih formi je daleko složeniji ¹²¹.

Smatra se da u imunoinflamatornom procesu dolazi i do narušavanja epitelne barijere, što ima za posledicu povećanu intestinalnu permeabilnost i prodor antigena iz lumena creva u mukožu ^{122,123}. Na kraju, genetska komponenta je takođe značajan etiološki faktor, a više imunogenetskih polimorfizama je ispitivano i utvrđeno kod ovih pacijenata ¹²⁴. Ipak, složena regulacija imunskog odgovora čini veliku individualnu varijabilnost u imunogenetskim polimorfizmima obolelih od IBC.

1.3.2. Klinička slika i dijagnostika IBC

Osim osnovnih kliničkih formi IBC kod nekih pacijenata javlja se i nedeterminisana forma, kada nije moguće odmah razlučiti da li se radi o KB ili UK ¹²⁵.

Kronovu bolest karakteriše pojava lezija koje se mogu javiti bilo gde u digestivnom traktu, počevši od oralne mukoze pa sve do anusa, i istovremeno mogu zahvatiti više različitih segmenata digestivnog trakta. Ove lezije mogu biti transmuralne, te dovesti do komplikacija u vidu fustula i stenoza.

Ulcerozni kolitis je ograničen samo na kolon i lezije su u kontinuitetu ¹²⁶. Na osnovu endoskopskog nalaza opisuju se dve forme: ograničena i ekstenzivna (pankolitis). Lezije kod UK zahvataju mukozu u vidu plitkih erozija i ulceracija.

Nedeteminisana forma je prelazna forma, kada nije moguće na osnovu kolonoskopskog i histopatološkog nalaza sa sigurnošću utvrditi da li se radi o KB ili UK. Tada su potrebna dodatna gastroenterološka ispitivanja koja uključuju neku od „imidžing“ metoda pregleda tankog creva, serološko ispitivanje i detaljno kliničko praćenje ¹¹⁵.

Sve tri forme imaju sličnu kliničku simptomatologiju, kao i sklonost ka određenim ekstraintestinalnim manifestacijama.

Dijagnoza IBC je zasnovana na postojećim dijagnostičkim kriterijumima ¹²⁵, koji se oslanjaju na endoskopski i histološki nalaz, uz kliničku simptomatologiju. Od endoskopskih pregleda obavezna je totalna kolonoskopija sa terminalnom ileoskopijom, uz uzimanje biopsija iz svakog segmenta creva. Endoskopski, a ponekad i radiološki pregledi, proksimalnih partija digestivnog trakta se takođe rade kako bi se isključilo postojanje inflamatornih ili nekih drugih koincidentalnih promena ⁸⁴.

Osim intestinalnih tegoba, pacijenti sa IBC često imaju i vancrevne manifestacije, koje mogu nastati usled hroničnog inflamatornog stanja, malapsorpcije i malnutricije, toksičnih efekata lečenja, ali i imunski-inflamatornih poremećaja koji zahvataju druge sisteme organa. Najčešće se javljaju inflamatorne promene hepatobilijarnog sistema, kože, zglobova i očiju, a na oralnoj mukozu se IBC mogu ispoljiti u vidu rekurentnih oralnih ulceracija, vegetantnog piostomatitisa i granulomatoznih lezija. Pacijenti sa IBC i ekstraintestinalnim manifestacijama češće imaju i druge imuno-posredovane bolesti, poput oboljenja štitaste žlezde, pankreasa, različitih vaskulitisa i sistemskih bolesti vezivnog tkiva ¹²⁷.

1.3.3. Serološki markeri povezani sa IBC

Kao jedno od pomoćnih sredstava u dijagnostici IBC, naročito u diferencijalno dijagnostičke svrhe, koriste se i serološki markeri, među kojima su anti-neutrofilna citoplazmatska antitela (ANCA) i antitela na *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) ¹²⁸.

1.3.3.1. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitela (ASCA)

ASCA su usmerena na gljivicu koja se široko koristi u industriji hrane. Pokazano je da je specifičan antigen na koji su usmerena ASCA oligomanozni epitop koji se nalazi na ćelijskom zidu gljivica ¹²⁹. Ovaj manozni polisaharid je takođe komponenta humanog manozna-vezujućeg lektina, koji učestvuje u anti-mikrobnom imunskom odgovoru. Kod pacijenata sa Kronovom bolešću koji su ASCA pozitivni, ovaj lektin se nalazi u sniženim koncentracijama, a otkriveno je da ovi pacijenti poseduju i mutacije za manozni lektin ¹³⁰.

Kod pacijenata sa KB, prevalenca ASCA se kreće od 39% do 76% ^{131,132}. ASCA IgG i IgA klase se mogu koristiti kao dijagnostički markeri za Kronovu bolest, naročito u diferencijalno dijagnostičke svrhe u odnosu na UK. Senzitivnost je u većini studija niska i u jednoj studiji je iznosila 59.1% za ASCA IgA, 44.1% za ASCA IgG ¹³⁰, a u studiji Linskens i sar. ¹³³ 72% za obe klase antitela. Specifičnost je u većini studija viša i kreće se od 82-98.1% za obe klase antitela ¹³⁴.

Zastupljenost ASCA kod pacijenata sa dijarejom, ali bez dijagnostikovane IBC je između 5-15%, kod zdravih kontrola od 1-6% ¹⁴¹, a kod zdravih srodnika pacijenata sa KB oko 20% ¹³⁵.

Više studija je potvrdilo povezanost nalaza ASCA u višim koncentracijama, naročito klase IgA, sa progresivnim i ekstenzivnim kliničkim fenotipom Kronove bolesti ¹³⁶, kao i sa potrebom za operativnim tretmanom u ranijoj fazi bolesti ¹³⁷. Takođe, uočen je češći nalaz ASCA kod mlađih pacijenata. Klinička aktivnost i dužina trajanja bolesti nisu korelirale sa nalazom ASCA, zbog čega se nalaz ASCA povezuje sa genetskom osnovom ¹³⁸.

ASCA obe klase su, osim kod pacijenata sa KB, u značajnijem procentu detektovana i kod pacijenata sa GSE ¹³⁹, Behčetovom bolešću ¹⁴⁰, a kod pacijenata sa ankilozirajućem spondilitisom je pokazan nalaz ASCA IgA u višim koncentracijama u odnosu na kontrole ¹⁴¹.

1.3.3.2. Anti-neutrofilna citoplazmatska antitela (ANCA)

ANCA su autoantitela koja su usmerena na različite peptide i enzime neutrofila. Mogu se određivati metodom indirektno imunofluorescence (IIF) i ELISA metodom. U

zavisnosti od neutrofilnog antigena na koja su usmerena kao i njihove lokalizacije u neutrofilima, ANCA se u IIF mogu prikazati kao citoplazmatska (c-ANCA), perinuklearna (p-ANCA) i atipična (x-ANCA). Osim toga, IIF nam može kvantifikovati ANCA nalaz u vidu titra. Metodom ELISA se ciljano ispituje određena antigenska specifičnost ANCA i ujedno određuje i njihova koncentracija.

Kod pacijenata sa UK se najčešće pronalazi p-ANCA, mada se može naći i x-ANCA. U literaturi se pominje da se p-ANCA nalaze u 40-78% pacijenata sa UK ¹⁴². Specifičnost kod UK se kreće oko 90%, a senzitivnost od 39.6-63% ^{143,144}. Stoga se ANCA smatra jednim od pomoćnih dijagnostičkih markera za UK, a naročito kada je potrebna pomoć u razlikovanju sa KB.

Neutrofilni peptidi na koje mogu biti usmerena ANCA obuhvataju mnogobrojne enzime smeštene u neutrofilnim granulama, ali i različite proteine koji se nalaze u sastavu jedra. Tu spadaju proteinaza 3 (PR3), mijeloperoksidaza (MPO), elastaza, katepsin G, laktoferin, "*bacterial-permeability increasing protein*" (BPI), histoni i drugi. Mnogi od ovih neutrofilnih antigena su angažovani u anti-mikrobnom odgovoru i regulaciji imunskog odgovora, a neki od njih se proizvode i izvan neutrofila ¹⁴⁵.

Iako neke studije nisu pronašle udruženost ANCA sa kliničkim karakteristikama UK ^{146,147}, više studija je saglasno da se ANCA češće nalaze kod dugotrajne i refraktorne forme ove bolesti ^{148,149}, a pokazana je i povezanost ANCA titra i koncentracije sa aktivnošću kolitisa.

1.4. Preosetljivost na komponentne hrane

Konzumiranje nekih namirnica, kao što su čokolada, konzervansi, orašasto voće, gluten, proteini kravljeg mleka, jaja, riba i drugo, mogu izazvati hipersenzitivnost kod određenih individua. Studija Natah-a i sar. ³ iz 2004. godine, je pokazala da neke od ovih komponenti hrane mogu izazvati proinflamatornu reakciju i sklonost ka učestaloj pojavi ROU. O'Farely i sar. ¹⁵⁰ su dokazali udruženost anti- α -glijadinskih antitela kod pacijenata sa ROU, a Thomas i sar. ⁵¹ su još 1973. godine pronašli značajan porast antitela na proteine kravljeg mleka kod iste kategorije pacijenata. Ipak, rezultati studija koje su ispitivale uspešnost lečenja ROU eliminacijom određene vrste hrane i promenom dijetetskih navika i dalje su kontradiktorne ^{151,152}.

Etiopatogenetski posmatrano, kod hipersezivnosti na određene komponentne hrane takođe učestvuju više faktora. Na prvom mestu, kao neophodan ulsov je prodor antigena hrane u dublje slojeve mukoze i submukozu, što se dešava usled narušene epitelne barijere ¹⁵³. Postojanje antitela na komponente hrane je pokazatelj povećane mukozne permeabilnosti ⁵¹. Neophodan je i neadekvatan i disregulisan odgovor mukoznog imuniteta, koji se ogleda u prekomernoj aktivaciji lokalnih mast-ćelija, CD-16, CD-89 ćelija, sa posledičnom produkcijom IgE, IgA, IgG antitela što može dovesti do lezija ćelija epitela i kliničke slike ROU.

U osnovi, proteini kravljeg mleka imaju više proteinskih komponenti (α -kazein, β -kazein, laktalbumin i drugi), a imunska reakcija može da se usmeri na različite antigenske epitope. Varijabilnost u antigenskim determinantama proteina kravljeg mleka takođe mogu biti razlog za individualni imunski i inflamatorni odgovor. ⁽⁵²⁾

1.5. Radna hipoteza

Oralna mukoza, kao početni deo digestivnog sistema, učestvuje u kompleksnim procesima stvaranja i održavanja imunske tolerancije na oralno unete antigene iz spoljašnje sredine, kao što su antigeni hrane i komensalni mikrobi. Ovi procesi se dalje intenzivno nastavljaju u ostalim partijama gastrointestinalnog trakta, zahvaljujući brojnim digestivnim enzimima, različitim peptidima i limfoidnom tkivu mukoze.

Poremećaji oralne tolerancije, mukoznog imuniteta i funkcionalnosti epitelne barijere se nalaze u etiopatogenezi GSE, IBC, preosetljivosti na pojedine alergene iz hrane, a takođe mogu posredovati i u nastanku ROU. Imajući u vidu složenu imunoetiopatogenezu ROU, koja nije sasvim razjašnjena, kao ni povezanost ROU sa GSE i IBC, opravdano je sprovesti studiju koja bi ispitala prisustvo i koncentracije seroloških markera kod pacijenata sa ROU.

Učestalost prisustva novih deamidovanih antitela specifičnih za GSE nije do sada ispitivana kod pacijenata sa ROU. Takođe, ne postoje podaci o vrednostima koncentracija GSE-specifičnih i IBC-povezanih seroloških markera kod pacijenata sa ROU. Rezultati studije bi mogli da pokažu dijagnostičku i kliničku vrednost novih GSE-specifičnih markera kod ovih pacijenata, ali i da ukažu na dalje smernice po pitanju etioloških mehanizama ROU.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je da se u serumu pacijenata sa ROU, u odnosu na zdrave ispitanike, odredi:

1. Prevalenca i koncentracija visoko specifičnih seroloških markera celijakije (antitela protiv tkivne transglutaminaze, deaminiranog glijadina i fuzionih glijadinskih analoga)
2. Prevalenca i koncentracija antitela koja se najčešće sreću u Kronovoj bolesti (antitela specifična za *Saccharomyces cerevisiae* - ASCA) i ulceroznom kolitisu (antitela specifična za citoplazmatske antigene neutrofilnih leukocita – ANCA)
3. Imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka i glijadin
4. Međusobna povezanost između produkcije prirodnih antitela na proteine hrane i produkcije autoantitela koja se sreću u inflamatornim bolestima creva i celijakiji

3. PACIJENTI, MATERIJAL I METODE

Ispitivanje karakteristika humoralnog imunskog odgovora kod pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama podeljeno je na klinički i laboratorijski deo.

3.1. Klinička ispitivanja

Klinički deo istraživanja je sproveden na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu u periodu od aprila 2011. do maja 2014. godine. Etički odbor Stomatološkog fakulteta, svojom odlukom broj 36/13, odobrio je plan studije, metode prikupljanja podataka, kao i postupak dobijanja informisanog pristanka pacijenata.

Eksperimentalnu grupu je činilo ukupno 73 pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Kod svih pacijenata je postavljena dijagnoza *aphtae minor* na osnovu prihvaćenih kriterijuma ⁸. U studiju nisu uključivani ispitanici koji su anamnestički izneli podatke o postojanju etioloških faktora koji mogu izazvati oralne ulceracije. Svi pacijenti su dobrovoljno dali informisani pristanak o učešću u istraživanju, koji podrazumeva klinički pregled i uzimanje uzorka venske krvi.

Kontrolnu grupu je činilo ukupno 89 zdravih osoba, koje su dobrovoljno dale krv na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, Stomatološkom fakultetu u Beogradu, kao i na Fakultetu Medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu. Kontrolna grupa je regrutovana među ljudima slične starosne strukture, kod kojih je anamnezom i kliničkim pregledom ustanovljeno odsustvo rekurentnih oralnih ulceracija i sistemskih oboljenja.

Svi pacijenti i zdravi ispitanici su bili stariji od 18 godina. Broj ispitanika se razlikovao prema obavljenim serološkim testovima, kako je naznačeno u rezultatima. Klinički deo istraživanja je obuhvatao detaljnu anamnezu i stomatološki pregled.

Od **anamnestičkih podataka** registrovano je sledeće:

- demografski podaci pacijenta,
- glavne tegobe,
- sadašnja bolest (koliko se često promene javljaju, dužinu trajanja, broj ulceracija po epizodi bolesti, veličinu ulceracija i dr.),
- lična anamneza (da li postoje neka sistemska oboljenja, da li ima genitalne ulceracije, da li i koje lekove i sredstva pacijent uzima i u kojim dozama, postojanje loših navika, konzumacija alkohola, duvana i psihoaktivnih supstanci),
- porodična anamneza (postojanje sličnih tegoba ili nekih sistemskih oboljenja u porodici pacijenta)

Klinički pregled je obuhvatao:

- ekstraoralni nalaz (eventualno prisustvo promena na ekstraoralnim strukturama, koži, očima, kranijalnim nervima, limfnim čvorovima i dr.)
- intraoralni nalaz (gde se promena nalazi, lokalizacija, oblik, veličina i broj promena).

Svi prikupljeni podaci su uneti u istraživački karton. Za potrebe ovog istraživanja korišćen je istraživački karton Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu.

Nakon uzimanja anamneze i obavljenog kliničkog pregleda, istog dana, pacijentima je intravenskom punkcijom uzimano 10 ml krvi iz koje se centrifugiranjem izdvajao serum. Uzorci su zamrzavani u više alikvota na temperaturi od -20°C do analiziranja.

Datum _____

Broj kartona

ORALNA MEDICINA - PREGLED

OPŠTI PODACI O BOLESNIKU

Prezime i ime _____

Godina rođenja _____

Adresa _____

Telefon _____

Zanimanje _____

Bračno stanje _____

Deca _____

Glavne tegobe (peckanje, žarenje, suvoća usta, krvarenje....)

Bol da ne

Kvalitet: oštar tup pekući

Trajanje bola: _____

Lokalizacija: unilateralni bilateralni centralni

Vreme pojavljivanja: _____

Deklanširajući faktor: _____

Ometa san: da ne

Objektivni znaci: da ne

Egzacerbacija: _____

Reakcija na analgetike: _____

Sadašnja bolest

Početak bolesti _____

Prodromalni simptomi _____

Tok bolesti (poboljšanja, pogoršanja) _____

učestalost recidiva _____

Prisustvo ekstraoralnih promena (koža, oči, genitalna sluzokoža) _____

Lekovi koje je pacijent uzimao pre početka simptoma _____

Lekovi i lekovita sredstva koje je koristio u cilju olakšanja tegoba _____

Lična anamneza

		<i>NE</i>	<i>DA</i>
KVS	oboljenja srca, hipertenzija, angina pectoris, sinkopa		
	operacije srca, reumatska groznica, endokarditis		
	poremećaji u krvarenju antikoagulantna terapija		
	Anemija		
RS	astma, TBC, bronhitis i dr.		
GU	bubrezi, bešika, polne bolesti		
	trudnoća, menstruacija, kontracepcija		
GI	hepatitis, žutica, druga oboljenja jetre		
	čir na želucu, celiakija, Kronova bolest, ulcerozni kolitis i dr.		
CNS	gluvoća		
	šlog, MS, Parkinsonova bolest, druge neurološke bolesti		
	psihijatrijski problem		
	epilepsija, konvulzije mentalna hendikepiranost		
END	Dijabetes mellitus Tireoidea druge bolesti		
HEM	Granulocitoza Granulocitopenija i agranulocitoza Ciklična neutropenija Kvalitativni poremećaji Le Leukemija, Mijelom, Limfom		
	Policitemija Anemija: mikrocitna hipohromna, Plummer-Vinson, megaloplastna, perniciozna itd.		
	Trombocitopenija Koagulopatije kao posledica lekova (dikumarol, aspirin, heparin...) Hemofilija A i B Von Willebrand		

IMUN	Alergije Primarne imunodeficijencije Sekundarne imunodef: sarkoidoza, AIDS Bolesti vezivnog tkiva: lupus, erythematosus, scleroderma, RA, DM		
Kožne bolesti			
Očne bolesti			
Lokomotorni system			
Ishrana, unošenje masti			
Putovanja			
Ljubimci			

Lekovi (koliko dugo ih koristi, dnevne doze)

Loše navike

Disanje na usta da ne

Grickanje stranih predmeta da ne

Sisanje bombona da ne

Alkohol da ne ranije da ne

Duvan da ne ranije da ne

Droga da ne ranije da ne

Porodična anamneza

Potpis pacijenta _____

KLINIČKI NALAZ

EKSTRAORALNI NALAZ

	Normalno	patološki nalaz
Oči		
Koža lica		
Usne		
Limfne žlezde		
Tireoidna žlezda		
TMZ		
Pljuvačne žlezde		
Kranijalni nervi		

TA	<input type="text"/>	Koža	_____
Puls	<input type="text"/>	Nokti	_____
Temperatura	<input type="text"/>	Slezina	_____
Mokraća	_____	Jetra	_____

INTRAORALNI NALAZ

Status localis

Lokalizacija

usne i uglovi usana
gingiva
jezik
nepce
farings

oralna sluzokoza
obraz
usana
vent. p. jezika
pod usta

da	ne

Oblik

Boja

Veličina

Ivice

Dno (površina)

Granica prema okolnom tkivu

Solitarna

Multipla

Rekurentna

Datum prve epizode

Učestalost epizoda

jasna	nejasna
da	ne
da	ne
da	ne

da	ne

Odnos prema nivou o.s.

Macula
Enathema
Papula
Vesicula
Bulla
Pustula
Crusta
Tumor
Tuber
Nodus et nodulus
Plax
Squama
Naslage
Hyperkeratosis

Cysta
Abscessus
Oedema
Hypertrophia
Hyperplasia
Erosia
Ulcus
Fissura et rhagas
Atrophia
Fistula
Necrosis
Gangrena
Cicatrix

da	ne

STATUS ZUBA

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Oralna higijena da ne pravilna nepravilna
Oboljenja parodontijuma: ne da _____
Oštre ivice zuba: ne da _____

Parafunkcije grickanje sluzokože da ne stiskanje zuba da ne
tiskanje jezika da ne bruksizam da ne

Različiti metali: - amalgam da ne

- zlato da ne

- legure da ne

Protetske nadoknade: - fiksne da ne

- mobilne (akrilatne, vizil) da ne

Ortodonski aparat: - fiksne da ne

- mobilne da ne

Otežano nicanje zuba: _____

DIFERENCIJALA DIJAGNOZA _____

TESTIRANJA

1. Oralni testovi

	Poz	Neg		Poz	Neg
Test edema			Breningov test		
Test fragilnosti kapilara			Intenzitet salivacije		
Kolorimetrijsko test. inflamacije			Kserostomija		
Nivo C vitamina			pH pljuvačke		
Toluidin plavo			Termoestezijski test		
Šilerova jodna proba			Galvanske struje		
Nikolski			Probna terapija		
Vitropresija					

2. Kliničko laboratorijski testovi

Mikrobiološko ispitivanje

Antibiogram

Virusološka dijagnostika

Titar At na viruse (HIV, HSV,

Hepatitis A, B, C, CMV,

Coxackie i dr.)

Kvalitativni sastav pljuvačke

Titar antitela na HIV u pljuvački

Eksfolijativno citološki testovi

Tzankov test

Biopsija

3. Laboratorijska ispitivanja

Hematološka ispitivanja

Eritrociti	<input type="text"/>	Trombociti	<input type="text"/>
Leukociti	<input type="text"/>	Hematokrit	<input type="text"/>
Gr	<input type="text"/>	Sedimentacija	<input type="text"/>
Li	<input type="text"/>	Vreme krvarenja	<input type="text"/>
Mo	<input type="text"/>	Vreme koagulacije	<input type="text"/>
Baz	<input type="text"/>	Hemoglobin	<input type="text"/>
Eoz	<input type="text"/>	Sedimentacija	<input type="text"/>

Biohemijska ispitivanja

(glikemija, gvožđe, i dr.)

Alergološka ispitivanja

Imunološka ispitivanja

4.Rdg

ORALNO MEDICINSKA DIJAGNOZA _____

PLAN TERAPIJE

lokalna _____

opšta _____

3.2. Laboratorijska ispitivanja

Laboratorijski deo istraživanja je obavljen na Klinici za alergologiju i imunologiju Kliničkog centra Srbije, kao i u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Na prikupljenim uzorcima krvi pacijenata sa ROU i zdravih ispitanika, vršena su ispitivanja navedena u daljem tekstu.

3.2.1. Određivanje prisustva i koncentracije antitela specifičnih za tkivnu transglutaminazu (t-TG) IgG i IgA klase

Za određivanje antitela protiv t-TG korišćen je komercijalni ELISA test (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Euroimmun, Libek, Nemačka). Mikrotitarske ploče obložene su rekombinantnom tkivnom transglutaminazom. Serumi pacijenata i zdravih ispitanika razblaženi su u odnosu 1:201 u puferu. U svaki bunarić ploče dodavano je po 100 μ L kalibratora koji sadrže poznate koncentracije antitela izražene u relativnim jedinicama (RU) po mL (2; 20; 200 RU/mL), pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma i razblaženih seruma pacijenata i zdravih ispitanika. Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi ploče su isprane tri puta sa po 300 μ L rastvora za ispiranje. U svaki bunarić je potom dodavano po 100 μ L anti-humanih IgG i IgA antitela obeleženih enzimom, peroksidazom (engl. *horseradish peroxidase*, HRP). Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi pločice su isprane tri puta sa po 300 μ L rastvora za ispiranje. U svaki bunarić je zatim dodato po 100 μ L enzimskog supstrata (tetrametilbenzidin–TMB sa H_2O_2). Inkubacija sa supstratom je trajala 15 minuta. Reakcija je prekidana dodavanjem 100 μ L rastvora koji sadrži 0.5 M sumpornu kiselinu. Optička gustina (apsorbancija) određivana je spektrofotometrijski pri talasnoj dužini od 450 nm, uz korišćenje referentnog filtra od 620 nm. Na osnovu očitanih optičkih gustina za kalibratore poznatih koncentracija formirana je kalibraciona kriva. Koncentracije antitela u serumima pacijenata i zdravih ispitanika određivane su interpolacijom uz pomoć softvera za preračunavanje. Prema preporuci proizvođača, gornja granica normalnih vrednosti iznosila je 20 RU/mL za IgG i IgA antitela.

3.2.2. Određivanje prisustva i koncentracije antitela specifičnih za deaminirane glijadinske peptide (DGP) IgG i IgA klase

Antitela specifična za DGP su detektovana uz pomoć komercijalnog ELISA testa (Biosystem, Barselona, Španija). Mikrotitarske ploče obložene su deaminiranim glijadinskim peptidima. Serum i pacijenata i zdravih ispitanika razblaženi su u odnosu 1:100 u puferu. U svaki bunarčić mikrotitarske ploče dodavano je po 100 μ L kalibratora koji sadrže poznate koncentracije antitela (0; 6; 12; 25; 50 i 100 U/mL), pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma i razblaženih seruma pacijenata i zdravih ispitanika. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, ploče su isprane tri puta sa po 300 μ L rastvora za pranje. U svaki bazenčić je potom dodavano po 100 μ L anti-humanih IgG i IgA antitela obeleženih enzimom, HRP. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, u vlažnoj komori, ploče su isprane tri puta sa po 300 μ L rastvora za ispiranje. U svaki bunarčić je zatim dodato po 100 μ L enzimskog supstrata (tetrametilbenzidin – TMB sa H_2O_2). Inkubacija sa supstratom je trajala 15 minuta. Obojena reakcija je prekidana dodavanjem 100 μ L rastvora koji sadrži 1 M hlorovodoničnu kiselinu. Optička gustina (OG) određivana je spektrofotometrijski pri talasnoj dužini od 450 nm, uz korišćenje referentnog filtra od 620 nm. Prema preporuci proizvođača standardni kalibrator sa koncentracijom 0 U/mL koristi se za podešavanje i vrednost očitane OG za ovaj standard ne sme biti viša od 0.150. Na osnovu očitanih optičkih gustina za kalibratore poznatih koncentracija formirana je kalibraciona kriva. Koncentracije antitela u serumima pacijenata i zdravih ispitanika određivane su interpolacijom uz pomoć softvera za preračunavanje. Prema preporuci proizvođača, uzorci seruma koji imaju koncentraciju IgA i IgG anti DGP antitela ≥ 10 U/ml smatraju se pozitivnim.

3.2.3. Određivanje prisustva i koncentracije antitela specifičnih za fuzione peptide, glijadinske analoge (GAF-3X) IgA klase

Određivanje prisustva i koncentracije antitela protiv GAF-3X vršeno je komercijalnim ELISA testom (Euroimmun, Libek, Nemačka). Mikrotitarske ploče obložene su fuzionim peptidima dobijenih rekombinantnom tehnologijom koji predstavljaju glijadinske analoge (GAF), a sastoje se od tri repetitivne sekvence. Serum i pacijenata i zdravih ispitanika razblaženi su u odnosu 1:201 u puferu. U svaki bunarčić

mikrotitarske ploče dodavano je po 100 μ L kalibratora koji sadrže poznate koncentracije antitela specifičnih za GAF-3X izražene u relativnim jedinicama (RU) po mL (2; 25; 200 RU/mL), pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma i razblaženih seruma pacijenata i zdravih ispitanika. Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi bunarčići su isprani tri puta sa po 300 μ L rastvora za ispiranje. U svaki bunarčić je potom dodavano po 100 μ L anti-humanih IgG i IgA antitela obeleženih enzimom, HRP. Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi bunarčići su isprani tri puta sa po 300 μ L rastvora za pranje. U svaki bunarčić je zatim dodato po 100 μ L enzimskog supstrata (tetrametilbenzidin –TMB sa H₂O₂). Inkubacija sa supstratom je trajala 15 minuta. Obojena reakcija je prekidana dodavanjem 100 μ L rastvora koji sadrži 1 M sumpornu kiselinu. Optička gustina određivana je spektrofotometrijski pri talasnoj dužini od 450 nm, uz korišćenje referentnog filtra od 620 nm. Na osnovu očitanih optičkih gustina za kalibratore poznatih koncentracija formirana je kalibraciona kriva. Koncentracije antitela u serumima pacijenata i zdravih ispitanika određivane su interpolacijom uz pomoć softvera za preračunavanje. Prema preporuci proizvođača, gornja granica normalnih vrednosti iznosila je 25 RU/mL za IgG i IgA antitela.

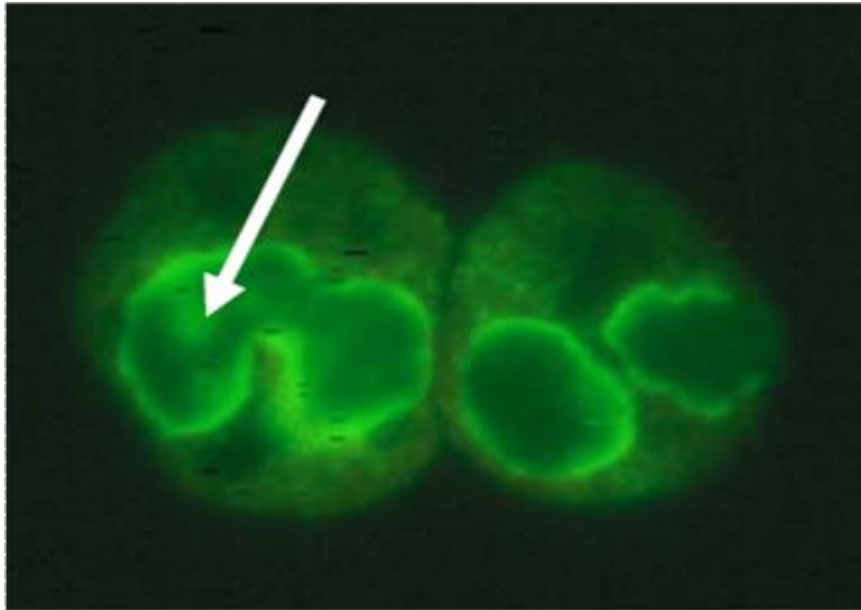
3.2.4. Određivanje prisustva i koncentracije antitela specifičnih za *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) IgG i IgA klase

Specifična antitela za *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) detektovana su komercijalnim ELISA testom (Orgentec Diagnostika, Mainz, Nemačka). Mikrotitarske ploče obložene su mananom iz ćelijskog zida gljivice *Saccharomyces cerevisiae*. Antitela se vezuju za oligomanozidne epitope. Serumi pacijenata i zdravih ispitanika razblaženi su u odnosu 1:100 u puferu. U svaki bunarčić mikrotitarske ploče dodavano je po 100 μ L kalibratora koji sadrže poznate koncentracije antitela (0; 6.3; 12.5; 25; 50 i 100 U/mL), pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma i razblaženih seruma pacijenata i zdravih ispitanika. Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi bunarčići su isprani tri puta sa po 300 μ L rastvora za ispiranje. U svaki bunarčić je potom dodavano po 100 μ L anti-humanih IgG i IgA antitela obeleženih enzimom, HRP. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi bunarčići su isprani tri puta sa po 300 μ L rastvora za ispiranje. U svaki bunarčić je zatim dodato po 100 μ L enzimskog supstrata (tetrametilbenzidin – TMB sa H₂O₂). Inkubacija sa supstratom je trajala 15 minuta. Obojena reakcija je

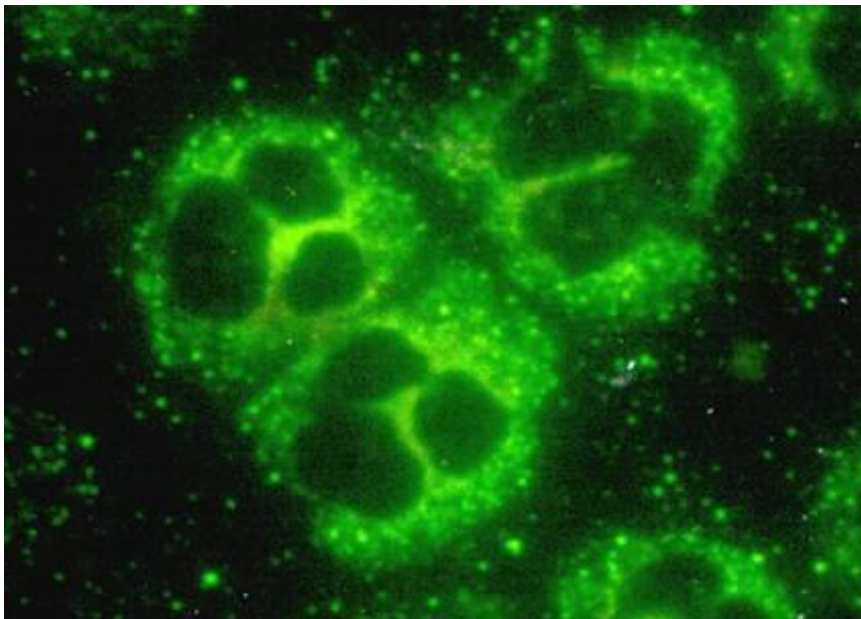
prekidana dodavanjem 100 μ L rastvora koji sadrži 0.5 M sumpornu kiselinu. Optička gustina određivana je spektrofotometrijski pri talasnoj dužini od 450 nm, uz korišćenje referentnog filtra od 620 nm. Na osnovu očitanih optičkih gustina za kalibratore poznatih koncentracija formirana je kalibraciona kriva. Koncentracije antitela u serumima pacijenata i zdravih ispitanika određivane su interpolacijom uz pomoć softvera za preračunavanje. Prema preporuci proizvođača, gornja granica normalnih vrednosti iznosila je 10 U/mL za IgG i IgA antitela.

3.2.5. Određivanje prisustva antitela specifičnih za citoplazmatske antigene neutrofila (ANCA)

Prisustvo antitela specifičnih za citoplazmatske antigene neutrofila (engl. *antineutrophil cytoplasmic antibodies*, ANCA) određivano je metodom indirektno imunofluorescencije (IIF) u serumima pacijenta i zdravih ispitanika. Korišćeni su standardni preparati humanih neutrofilnih leukocita fiksiranih etanolom (Euroimmun, Libek, Nemačka). Serumi pacijenata, zdravih ispitanika, kao i pozitivni i negativni kontrolni serumi razblaženi su u fosfatnom puferu (pH=7.2) u odnosu 1:40. Po 20 μ L razblaženih seruma dodavano je na supstrat neutrofilnih leukocita koji su prethodno bili fiksirani u etanolu. Pločice su inkubirane tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi i ispirane tri puta u trajanju od po 5 minuta u fosfatnom puferu. U drugom koraku su pločice inkubirane tokom 30 minuta sa anti-humanim IgG antitelima obeleženim fluorescein izotiocijanatom (FITC). Nakon toga pločice su ispirane rastvorom fosfatnog pufera, dodavan je glicerolski pufer i pokrivno stakalce. Mesta na kojima su se vezala antitela vizuelizuju se uz pomoć fluorescentnog mikroskopa. Pozitivni uzorci su dalje titrirani u dvostrukim razblaženjima. Poslednje razblaženje koje je davalo pozitivnu reakciju označavano je kao konačni titar. Pozitivni uzorci su definisani i prema tipu bojenja kao: periferni tip (pANCA, Slika 1.), citoplazmatski tip (cANCA, Slika 2.) i atipičan tip bojenja (xANCA).



Slika 1. Periferni tip bojenja (p ANCA).



Slika 2. Citoplazmatski tip bojenja (cANCA)

3.2.6. Određivanje koncentracije antitela specifičnih za glijadin

Određivanje koncentracije antitela specifičnih za glijadin iz pšenice IgM, IgG, IgA i IgE klase vršeno je primenom ELISA testa. Radni rastvor glijadina napravljen je razblaživanjem rastvora glijadina u 1% SDS-u (engl. *sodium dodecyl sulfate*) koncentracije 1 mg/mL u 70% etanolu do finalne koncentracije od 50 µg/mL. Korišćen je glijadin proizvođača Sigma-Aldrich (kataloški broj G3375). U bunariće polistirenske mikrotitarske ploče sa 96 bunarića (F96 MaxiSorp NuncTM Immuno Plate, kat. broj 442404, Thermo Fisher Scientific, Denmark) sipano je po 100 µL radnog rastvora glijadina, i ploče su zatim inkubirane tokom noći na sobnoj temperaturi na otvorenom, kako bi iz rastvora antigena ispario etanol. Sledećeg dana u ploče obložene glijadinom sipano je po 200 µL rastvora 1% BSA (engl. *bovine serum albumin*) u TTBS-u (engl. *tris-buffered saline*, TBS). TTBS predstavlja smešu TBS-a i 0.05 % Tween 20. Goveđi serum albumin (BSA) omogućava blokiranje nespecifičnih mesta vezivanja. Nakon 1h inkubacije na sobnoj temperaturi, ploče su isprane 3 puta rastvorom 0.05% Tween 20 u PBS-u (engl. *phosphate buffer saline*). Nakon uklanjanja rastvora za ispiranje, u bunariće ploče je sipano po 50 µL uzoraka seruma razblaženih u 1% BSA u TTBS-u u odnosu 1:100, i to u kvadruplikatu (duplikat za antigen i duplikat za blank seruma). U odgovarajuće bunariće ploče sipani su serumi kalibratora i to u sledećim razblaženjima: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600. Humani serumi koji su imali najvišu koncentraciju anti-glijadinskih antitela IgM, IgG, IgA i IgE klase su korišćeni za kalibraciju. Uzorci seruma su inkubirani 1h na sobnoj temperaturi, a potom su ploče isprane 3 puta. Sekundarna antitela konjugovana sa HRP su korišćena za detekciju primarnih antitela vezanih za antigen glijadin (anti-humano ovčije IgM antitelo, anti-humano ovčije IgG antitelo, anti-humano ovčije IgA antitelo i anti-humano kozje IgE antitelo). Anti-humana ovčija sekundarna antitela bila su proizvod kompanije The Binding Site, dok je anti-humano kozje antitelo bilo proizvod kompanije Sigma Aldrich. U ploče je sipano po 50 µL sekundarnih antitela razblaženih u 1% BSA u TTBS-u, nakon čega je usledila inkubacija od 1h. Ploče su zatim isprane 5 puta. U bunariće je zatim dodato po 100 µL rastvora supstrata - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. Nakon kraće inkubacije u mraku enzimska reakcija je prekinuta dodatkom 50 µL 2M sumporne kiseline. Neposredno posle prekidanja, apsorbancija uzoraka je očitavana na talasnoj dužini od 450 nm

načitaču Multiskan EX Thermo Labsystems. Od apsorbancije uzoraka seruma oduzimana je apsorbancija odgovarajućih blankova.

Nivoi IgG i IgA antitela specifičnih za glijadin iz pšenice, predstavljeni su u jedinicama IU/mL. Dok su nivoi IgM i IgE antitela specifičnih za glijadin iz pšenice, predstavljeni u arbitrarnim jedinicama AU/mL. Referentne vrednosti za definisanje povišenih nivoa antitela IgM, IgG, IgA i IgE klase dobijene su na osnovu analize seruma zdravih osoba. Predstavljene su kao srednja vrednost + dvostruka vrednost standardne devijacije ($\bar{X} + 2SD$), pre čega su iz referentnih vrednosti izbačene kontrole čiji je nivo antitela bio viši od vrednosti $\bar{X} + 2,5SD$. Referentne vrednosti za nivo antitela specifičnih za glijadin iz pšenice predstavljene su u Tabeli 1.

Tabela 1. Referentne vrednosti za nivo antitela specifičnih za glijadin iz pšenice

Nivoi antitela specifičnih za glijadin	IgM antitela (AU/mL)	IgG antitela (IU/mL)	IgA antitela (IU/mL)	IgE antitela (AU/mL)
	92.0	12.6	3.4	25.0

3.2.7. Određivanje koncentracije antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka

Određivanje koncentracije antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka IgM, IgG, IgA i IgE klase vršeno je primenom ELISA testa. Radni rastvor proteina kravljeg mleka napravljen je u bikarbonatnom puferu i njegova koncentracija bila je 100 µg/mL. Korišćeni su proteini kravljeg mleka od proizvođača ICN Pharmaceuticals. U bunariće polistirenske mikrotitarske ploče sa 96 mesta sipano je po 100 µL radnog rastvora proteina kravljeg mleka, i ploče su zatim inkubirane tokom noći na temperaturi od 4°C. Sledećeg dana ploče su isprane 3 puta, a zatim je u ploče obložene proteinima kravljeg mleka sipano po 200 µL rastvora 1% BSA u TTBS-u. Nakon 1h inkubacije na sobnoj temperaturi, ploče su isprane 3 puta. Nakon uklanjanja rastvora za ispiranje, u bunariće ploče je sipano po 50 µL uzoraka seruma razblaženih u 1% BSA u TTBS-u u odnosu 1:100 u kvadrilikatu. U odgovarajuće bunariće ploče sipani su serumi kalibratora i to u sledećim razblaženjima: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600. Humani serumi koji su imali najvišu koncentraciju antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka IgM, IgG, IgA i IgE klase su korišćeni za kalibraciju. Uzorci seruma su inkubirani 1h na sobnoj temperaturi, a potom su ploče isprane 3 puta. Sekundarna antitela konjugovana sa

peroksidazom rena su korišćena za detekciju primarnih antitela vezanih za antigen. U ploče je sipano po 50 μL sekundarnih antitela razblaženih u 1% BSA u TTBS-u, nakon čega je usledila inkubacija od 1h. Ploče su zatim isprane 5 puta. U bunariće je zatim dodato po 100 μL rastvora supstrata - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. Nakon kraće inkubacije u mraku enzimska reakcija je prekinuta dodatkom 50 μL 2 M sumporne kiseline. Neposredno posle prekidanja, apsorbancija uzoraka je očitavana na talasnoj dužini od 450 nm. Od apsorbancije uzoraka seruma oduzimana je apsorbancija odgovarajućih blankova.

Nivoi IgM, IgG, IgA i IgE antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka, predstavljeni su u arbitrarnim jedinicama AU/mL. Referentne vrednosti za definisanje povišenih nivoa antitela IgM, IgG, IgA i IgE klase dobijene su na osnovu analize seruma zdravih osoba. Predstavljene su kao srednja vrednost + dvostruka vrednost standardne devijacije ($X_{av} + 2SD$), pre čega su iz referentnih vrednosti izbačene kontrole čiji je nivo antitela bio viši od vrednosti $X_{av} + 2,5SD$. Referentne vrednosti za nivoe antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka predstavljene su u Tabeli 2.

Tabela 2. Referentne vrednosti za nivoe antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka

Nivoi antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka	IgM antitela (AU/mL)	IgG antitela (AU/mL)	IgA antitela (AU/mL)	IgE antitela (AU/mL)
	127.0	36.1	30.4	33.8

3.3. Statistička analiza dobijenih podataka

Podaci koji imaju kontinualnu vrednost izraženi su kao srednje vrednosti i standardne devijacije srednjih vrednosti. Za ispitivanje slaganja njihove distribucije između ispitivanih grupa korišćen je Studentov T test, Man-Vitnijev (engl. *Mann-Whitney*) test, analiza varijanse (ANOVA) test i Kruskal-Volisov (engl. *Kruskal-Wallis*) test, u zavisnosti od prisustva normalne raspodele. Za kategorijske varijable korišćen je test nezavisnosti između dve kategorijske varijable Pirsonov χ^2 test. Za utvrđivanje korelacije dve varijable korišćen je Spirmanov (engl. *Spearman*) test. U svim testovima vrednosti verovatnoće, p-vrednosti manje od 0.05 smatrane su značajnima, a manje od 0.01 visoko značajnim.

4. REZULTATI

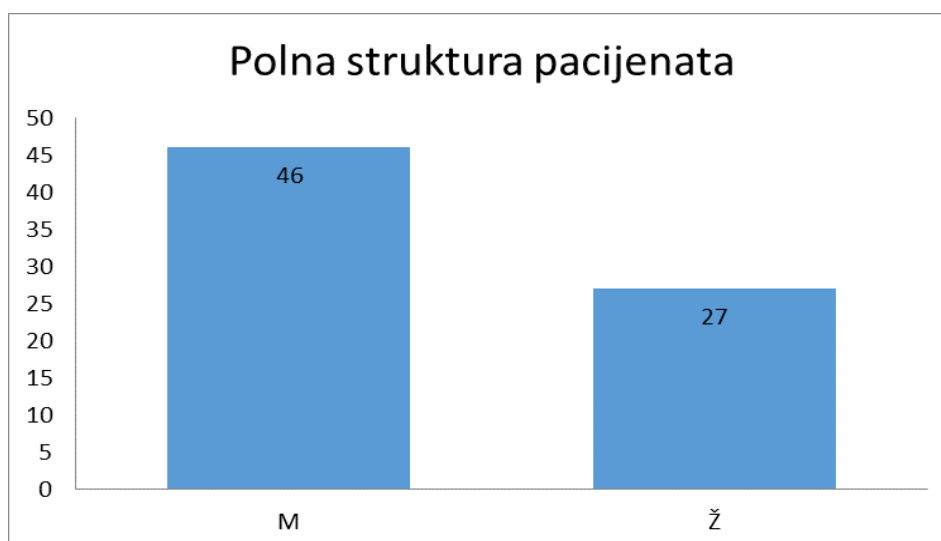
Rezultate dobijene analizom podataka prikupljenih od 73 pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (eksperimentalna grupa) i 89 zdravih osoba (kontrolna grupa) predstavili smo u 5 kategorija. Pacijenti sa ROU nisu imali gastrointestinalne smetnje, negirali su prisustvo sistemskih oboljenja i nisu koristili lekove koji potencionalno mogu izazvati ulceracije. Kontrolnu grupu činile su zdrave osobe, koje nisu imale kliničke znakove rekurentnih oralnih ulceracija, niti su imale gastrointestinalne tegobe.

4.1. Demografski podaci

Demografski podaci pacijenata eksperimentalne grupe prikazani su u Tabeli 3. i na Graficima 1. i 3. Najmlađi pacijent u eksperimentalnoj grupi je imao 18, a najstariji 76 godina. Osobe mlađe od 18 godina nisu bile uključivane u studiju.

Tabela 3. Demografski podaci pacijenata eksperimentalne grupe

Broj pacijenata u eksperimentalnoj grupi	$n = 73$
Pol (M/Ž)	46/27
Starost, srednja vrednost godina \pm SD	43.7 \pm 20.6
Raspon godina u grupi	[18-78]

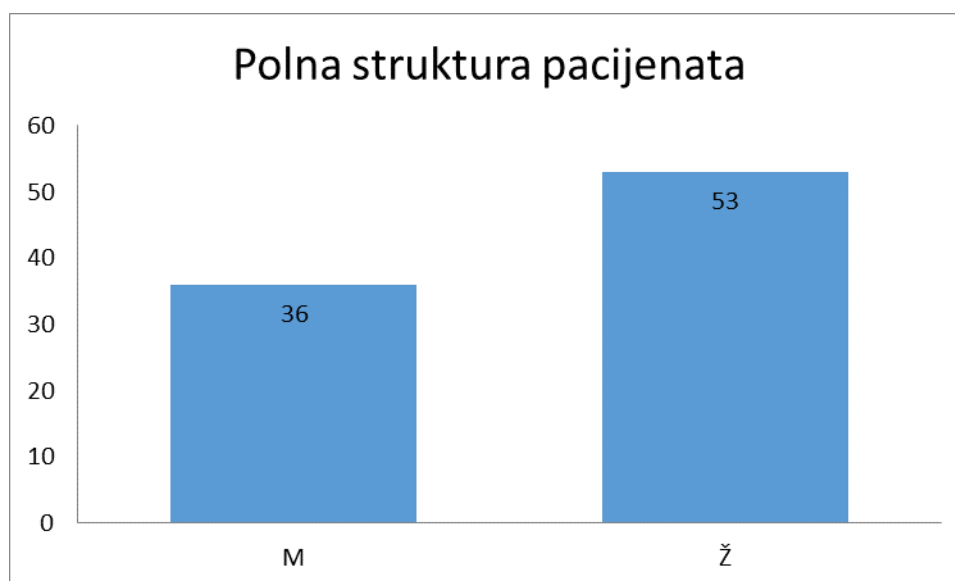


Grafik 1. Polna struktura pacijenata eksperimentalne grupe

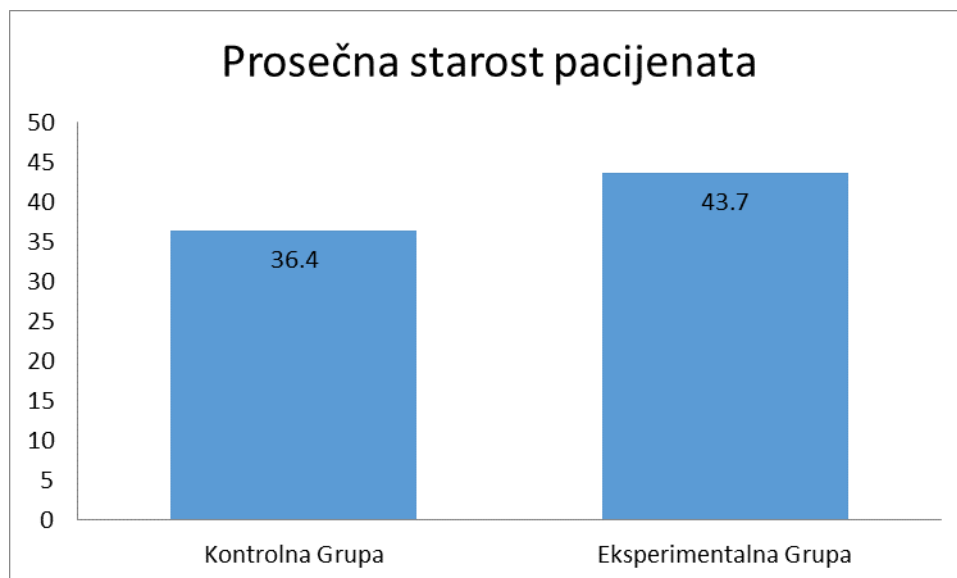
Podaci o polnoj i starosnoj strukturi ispitanika kontrolne grupe (C) prikazani su u Tabeli 4. i Graficima 2. i 3. Najmlađi ispitanik u kontrolnoj grupi je imao 19, a najstariji 62 godine. Prosečna starost eksperimentalne grupe je bila 43.7 godina, dok je prosečna starost kontrolne grupe iznosila 36.4 godine (Grafik 3.).

Tabela 4. Demografski podaci ispitanika u kontrolnoj grupi

Broj pacijenata u kontrolnoj grupi	$n = 89$
Pol (M/Ž)	36/53
Starost, srednja vrednost godina \pm SD	36.4 ± 9.41
Raspon godina u grupi	[19-62]



Grafik 2. Polna struktura ispitanika kontrolne grupe



Grafik 3. Prosečna starost pacijenata u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi

4.2. Klinička ispitivanja

Najznačajniji parametri vezani za kliničku sliku pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (učestalost pojave recidiva, broj lezija na kliničkom pregledu i prosečno vreme zarastanja ulceracija) prikazani su u Tabelama 5, 6 i 7. i na Grahicima 4, 5 i 6.

Kod 67 pacijenata (91.2%), rekurentne oralne ulceracije su se prvi put pojavile pre više godina, dok su se kod 6 pacijenata javile u poslednjih godinu dana. Jedan pacijent je izjavio da probleme sa ROU ima već 30 godina, što je ujedno bilo i najduže pojedinačno trajanje bolesti u eksperimentalnoj grupi. ROU je najkraće imao pacijent kome su se ulceracije prvi put pojavile pre 6 meseci.

Prosečna dužina trajanja bolesti iznosila je oko 10 godina (9.71 godina).

Neke od oralnih ulceracija sa različitim lokalizacijama na oralnoj sluzokoži, fotografisane su, i prikazane na Slikama 3-8.



Slika 3. Oralna ulceracija u predelu bukalne plike



Slika 4. Oralne ulceracije u gornjem forniksu



Slika 5. Oralna ulceracija u predelu pokretne mukoze alveolarnog grebena maksile



Slika 6. Oralna ulceracija u retromolarnom predelu



Slika 7. Oralne ulceracije poda usta i ventralne strane jezika



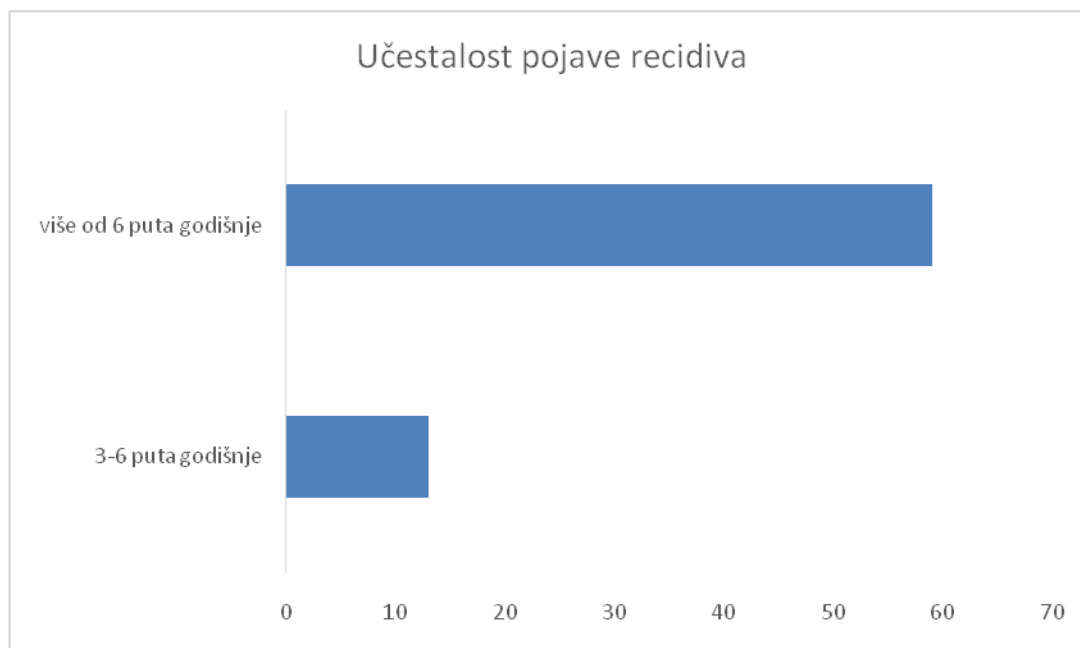
Slika 8. Oralne ulceracije poda usta

4.2.1. Učestalost javljanja recidiva rekurentnih oralnih ulceracija

Kod svih pacijenata uključenih u studiju, oralne ulceracije su se ponavljale više puta. Broj recidiva ROU u okviru jedne godine bio je različit. Najveći broj pacijenata, 59 (80.8%), je izjavio da im se nove ulceracije javljaju više od 6 puta godišnje, dok su kod 14 pacijenata (19.2%) ulceracije recidivirale od 3 do 6 puta na godišnjem nivou (Tabela 5, Grafik 4.).

Tabela 5. Učestalost pojave recidiva rekurentnih oralnih ulceracija (ROU)

Učestalost pojave recidiva	
3-6 puta godišnje	14 (19.2%)
više od 6 puta godišnje	59 (80.8%)



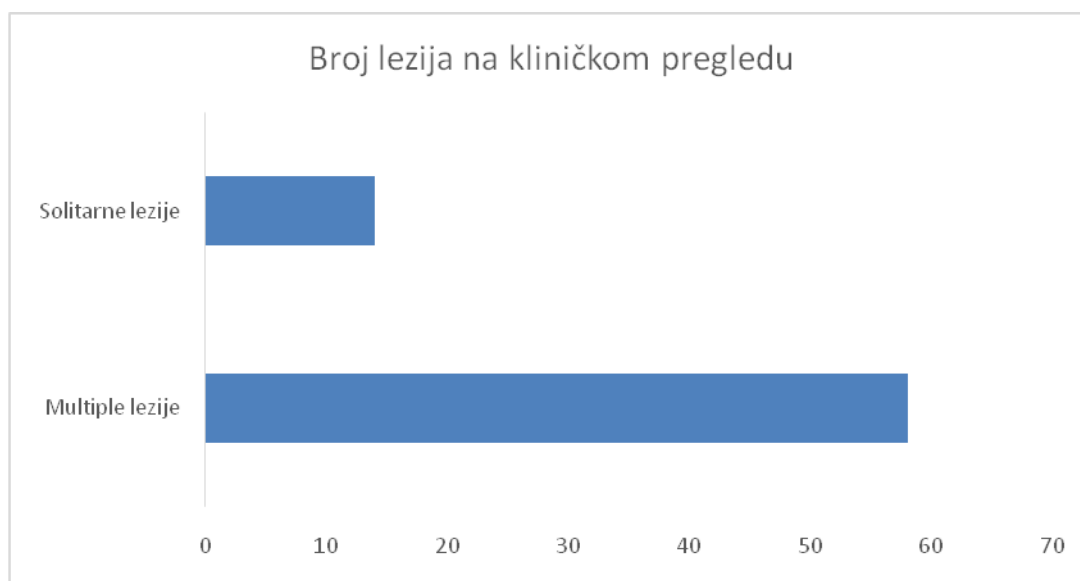
Grafik 4. Učestalost pojave recidiva rekurentnih oralnih ulceracija (ROU) u eksperimentalnoj grupi

4.2.2. Broj rekurentnih oralnih ulceracija

Kod 58 pacijenata (79.4%), kliničkim pregledom je utvrđeno istovremeno postojanje dve i/ili više ulceracija na oralnoj sluzokoži (multiple ulceracije), dok je kod 15 pacijenata (20.6%) u trenutku pregleda bila prisutna samo jedna (solitarna) ulceracija (Tabela 6, Grafik 5.).

Tabela 6. Broj rekurentnih oralnih ulceracija na kliničkom pregledu

Broj lezija na kliničkom pregledu	
Solitarne lezije	15 (20.5%)
Multiple lezije	58 (79.5%)



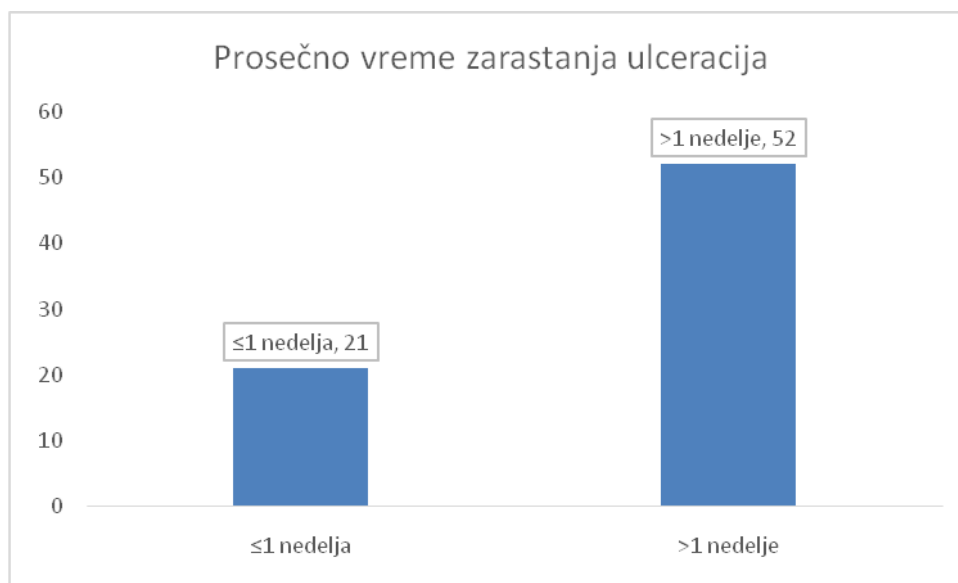
Grafik 5. Broj rekurentnih oralnih ulceracija

4.2.3. Vreme zarastanja rekurentnih oralnih ulceracija

Analizirajući prosečno vreme zarastanja oralnih ulceracija u eksperimentalnoj grupi uočili smo da je kod 21/73 (28.8%) naših pacijenata ono iznosilo više od nedelju dana (Tabela 7, Grafik 6.), iako su sve dijagnostifikovane ulceracije bile tipa afte minor.

Tabela 7. Prosečno vreme zarastanja rekurentnih oralnih ulceracija

Prosečno vreme zarastanja ulceracija	
≤ 1 nedelja	21 (28.8%)
>1 nedelje	52 (71.2%)



Grafik 6. Prosečno vreme zarastanja ulceracija.

4.3. Ispitivanje humoralne imunosti pacijenata sa ROU

Prikupljeni rezultati laboratorijskih analiza seruma pacijenata sa ROU podeljeni su u 4 grupe: prevalenca i koncentracija antitela visoko specifičnih za celijakiju, prevalenca i koncentracija antitela koja su karakteristična za inflamatorne bolesti creva, humoralna imunost specifična za mleko i glijadin i korelacije između antitela na proteine hrane i seroloških markera celijakije.

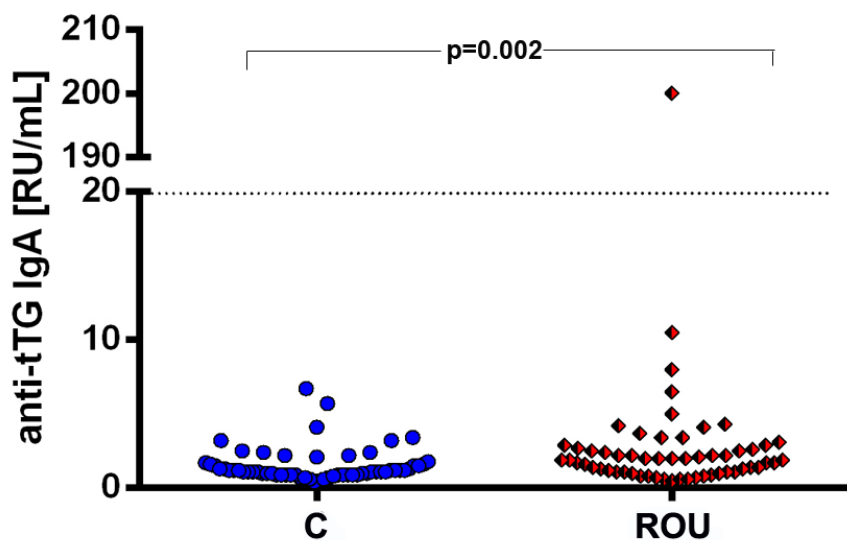
4.3.1. Prevalenca i koncentracija antitela visoko specifičnih za celijakiju

Rezultati dobijeni obradom prikupljenih podataka o prevalenci i koncentraciji četiri grupe seroloških markera novije generacije koji su visoko specifični za GSE prikazani su u daljem tekstu.

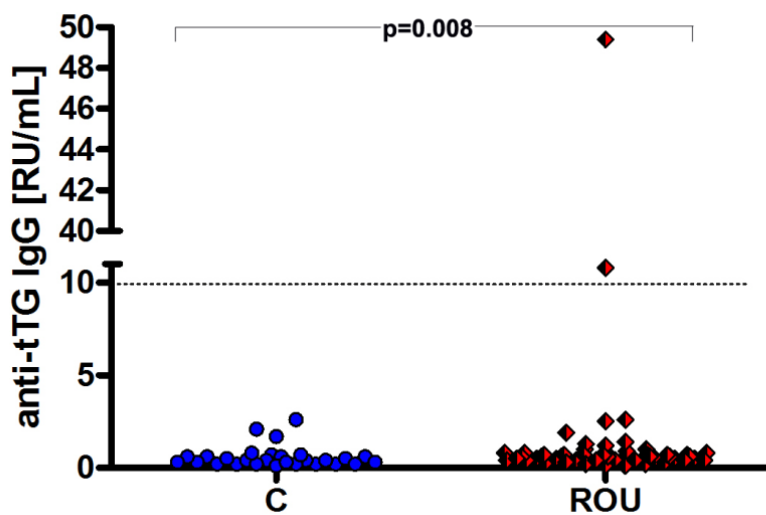
4.3.1.1. Prisustvo i koncentracija antitela specifičnih za tkivnu transglutaminazu (tTG) IgG i IgA klase

Povišena **imunoreaktivnost IgA tipa** na tkivnu transglutaminazu evidentirana je kod (1.8%) pacijenata sa ROU, dok u kontrolnoj grupi nije bilo povišenih antitela ove klase. Koncentracija anti-tTG IgA antitela kod pacijenata sa ROU bila je značajno viša u poređenju sa koncentracijom istih antitela kod ispitanika iz kontrolne grupe (Mann-Whitney test, $p=0.002$) (Grafik 7.).

Povišena serumaska **imunoreaktivnost IgG tipa** (Grafik 8.) specifična za tkivnu transglutaminazu uočena je kod 2 pacijenta, dok u kontrolnoj grupi nije bilo povišenih vrednosti. Nivo anti-tTG IgG antitela bio je statistički značajno viši kod pacijenata sa ROU u odnosu na kontrolnu grupu (Mann-Whitney test, $p=0.008$).



Grafik 7. Nivoi IgA antitela specifičnih za tkivnu transglutaminazu (tTG) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolnoj grupi (C)



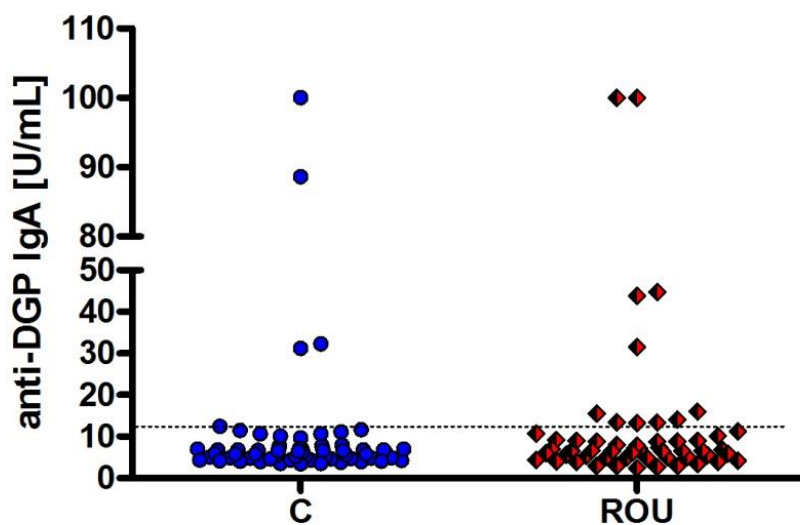
Grafik 8. Nivoi IgG antitela specifičnih za tkivnu transglutaminazu (tTG) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolnoj grupi (C)

4.3.1.2. Prisustvo i koncentracija antitela specifičnih za deaminirane glijadinske peptide (DGP) IgG i IgA klase

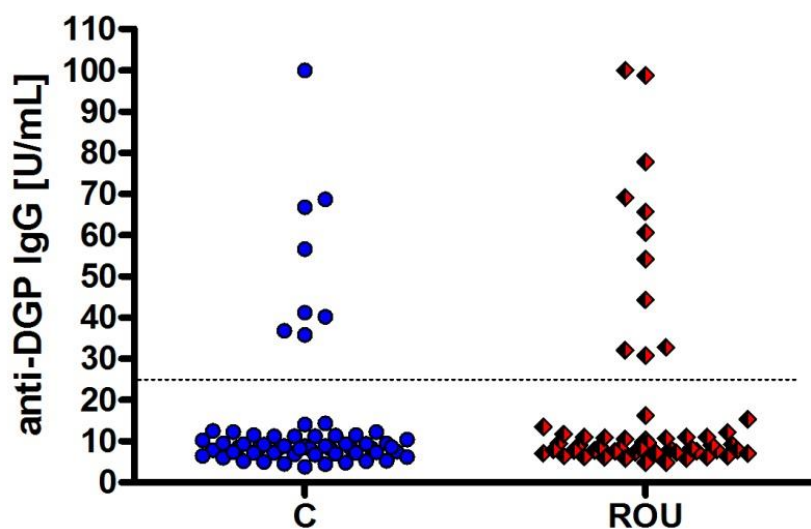
Na osnovu rezultata dobijenih iz seruma zdravih kontrola, granične vrednosti (srednja vrednost+2SD) su postavljene na 12.5 U/ml za IgA i 26 U/ml za IgG anti DGP antitela.

Imunoreaktivnost IgA i/ili **IgG tipa** je utvrđena kod (19.6%) ROU pacijenata i kod (8.3%) IgA-DGP, odnosno (13.3%) IgG-DGP zdravih kontrola što nije predstavljalo statistički značajnu razliku ($p=0.067$ i $p=0.253$).

Upoređujući rezultate koncentracija anti-DGP IgA i IgG antitela između eksperimentalne i kontrolne grupe nije uočena statistički značajna razlika (Grafik 9. i 10.).



Grafik 9. Nivoi IgA antitela specifičnih za deaminovane peptide glijadina (DGP) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolnoj grupi (C)

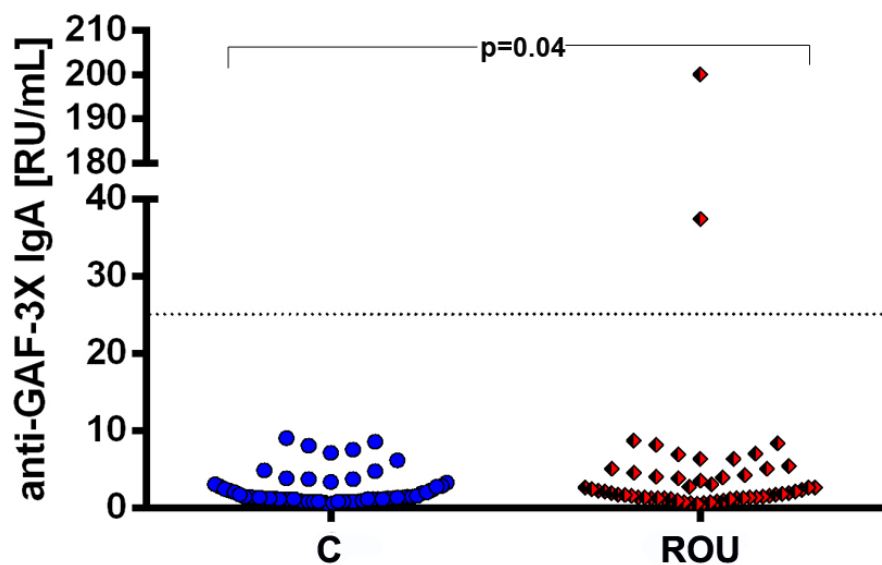


Grafik 10. Nivoi IgG antitela specifičnih za deaminovane peptide glijadina (DGP) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolnoj grupi (C)

4.3.1.3. Prisustvo i koncentracija antitela specifičnih za fuzione peptide, glijadinske analoge (GAF-3X) IgA klase

Povišene vrednosti serumskih anti-GAF-3X antitela IgA klase evidentirane su kod (3.6%) pacijenata sa ROU. U kontrolnoj grupi niko od ispitanika nije imao povišen nivo anti-GAF-3X IgA antitela.

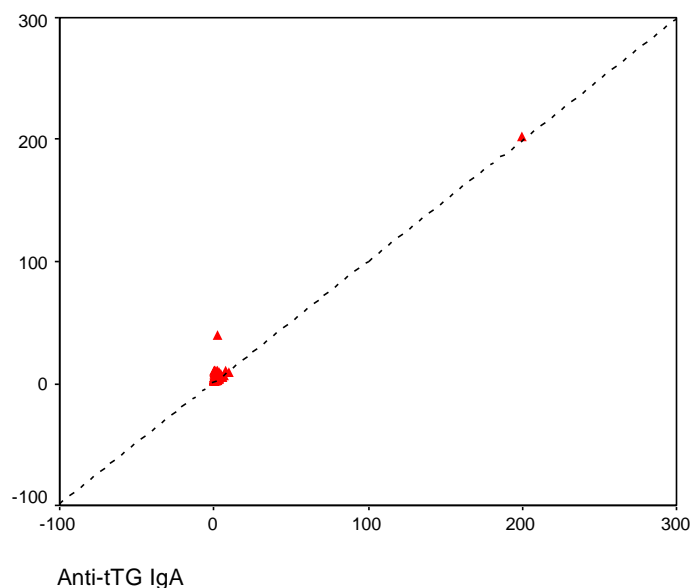
Koncentracija anti-GAF-3X IgA antitela u grupi pacijenata sa ROU bila je statistički značajno viša u poređenju sa grupom zdravih individua (Mann-Whitney test, $p=0.04$) (Grafik 11.).



Grafik 11. Nivoi IgA antitela specifičnih za fuzione peptide, glijadinske analoge (GAF-3X) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolnoj grupi (C)

4.3.1.4. Korelacije između koncentracija antitela visoko specifičnih za celijakiju

Upoređivanjem dobijenih rezultata uočeno je postojanje statistički visoko značajne (Spearman-ov test, ($\rho=0.36$; $p=0.007$) pozitivne korelacije koncentracija anti-tTG i anti-GAF-3X antitela IgA klase (Grafik 12.) u serumu pacijenata eksperimentalne grupe. Nasuprot tome, koncentracija IgA anti DGP nije korelirala sa IgA t-TG i IgA GAF-3X antitelima ($p>0.05$).



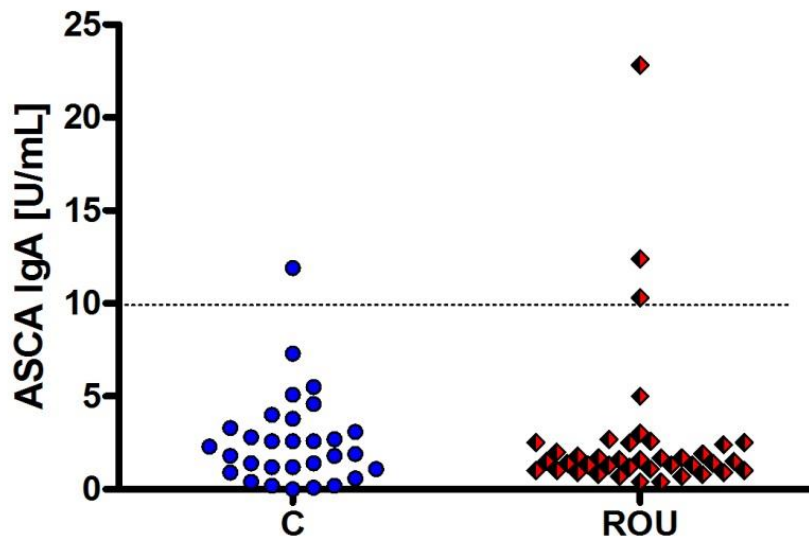
Grafik 12. Korelacija koncentracije antitela IgA klase specifičnih za tkivnu transglutaminazu (tTG) i antitela specifičnih za fuzione peptide, glijadinske analoge (GAF-3X)

4.3.2. Prevalenca i koncentracija antitela koja su karakteristična za inflamatornu bolest creva

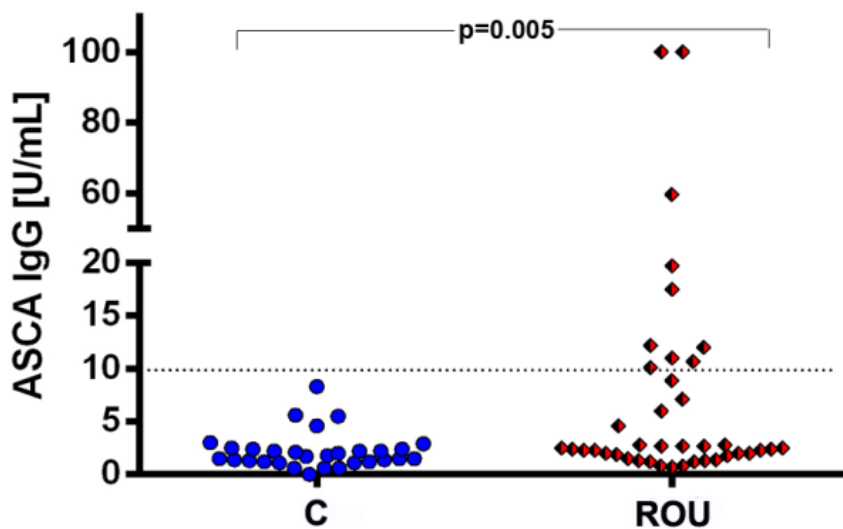
Analizirajući nivoe antitela specifičnih za *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) koja su karakteristična za Kronovu bolest, odnosno antitela specifičnih za citoplazmatske antigene neutrofilnih leukocita (ANCA) koja mogu biti znak ulceroznog kolitisa u serimima pacijenata sa ROU i kontrolnoj grupi, došli smo do sledećih rezultata.

4.3.2.1. Prisustvo i koncentracija antitela specifičnih za *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) IgA i IgG klase

Prevalenca, kao i koncentracija IgA ASCA seropozitivnosti (Grafik 13.) se nije bitno razlikovala između grupe pacijenata sa ROU i grupe zdravih osoba (7.5%) naspram (3.3%), ($p > 0.05$). Nasuprot tome, pojava IgG ASCA seropozitivnosti je bila viša u eksperimentalnoj grupi u poređenju sa kontrolnom grupom (25%) naspram (0%). Koncentracija IgG antitela specifičnih za *Saccharomyces cerevisiae* je bila statistički značajno viša u grupi pacijenata sa ROU u odnosu na kontrolnu grupu (Mann-Whitney test, $p = 0.005$) (Grafik 14.).



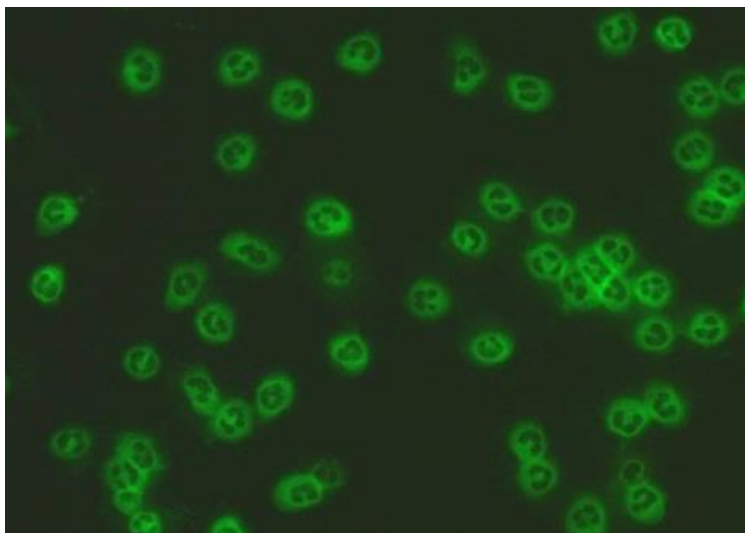
Grafik 13. Nivoi IgA antitela specifičnih za *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolnoj grupi (C)



Grafik 14. Nivoi IgG antitela specifičnih za *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolnoj grupi (C)

4.3.2.2. Prisustvo antitela specifičnih za citoplazmatske antigene neutrofila (ANCA)

Utvrđeno je da učestalost pojave ANCA nije bila viša kod pacijenata sa ROU. Naime, atipična ANCA (xANCA) su detektovana kod 3 ROU pacijenta i kod jedne osobe iz kontrolne grupe (Slika 9.). Titar ANCA je bio nizak, u rasponu od 1:20 do 1:80.



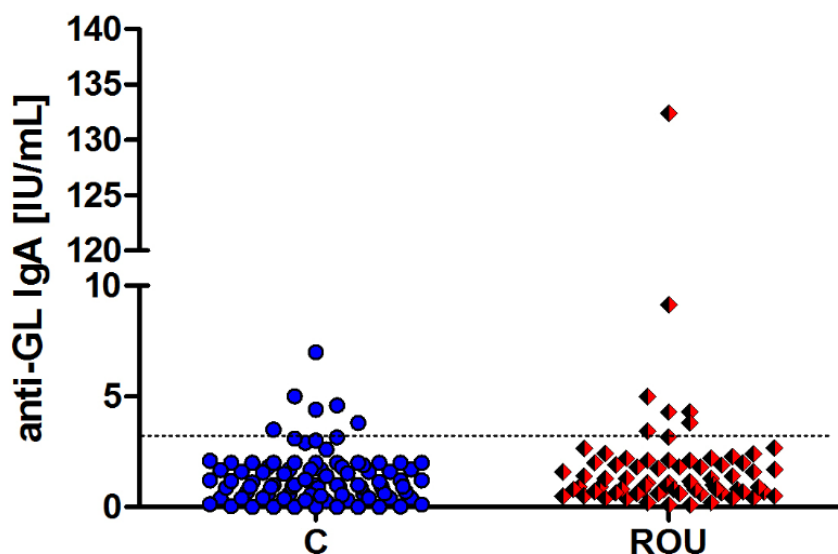
Slika 9. Atipična (xANCA).

4.3.3. Humoralna imunost specifična za mleko i glijadin

Analizom prikupljenih podataka o nivoima antitela specifičnih za glijadin (GL) i ukupne proteine kravljeg mleka (CMP) IgM, IgG, IgA i IgE klase u serumu pacijenata sa ROU i kontrolnoj grupi dobijeni su sledeći rezultati.

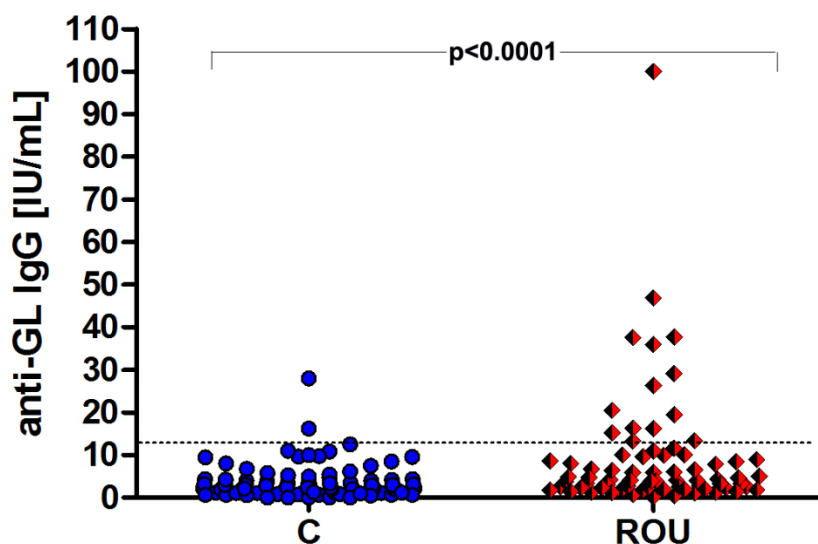
4.3.3.1. Humoralna imunost specifična za glijadin

Imunoreaktivnost IgA tipa na glijadin je evidentirana kod (9.6%) pacijenata sa ROU i kod (6.7%) osoba iz kontrolne grupe. Nije uočeno prisustvo statističke značajne razlika u nivoima IgA antitela specifičnih za glijadin između grupe pacijenata sa ROU i kontrolne grupe (Grafik 15.).



Grafik 15. Nivoi IgA antitela specifičnih za glijadin (GL) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolne grupe (C)

Imunoreaktivnost IgG tipa na glijadin (Grafik 16.) utvrđena je kod (19.2%) pacijenata i kod (2.2%) ispitanika u kontrolnoj grupi. U eksperimentalnoj grupi je utvrđen statistički značajno viši nivo IgG antitela specifičnih za glijadin u odnosu na kontrolnu grupu (Mann-Whitney test; $p < 0.0001$).

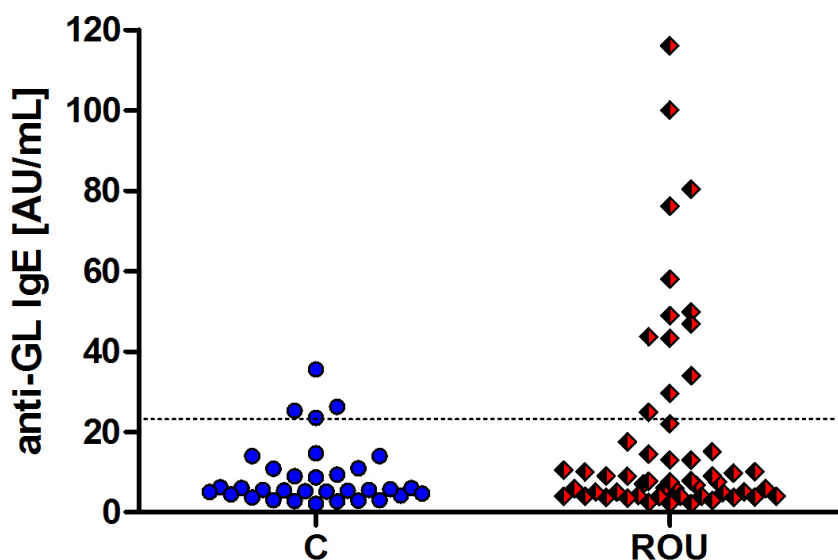


Grafik 16. Nivoi IgG antitela specifičnih za glijadin (GL) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolnoj grupi (C)

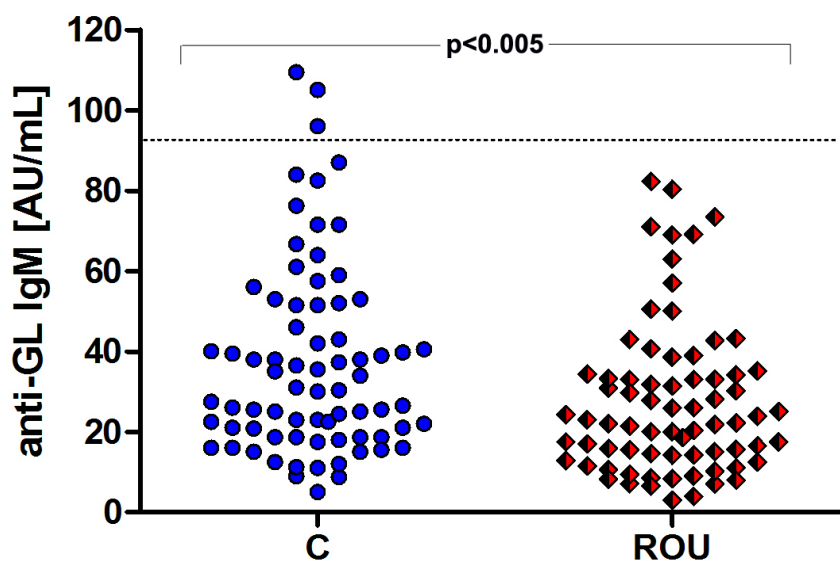
Na graficima koji prikazuju nivoe antitela IgA i IgG klase specifičnih za prirodni glijadin (Grafik 15. i 16.) se uočava da jedan pacijent sa ROU ima visoku koncentraciju ovih antitela. Kod istog pacijenta dokazana je visoka koncentracija svih ispitivanih antitela specifičnih za celijakiju kako je prethodno prikazano (Grafici 7-11.).

U eksperimentalnoj grupi je evidentirana povišena **imunoreaktivnost IgE tipa** specifična za glijadin kod (21.8%) pacijenata, dok je u kontrolnoj grupi kod (9%) utvrđen povišen nivo antitela (Grafik 17.). Nije postajala statistički značajna razlika kada je u pitanju koncentracija antitela specifičnih za glijadin IgE klase između eksperimentalne i kontrolne grupe.

Niti jedan pacijent sa ROU nije imao povišenu **imunoreaktivnost IgM tipa** specifičnu za glijadin. Suprotno tome, kod ispitanika (4%) u kontrolnoj grupi evidentirana je povišena imunoreaktivnost. Statističkom analizom (Mann-Whitney test) je utvrđen značajno viši nivo IgM antitela specifičnih za glijadin u kontrolnoj grupi u odnosu na eksperimentalnu grupu ($p < 0.005$) (Grafik 18.).



Grafik 17. Nivoi IgE antitela specifičnih za glijadin (GL) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolnoj grupi (C)

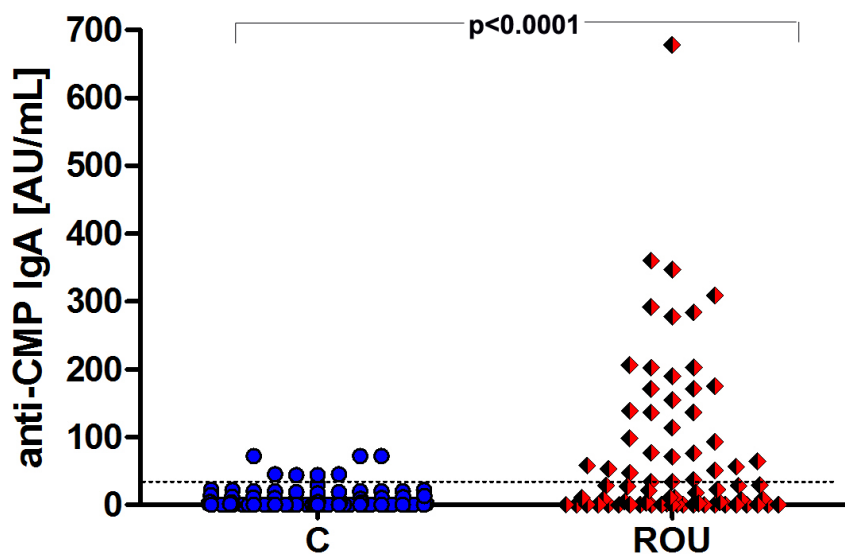


Grafik 18. Nivoi IgM antitela specifičnih za glijadin (GL) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i zdravih kontrola (C)

4.3.3.2. Humoralna imunost specifična za proteine kravljeg mleka

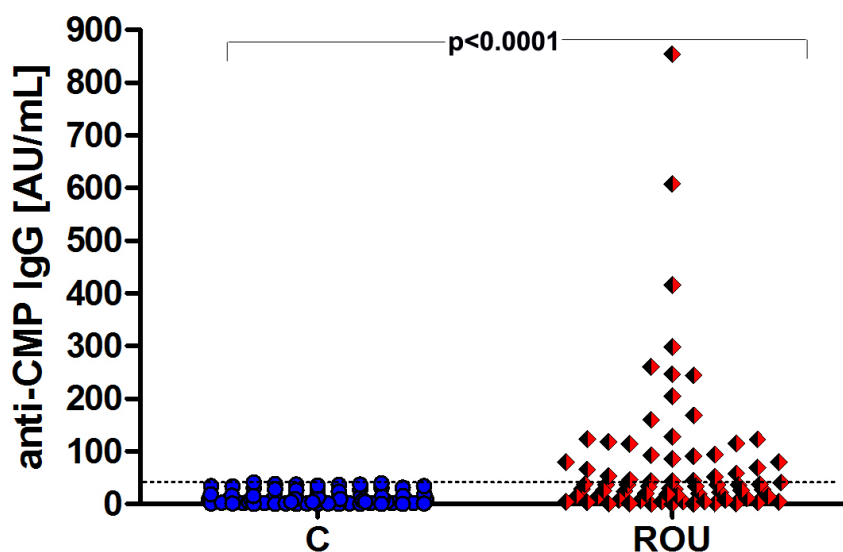
Humoralna **imunoreaktivnost IgA tipa** specifična za ukupne proteine kravljeg mleka (Grafik 19.) evidentirana je kod (45.2%) pacijenata sa ROU, kao i kod (7.6%) zdravih kontrola.

Pacijenti sa ROU su imali statistički značajno viši nivo IgA antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka u odnosu na kontrolnu grupu (Mann-Whitney test; $p < 0.0001$).



Grafik 19. Nivoi IgA antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka (CMP) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolnoj grupi (C)

Statistički značajna razlika između eksperimentalne i kontrolne grupe utvrđena je i kada je u pitanju **imunoreaktivnost IgG tipa specifična** za ukupne proteine kravljeg mleka (Grafik 20.). Naime, (49.3%) ispitanika iz eksperimentalne grupe odnosno (5.7%) zdravih kontrola imalo je povišen nivo IgG antitela specifičnih za ukupne proteine kravljeg mleka. Grupa pacijenata sa ROU imala je statistički značajno viši nivo IgG antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka u odnosu na kontrolnu grupu (Mann-Whitney test; $p < 0.0001$).

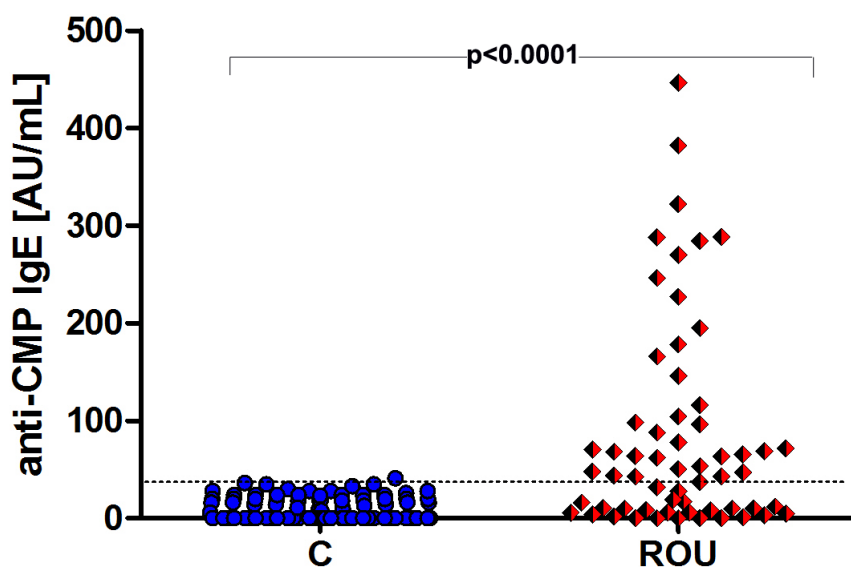


Grafik 20. Nivoi IgG antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka (CMP) u seumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolnoj grupi (C)

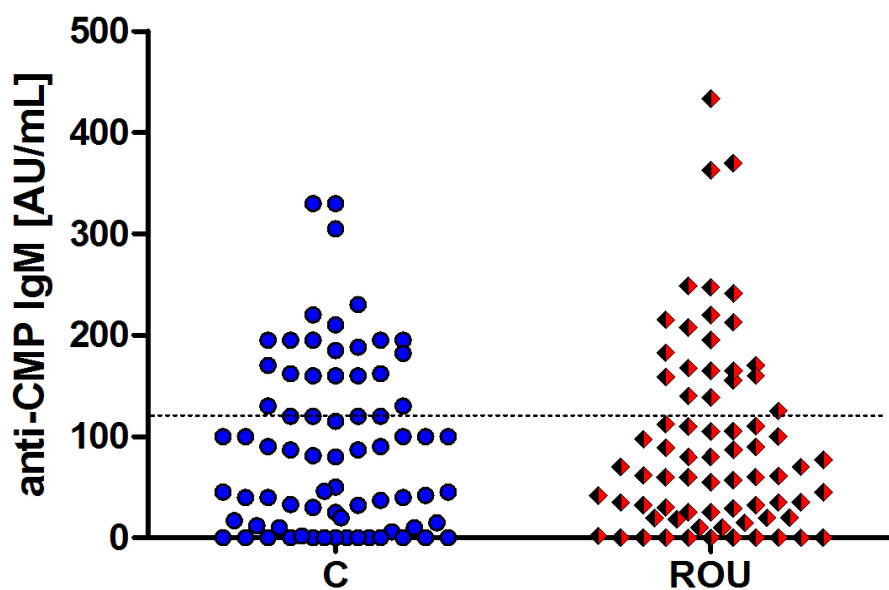
Imunoreaktivnost IgE tipa specifična za ukupne proteine kravljeg mleka je konstatovana kod (58.3%) pacijenata sa ROU i kod (4.6%) osoba u kontrolnoj grupi (Grafik 21.).

Nivo IgE antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka bio je statistički značajno viši kod pacijenata sa ROU u poređenju sa kontrolnom grupom (Mann-Whitney test; $p < 0.0001$).

Imunoreaktivnost IgM tipa (Grafik 22.) specifična za ukupne proteine kravljeg mleka predstavlja jedini tip humoralne imunoreaktivnosti specifične za mleko koje smo ispitivali, a da nije uočena statistički značajna razlika između eksperimentalne i kontrolne grupe (28.8% naspram 30.1%; $p > 0.05$).



Grafik 21. Nivoi IgE antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka (CMP) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i zdravih kontrola (C)



Grafik 22. Nivoi IgM antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka (CMP) u serumu pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (ROU) i kontrolnoj grupi (C)

4.3.4. Korelacije između antitela na proteine hrane i seroloških markera GSE

Rezultati analize postojanja korelacija između koncentracije antitela specifičnih za proteine hrane (glijadin i mleko) i seroloških markera GSE novije generacije u serumu pacijenata sa ROU prikazani su u Tabelama 8. i 9.

Evidentirano je postojanje statistički značajne pozitivne korelacije nivoa IgG antitela specifičnih za glijadin i IgG antitela specifičnih za deaminovane peptide glijadina u grupi pacijenata sa ROU (Tabela 8.). Koeficijent korelacije ukazuje na umerenu pozitivnu korelaciju ovih parametara.

Tabela 8. Koeficijenti korelacije između antitela IgG klase specifičnih za glijadin ili proteine kravljeg mleka i antitela IgG klase specifičnih za deaminovani glijadin kod pacijenata sa ROU

Koeficijent korelacije (ρ)	anti-DGP IgG
anti-GL IgG	0.4585*
anti-CMP IgG	0.1844

* Spirmanov test korelacije $p= 0.0004$

Uočeno je postojanje statistički značajne linearne povezanosti između nivoa IgA antitela specifičnih za glijadin i IgA antitela specifičnih za demaminovane peptide glijdina u grupi pacijenata sa ROU (Tabela 9.). Koeficijent korelacije ukazuje na slabu pozitivnu korelaciju ovih parametara. Dokazano je i prisustvo statistički značajne pozitivne korelacije između nivoa IgA antitela specifičnih za glijadin i nivoa IgA antitela specifičnih za tkivnu transglutaminazu. Koeficijent korelacije ukazuje na umeren stepen linearne povezanosti ovih parametara.

Tabela 9. Koeficijenti korelacije između antitela IgA klase specifičnih za glijadin ili proteine kravljeg mleka i antitela IgA klase specifičnih za deaminovani glijadin ili tkivnu transglutaminazu kod pacijenata sa ROU

Koeficijent korelacije (ρ)	anti-DGP IgA	Anti-tTG IgA
anti-GL IgA	0.3257*	0.4027**
anti-CMP IgA	-0.1131	0.0742

* Spirmanov test korelacije $p= 0.0152$

** Spirmanov test korelacije $p= 0.0021$

Nije uočeno postojanje značajne linearne povezanosti ni jedne od ispitivanih klasa antitela specifičnih za ukupne proteine kravljeg mleka i antitela koja predstavljaju serumske markere celijakije.

4.4. Korelacija kliničkih parametara oboljenja sa koncentracijama antitela

Nije uočena značajna povezanost između karakteristika ROU kao što su srednja vrednost dužine trajanja bolesti, vrsta i broj ulceracija i učestalost pojave recidiva sa dobijenim koncentracijama ispitivanih antitela.

4.5. Dijagnostički postupci i kliničko praćenje pacijenta sa utvrđenim pozitivnim serološkim markerima za GSE

Jedan pacijent koji je imao izrazito visoke koncentracije antitela specifične za tTG (IgA), GAF-3X (IgA) i DGP (IgA i IgG), bez prisutnih gastrointestinalnih simptoma, upućen je na dalji gastroenterološki pregled. On je bio podvrgnut endoskopskoj biopsiji duodenalne mukoze. Histopatološki nalaz je bio karakterističan za celijakiju, sa prisutnom viloznom atrofijom uz kriptalnu hiperplaziju i povećanje broja intraepitelijalnih limfocita (Marsh tip III) (Slika 10.). Nakon bezglutenske dijeta u trajanju od dva meseca primećeno je značajno poboljšanje kliničke slike ROU, dok su oralne ulceracije u potpunosti nestale nakon šest meseci od prestanka unošenja glutena.



Slika 10. Histopatološki nalaz kod pacijenta sa visokim titrom antitela specifičnih za celijakiju (Marsh III).

Pacijentima sa visokom koncentracijom ASCA IgG (>50 U/ml) predložena je dalja dijagnostika kojom bi se isključilo postojanje IBC. Pacijenti nisu bili motivisani za dalja ispitivanja jer nisu imali gastroenterološke simptome, a endoskopska procedura nije sprovedena zbog nelagodnosti i straha pacijenta od same endoskopije.

5. DISKUSIJA

Rekurentne oralne ulceracije su hronično, inflamatorno oboljenje, karakterisano recidivirajućim solitarnim ili multiplim bolnim oralnim lezijama. One predstavljaju jedno od najčešćih patoloških stanja na oralnoj mukozu. Etiološki se povezuju sa brojnim predisponirajućim faktorima, ali sama patogeneza još uvek nije u potpunosti razjašnjena³.

Kao jedan od mogućih patofizioloških mehanizama u nastanku ROU navodi se disregulisan imunski odgovor indukovani različitim spoljnim činiocima kod genetski podložnih individua⁵. Ispitivanje lezija oralne mukoze u toku epizoda ROU je pokazalo da postoji poremećaj mukoznog imuniteta, disbalans mukoznog T-helper i T-regulatornog odgovora, uz poremećenu produkciju proinflamatornih i anti-inflamatornih citokina, što sve ima za posledicu i neadekvatnu aktivaciju humoralnog imuniteta⁵⁵. U prilog tome govori i prisustvo različitih antitela koja su uočena kod nekih pacijenata sa ROU^{154,155}.

Dijagnoza ROU se najčešće postavlja na osnovu oralnog i nalaza i anamnestičkih podataka¹⁵⁶. Obzirom na mnogobrojne etiološke faktore koji mogu učestvovati u nastanku ROU, veoma je važno prikupiti detaljne anamnestičke podatke kako bi se isključila druga stanja koja se mogu prezentovati oralnim ulceracijama. Neki od predisponirajućih faktora se mogu saznati anamnestički od pacijenta, kao što su podaci o skorašnjoj lokalnoj traumi, pušenju, stresu i alergiji na hranu koja je prisutna od ranije. Međutim, neki drugi mogući etiološki faktori ROU, kao što su deficijencija nutritijenata, hormonski disbalans, nedijagnostikovano sistemsko oboljenje ili intolerancija na određenu vrstu hrane, mogu se utvrditi jedino ciljanim dijagnostičkim procedurama koje uključuju različite laboratorijske analize, ali i druge specifične preglede.

Analizirajući prikupljene podatke, na osnovu anamneze i kliničkog pregleda, utvrdili smo da su svi pacijenti imali afte minor, kao jednu bitnu podgrupu ROU, nepoznate etiologije. Većina pacijenata je imala multiple lezije kojima je trebalo više od nedelju dana da zarastu. Klinički rezultati naše studije su saglasni sa podacima iz literature. Naime, afte minor su najčešća klinička forma ROU i zastupljene su u oko 80% pacijenata⁸³. Treba napomenuti da smo dva pacijenta kod kojih smo postavili dijagnozu afti major isključili iz studije jer su anamnestički izjavili da su ulceracije nastale

neposredno nakon lokalne traume, tj. nakon oralnohirurških intervencija. Takođe, vreme zarastanja koje je uočeno kod pacijenata u eksperimentalnoj grupi se poklapa sa nalazima drugih studija kada su u pitanju afte minor ^{157,158}.

Na osnovu anamnestičkih podataka koje smo prikupili, prosečna dužina trajanja bolesti kod naših pacijenata iznosila je oko 10 godina, dok su se recidivi ROU kod većine pacijenata javljali više od 6 puta godišnje, što govori o aktivnosti bolesti. Prema studiji Gurkan i sar.¹⁵⁹ srednja vrednost broja afti koje su se javljale kod pacijenata na godišnjem nivou iznosila je 12.8 ± 8.5 . Ista studija iznosi podatak da je prosečno vreme trajanja bolesti u grupi pacijenata sa ROU iznosilo oko 4 godine što je kraće u odnosu na našu eksperimentalnu grupu. Ova razlika se može objasniti razlikom u starosnoj strukturi pacijenata sa ROU u dve odvojene studije.

Poznato je da ROU mogu biti jedan od simptoma drugih mukokutanih oboljenja koja se manifestuju lezijama na različitim lokalitetima, a među njima i na oralnoj mukozi ⁷⁸. Pored toga, i sistemske i neke imuno-inflamatorne bolesti takođe mogu imati ROU kao jedan od simptoma ⁷⁵. U slučajevima kada se ROU karakterišu učestalim recidivima, refrakternim na konzervativnu terapiju, trebalo bi ispitati postojanje drugih patoloških stanja i poremećaja, čiji bi tretman obezbedio adekvatan terapijski efekat ¹⁶⁰.

Kada su u pitanju pridružena sistemska i inflamatorna oboljenja, posebna pažnja se pridaje vezi između ROU i inflamatornih oboljenja gastrointestinalnog trakta, među kojima su GSE i IBC, kao i različite vrste senzitivnosti na komponente hrane. Za to postoji više obrazloženja, među kojima se ističe to da je oralna mukoza, kao prva barijera gastrointestinalnog trakta, mesto ulaza spoljnih antigena, koji mogu biti etiološki faktor za razvoj ovih patoloških stanja ⁸⁴.

Na osnovu dostupnih podataka o etiopatogenezi, čini se da ROU, GSE i IBC dele osnovne patofiziološke mehanizme u svom razvoju. Naime, sva tri stanja se povezuju sa neadekvatnim mukoznim imunskim odgovorom genetski podložnih individua na neke spoljne faktore, među njima najveći značaj imaju mikrobnii činioci i hrana ^{95,123}.

Senzibilizacija ovim antigenima imunogenetski podložnih individua se dešava na nivou mukoze, a u osnovi se nalazi poremećaj imunske tolerancije ².

U kliničkom pogledu, ROU se kod pacijenata sa dijagnostikovanom GSE ili IBC smatraju ekstraintestinalnom manifestacijom ovih hroničnih oboljenja i obično prate klinički tok osnovne bolesti, čije lečenje povoljno utiče i na ROU ^{73,161}. ROU se mogu

javiti i kao prvi simptom inflamatornih oboljenja digestivnog trakta i zbog toga je više studija ispitivalo prevalencu GSE-specifičnih seroloških markera, kao i proteina kravljeg mleka kod pacijenata sa ROU ^{70,71,52}. Međutim, prema dostupnoj literaturi, kod pacijenata sa ROU nisu sprovedene studije koje su ispitivale serološke markere povezane sa IBC, kao što su ASCA i ANCA.

Naša studija je ispitivala specifičan humoralni imunitet, određujući GSE-specifične serološke markere, IBC-povezana antitela, kao i antitela više Ig klasa na nativni glijadin i proteine kravljeg mleka, kod pacijenata sa ROU bez kliničkih znakova za neko od navedenih oboljenja tj. bez gastrointestinalnih i alergijskih tegoba. Cilj je bio da se ispita prevalenca i koncentracija ovih antitela kod pacijenata sa ROU u odnosu na zdrave kontrole, kako bi se ustanovilo da li prisustvo ROU može ukazivati na postojanje neke od ovih imuno-inflamatornih bolesti, u cilju brže dijagnostike, ali i u svrhu razotkrivanja etiopatogenetske prirode ROU.

5.1. GSE-specifični serološki markeri

Oralne ulceracije se kao jedan od simptoma javljaju kod 3-61% pacijenata sa GSE i navodi se da ROU predstavljaju peti po učestalosti klinički simptom GSE ¹⁶². Naročiti problem predstavljaju pritajene i atipične forme GSE, kada se oralne ulceracije mogu javiti kao prvi i i jedini simptom, pre bilo kakvih gastrointestinalnih tegoba ¹⁶³. Podaci sprovednih studija o povezanosti ROU i GSE su različiti, tako da još uvek nije razjašnjena tačna klinička i etiopatogenetska veza ova dva patološka stanja ¹⁶⁴. Naša studija je ispitivala prevalencu GSE-specifičnih markera, i to: anti-tTG antitela klase IgA i IgG, kao i nova viskoko specifična deamidovana anti-glijadinska antitela anti-DGP IgG i IgA i anti-GAF-3X IgA klase. Na osnovu dostupne literature, nijedna studija nije prikazala vrednosti koncentracija GSE-specifičnih seroloških markera, niti je ispitivala prisustvo novih deamidovanih anti-glijadinskih antitela kod pacijenata sa ROU.

Dobijeni rezultati pokazuju da je učestalost pozitivnosti za visoko specifična IgA anti-tTG i anti-GAF-3X antitela iznosila 1.8% i 3.6%, dok u kontrolnoj grupi nije bilo pozitivnih nalaza. Samo je jedan pacijent sa visoko pozitivnim antitelima podvrgnut endoskopiji. Histološkim pregledom sluznice duodenuma dokazano je postojanje GSE. Stoga je učestalost GSE u našoj grupi ispitanika sa ROU iznosila 1.8%, uz ograničenje

da endoskopska ispitivanja nisu rađena asimptomatskim pacijentima sa ROU koji nisu bili seropozitivni. Nažalost, za sada nema dostupnih podataka o učestalosti GSE u našoj zemlji. Prema rezultatima objavljenih epidemioloških studija učestalost u evropskim zemljama je oko 1% ⁸⁷.

Studije koje su se bavile ispitivanjem seroloških markera GSE kod pacijenata sa ROU su metodološki vrlo raznolike. Naime, ispitivana su različita antitela koja se sreću u GSE, među kojima je veliki broj studija koristilo nativna anti-glijadinska antitela ⁷², koja se već neko vreme smatraju nedovoljno specifičnim za GSE ¹⁰⁶. Neke studije su ispitivale i utvrđivale postojanje GSE endoskopskim i patohistološkim pregledom sluznice duodenuma tako što su obavljali pregled svim pacijentima sa ROU ¹⁵⁴, dok su druge studije ove specifične gastroenterološke preglede vršili samo kod onih pacijenata koji su imali pozitivan serološki nalaz za specifična antitela ¹⁵⁵. Poznato je da postoji značajan procenat latentnih, pritajenih i atipičnih formi GSE koje mogu ostati neprepoznate bez endoskopske i patohistološke dijagnostike ¹⁶⁵. Takođe, pojedine studije su pratile kliničku sliku nakon uvođenja bezglutenske dijeta ⁷⁰. Stoga se sve ove činjenice o metodologiji studija moraju uzimati u obzir prilikom razmatranja njihovih rezultata.

Ferguson i sar. ¹⁶⁶ su prvi ispitivali postojanje prethodno nedijagnostikovane GSE kod pacijenata sa ROU i utvrdili su prisustvo GSE kod 24% pacijenata sa ROU. Autori ove studije su svim pacijentima sa ROU radili patohistološki pregled jejunalne mukoze, a potom su i pacijente kod kojih su utvrdili prisustvo GSE podvrgli dijeti bez glutena i dobili povoljan terapijski odgovor u pogledu javljanja oralnih ulceracija. Ovo je bila jedna od prvih studija koja je ukazala da senzitivnost na gluten može biti etiološki faktor za nastanak ROU, kao i da se među pacijentima sa ROU mogu nalaziti oni sa neprepoznom GSE. Ipak, ova studija je obuhvatila svega 33 pacijenta, što se može smatrati jednim od značajnih nedostataka. Ubrzo zatim, ista grupa autora je obavila istraživanje koje je obuhvatilo 50 pacijenata sa ROU i pronašla GSE u svega 2 slučaja (4%) ¹⁶⁷.

Primitili smo da je većina studija kod pacijenata sa ROU ređe ispitivala anti-tTG antitela, dok su uglavnom korišćena endomizijalna antitela (EMA) kao specifičan serološki marker za GSE. EMA su pouzdan i prvi serološki marker koji se primenjuje u

dijagnostici GSE, a naknadno je otkriveno da je tkivna transglutaminaza (tTG) glavni antigen EMA.

Studija Olszewske i sar.¹⁵⁵ je analizirala prisustvo IgG i IgA EMA kod pacijenata sa ROU i kod zdrave kontrolne grupe, a potom su kod dva pacijenta u grupi sa ROU, kod kojih su pronašli povišen titar EMA, obavili endoskopski i patohistološki pregled duodenalne mukoze i utvrdili postojanje GSE. Zanimljivo je da su oba pacijenta nakon sprovođenja dijeta bez glutena bila bez novih epizoda ROU. Na osnovu dobijenih rezultata, autori su zaključili da bi sve pacijente sa ROU koji imaju bilo kakve gastrointestinalne tegobe ili simptome trebalo podvrgnuti skriningu na EMA.

Slične rezultate su objavili i Aydemir i sar.¹⁵⁴ koji su kod svih pacijenata sa ROU sproveli analizu EMA, IgG i IgA nativnih anti-glijadinskih antitela, ali i endoskopski i patohistološki pregled duodenuma. Njihovi rezultati su takođe pokazali da je EMA IgA bila visoko senzitivna, jer su kod 2/41 pacijenta sa ROU koji su imali pozitivan nalaz na EMA potvrdili GSE patohistološkim nalazom duodenuma. U njihovoj studiji, senzitivnost i specifičnost anti-glijadinskih antitela je bila niža, naročito za IgG klasu antitela.

S druge strane, nekoliko studija koje su takođe ispitivale prisustvo GSE-specifičnih seroloških markera kod pacijenata sa ROU, nije našlo povezanost između ROU i GSE.

Robinson i sar.⁷¹ su ispitivali IgA EMA i IgA anti-retikulinska antitela kod 87 pacijenata sa minor aftama, ali nisu našli značajno višu prevalencu ovih seroloških markera kod pacijenata sa ROU u odnosu na kontrolnu grupu. Jedan pacijent koji je imao povišene vrednosti ispitivanih antitela nije imao pozitivan nalaz za GSE na gastroenterološkom pregledu.

Slične rezultate je dobila i studija Yasar-a i sar.⁷², koja je ispitivala prisustvo IgA i IgG EMA i nativnih anti-glijadinskih antitela kod 82 pacijenata sa ROU i kod istog broja zdravih kontrola. Istovremeno, oni su svim pacijentima obavili endoskopski i patohistološki pregled duodenuma, uz praćenje anamnestičkih podataka o gastrointestinalnim tegobama. U njihovoj studiji, kod 1/82 pacijenta sa ROU je dijagnostikovana GSE, koja je potvrđena serološki i patohistološki. Na osnovu ovih rezultata, zaključeno je da ispitivanje EMA i nativnih anti-glijadinskih antitela kod svih pacijenata sa ROU nije od kliničkog značaja.

Studija koju su sproveli Shakeri i sar. ⁷⁰ je dodatno ukazala na složenost i težinu pitanja povezanosti ROU i GSE. Oni su na većoj grupi pacijenata sa ROU ispitivali prisustvo IgA EMA i anti-TG antitela, a potom kod slučajeva sa pozitivnom serologijom obavili i endoskopski i patohistološki pregled duodenuma. Njihovi rezultati su pokazali da je 1/247 imao pozitivan nalaz IgA EMA i anti-tTG antitela, dok je 6/247 imalo pozitivan nalaz samo IgA anti-tTG. Od ovih sedam pacijenata sa pozitivnom serologijom, 4 pacijenta su imala patohistološki nalaz koji odgovara Marš I stepenu, 2 pacijenta su imala GSE Marš II stepena, dok je pacijent sa istovremeno pozitivnim nalazom EMA i anti-tTG antitela je imao GSE Marsh III stepena. U navedenoj studiji, 4/7 pacijenata sa pozitivnim serološkim nalazom za GSE su sprovodili dijetu bez glutena i imali su pozitivan terapijski učinak i na pojavu ROU. Autori ove studije su razmatrali ulogu anti-tTG u ranom otkrivanju GSE i mogućnosti za postojanje lažno negativnih rezultata.

Tabela 10. Prikaz studija koje su ispitivale GSE-serološke markere kod pacijenata sa ROU

Autor studije	God.	Studij. grupa (n)	Kontrol grupa (n)	IgA anti-Gl %	IgA EMA %	IgA anti-tTG (%)	Urađena EGD* i PHd**	GSE (%)	Primena dijetu bez gluten
Ferguson	1976	33	-	-	-	-	+	24%	+
Ferguson	1980	50	-	-	-	-	+	4%	+
Olszewska	2006	42	42	-	4.7 vs 0%	-	EMA +	4.7%	+
Aydemir	2004	41	49	7.3 vs 4%	4.8 vs 0%	-	+	4.8%	+
Robinson	2004	87	87	-	1.1% vs 0%	-	EMA +	0%	-
Yasar	2011	82	82	2.4 vs 1.2%	1.2 vs 0%	-	+	1.2%	-
Shakeri	2009	247	-	-	0.4%	2.83%	+ anti-tTG	2.83%	+
Bijelić	2017	57	60	9.6 vs 6.7%	-	1.8 vs 0%	+ anti-tTG	1.8%	+

* - EGD - ezofagogastroduodenoskopija

** - PHd - patohistologija duodenuma

*** anti-GL At - nativna anti-glijadinska antitela

Mnoge studije su odbacile mogućnost da ROU predstavlja faktor rizika za nastanak GSE^{71,72} a postoje i stanovišta da se ROU mogu smatrati indikatorom tj. prediktivnim markerom za nastanak GSE¹⁶⁸. Otežavajući faktori u dijagnostici GSE su širok dijapazon simptoma i kliničkih formi, nekonkluzivni endoskopski i histološki nalazi i slučajevi sa oprečnim histološkim i serološkim nalazima koji se najčešće javljaju kod nedovoljno razvijenih ili atipičnih formi GSE¹⁶¹. Pored toga, senzitivnost na gluten ima široku lepezu simptoma, koju je često u praksi teško definisati, te se još uvek dijagnostikuju na osnovu subjektivnih tegoba pacijenta i terapijskog odgovora na primenu odgovarajuće dijeta¹⁶⁹.

Kao što smo na početku naveli, naša studija je po prvi put ispitivala vrednosti koncentracija seroloških markera kod pacijenata sa ROU. Naši rezultati su pokazali da su prosečne vrednosti koncentracija anti-tTG IgA i IgG antitela bile značajno više kod pacijenata sa ROU u odnosu na kontrolnu grupu, što zahteva dodatna razmatranja imajući u vidu složenost dijagnostičkog tumačenja anti-tTG antitela kod nekih grupa pacijenata sa GSE.

Naime, kod pacijenata sa GSE, anti-tTG i EMA se smatraju markerima jejunalnog oštećenja, a pokazana je i pozitivna korelacija između koncentracije anti-tTG i stepena histopatološkog nalaza GSE (Marsh klasifikacija)¹⁷⁰. Stoga nije iznanađujuće što su neke studije pokazale da su ovi markeri bili predominantno negativni kod odraslih pacijenata sa blagom i početnom formom GSE, kao i kod atipičnih formi GSE^{165,171}.

Negativan nalaz anti-tTG antitela ne može biti dovoljan za isključenje GSE⁹⁸, jer je pokazano da postoje slučajevi sa negativnom serologijom, a pozitivnim histopatološkim nalazom koji govori u prilog GSE. Zanimljiv je i podatak iz studije koji su sprovedeli Kurppa i sar.¹⁷² u kojoj je dokazano da u ranoj fazi celijačne bolesti anti-DGP antitela imaju i veći senzibilitet u odnosu na anti-tTG antitela.

Na osnovu dostupne literature, deamidovana glijadinska antitela nisu do sad ispitivana kod pacijenata sa ROU, već uglavnom kod pacijenata sa GSE. Prema tome, u sprovedenoj studiji smo prvi put ispitali prevalencu, kao i koncentraciju novih anti-GAF-3X i anti-DGP antitela kod pacijenata sa ROU, uz istovremeno određivanje i nativnih anti-glijadinskih antitela. U našoj studiji, u grupi pacijenata sa ROU, pozitivan nalaz anti-DGP IgA i/ili IgG klase je imalo 19.6% pacijenata, dok je anti-GAF-3X IgA

imalo 3.6%. U odnosu na kontrolnu grupu, ovi rezultati nisu bili statistički značajno povišeni.

U dijagnostici GSE, nativna anti-glijadinska antitela su već nekoliko godina unazad zamenjena novim deamidovanim anti-glijadinskim antitelima, anti-DGP antitelima i još novijim anti-GAF-3X antitelima sa visoko senzitivnim i specifičnim imunodominantnim epitopima. Anti-DGP antitela i anti-GAF-3X su ispitivana u nekoliko studija kod pacijenata sa GSE ^{173,174}. Pokazano je da anti-DGP imaju višu senzitivnost i specifičnost za detekciju GSE u odnosu na nativna anti-glijadinska antitela. U pogledu diferencijalne dijagnoze GSE, Lutteri i sar. ¹⁷⁵ su ispitivali više vrsta deamidovanih anti-glijadinskih antitela i pokazali su njihovu superiornost u odnosu na konvencionalna anti-glijadinska antitela.

Izolovano postojanje anti-glijadinskih antitela, pa čak i novih deamidovanih antitela, nije dovoljno za postavljanje dijagnoze GSE, obzirom da postoje slučajevi sa pozitivnim serološkim nalazom na glijadin koji nemaju nalaz enteropatije prilikom endoskopskog i patohistološkog pregleda tankog creva. Na osnovu pregledane literature, mnoge studije koje su ispitivale prisustvo GSE-specifičnih seroloških markera, najčešće su pronalazili veću učestalost pozitivnog nalaza nativnih anti-glijadinskih antitela u odnosu na EMA ili anti-tTG, što nije bilo praćeno gastroenterološkim nalazom koji bi govorio u prilog GSE ^{154,72}. Jedno od objašnjenja za ovakve nalaze je da prodor glijadina kroz mukozu može indukovati stvaranje anti-glijadinskih antitela kod nekih individua, ali ne mora uvek rezultovati i pojavom inflamacije i jejunalnog oštećenja u smislu celijačne enteropatije ⁹⁵. Prednost novih deamidovanih anti-glijadinskih antitela se nalazi u tome što detektuju upravo one toksične epitope glijadina koji su povezani sa patološkim odgovorom mukoznog imuniteta, te se oni smatraju specifičnijim u odnosu na nativna anti-glijadinska antitela. U tom smislu, Tonutti i sar. ¹⁷⁶ su sugerisali da je pozitivan test na anti-DGP IgG antitela indikacija za detaljno ispitivanje čak iako su EMA i anti-tTG negativna. Nisku koncentraciju anti-tTG kod blagih i početnih formi GSE smo već komentarisali, u smislu lažno negativnog nalaza. Stoga su od značaja preporuke više studija koje su iznele da je najviša dijagnostička preciznost postignuta istovremenim određivanjem anti-GAF 3X IgG antitela i anti-tTG IgA antitela. Anti-GAF 3X u visokom titru naročito ima dijagnostički značaj kada su anti-tTG antitela granično povišena. IgG anti-

GAF-3X imaju značaja za dijagnostiku kod pacijenata sa GSE i IgA deficijencijom^{177,178}.

Zanimljiva je studija Lu i sar.¹⁷⁹ koja je ispitivala prisustvo anti-DGP antitela kod pacijenata sa sindromom iritabilnog kolona, koji su patili od probavnih smetnji, nadutosti i problema sa pražnjenjem. U njihovoj studijskoj grupi, prevalenca anti-DGP antitela je bila značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu, a svi anti-DGP pozitivni pacijenti su ujedno imali i pozitivan terapijski efekat na primenu dijete bez glutena. Takođe, značajna većina pacijenata sa anti-DGP antitelima je imala početne znake karakteristične za celijačnu bolest na histološkom pregledu duodenalne mukoze. Njihovi rezultati su ukazali na mogućnost neprepoznate celijačne bolesti među pacijentima sa sindromom iritabilnog kolona, te da anti-DGP pozitivan nalaz može govoriti u prilog rane celijačne bolesti.

U našoj studiji smo ispitivali i koncentraciju navedenih antitela, i uočeno je da je srednja vrednost koncentracija anti-GAF-3X IgA klase bila značajno viša kod pacijenata sa ROU u odnosu na kontrolnu grupu. Zanimljiv je rezultat naše studije koji je pokazao da su više koncentracije IgA anti-tTG i anti-GAF-3X antitela međusobno korelirale, dok nije postojala korelacija između anti-tTG IgA i anti-DGP IgA.

Prihvaćeni GSE-specifični markeri, anti-tTG i nova deamidovana glijadinska antitela, osim svog dijagnostičkog značaja, pomogli su i u boljem razumevanju patofiziološkog mehanizma nastanka GSE¹⁸⁰. Ova saznanja takođe mogu biti od značaja u razmatranju povezanosti ROU i GSE. Objašnjenja za rezultate povišenih vrednosti koncentracije IgA anti-tTG antitela i IgA anti-GAF-3X antitela, kao i njihovu međusobnu korelaciju, koji su pronađeni u ovoj studiji među pacijentima sa ROU, mogli bi se potražiti u patofiziološkoj ulozi enzima tkivne transglutaminaze i glijadina. U tom smislu, uloga mukoznog imuniteta i epitelne barijere, od oralne mukoze pa nadalje duž mukoza celog digestivnog trakta, se ogleda u prodoru spoljnih antigena i generisanju imunskog odgovora, što je od značaja u imunopatogenezi ROU, kao i kod GSE².

Smatra se da prodor glijadinskih peptida u intestinalni epitel inicira imunski odgovor u lamini proprij, dovodeći do sekrecije GSE-specifičnih antitela. Uloga deamidovanih glijadin-peptidnih antitela IgA klase u patogenezi GSE nije sasvim razjašnjena, mada postoje indicije da oni doprinose poremećaju intestinalnog permeabiliteta, translokaciji glijadina kroz epitelne ćelije i povećanju aktivnosti enzima transglutaminaze, što su

pokazali Rauhavirta i sar¹⁸¹. Zanimljivo je da anti-DGP antitela mogu ukršteno da reaguju sa TG, čime se povećava transepitelni prolaz glijadina¹⁸². Značaj patogenetske uloge TG i glijadina kod GSE je potvrdila već pomenuta grupa autora (Rauhavirta i sar.)¹⁸³, koja je koristila ex vivo inhibitore TG2 i pokazala njihov anti-proliferativni efekat na T ćelije, kao i protektivni efekat na epitelnu barijeru.

Rauhavirta i sar.¹⁸⁰ su utvrdili i interesantne podatke da se narušena epitelna barijera i povećana intestinalna permeabilnost, osim kod razvijene forme GSE, nalaze i kod ranih oblika ove bolesti. Ovo je demonstrirano ispitujući proteine “tesnih spojnica” epitelnih ćelija, pokazavši njihovu smanjenu ekspresiju čak i kod pacijenata bez evidentnih histoloških promena mukoze u smislu GSE. Imajući u vidu da glijadin direktno dovodi do promena u epitelnoj barijeri, postojanje anti-DGP i anti-GAF-3X antitela mogu ukazivati na povećanu translokaciju glijadina i povećanu mukoznu permeabilnost, a moguće i početne epitelne promene na molekularnom nivou.

Narušena epitelna barijera u sklopu nekih akutnih gastrointestinalnih infektivnih stanja ili drugih imuno-inflamatornih patologija može omogućiti prodor spoljnih antigena, među njima i glijadina koji je široko zastupljen u hrani u formi glutena, i na taj način stvoriti uslove za generisanje imunskog odgovora. Ipak, za razvoj patološkog imunskog odgovora na glijadinske peptide potrebni su i drugi faktori, među kojima je i imunogenetska predispozicija. U prilog tome govori i podatak da je povećana intestinalna permeabilnost uočena i kod pacijenata sa dermatitis herpetiformisom koji nisu imali histološke promene na tankom crevu¹⁸⁴.

Imajući u vidu patogenu ulogu glijadinskih peptida na epitelnu barijeru i deamidovanih anti-glijadinskih antitela, sam nalaz seropozitivnosti na ova antitela kod pacijenata sa ROU opravdava dalja ispitivanja funkcionalnosti epitelne barijere i promena na mukozi. Pozitivan nalaz anti-glijadinskih antitela uz prisustvo atipičnih ekstraintestinalnih simptoma, u koje spadaju i ROU, mogu biti sasvim opravdani razlozi za sumnju na GSE i za adekvatno gastroenterološko praćenje. Obzirom na podatak da se ROU kao prva i jedina manifestacija javlja u oko 5% pacijenata sa GSE^{70,161}, i da se uočava sve veća zastupljenost atipičnih formi GSE, koje nemaju jasno prezentovane gastrointestinalne simptome bolesti¹⁸⁵, upravo ove atipične i blage forme predstavljaju najveći izazov za pravovremeno dijagnostikovanje.

Dijagnostikovanje GSE kod našeg pacijenta ukazuje na značaj ispitivanja GSE-specifičnih seroloških markera kod pacijenata sa ROU, čak i bez gastrointestinalnih tegoba ili drugih znakova koji bi upućivali na GSE. Nakon uvođenja dijeta bez glutena kod našeg pacijenta je došlo do značajnog poboljšanja, da bi se afte potpuno izgubile posle 6 meseci. Pokazano je da u slučajevima ROU refrakternim na standardnu terapiju, dijeta bez glutena može dovesti do kliničkog poboljšanja ⁷⁰, iako pojedine studije ne potvrđuju da dijeta bez glutena može dovesti do remisije ROU ^{150,186,187}.

Iako nalazi naše, kao i mnogih drugih studija ne opravdavaju analizu GSE-specifičnih markera kao metod za skrining GSE kod svih pacijenata sa ROU, potrebno je istaći koji to patološki nalazi kod ROU mogu predstavljati sumnju na GSE ¹⁰¹. U tom smislu, ukoliko pacijent sa ROU prijavljuje čak i blage, nespecifične gastrointestinalne tegobe, ili ukoliko se slučajno otkrije poremećaj u hepatogramu, treba biti upućen gastroenterologu, uz obavljanje specifičnih seroloških analiza. Pored toga, opšti simptomi, poput umora, malaksalosti, gubitka telesne težine mogu biti jedan od znakova malnutricije i malapsorpcije. Treba imati na umu da znakovi nutritivnog deficita mogu ostati duže vremena neprepoznati te to zahteva ciljano ispitivanje ^{7,98}. Hematološki poremećaj u vidu anemije takođe može biti jedan od izolovanih poremećaja, koji je uočen kod pacijenata sa ROU, ali i kod pacijenata sa GSE. Takođe, i hormonski disbalans koji je opisan kod nekih pacijenata sa ROU kao predisponirajući faktor, može se videti i kod pacijenata sa GSE. Endokrini poremećaji kod GSE mogu biti posledica malnutricije i poremećaja metabolizma, ali mogu se javljati i pridružena oboljenja imuno-posredovane etiopatogeneze, poput dijabetes melitusa tip 1 ili oboljenja štitaste žlezde. Uočeno je da se GSE javlja u 3-10% pacijenata koji imaju diabetes melitus tip I ^{188,189}. Osim sistemskih znakova, neophodno je pomenuti čest stomatološki nalaz koji prati GSE, a to je nalaz dekolorizacije zuba i hipoplazije zubne gleđi. Smatra se da ovi pacijenti imaju veću učestalost za GSE u odnosu na opštu populaciju. Na kraju, postoje primeri pacijenata sa ROU koji imaju pozitivnu porodičnu anamnezu za GSE, iako oni sami nemaju jasne tegobe koje bi upućivale na GSE. Takve pacijente je apsolutno indikovano uputiti na dalji skrining u pravcu GSE ⁸⁷.

5.2. IBC-povezani serološki markeri

Oralne manifestacije su jedna od najčešćih ekstraintestinalnih lokalizacija kod pacijenata sa IBC ⁸⁴. Javljaju se u vidu oralnih ulceracija, a pored toga se mogu manifestovati kao vegetantni piostomatitis i u vidu granulomatoznih lezija kod KB. Prema izveštajima studija, ulceracije oralne mukoze se mogu naći kod 10% pacijenata sa ulceroznim kolitisom, a u 20-30% pacijenata sa Kronovom bolešću ⁷³. U studiji sprovedenoj među turskim pacijentima sa IBC, prevalenca za oralne ulceracije je bila daleko viša i iznosila je 39.7% kod pacijenata sa KB i 33.1% kod pacijenata sa UK, pri čemu su autori isključili druga stanja povezana sa pojavom oralnih ulceracija, kao što su Behčetova bolest, Reiterov sindrom, HIV i HSV infekcija ¹⁹⁰. Pretpostavlja se da su drugi faktori za nastanak ROU uticali na češću pojavu ulceracija kod IBC pacijenata u ovoj studiji. Neke studije su primetile da se ROU javljaju češće kod pacijenata sa IBC koji već imaju neku pridruženu ekstraintestinalnu manifestaciju.

Iako se oralne manifestacije češće javljaju nakon razvoja intestinalne bolesti, u oko 5-10% pacijenata promene u usnoj duplji prethode intestinalnoj bolesti ⁷³ i tada mogu pobuditi sumnju na IBC. U odnosu na klinički nalaz IBC, zapaženo je da su učestalije kod pacijenata sa KB kojima je bolest lokalizovana u gornjim partijama digestivnog trakta, kao i da se češće javljaju kod dece nego kod odraslih ¹⁹¹. ROU se kod pacijenata sa KB mogu javiti kao jedan od simptoma bolesti kako u sklopu recidiva, tako i u fazama remisije ¹⁹². Kod pacijenata sa UK, kod kojih je intestinalna bolest ograničena na debelo crevo, pojava promena oralne mukoze se smatra ekstraintestinalnom manifestacijom, u vidu rekurentnih oralnih ulceracija ¹⁹³.

Kod oba ova stanja je uočeno da više egzogenih i endogenih faktora mogu dovesti do narušavanja integriteta epitelne barijere i imunizacije različitim antigenima koji su prisutni na mukozi ². Serološki markeri koji se povezuju sa IBC su antitela na *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) koja se češće nalaze kod pacijenata sa KB i anti-neutrofilna citoplazmatska antitela (ANCA) koje se mogu naći kod pacijenata sa UK ¹²⁸. Imajući u vidu slične patofiziološke karakteristike ROU i IBC, ispitivali smo prisustvo ASCA i ANCA kod pacijenata sa ROU kako bi istražili njihov potencijalni patološki i klinički značaj kod ROU. Pored toga, nije poznata učestalost dijagnostikovanja novih slučajeva IBC kod pacijenata sa ROU.

Na osnovu pregledane literature, prisustvo ASCA i ANCA do sada nije ispitivano kod pacijenata sa ROU. Naši rezultati ukazuju na potencijalni klinički značaj ASCA serološkog markera kod ROU. Naime, ASCA antitela IgG klase su bila značajno češće prisutna kod pacijenata sa ROU u odnosu na zdrave kontrole, što je prvi put dokazana povezanost ASCA i ROU. Obzirom na ovakav rezultat, neophodno je, na osnovu dosadašnjih saznanja o patogenezi ROU, razmotriti patofiziološki mehanizam koji bi mogao biti odgovoran za pojavu ASCA kod ROU.

Do sada, ASCA su korišćene kao dijagnostički marker za Kronovu bolest (KB), a naročito u diferencijalno-dijagnostičke svrhe u slučaju nedeterminisanih formi IBC ¹³². Iako etiopatogenska uloga ASCA kod KB nije razjašnjena, jedna od pretpostavki je da je pojava ovih antitela u vezi sa povećanom intestinalnom permeabilnošću koja je uočena kod ovih pacijenata. Smatra se da narušen integritet epitelne barijere omogućava povećanu izloženost mukoze antigenima hrane, među kojima je gljivica *Saccharomyces cerevisiae* jedna od veoma zastupljenih komponenti koja se koristi u industriji hrane ¹⁹⁴. U prilog tome govori i podatak da se ASCA mogu naći i kod pacijenata sa GSE ¹⁹⁵, kojima je takođe u patogenezi poremećena crevna permeabilnost, a uočeno je njihovo prisustvo i kod pacijenata sa Behčetovom bolešću ¹⁹⁶. Kod pacijenata sa ROU nije do sada sprovedena studija koja je istraživala funkcionalnost oralne epitelne barijere, ali ovi nalazi ukazuju da bi takva studija bila od značaja kako bi se ustanovilo mesto prodora antigena u mukoza.

Osim poremećaja epitelne barijere i povećane propustljivosti za spoljne antigene, prisustvo ASCA može ukazivati i na gubitak imunske tolerancije ¹⁹⁴. Gubitak imunske tolerancije na oralno unete antigene je dokazan kod pacijenata sa ROU, u vidu poremećaja funkcionalnosti T regulatornih ćelija koje su glavne za održavanje imunske tolerancije ¹⁹⁷. U regulaciji imunskog odgovora i održavanju homeostaze mukoznog imuniteta, mikrobnii sastav mukoza ima izuzetno značajnu ulogu, naročito komensalni mikrobi koji su u intenzivnoj i složenoj interakciji sa ćelijama mukoznog imuniteta. Svojim metabolitima mikrobi na mukozama utiču na proliferaciju imunskih ćelija, diferencijaciju subpopulacija T limfocita i balans u produkciji citokina ¹⁹⁸.

Postoje sumnje da disbalans oralne mikrobiote može učestvovati u etiopatogenezi ROU, iako nijedna specifična bakterijska vrsta nije identifikovana do sada ¹⁹⁹. Poslednja saznanja ukazuju da se sastav oralne mikrobiote kod pacijenata sa ROU razlikuje u

odnosu na mikrobiološki sastav kod zdravih kontrola ²⁰⁰. Ovakvi rezultati bi mogli da indikuju da promene u mikrobiološkom sastavu oralne mukoze imaju etiološku ulogu u nastanku hroničnih inflamatornih promena mukoze. Poremećen mikrobni sastav digestivnog trakta, to jest disbioza, se smatra značajnim faktorom za nastanak mnogih imunsko-posredovanih inflamatornih oboljenja gastrointestinalnog trakta ²⁰¹, ali i alergija, pa čak i metaboličkih oboljenja. U kreiranju mikrobnog sastava na mukozama, osim priliva mikroba iz spoljne sredine i kroz hranu, značajnu ulogu imaju i receptori za prepoznavanje mikroba, a među najvažnijima su tzv. “*toll-like receptori*” (TLR). Ovi receptori se nalaze u formi više podtipova koji su specijalizovani za određene grupe mikroba. Aktivacija određenog TLR preko signalnih puteva pokreće odgovarajući tip adaptivnog T-ćelijskog odgovora, uz balansiranje Th1/Th2, kao i T regulatornog puta. Jedan od patogenih mehanizama disbioze je neadekvatna indukcija i funkcionalnost T regulatornih ćelija i njihovih efektor, što može uticati na održavanje oralne tolerancije ²⁰².

Kod pacijenata sa ROU, Lewkowicz i sar. ¹⁹⁷ su ustanovili da postoji snižen broj CD4+CD25+ T regulatornih ćelija u perifernoj krvi, kao i njihova disfunkcija. Isti autori su utvrdili i smanjenu aktivnost TLR-2 receptora kod ROU pacijenata. Interesantno je da se upravo na CD4+CD25+ Treg ćelijama eksprimira i TLR-2 i to je jedan od načina kojim se ostvaruje imunosupresivni, regulatorni efekat. Stoga, deficit TLR-2 signalnog puta utiče na disfunkciju T regulatornih ćelija, što je uočeno kod ROU, a sve to ima za posledicu i narušavanje oralne tolerancije i stanje disregulacije imunskog odgovora, uz polarizaciju T-helper (Th) ćelijskog odgovora u pravcu Th1 profila ⁵⁴.

Disbalans Th1/Th2 odgovora u korist Th1 profila je prisutan i kod drugih imunski-posredovanih oboljenja. Disregulacija T regulatornih ćelija je pokazana i kod pacijenata sa IBC, kao i kod ROU, i dovodi se u vezu sa mukoznim mikrobiološkim sastavom i interakcijom ovih ćelija i mikroba koji aktivno učestvuju u kreiranju imunskog odgovora mukoze ^{46,47}. Kod IBC, hronična inflamacija mukoze se može smatrati posledicom neadekvatnog mukoznog imunskog odgovora na komensalne mikrobe i druge oralno unete antigene kod genetski podložnih individua. Narušena epitelna barijera i povećana intestinalna permeabilnost mukoze omogućava prodor spoljnih antigena u mukoza, što uz disregulisan imunski odgovor i gubitak tolerancije dovodi do nalaza anti-mikrobnih antitela i antitela na antigene hrane ^{123,203,204}.

Kada su u pitanju klinički podaci, možemo uočiti da stanja u kojima se javljaju ASCA imaju zajedničko obeležje, a to je narušen integritet epitelne barijere i povećana permeabilnost. Tako su ASCA pronađena u određenom broju pacijenata sa početnom formom GSE, i to istovremeno sa nalazom nekih anti-mikrobnih antitela, što se dovodi u vezu sa poremećenim imunskim odgovorom na komensalne mikrobe kod ovih pacijenata ²⁰⁵. Studija koju su sproveli Frehn sar. ²⁰⁶ je ispitivala više anti-mikrobnih antitela i antitela na različite antigene iz hrane, upoređujući njihov nalaz u serumu i u fecesu kod pacijenata sa KB, UK, akutnim gastroenteritisom i kod ne-inflamatornih, zdravih kontrola. Oni su pronašli povišene vrednosti ASCA i nekih anti-mikrobnih antitela u serumu pacijenata sa KB, kao i fekalnih anti-mikrobnih i antitela klase IgG na antigene hrane (iz mleka, pšenice itd.), kod istih pacijenata. Sve ovo govori u prilog uloge integriteta epitelne barijere i gubitka oralne tolerancije na oralno unete egzogene antigene kod pacijenata koji uz određeno imuno-inflamatorno oboljenje mukoza imaju i nalaz ASCA. Pored toga, interesantan je podatak da se ASCA češće nalazila kod pacijenata sa KB koji imaju inflamatorne lezije u proksimalnim delovima digestivnog trakta, a da je prevalenca ASCA opadala kod inflamacije ileuma i najniža je bila kod inflamatornih lezija u kolonu ¹³⁴. Moguće je i da mikrobnii sastav u interakciji sa mukoznim imunitetom određenih segmenata digestivnog trakta čini gornje partije podložnijim prodiru antigena ASCA.

Studija Seoudi i sar. ²⁰⁰ je ispitivala salivarni i oralni mukozni mikrobnii sastav kod pacijenata sa Behčetovom bolešću, ROU i kod zdravih kontrola. Oni su ustanovili razlike u mikrobnom sastavu oralne mukoze između pacijenata sa Behčetovom bolešću i sa ROU, a koje mogu biti etiološke ili reaktivne prirode u sklopu inflamacije. Studija koja je ispitivala ASCA kod pacijenata sa Behčet-ovom bolešću, pronašla je značajno viši nivo ASCA kod ovih pacijenata. Zanimljivo je što su u dve odvojene studije (Krause i sar.) ¹⁴⁰ i (Rhee i sar) ¹⁷⁷, koji su ispitivali ASCA kod pacijenata sa Behčetovom bolešću, koristili pacijente sa ROU kao kontrolnu grupu i u obe studije su uočili prisustvo ASCA u visokim vrednostima titra, kod 1/10 u prvoj, odnosno 1/12 ROU pacijenata u drugoj studiji. Pored toga, Monselise i sar. ¹⁹⁶ su pronašli pozitivnu korelaciju između titra IgG ASCA i učestalih epizoda oralnih ulceracija kod zdravih srodnika pacijenata sa Behčetovom bolešću. Behčetova bolest je retko oboljenja koje se manifestuje pojavom ROU, genitalnih ulceracija i uveitisa. Iako etiopatogeneza nije

potpuno razjašnjena, smatra se da u nastanku bolesti posreduje imunogenetska patogeneza, a kao dodatni spoljni faktor se uočava uloga mikroba koji pokreću neadekvatan imunski odgovor. Stoga nije iznenađujuće što su ASCA otkrivena u značajnom broju ovih pacijenata. U sklopu Behčetove bolesti, ulcerogene lezije mogu zahvatati i tanko i debelo crevo, a endoskopski nalaz liči na UK. Procenjeno je da je gastrointestinalni trakt zahvaćen kod 3%-25% pacijenata sa Behčetovom bolešću, što varira u odnosu na geografski region ²⁰⁷.

Osim prevalence, naša studija je ispitivala i koncentracije ASCA. Utvrđene su značajno više srednje vrednosti ASCA klase IgG kod naših pacijenata sa ROU u odnosu na kontrolnu grupu. Značajno češći nalaz ASCA, sa značajno višim koncentracijama zahteva više razmatranja, kao i nova istraživanja u pravcu moguće etiopatogenetske uloge ASCA u nastanku ROU.

Više studija je potvrdilo povezanost nalaza ASCA u višim koncentracijama, naročito klase IgA, sa progresivnim i ekstenzivnim kliničkim fenotipom KB ¹³⁶, kao i slučajevima refraktarnim na medikamentnu terapiju i potrebu za operativnim tretmanom u ranijoj fazi bolesti ¹³⁷. Studija Teml i sar. ²⁰⁸ je ispitivala vrednosti koncentracija kod pacijenata sa KB tokom lečenja kortikosteroidima i utvrdila opadanje vrednosti koncentracija IgG i IgA klase ASCA. Zanimljivo je da je u studiji Viitasalo i sar. ¹³⁹ kod pacijenata sa GSE uočeno smanjenje seropozitivnosti na ASCA i anti-mikrobna antitela nakon primene dijeta bez glutena.

Ovi nalazi sugerišu da oporavak mukoze i integriteta epitelne barijere smanjuju izloženost mukoznog imuniteta egzogenim antigenima, što je u saglasnosti sa teorijom da ASCA nastaju kao posledica povećane permeabilnosti i prodora antigena u mukožu. Nalaz značajno više prevalencije i srednje koncentracije ASCA IgG antitela koje smo pronašli u našoj studijskoj grupi pacijenata sa ROU ukazuje da su potrebne dodatne studije, koje bi ispitale funkcionalnost epitelne barijere kod ovih pacijenata. Takođe, potrebne su prospektivne studije koje bi pratile vrednosti ASCA i klinički nalaz kod veće grupe pacijenata, što je od značaja imajući u vidu nedovoljnu specifičnost i senzitivnost ASCA. Naime, ASCA je zastupljena kod 5-15% pacijenata sa dijerejom bez dijagnostikovane IBC, kod zdravih kontrola od 1-6% ¹³², a kod zdravih srodnika pacijenata sa KB oko 20% ¹³⁵.

Kod IBC, ANCA se smatraju serološkim markerom povezanim sa UK, a uočena je i njihova pojava kod pacijenata sa Kron-kolitisom ¹⁴². Takođe, ANCA se češće sreću kod pacijenata sa pridruženim ekstraintestinalnim manifestacijama, a među njima su i oralne manifestacije ⁷³. Iako je uočena pojava oralnih ulceracija kod pacijenata sa UK, nijedna studija do sada nije ispitivala prisustvo ANCA kod pacijenata sa ROU. Imajući u vidu kompleksnu etiologiju ROU, koja se dovodi u vezu sa inflamacijom i mikrobnim faktorom, kao i da se aftozne lezije često sreću i kod drugih stanja sa pozitivnim ANCA nalazom ²⁰⁹, opravdano je bilo ispitati prevalencu ANCA kod pacijenata sa ROU. Inače, ANCA su prvobitno uočena kod vaskulitisa, gde predstavljaju dijagnostički i prognostički marker ²¹⁰, a u manjem procentu i kod Behčetove bolesti, hroničnog bronhitisa, bronhiektazija, cistične fibroze i kod HIV infekcije. Ono što je od značaja je da se sva ova stanja karakterišu hroničnom inflamacijom i neadekvatnim imunskim odgovorom na mikrobe ^{211,212,213}.

Iako rezultati naše studije nisu pokazali značajno prisustvo ANCA kod ROU u odnosu na grupu zdravih kontrola, od značaja je pomenuti određene činjenice vezano za nalaz ANCA kod UK. Naime, kada su ANCA otkrivena kao značajan serološki marker kod pacijenata sa UK, većina istraživača je smatrala da ova antitela predstavljaju epifenomen bolesti i da nemaju patogenetski značaj kod UK ¹⁴⁷. Neke studije nisu mogle da utvrde povezanost ANCA nalaza sa kliničkim karakteristikama bolesti kod pacijenata sa UK ¹⁴⁶. Ipak, nekoliko studija je pokazalo da se ANCA češće nalaze kod dugogodišnjeg UK. Takođe je pokazano i da se ANCA uglavnom javljaju kod pacijenata koji imaju već refraktarnu i kompleksnu formu UK, praćenu različitim komplikacijama i pridruženim inflamatornim bolestima ^{148,149}.

Kod pacijenata sa UK, uloga ANCA i mehanizam njihovog nastanka nije razjašnjen, međutim prisustvo ANCA se sve više dovodi u vezu sa patološkim imunskim odgovorom na komensalne mikrobe ²¹⁴. Pretpostavlja se da je kod pacijenata sa UK u pitanju selektivni gubitak tolerancije ²¹⁵ na određene bakterijske antigene koji imaju specifičan uticaj na lokalizaciju i klinički tok bolesti ²¹⁶. Novija istraživanja su ukazala da pacijenti sa UK imaju poremećen mikrobnii sastav, smanjen diverzitet mikrobnih vrsta, za koji se takođe još uvek ne zna da li je uzrok disbalansa mukoznog imuniteta ili je posledica hronične inflamacije ²¹⁷.

Vrednosti titra ANCA među pacijentima sa ROU u našoj studiji koji su imali pozitivan nalaz ANCA su bile niske i kretale su se ispod 1:80. Imajući u vidu nalaze ANCA titra i koncentracija u odnosu na kliničku aktivnost pacijenata sa UK, verovatno je da bi nalaz ANCA u višem titru tek mogao biti od kliničkog značaja. U tim slučajevima je preporučljivo ispitati prisustvo patoloških stanja koja su praćena ANCA nalazom. Pacijentima sa ROU koji imaju vrednosti titra ANCA višim od 1:80 je opravdano ispitati antigensku specifičnost ANCA, obzirom da etiopatologija neutrofilnih enzima u imunskom odgovoru na mikrobe tek treba da se razjasni.

5.3. Hipersenzitivnost na antigene hrane

Među najčešćim oblicima preosetljivost na hranu, sreću se hipersenzitivnost na gluten i na proteine kravljeg mleka. Preosetljivost na ove antigene hrane prepoznati su kao jedni od etioloških faktora za nastanak ROU ^{48,52}.

Hipersenzitivnost na gluten ima širok dijapazon kliničkih simptoma i patoloških promena, koje se mogu manifestovati gastrointestinalnim, ali i različitim ekstraintestinalnim simptomima i predstavljaju grupu glutenom-izazvanih poremećaja. Patogenetski mehanizmi ovih različitih glutenom-izazvanih poremećaja je takođe drugačiji ²¹⁸.

Povezanost ROU i hipersenzitivnosti na gluten bez gastrointesinalnih abnormalnosti je sugerisao Wray ¹⁸⁷ u studiji u kojoj je na osnovu rezultata razmatrao mogućnost da hipersenzitivnost na gluten može biti uvertira za GSE. Antitela na glijadin su analizirali O'Farrelly i sar. ¹⁵⁰ kada su uočili povećanu učestalost ovog serološkog markera kod pacijenata sa ROU.

U našoj studiji smo utvrdili povišene vrednosti nativnih anti-glijadinskih antitela IgG klase kod 19.2% pacijenta sa ROU u odnosu na 2.2% kod zdravih kontrola, što je imalo statističku značajnost. Takođe, nalaz IgG anti-glijadinskih antitela i IgG anti-DGP antitela je korelirao. Učestalost IgA nativnih anti-glijadinskih antitela je kod pacijenata sa ROU iznosila 9.6%, a kod kontrolne grupe 6.7%. Takođe, nalaz IgA anti-glijadinskih antitela je korelirao sa nalazom IgA anti-DGP i anti-tTG antitela.

Anti-glijadinska antitela, naročito nativna, se mogu pronaći kod izvesnog broja zdravih individua ¹⁰⁷. Pored toga, poslednje decenije su stručnjaci iz oblasti gastroenterologije pokušali da kategorizuju kliničke forme glutenske senzitivnoisti bez enteropatije, pa su

definisali kao poseban klinički entitet ne-celijačnu glutensku senzitivnost (NCGS). NCGS nije imunski posredovano stanje i ne postoje patološke promene u mukozi creva²¹⁹. Većina studija se slaže da pacijenti sa NCGS uglavnom imaju povišene vrednosti anti-glijadinskih antitela IgG klase, poneki i IgA klase, dok su ostali serološki markeri, poput EMA, tTG i novih deamidovanih anti-glijadinskih antitela kod ovih pacijenata dominantno negativni²²⁰. U prilog tome govori i to što je negativan nalaz EMA i tTG antitela kod pacijenata sa NCGS korelirao sa urednim nalazom na crevnoj mukozi. Pacijenti sa NCGS imaju raznovrsnu simpomatologiju koja se obično povlači na primenu dijeta bez glutena, međutim nije sprovedena studija o učestalosti ROU kod ove grupe pacijenata. Imajući u vidu da neki pacijenti sa ROU imaju terapijski učinak na primenu dijeta bez glutena, a da im pritom nije postavljena dijagnoza GSE^{150,187}, moguće je da postoji udruženost pojave ROU kod pacijenata sa glutenskom senzitivnošću bez celijačne enteropatije.

Obzirom na širok dijapazon simptoma i otežanog dijagnostičkog postupka poremećaja izazvanih glutenom, dodatna istraživanja su neophodna, koja bi obuhvatila ispitivanje nativnih, ali i novih deamidovanih anti-glijadinskih antitela kod pacijenata sa glutenskom senzitivnošću.

Hipersenzitivnost na proteine kravljeg mleka je prvi put dovedena u vezu sa pojavom ROU kod pacijenata sa oboljenjima gastrointestinalnog trakta, 1964. godine u studiji Taylor i sar.⁵⁰. Potom su Thomas i sar.⁵¹ ispitivali antitela na proteine kravljeg mleka kod pacijenata sa minor aftama i drugim akutnim i hroničnim ulcerativnim lezijama usta, a povišeni titar antitela na proteine hrane su objašnjavali povećanom permeabilnošću sluzokože. Prema zastupljenosti različitih klasa Ig anti-CMP antitela, hipersenzitivnost na proteine kravljeg mleka se deli na IgE-posredovane, non-IgE i kombinovane^{221,222}.

Studija Besu i sar.⁵² je po prvi put ispitivana imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka kod pacijenata sa rekurentnim aftoznim ulceracijama (RAU) nepoznate etiologije, kod kojih su isključeni svi ostali etiološki faktori koji bi mogli dovesti do nastanka ulceracija. Autori navode da proteini kravljeg mleka, mogu biti uzročnici RAU nepoznate etiologije, jer je njihova studija pokazala udruženost pojave RAU sa povišenim titrom antitela na proteine kravljeg mleka.

U našoj studiji, IgE anti-CMP je imalo najvišu prevalencu, čak 58.3% među pacijentima sa ROU, naspram 4.6% kod zdravih kontrola, što je od visoke statističke značajnosti. Od non-IgE anti-CMP antitela, među našim pacijentima sa ROU, klasa IgA je bila zastupljena kod 45.2%, a IgG kod 49.3% i oba nalaza su imala statističku značajnost u odnosu na zdrave kontrole.

Već pomenuta studija Besu i sar.⁵² je kod nekoliko pacijenata pratila vrednosti koncentracija Ig klasa anti-CMP antitela tokom perioda dijetetskog režima bez proteina kravljeg mleka. Oni su ustanovili pad anti-CMP antitela i remisiju RAU tokom pridržavanja dijeta, kao i ponovni porast ovih seroloških markera pri ponovnom unosu proizvoda kravljeg mleka.

U nastanku hipersenzitivnosti na kravlje mleko, takođe se pominje značaj funkcionalnosti epitelne barijere i gubitka imunske tolerancije za ove antigene, kod genetski podložnih individual^{223,224}. U tom smislu, za generisanje patološkog imunskog odgovora, neophodno je saučestvovanje i aktivacija određenih ćelija u mukozni, kao što su mastociti, CD16+, CD89+ ćelije, za koje se vezuju Ig i koje potom proizvode različite zapaljenske i druge ćelijske medijatore²²⁵.

Drugi značajan faktor u nastanku hipersenzitivnosti na proteine kravljeg mleka je način ishrane, naročito u prvim danima i nedeljama života. Kroz kliničke studije je dokazano da ishrana novorođenčadi humanim mlekom smanjuje rizik za pojavu alergija i hipersenzitivnosti na hranu, kao i druge atopijske manifestacije²²⁶. Pored toga, McCullough i sar.²²⁷ su pokazali ređu pojavu ROU kod onih koji su hranjeni majčinim mlekom. Ishrana humanim mlekom u prvim danima života takođe ima veliki značaj u formiranju crevne flore²²⁸. Uz to, sami komensalni mikrobi koji adheriraju na mukoze intereaguju sa ćelijama mukoznog imuniteta i održavaju imunski odgovor domaćina u homeostazi. Stoga se i nastanak hipersenzitivnosti na hranu dovodi u vezu sa poremećenim mikrobnim sastavom mukozna²²⁹. Neophodna su detaljnija istraživanja vezano za prodor proteina kravljeg mleka kroz epitelnu barijeru, u odnosu na aktivnost mukoznog imuniteta i efekata mikrobiote, kako bi se bolje razumeo patofiziološki mehanizam kod ovih pacijenata.

Na osnovu rezultata naše, a i drugih studija, ispitivanje humoralnog imuniteta na proteine kravljeg mleka kod pacijenata sa ROU je opravdano u cilju otkrivanja potencijalnog predisponirajućeg faktora, a time efikasne prevencije i lečenja ROU.

Na osnovu dosadašnjih saznanja, jasno je da mukozni imunitet oralne i crevne mukoze ima značajnu ulogu u održavanju balansiranog imunskog odgovora, naročito u stvaranju i održavanju oralne tolerancije, kao veoma važnog mehanizma sveukupne imunske tolerancije. Oralna mukoza predstavlja prvu barijeru digestivnog sistema, i samim tim, disfunkcija epitelne barijere može dovesti do poremećaja mukoznog imuniteta i gubitka humoralne tolerancije na strane i sopstvene antigene. Nalaz specifičnih markera humoralnog imuniteta kod ROU ukazuje na imunski-posredovanu patogenezu ovog oboljenja, međutim sama patogenetska uloga i klinički značaj različitih antitela u serumu pacijenata sa ROU još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Prospektivna studija koja bi obuhvatila veću grupu pacijenata sa ROU, uz laboratorijsko i kliničko praćenje je neophodna, kako bi se bolje razumeo poremećaj mukoznog imuniteta, epitelne barijere i udruženost sa drugim inflamatornim oboljenjima.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu kompletne analize dobijenih podataka, a prema postavljenim ciljevima istraživanja, došli smo do sledećih zaključaka:

1. Prevalenca i koncentracija visoko specifičnih seroloških markera celijakije:

- GSE-specifični serološki markeri (antitela protiv tkivne transglutaminaze, deaminiranog glijadina i fuzionih glijadinskih analoga) nisu značajno češće prisutni kod pacijenata sa ROU u odnosu na zdrave kontrole.
- Srednje vrednosti koncentracija anti-tTG IgA i IgG, kao i anti-GAF-3X IgA su značajno više kod pacijenata sa ROU u odnosu na zdrave kontrole. ($p < 0.005$).
- Vrednosti koncentracija IgA anti-GAF-3X i IgA anti-tTG antitela su imale značajno visoku pozitivnu korelaciju ($p < 0.005$). Nasuprot tome, koncentracija IgA anti DGP nije korelirala sa IgA anti-tTG i IgA GAF-3X antitelima.

2. Prevalenca i koncentracija antitela koja se najčešće sreću u IBC:

- ASCA IgG su utvrđena kod značajno većeg broja pacijenata sa ROU u odnosu na zdrave kontrole (25% vs 0%, $p < 0.005$). Takođe, srednja vrednost koncentracije IgG ASCA je bila značajno viša kod pacijenata sa ROU u odnosu na zdrave kontrole ($p < 0.005$). Prevalenca i koncentracija ASCA IgA kod pacijenata sa ROU nisu se razlikovale u odnosu na kontrolnu grupu.
- Učestalost pojave ANCA nije bila viša u eksperimentalnoj u odnosu na kontrolnu grupu.

3. Imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka i glijadin:

- Nativna anti-glijadinska antitela klase IgG su bila značajno češće prisutna kod pacijenata sa ROU u odnosu na kontrolnu grupu (19.2% vs 2.2%, $p < 0.0001$), dok za anti-glijadinska antitela klasa IgA, IgE i IgM nije utvrđena značajna razlika.

- Pacijenti sa ROU su imali značajno češći nalaz antitela specifičnih za proteine kravljeg mleka u odnosu na zdrave individue: klase IgA (45.2% vs 7.6%), IgG (49.3% vs 5.7%) i IgE (58.3% vs 4.6%), ($p < 0.0001$). Prevalenca IgM antitela na proteine kravljeg mleka nije bila značajno visa kod studijske u odnosu na kontrolnu grupu.

4. Međusobna povezanost između produkcije prirodnih antitela na proteine hrane i produkcije autoantitela koja se sreću u inflamatornim bolestima creva i celijakiji:

- Nije uočeno postojanje značajne linearne povezanosti ni jedne od ispitivanih klasa antitela specifičnih za ukupne proteine kravljeg mleka i GSE-specifičnih antitela.
- Kod pacijenata sa ROU je postojala značajna pozitivna korelacija između IgG anti-glijadinskih antitela i IgG anti-DGP antitela (koeficijent korelacije $\rho = 0.4585$), kao i blaga pozitivna korelacija između IgA anti-glijadinskih antitela i IgA anti-DGP antitela (koeficijent korelacije $\rho = 0.3257$). Uočena je i umerena pozitivna korelacija između IgA anti-glijadinskih antitela i IgA anti-tTG (koeficijent korelacije $\rho = 0.4027$).

Poremećaj funkcije oralne mukoze i izloženost različitim antigenima može da bude razlog gubitka imunske tolerancije i povišene produkcije autoantitela. Čini se da su antitela pre markeri izmenjenog imunskog odgovora nego primarni etiološki faktor u nastanku ROU. Kod teških kliničkih formi ROU, refrakternih na standardnu terapiju, indikovano je uputiti pacijenta na dalja ispitivanja u smislu seroloških markera GSE i IBC, kao i preosetljivosti na proteine hrane, pre svega na mleko i glijadin.

REFERENCE

1. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik J M. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001.
2. Slebioda Z, Szponar E, Kowalska A. Etiopathogenesis of recurrent aphthous stomatitis and the role of immunologic aspects: literature review. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014 Jun;62(3):205-15.
3. Natah SS, Konttinen YT, Enattah NS, Ashammakhi N, Sharkey KA, Häyrynen-Immonen R. Recurrent aphthous ulcers today: a review of the growing knowledge. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Apr;33(3):221-34.
4. Scully C. Oral and maxillofacial medicine: the basis of diagnosis and treatment. 3rd edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003. pp. 226–234.
5. Preeti L, Magesh K, Rajkumar K, Karthik R. Recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2011 Sep;15(3):252-6.
6. Wray D, Graykowski EA, Notkins AL. Role of mucosal injury in initiating recurrent aphthous stomatitis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981 Dec 12;283(6306):1569-70.
7. Sun A, Chen HM, Cheng SJ, Wang YP, Chang JY, Wu YC, Chiang CP. Significant association of deficiencies of hemoglobin, iron, vitamin B12, and folic acid and high homocysteine level with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 2015 Apr;44(4):300-5.
8. Tarakji B, Gazal G, Al-Maweri SA, Azzeghaiby SN, Alaizari N. Guideline for the diagnosis and treatment of recurrent aphthous stomatitis for dental practitioners. *J Int Oral Health*. 2015 May;7(5):74-80.

-
9. Brocklehurst P, Tickle M, Glenny AM, Lewis MA, Pemberton MN, Taylor J, Walsh T, Riley P, Yates JM. Systemic interventions for recurrent aphthous stomatitis (mouth ulcers). *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Sep 12;(9):CD005411.
 10. Shohat-Zabarski R, Kalderon S, Klein T, Weinberger A. Close association of HLA-B51 in persons with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992 Oct;74(4):455-8.
 11. Bazrafshani MR, Hajeer AH, Ollier WE, Thornhill MH. Recurrent aphthous stomatitis and gene polymorphisms for the inflammatory markers TNF-alpha, TNF-beta and the vitamin D receptor: no association detected. *Oral Dis.* 2002 Nov;8(6):303-7.
 12. Buño IJ, Huff JC, Weston WL, Cook DT, Brice SL. Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, interleukins 2, 4, and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol.* 1998 Jul;134(7):827-31.
 13. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Oral & maxillofacial pathology.* 3rd edition. Philadelphia: W.B. Saunders. 2008. pp. 331–336.
 14. Wray D, Ferguson MM, Mason DK, Hutcheon AW, Dagg JH. Recurrent aphthae: treatment with vitamin B12, folic acid, and iron. *Br Med J.* 1975 May 31;2(5969):490-3.
 15. Nolan A, McIntosh WB, Allam BF, Lamey PJ. Recurrent aphthous ulceration: vitamin B1, B2 and B6 status and response to replacement therapy. *J Oral Pathol Med.* 1991 Sep;20(8):389-91.
 16. Porter S, Flint S, Scully C, Keith O. Recurrent aphthous stomatitis: the efficacy of replacement therapy in patients with underlying hematinic deficiencies. *Ann Dent.* 1992 Winter;51(2):14-6.

-
17. Haisraeli-Shalish M, Livneh A, Katz J, Doolman R, Sela BA. Recurrent aphthous stomatitis and thiamine deficiency. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996 Dec;82(6):634-6.
18. Carrozzo M. Vitamin B12 for the treatment of recurrent aphthous stomatitis. *Evid Based Dent.* 2009;10(4):114-5.
19. Volkov I, Rudoy I, Freud T, Sardal G, Naimer S, Peleg R, Press Y. Effectiveness of vitamin B12 in treating recurrent aphthous stomatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Board Fam Med.* 2009 Jan-Feb;22(1):9-16.
20. Maheswaran T, Yamunadevi A, Ilayaraja V, Dineshshankar J, Yoithapprabhunath TR, Ganapathy N. Correlation between the menstrual cycle and the onset of recurrent aphthous stomatitis. *J Indian Acad Dent Spec Res.* 2015;2:25-6.
21. McCartan BE, Sullivan A. The association of menstrual cycle, pregnancy, and menopause with recurrent oral aphthous stomatitis: a review and critique. *Obstet Gynecol.* 1992 Sep;80(3 Pt 1):455-8.
22. Shapiro S, Olson DL, Chellemi SJ. The association between smoking and aphthous ulcers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1970 Nov;30(5):624-30.
23. Axéll T, Henricsson V. Association between recurrent aphthous ulcers and tobacco habits. *Scand J Dent Res.* 1985 Jun;93(3):239-42.
24. Marakoğlu K, Sezer RE, Toker HC, Marakoğlu I. The recurrent aphthous stomatitis frequency in the smoking cessation people. *Clin Oral Investig.* 2007 Jun;11(2):149-53.
25. Bookman R. Relief of Canker Sores on Resumption of Cigarette Smoking. *Calif Med.* 1960 Oct;93(4):235-6.

-
26. Thomas GA, Rhodes J, Green JT, Richardson C. Role of smoking in inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Postgrad Med J*. 2000 May;76(895):273-9.
27. Benowitz NL, Fitzgerald GA, Wilson M, Zhang Q. Nicotine effects on eicosanoid formation and hemostatic function: comparison of transdermal nicotine and cigarette smoking. *J Am Coll Cardiol*. 1993 Oct;22(4):1159-67.
28. Sandborn WJ, Tremaine WJ, Offord KP, Lawson GM, Petersen BT, Batts KP, Croghan IT, Dale LC, Schroeder DR, Hurt RD. Transdermal nicotine for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*. 1997 Mar 1;126(5):364-71.
29. Hooks JJ. Possibility of a viral etiology in recurrent aphthous ulcers and Behçet's syndrome. *J Oral Pathol*. 1978;7(6):353-64.
30. Sun A, Chang JG, Chu CT, Liu BY, Yuan JH, Chiang CP. Preliminary evidence for an association of Epstein-Barr virus with pre-ulcerative oral lesions in patients with recurrent aphthous ulcers or Behçet's disease. *J Oral Pathol Med*. 1998 Apr;27(4):168-75.
31. Shimoyama T, Horie N, Kato T, Kaneko T, Komiyama K. *Helicobacter pylori* in oral ulcerations. *J Oral Sci*. 2000 Dec;42(4):225-9.
32. Leimola-Virtanen R, Happonen RP, Syrjänen S. Cytomegalovirus (CMV) and *Helicobacter pylori* (HP) found in oral mucosal ulcers. *J Oral Pathol Med*. 1995 Jan;24(1):14-7.
33. Zakrzewska JM, Robinson P, Williams IG. Severe oral ulceration in patients with HIV infection: a case series. *Oral Dis*. 1997 May;3 Suppl 1:S194-6.
34. MacPhail LA, Greenspan JS. Oral ulceration in HIV infection: investigation and pathogenesis. *Oral Dis*. 1997 May;3 Suppl 1:S190-3.

-
35. Serrano-Villar S, Sainz T, Lee SA, Hunt PW, Sinclair E, Shacklett BL, Ferre AL, Hayes TL, Somsouk M, Hsue PY, Van Natta ML, Meinert CL, Lederman MM, Hatano H, Jain V, Huang Y, Hecht FM, Martin JN, McCune JM, Moreno S, Deeks SG. HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. *PLoS Pathog.* 2014 May 15;10(5):e1004078.
36. Lehner T, Lavery E, Smith R, van der Zee R, Mizushima Y, Shinnick T. Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies in Behçet's syndrome. *Infect Immun.* 1991 Apr;59(4):1434-41.
37. Greenspan JS, Gadol N, Olson JA, Hoover CI, Jacobsen PL, Shillitoe EJ, Armitage GC. Lymphocyte function in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol.* 1985 Sep;14(8):592-602.
38. Hasan A, Shinnick T, Mizushima Y, van der Zee R, Lehner T. Defining a T-cell epitope within HSP 65 in recurrent aphthous stomatitis. *Clin Exp Immunol.* 2002 May;128(2):318-25.
39. Birek C, Grandhi R, McNeill K, Singer D, Ficarra G, Bowden G. Detection of *Helicobacter pylori* in oral aphthous ulcers. *J Oral Pathol Med.* 1999 May;28(5):197-203.
40. Taş DA, Yakar T, Sakalli H, Serin E. Impact of *Helicobacter pylori* on the clinical course of recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 2013 Jan;42(1):89-94.
41. Fritscher AM, Cherubini K, Chies J, Dias AC. Association between *Helicobacter pylori* and recurrent aphthous stomatitis in children and adolescents. *J Oral Pathol Med.* 2004 Mar;33(3):129-32.

-
42. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 1977;31:107-33.
43. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet.* 2003 Feb 8;361(9356):512-9.
44. Brestoff JR, Artis D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol.* 2013 Jul;14(7):676-84.
45. Bankvall M, Sjöberg F, Gale G, Wold A, Jontell M, Östman S. The oral microbiota of patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Microbiol.* 2014 Oct 29;6:25739.
46. Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol.* 2015 Jan;37(1):47-55.
47. Cenit MC, Olivares M, Codoñer-Franch P, Sanz Y. Intestinal Microbiota and Celiac Disease: Cause, Consequence or Co-Evolution? *Nutrients.* 2015 Aug 17;7(8):6900-23.
48. Nolan A, Lamey PJ, Milligan KA, Forsyth A. Recurrent aphthous ulceration and food sensitivity. *J Oral Pathol Med.* 1991 Nov;20(10):473-5.
49. Wright A, Ryan FP, Willingham SE, Holt S, Page AC, Hindle MO, Franklin CD. Food allergy or intolerance in severe recurrent aphthous ulceration of the mouth. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1986 May 10;292(6530):1237-8.
50. Taylor KB, Truelove SC, Wright R. Serologic reactions to gluten and cow's milk proteins in gastrointestinal disease. *Gastroenterology.* 1964 Feb;46:99-108.
51. Thomas HC, Ferguson A, McLennan JG, Mason DK. Food antibodies in oral disease: a study of serum antibodies to food proteins in aphthous ulceration and other oral diseases. *J Clin Pathol.* 1973 May;26(5):371-4.

-
52. Besu I, Jankovic L, Magdu IU, Konic-Ristic A, Raskovic S, Juranic Z. Humoral immunity to cow's milk proteins and gliadin within the etiology of recurrent aphthous ulcers? *Oral Dis.* 2009 Nov;15(8):560-4.
53. Herlofson BB, Barkvoll P. Sodium lauryl sulfate and recurrent aphthous ulcers. A preliminary study. *Acta Odontol Scand.* 1994 Oct;52(5):257-9.
54. Lewkowicz N, Lewkowicz P, Banasik M, Kurnatowska A, Tchórzewski H. Predominance of Type 1 cytokines and decreased number of CD4(+)CD25(+high) T regulatory cells in peripheral blood of patients with recurrent aphthous ulcerations. *Immunol Lett.* 2005 Jun 15;99(1):57-62.
55. Scully C, Porter S. Oral mucosal disease: recurrent aphthous stomatitis. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Apr;46(3):198-206.
56. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 2012 May;5(3):232-9.
57. Presland RB, Jurevic RJ. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J Dent Educ.* 2002 Apr;66(4):564-74.
58. Yu LC. Intestinal epithelial barrier dysfunction in food hypersensitivity. *J Allergy (Cairo).* 2012;2012:596081. doi: 10.1155/2012/596081.
59. Jump RL, Levine AD. Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2004 Jul;10(4):462-78.
60. Murphy, Kenneth. *Janeway's Immunobiology: 8th edition.* Chapter 15: Garland Science. 2012. pp. 611–668.

-
61. Savage NW, Seymour GJ, Kruger BJ. T-lymphocyte subset changes in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985 Aug;60(2):175-81.
62. Savage NW, Mahanonda R, Seymour GJ, Bryson GJ, Collins RJ. The proportion of suppressor-inducer T-lymphocytes is reduced in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol.* 1988 Jul;17(6):293-7.
63. Freysdottir J, Lau S, Fortune F. Gammadelta T cells in Behçet's disease (BD) and recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Clin Exp Immunol.* 1999 Dec;118(3):451-7.
64. Natah SS, Häyrynen-Immonen R, Hietanen J, Patinen P, Malmström M, Savilahti E, Konttinen YT. Increased density of lymphocytes bearing gamma/delta T-cell receptors in recurrent aphthous ulceration (RAU). *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2000 Oct;29(5):375-80.
65. Borra RC, Andrade PM, Silva ID, Morgun A, Weckx LL, Smirnova AS, Franco M. The Th1 /Th2 immune-type response of the recurrent aphthous ulceration analyzed by cDNA microarray. *J Oral Pathol Med.* 2004 Mar;33(3):140-6.
66. Lewkowicz N, Kur B, Kurnatowska A, Tchorzewski H, Lewkowicz P. Expression of Th1/Th2/Th3/Th17-related genes in recurrent aphthous ulcers. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2011 Oct;59(5):399-406.
67. Seligman PA, Kovar J, Gelfand EW. Lymphocyte proliferation is controlled by both iron availability and regulation of iron uptake pathways. *Pathobiology.* 1992;60(1):19-26.
68. Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV. Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Apr 28;245(3):933-8.

69. Polanska BO, Niemczuk MA, Augustyniak DA, Jankowski AD. Plasma neutrophil elastase in children with recurrent aphthous stomatitis. *Central European Journal of Immunology*. 2006;31(1/2):15.

70. Shakeri R, Zamani F, Sotoudehmanesh R, Amiri A, Mohamadnejad M, Davatchi F, Karakani AM, Malekzadeh R, Shahram F. Gluten sensitivity enteropathy in patients with recurrent aphthous stomatitis. *BMC Gastroenterol*. 2009 Jun 17;9:44.

71. Robinson NA, Porter SR. Low frequency of anti-endomysial antibodies in recurrent aphthous stomatitis. *Ann Acad Med Singapore*. 2004 Jul;33(4 Suppl):43-7.

72. Yaşar S, Yaşar B, Abut E, Aşiran Serdar Z. Clinical importance of celiac disease in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Turk J Gastroenterol*. 2012 Feb;23(1):14-8.

73. Trikudanathan G, Venkatesh PG, Navaneethan U. Diagnosis and therapeutic management of extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Drugs*. 2012 Dec 24;72(18):2333-49.

74. Baccaglioni L. Myths and evidence on the link between recurrent aphthous stomatitis and systemic diseases. *Oral Dis*. 2012 Jan 11.

75. Jurge S, Kuffer R, Scully C, Porter SR. Mucosal disease series. Number VI. Recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis*. 2006 Jan;12(1):1-21.

76. Shotts RH, Scully C, Avery CM, Porter SR. Nicorandil-induced severe oral ulceration: a newly recognized drug reaction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 Jun;87(6):706-7.

77. Healy CM, Thornhill MH. An association between recurrent oro-genital ulceration and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Oral Pathol Med*. 1995 Jan;24(1):46-8.

-
78. Keogan MT. Clinical Immunology Review Series: an approach to the patient with recurrent orogenital ulceration, including Behçet's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2009 Apr;156(1):1-11.
79. Chen Y, Fang L, Yang X. Cyclic neutropenia presenting as recurrent oral ulcers and periodontitis. *J Clin Pediatr Dent*. 2013 Spring;37(3):307-8.
80. Berlucchi M, Meini A, Plebani A, Bonvini MG, Lombardi D, Nicolai P. Update on treatment of Marshall's syndrome (PFAPA syndrome): report of five cases with review of the literature. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003 Apr;112(4):365-9.
81. Riera Matute G, Riera Alonso E. Recurrent aphthous stomatitis in Rheumatology. *Reumatol Clin*. 2011 Sep-Oct;7(5):323-8.
82. Jorizzo JL, Taylor RS, Schmalstieg FC, Solomon AR Jr, Daniels JC, Rudloff HE, Cavallo T. Complex aphthosis: a forme fruste of Behçet's syndrome? *J Am Acad Dermatol*. 1985 Jul;13(1):80-4.
83. Rogers RS 3rd. Complex aphthosis. *Adv Exp Med Biol*. 2003;528:311-6.
84. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2004 May;126(6):1518-32.
85. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KE, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013 Jan;62(1):43-52.
86. Catassi C, Kryszak D, Bhatti B, Sturgeon C, Helzlsouer K, Clipp SL, Gelfond D, Puppa E, Sferruzza A, Fasano A. Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Ann Med*. 2010 Oct;42(7):530-8.

-
87. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med.* 2003 Feb 10;163(3):286-92.
88. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, Murray L, Metzger MH, Gasparin M, Bravi E, Mäki M; Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology.. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med.* 2010 Dec;42(8):587-95.
89. Bai JC, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing M, Catassi C, Greco L, Cohen H, Ciacci C, Eliakim R, Fasano A, González A, Krabshuis JH, LeMair A; World Gastroenterology Organization. World Gastroenterology Organisation global guidelines on celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 2013 Feb;47(2):121-6.
90. Catassi C, Kryszak D, Louis-Jacques O, Duerksen DR, Hill I, Crowe SE, Brown AR, Procaccini NJ, Wonderly BA, Hartley P, Moreci J, Bennett N, Horvath K, Burk M, Fasano A. Detection of Celiac disease in primary care: a multicenter case-finding study in North America. *Am J Gastroenterol.* 2007 Jul;102(7):1454-60.
91. Catassi C, Gatti S, Fasano A. The new epidemiology of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014 Jul;59 Suppl 1:S7-9.
92. Jovanović I, Popović D, Marinković J. Celijakija od saznanja do razumevanja: knjiga bez glutena. CIBID, Medicinski fakultet Beograd, 2008.
93. Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:53-81.
94. Castellanos-Rubio A, Santin I, Irastorza I, Castaño L, Carlos Vitoria J, Ramon Bilbao J. TH17 (and TH1) signatures of intestinal biopsies of CD patients in response to gliadin. *Autoimmunity.* 2009 Jan;42(1):69-73.

-
95. Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, De Rosa M, Stefanile R, Mazzarella G, Tolone C, Russo MI, Esposito P, Ferraraccio F, Carteni M, Riegler G, de Magistris L, Fasano A. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med.* 2011 Mar 9;9:23.
96. Sestak K, Fortgang I. Celiac and Non-Celiac Forms of Gluten Sensitivity: Shifting Paradigms of an Old Disease. *Br Microbiol Res J.* 2013 Oct;3(4):585-589.
97. Tovoli F, Masi C, Guidetti E, Negrini G, Paterini P, Bolondi L. Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders. *World J Clin Cases.* 2015 Mar 16;3(3):275-84.
98. Fasano A, Catassi C. Clinical practice. Celiac disease. *N Engl J Med.* 2012 Dec 20;367(25):2419-26.
99. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis.; ESPGHAN Gastroenterology Committee.; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition.. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 Jan;54(1):136-60.
100. Holtmeier W, Caspary WF. Celiac disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2006 Mar 1;1:3.
101. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA; American College of Gastroenterology. ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2013 May;108(5):656-76; quiz 677.
102. Berger E. Allergic pathogenesis of celiac disease with studies of the splitting up of pathogenic antigens by enzymes. *Bibl Paediatr.* 1958;6(67):1-55.

-
103. Chorzelski TP, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Beutner EH, Kumar V. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;420:325-34.
104. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):797-801.
105. Calabuig M, Torregosa R, Polo P, Tuset L, Tomás C, Alvarez V, Garcia-Vila A, Brines J, Vilar P, Farré C. Serological markers and celiac disease: a new diagnostic approach? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1990 May;10(4):435-42.
106. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on Celiac Disease, June 28-30, 2004. *Gastroenterology.* 2005 Apr;128(4 Suppl 1):S1-9.
107. Prause C, Ritter M, Probst C, Daehnrich C, Schlumberger W, Komorowski L, Lieske R, Richter T, Hauer AC, Stern M, Uhlig HH, Laass MW, Zimmer KP, Mothes T. Antibodies against deamidated gliadin as new and accurate biomarkers of childhood coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009 Jul;49(1):52-8.
108. Prause C, Richter T, Koletzko S, Uhlig HH, Hauer AC, Stern M, Zimmer KP, Laass MW, Probst C, Schlumberger W, Mothes T. New developments in serodiagnosis of childhood celiac disease: assay of antibodies against deamidated gliadin. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Sep;1173:28-35.
109. Carroccio A, Cavataio F, Iacono G, Agate V, Ippolito S, Kazmierska I, Campagna P, Soresi M, Montalto G. IgA antiendomysial antibodies on the umbilical cord in diagnosing celiac disease. Sensitivity, specificity, and comparative evaluation with the traditional kit. *Scand J Gastroenterol.* 1996 Aug;31(8):759-63.
110. James MW, Scott BB. Endomysial antibody in the diagnosis and management of coeliac disease. *Postgrad Med J.* 2000 Aug;76(898):466-8.

111. Picarelli A, Maiuri L, Mazzilli MC, Coletta S, Ferrante P, Di Giovambattista F, Greco M, Torsoli A, Auricchio S. Gluten-sensitive disease with mild enteropathy. *Gastroenterology*. 1996 Sep;111(3):608-16.

112. van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Peña S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning F. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol*. 1998 Aug 15;161(4):1585-8.

113. Skovbjerg H, Koch C, Anthonsen D, Sjöström H. Deamidation and cross-linking of gliadin peptides by transglutaminases and the relation to celiac disease. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 5;1690(3):220-30.

114. Baudon JJ, Johanet C, Absalon YB, Morgant G, Cabrol S, Mougenot JF. Diagnosing celiac disease: a comparison of human tissue transglutaminase antibodies with antigliadin and antiendomysium antibodies. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2004 Jun;158(6):584-8.

115. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Jan;15(1):79-94.

116. Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem*. 2006 Feb;52(2):171-81.

117. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012 Jan;142(1):46-54.e42; quiz e30.

118. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Apr;12(4):205-17.

-
119. Ardizzone S, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med.* 2002 Dec;252(6):475-96.
120. Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L, Gal I, Papp J. Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ? *World J Gastroenterol.* 2006 Mar 28;12(12):1829-41.
121. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest.* 2004 May;113(10):1490-7.
122. Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2006 Aug 14;12(30):4807-12.
123. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev.* 2014 Jan;13(1):3-10.
124. Peña AS. Contribution of genetics to a new vision in the understanding of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2006 Aug 14;12(30):4784-7.
125. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1989;170:2-6; discussion 16-9.
126. Simpson P, Papadakis KA. Endoscopic evaluation of patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Sep;14(9):1287-97.
127. Levine JS, Burakoff R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2011 Apr;7(4):235-41.

-
128. Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007 Nov;133(5):1670-89.
129. Sendid B, Colombel JF, Jacquinet PM, Faille C, Fruit J, Cortot A, Lucidarme D, Camus D, Poulain D. Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996 Mar;3(2):219-26.
130. Seibold F, Boldt AB, Seibold-Schmid B, Schoepfer AM, Flogerzi B, Müller S, Kun JF. Association of deficiency for mannan-binding lectin with anti-mannan antibodies in Crohn's disease: a family study. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Sep;13(9):1077-82.
131. Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P. Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2001 Mar;96(3):730-4.
132. Vermeire S, Joossens S, Peeters M, Monsuur F, Marien G, Bossuyt X, Groenen P, Vlietinck R, Rutgeerts P. Comparative study of ASCA (Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody) assays in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2001 Mar;120(4):827-33.
133. Linskens RK, Mallant-Hent RC, Groothuisink ZM, Bakker-Jonges LE, van de Merwe JP, Hooijkaas H, von Blomberg BM, Meuwissen SG. Evaluation of serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease: pANCA, ASCA and agglutinating antibodies to anaerobic coccoid rods. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Sep;14(9):1013-8.
134. Walker LJ, Aldhous MC, Drummond HE, Smith BR, Nimmo ER, Arnott ID, Satsangi J. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations. *Clin Exp Immunol*. 2004 Mar;135(3):490-6.

135. Vermeire S, Peeters M, Vlietinck R, Joossens S, Den Hond E, Bulteel V, Bossuyt X, Geypens B, Rutgeerts P. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA), phenotypes of IBD, and intestinal permeability: a study in IBD families. *Inflamm Bowel Dis*. 2001 Feb;7(1):8-15.

136. Gologan S, Iacob R, Preda C, Vadan R, Cotruta B, Catuneanu AM, Iacob S, Constantinescu I, Gheorghe L, Iobagiu S, Gheorghe C, Diculescu M. Higher titers of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies IgA and IgG are associated with more aggressive phenotypes in Romanian patients with Crohn's disease. *J Gastrointest Liver Dis*. 2012 Mar;21(1):39-44.

137. Forcione DG, Rosen MJ, Kisiel JB, Sands BE. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody (ASCA) positivity is associated with increased risk for early surgery in Crohn's disease. *Gut*. 2004 Aug;53(8):1117-22.

138. Müller S, Styner M, Seibold-Schmid B, Flogerzi B, Mähler M, Konrad A, Seibold F. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody titers are stable over time in Crohn's patients and are not inducible in murine models of colitis. *World J Gastroenterol*. 2005 Nov 28;11(44):6988-94.

139 . Viitasalo L, Niemi L, Ashorn M, Ashorn S, Braun J, Huhtala H, Collin P, Mäki M, Kaukinen K, Kurppa K, Iltanen S. Early microbial markers of celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2014 Aug;48(7):620-4..

140. Krause I, Monselise Y, Milo G, Weinberger A. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies--a novel serologic marker for Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2002 Jul-Aug;20(4 Suppl 26):S21-4.

141. Hoffman IE, Demetter P, Peeters M, De Vos M, Mielants H, Veys EM, De Keyser F. Anti-saccharomyces cerevisiae IgA antibodies are raised in ankylosing spondylitis and undifferentiated spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003 May;62(5):455-9.

142. Prideaux L, De Cruz P, Ng SC, Kamm MA. Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Jul;18(7):1340-55.

143. Saibeni S, Folli C, de Franchis R, Borsi G, Vecchi M. Diagnostic role and clinical correlates of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) in Italian patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Liver Dis.* 2003 Dec;35(12):862-8.

144. Linskens RK, Mallant-Hent RC, Groothuismink ZM, Bakker-Jonges LE, van de Merwe JP, Hooijkaas H, von Blomberg BM, Meuwissen SG. Evaluation of serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease: pANCA, ASCA and agglutinating antibodies to anaerobic coccoid rods. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002 Sep;14(9):1013-8.

145. Specks U, Homburger HA. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Mayo Clin Proc.* 1994 Dec;69(12):1197-8.

146. Reumaux D, Colombel JF, Masy E, Duclos B, Heresbach D, Belaïche J, Cortot A, Duthilleul P; GETAID. Groupe d'Etude des Affections Inflammatoires du Tube Digestif.. Anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies (ANCA) in ulcerative colitis (UC): no relationship with disease activity. *Inflamm Bowel Dis.* 2000 Nov;6(4):270-4.

147. Roozendaal C, Kallenberg CG. Are anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) clinically useful in inflammatory bowel disease (IBD)? *Clin Exp Immunol.* 1999 May;116(2):206-13.

148. Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR. Association of antineutrophil cytoplasmic antibodies with resistance to treatment of left-sided ulcerative colitis: results of a pilot study. *Mayo Clin Proc.* 1996 May;71(5):431-6.

-
149. Sobajima J, Ozaki S, Okazaki T, Osakada F, Sumita S, Mori K, Nakao K. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in ulcerative colitis: anti-cathepsin G and a novel antibody correlate with a refractory type. *Clin Exp Immunol.* 1996 Jul;105(1):120-4.
150. O'Farrelly C, O'Mahony C, Graeme-Cook F, Feighery C, McCartan BE, Weir DG. Gliadin antibodies identify gluten-sensitive oral ulceration in the absence of villous atrophy. *J Oral Pathol Med.* 1991 Nov;20(10):476-8.
151. Hunter IP, Ferguson MM, Scully C, Galloway AR, Main AN, Russell RI. Effects of dietary gluten elimination in patients with recurrent minor aphthous stomatitis and no detectable gluten enteropathy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993 May;75(5):595-8.
152. Tarakji B, Baroudi K, Kharma Y. The effect of dietary habits on the development of the recurrent aphthous stomatitis. *Niger Med J.* 2012 Jan;53(1):9-11.
153. Fasano A. Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation: living life on the edge of the wall. *Am J Pathol.* 2008 Nov;173(5):1243-52.
154. Aydemir S, Tekin NS, Aktunç E, Numanoğlu G, Ustündağ Y. Celiac disease in patients having recurrent aphthous stomatitis. *Turk J Gastroenterol.* 2004 Sep;15(3):192-5.
155. Olszewska M, Sulej J, Kotowski B. Frequency and prognostic value of IgA and IgG endomysial antibodies in recurrent aphthous stomatitis. *Acta Derm Venereol.* 2006;86(4):332-4.
156. Tarakji B., Gazal G, Ali Al-Maweri S, Azzeghaiby SN and Alaizari N.) Guideline for the Diagnosis and Treatment of Recurrent Aphthous Stomatitis for Dental Practitioners. *J Int Oral Health.* 2015 May; 7(5): 74–80.)

157. Sircus W, Church R, Kelleher J. Recurrent Aphthous Ulceration Of The Mouth; A Study Of The Natural History, Aetiology, and Treatment. *Q J Med.* 1957 Apr;26(102):235-49.

158. Akintoye SO, Greenberg MS. Recurrent aphthous stomatitis. *Dent Clin North Am.* 2005 Jan;49(1):31-47, vii-viii.

159. Gürkan A, Özlü SG, Altıaylık-Özer P, Kurtul BE, Karacan CD, Şenel S. Recurrent Aphthous Stomatitis in Childhood and Adolescence: A Single-Center Experience. *Pediatr Dermatol.* 2015 Jul-Aug;32(4):476-80.)

160. Baccaglini L, Lalla RV, Bruce AJ, Sartori-Valinotti JC, Latortue MC, Carrozzo M, Rogers RS 3rd. Urban legends: recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis.* 2011 Nov;17(8):755-70.

161. Tursi A, Giorgetti G, Brandimarte G, Rubino E, Lombardi D, Gasbarrini G. Prevalence and clinical presentation of subclinical/silent celiac disease in adults: an analysis on a 12-year observation. *Hepatogastroenterology.* 2001 Mar-Apr;48(38):462-4.

162. de Freitas IN, Sipahi AM, Damião AO, de Brito T, Caçado EL, Leser PG, Laudanna AA. Celiac disease in Brazilian adults. *J Clin Gastroenterol.* 2002 Apr;34(4):430-4.

163. Cilleruelo Pascual ML, Román Riechmann E, Jiménez Jiménez J, Rivero Martín MJ, Barrio Torres J, Castaño Pascual A, Campelo Moreno O, Fernández Rincón A. [Silent celiac disease: exploring the iceberg in the school-aged population]. *An Esp Pediatr.* 2002 Oct;57(4):321-6.

164. Baccaglini L. Myths and evidence on the link between recurrent aphthous stomatitis and systemic diseases. *Oral Dis.* 2012 Jan 11.

-
165. Mino Kenudson M, Brown I, Lauwers G Y. Histopathological diagnosis of gluten sensitive enteropathy. *Curr Diagn Pathol* 2005;11274–283.283.
166. Ferguson R, Basu MK, Asquith P, Cooke WT. Jejunal mucosal abnormalities in patients with recurrent aphthous ulceration. *Br Med J*. 1976 Jan 3;1(6000):11-13.
167. Ferguson MM, Wray D, Carmichael HA, Russell RI, Lee FD. Coeliac disease associated with recurrent aphthae. *Gut*. 1980 Mar;21(3):223-6.
168. Campisi G, Di Liberto C, Carroccio A, Compilato D, Iacono G, Procaccini M, Di Fede G, Lo Muzio L, Craxi A, Catassi C, Scully C. Coeliac disease: oral ulcer prevalence, assessment of risk and association with gluten-free diet in children. *Dig Liver Dis*. 2008 Feb;40(2):104-7.
169. Rashid M, Cranney A, Zarkadas M, Graham ID, Switzer C, Case S, Molloy M, Warren RE, Burrows V, Butzner JD. Celiac disease: evaluation of the diagnosis and dietary compliance in Canadian children. *Pediatrics*. 2005 Dec;116(6):e754-9.
170. Donaldson MR, Firth SD, Wimpee H, Leiferman KM, Zone JJ, Horsley W, O'Gorman MA, Jackson WD, Neuhausen SL, Hull CM, Book LS. Correlation of duodenal histology with tissue transglutaminase and endomysial antibody levels in pediatric celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 May;5(5):567-73.
171. Vivas S, Ruiz de Morales JG, Riestra S, Arias L, Fuentes D, Alvarez N, Calleja S, Hernando M, Herrero B, Casqueiro J, Rodrigo L. Duodenal biopsy may be avoided when high transglutaminase antibody titers are present. *World J Gastroenterol*. 2009 Oct 14;15(38):4775-80.
172. Kurppa K, Lindfors K, Collin P, Saavalainen P, Partanen J, Haimila K, Huhtala H, Laurila K, Mäki M, Kaukinen K. Antibodies against deamidated gliadin peptides in early-stage celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2011 Sep;45(8):673-8.

173. Agardh D. Antibodies against synthetic deamidated gliadin peptides and tissue transglutaminase for the identification of childhood celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Nov;5(11):1276-81.

174. de Chaisemartin L, Meatchi T, Malamut G, Fernani-Oukil F, Hosking F, Rault D, Bellery F, Cellier C, Dragon-Durey MA. Application of Deamidated Gliadin Antibodies in the Follow-Up of Treated Celiac Disease. *PLoS One*. 2015 Aug 31;10(8):e0136745.

175. Lutteri L, Sagot C, Chapelle JP. [Anti-deamidated gliadin peptides antibodies and coeliac disease: state of art and analysis of false-positive results from five assays]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2010 Mar-Apr;68(2):149-56.

176. Tonutti E, Visentini D, Picierno A, Bizzaro N, Villalta D, Tozzoli R, Kodermaz G, Carroccio A, Iacono G, Teresi S, La Chiusa SM, Brusca I. Diagnostic efficacy of the ELISA test for the detection of deamidated anti-gliadin peptide antibodies in the diagnosis and monitoring of celiac disease. *J Clin Lab Anal*. 2009;23(3):165-71.

177. Rhee SH, Kim YB, Lee ES. Comparison of Behcet's disease and recurrent aphthous ulcer according to characteristics of gastrointestinal symptoms. *J Korean Med Sci*. 2005 Dec;20(6):971-6.

178. Villalta D, Tonutti E, Prause C, Koletzko S, Uhlig HH, Vermeersch P, Bossuyt X, Stern M, Laass MW, Ellis JH, Ciclitira PJ, Richter T, Daehnrich C, Schlumberger W, Mothes T. IgG antibodies against deamidated gliadin peptides for diagnosis of celiac disease in patients with IgA deficiency. *Clin Chem*. 2010 Mar;56(3):464-8.

179. Lu W, Gwee KA, Siah KT, Kang JY, Lee R, Ngan CC. Prevalence of Anti-deamidated Gliadin Peptide Antibodies in Asian Patients With Irritable Bowel Syndrome. *J Neurogastroenterol Motil*. 2014 Apr 30;20(2):236-41.

180. Rauhavirta T, Lindfors K, Koskinen O, Laurila K, Kurppa K, Saavalainen P, Mäki M, Collin P, Kaukinen K. Impaired epithelial integrity in the duodenal mucosa in early stages of celiac disease. *Transl Res.* 2014 Sep;164(3):223-31.

181. Rauhavirta T, Qiao SW, Jiang Z, Myrsky E, Loponen J, Korponay-Szabó IR, Salovaara H, Garcia-Horsman JA, Venäläinen J, Männistö PT, Collighan R, Mongeot A, Griffin M, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Epithelial transport and deamidation of gliadin peptides: a role for coeliac disease patient immunoglobulin A. *Clin Exp Immunol.* 2011 Apr;164(1):127-36.

182. Korponay-Szabó IR, Vecsei Z, Király R, Dahlbom I, Chirido F, Nemes E, Fésüs L, Mäki M. Deamidated gliadin peptides form epitopes that transglutaminase antibodies recognize. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Mar;46(3):253-61.

183. Rauhavirta T, Oittinen M, Kivistö R, Männistö PT, Garcia-Horsman JA, Wang Z, Griffin M, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Are transglutaminase 2 inhibitors able to reduce gliadin-induced toxicity related to celiac disease? A proof-of-concept study. *J Clin Immunol.* 2013 Jan;33(1):134-42.

184. Smecuol E, Sugai E, Niveloni S, Vázquez H, Pedreira S, Mazure R, Moreno ML, Label M, Mauriño E, Fasano A, Meddings J, Bai JC. Permeability, zonulin production, and enteropathy in dermatitis herpetiformis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005 Apr;3(4):335-41.

185. Admou B, Essaadouni L, Krati K, Zaher K, Sbihi M, Chabaa L, Belaabidia B, Alaoui-Yazidi A. Atypical celiac disease: from recognizing to managing. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:637187.

186. Tyldesley WR. Recurrent oral ulceration and coeliac disease. A review. *Br Dent J.* 1981 Aug 4;151(3):81-3.

-
187. Wray D. Gluten-sensitive recurrent aphthous stomatitis. *Dig Dis Sci.* 1981 Aug;26(8):737-40.
188. Gillett PM, Gillett HR, Israel DM, Metzger DL, Stewart L, Chanoine JP, Freeman HJ. High prevalence of celiac disease in patients with type 1 diabetes detected by antibodies to endomysium and tissue transglutaminase. *Can J Gastroenterol.* 2001 May;15(5):297-301.
189. Holmes GK. Screening for coeliac disease in type 1 diabetes. *Arch Dis Child.* 2002 Dec;87(6):495-8.
190. Yüksel I, Başar O, Ataseven H, Ertuğrul I, Arhan M, Ibiş M, Dağlı U, Demirel BT, Ulker A, Seçilmiş S, Saşmaz N. Mucocutaneous manifestations in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 Apr;15(4):546-50.
191. Pittock S, Drumm B, Fleming P, McDermott M, Imrie C, Flint S, Bourke B. The oral cavity in Crohn's disease. *J Pediatr.* 2001 May;138(5):767-71.
192. Rutgeerts PJ. From aphthous ulcer to full-blown Crohn's disease. *Dig Dis.* 2011;29(2):211-4.
193. Lourenço SV, Hussein TP, Bologna SB, Sipahi AM, Nico MM. Oral manifestations of inflammatory bowel disease: a review based on the observation of six cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010 Feb;24(2):204-7.
194. Krause I, Milo G: Anti-Saccharomyces Cerevisiae antibodies and autoimmune diseases. In: Shoenfeld Y, Rose NR (Eds.) *Infection and Autoimmunity*: Elsevier; 2004: 467-70.
195. Giaffer MH, Clark A, Holdsworth CD. Antibodies to Saccharomyces cerevisiae in patients with Crohn's disease and their possible pathogenic importance. *Gut.* 1992 Aug;33(8):1071-5.

-
196. Monselise A, Weinberger A, Monselise Y, Fraser A, Sulkes J, Krause I. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in Behçet's disease--a familial study. *Clin Exp Rheumatol*. 2006 Sep-Oct;24(5 Suppl 42):S87-90. Erratum in: *Clin Exp Rheumatol*. 2007 May-Jun;25(3):507-8.
197. Lewkowicz N, Lewkowicz P, Dzitko K, Kur B, Tarkowski M, Kurnatowska A, Tchórzewski H. Dysfunction of CD4+CD25high T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 2008 Sep;37(8):454-61.
198. Longman RS, Yang Y, Diehl GE, Kim SV, Littman DR. Microbiota: host interactions in mucosal homeostasis and systemic autoimmunity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2013;78:193-201.
199. Hijazi K, Lowe T, Meharg C, Berry SH, Foley J, Hold GL. Mucosal microbiome in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Dent Res*. 2015 Mar;94(3 Suppl):87S-94S.
200. Seoudi N, Bergmeier LA, Drobniowski F, Paster B, Fortune F. The oral mucosal and salivary microbial community of Behçet's syndrome and recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Microbiol*. 2015 Jun 1;7:27150.
201. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004 Jan;53(1):1-4.
202. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonopoulou J, Gorgoulis VG. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol*. 2005 Feb 7;11(5):681-5.
203. Basso D, Zamboni CF, Plebani M. Inflammatory bowel diseases: from pathogenesis to laboratory testing. *Clin Chem Lab Med*. 2014 Apr;52(4):471-81.

-
204. Fasano A. Leaky gut and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012 Feb;42(1):71-8.
205. Conrad K, Schmechta H, Klafki A, Lobeck G, Uhlig HH, Gerdi S, Henker J. Serological differentiation of inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Feb;14(2):129-35.
206. Frehn L, Jansen A, Bennek E, Mandic AD, Temizel I, Tischendorf S, Verdier J, Tacke F, Streetz K, Trautwein C, Sellge G. Distinct patterns of IgG and IgA against food and microbial antigens in serum and feces of patients with inflammatory bowel diseases. *PLoS One*. 2014 Sep 12;9(9):e106750.
207. Yurdakul S, Tüzüner N, Yurdakul I, Hamuryudan V, Yazici H. Gastrointestinal involvement in Behçet's syndrome: a controlled study. *Ann Rheum Dis*. 1996 Mar;55(3):208-10.
208. Teml A, Kratzer V, Schneider B, Lochs H, Norman GL, Gangl A, Vogelsang H, Reinisch W. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies: a stable marker for Crohn's disease during steroid and 5-aminosalicylic acid treatment. *Am J Gastroenterol*. 2003 Oct;98(10):2226-31.
209. Hauschild S, Schmitt WH, Csernok E, Flesch BK, Rautmann A, Gross WL. ANCA in systemic vasculitides, collagen vascular diseases, rheumatic disorders and inflammatory bowel diseases. *Adv Exp Med Biol*. 1993;336:245-51.
210. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Lüdemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. *Kidney Int*. 1998 Mar;53(3):743-53.

-
211. Vidrich A, Lee J, James E, Cobb L, Targan S. Segregation of pANCA antigenic recognition by DNase treatment of neutrophils: ulcerative colitis, type 1 autoimmune hepatitis, and primary sclerosing cholangitis. *J Clin Immunol*. 1995 Nov;15(6):293-9.
212. Duzgun N, Sahin M, Ayaslioglu E. Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody in Behçet's Disease. *Int J Biomed Sci*. 2006 Feb;2(1):49-52.
213. Kobayashi O. Clinical role of autoantibody against bactericidal/permeability-increasing protein in chronic airway infection. *J. Infect Chemother*. 1998;4:83–93.
214. Seibold F, Brandwein S, Simpson S, Terhorst C, Elson CO. pANCA represents a cross-reactivity to enteric bacterial antigens. *J Clin Immunol*. 1998 Mar;18(2):153-60.
215. Landers CJ, Cohavy O, Misra R, Yang H, Lin YC, Braun J, Targan SR. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology*. 2002 Sep;123(3):689-99.
216. Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, Tsang J, Balish EJ, Braun J, Huycke MM, Sartor RB. Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology*. 2005 Apr;128(4):891-906.
217. Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol*. 2015 Jan;37(1):47-55.
218. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*. 2012 Feb 7;10:13.
219. Czaja-Bulsa G. Non coeliac gluten sensitivity - A new disease with gluten intolerance. *Clin Nutr*. 2015 Apr;34(2):189-94.

220. Volta U, Tovoli F, Cicola R, Parisi C, Fabbri A, Piscaglia M, Fiorini E, Caio G. Serological tests in gluten sensitivity (nonceliac gluten intolerance). *J Clin Gastroenterol*. 2012 Sep;46(8):680-5.

221. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 May;113(5):832-6.

222. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 May;113(5):832-6.

223. Yu LC. Intestinal epithelial barrier dysfunction in food hypersensitivity. *J Allergy (Cairo)*. 2012;2012:596081.

224. Vitaliti G, Cimino C, Coco A, Praticò AD, Lionetti E. The immunopathogenesis of cow's milk protein allergy (CMPA). *Ital J Pediatr*. 2012 Jul 23;38:35.

225. Rašković S, Matić IZ, Dordić M, Damjanović A, Kolundžija B, Grozdanić-Stanisavljević N, Besu I, Jovičić Z, Bijelić B, Janković L, Juranić Z. Immunoreactivity to food antigens in patients with chronic urticaria. *Immunol Invest*. 2014;43(5):504-16.

226. van Odijk J, Kull I, Borres MP, Brandtzaeg P, Edberg U, Hanson LA, Høst A, Kuitunen M, Olsen SF, Skerfving S, Sundell J, Wille S. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy*. 2003 Sep;58(9):833-43.

227. McCullough MJ, Abdel-Hafeth S, Scully C. Recurrent aphthous stomatitis revisited; clinical features, associations, and new association with infant feeding practices? *J Oral Pathol Med.* 2007 Nov;36(10):615-20.

228. Guaraldi F, Salvatori G. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Oct 16;2:94.

229. Rook GA, Brunet LR. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut.* 2005 Mar;54(3):317-20.

BIOGRAFIJA

Borivoj Bijelić je rođen 24.06.1984. u Karlovcu. Osnovno i srednje obrazovanje je stekao u Čačku, kao nosilac Vukove diplome i pobednik Republičke smotre mladih talenata iz oblasti Biologije u Kladovu 2003. godine. Školske 2003/2004. upisao je Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, a diplomirao je 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,55. Stručni ispit za doktora stomatologije položio je 2010. godine. Od 2008. do 2011. godine bio je stipendista Republičkog fonda za mlade talente, a od 2011. do 2013. stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Školske 2009/2010. je upisao Doktorske akademske studije na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu gde je 2014. godine prijavio doktorsku disertaciju pod nazivom „Specifičnosti humoralne imunosti kod obolelih od rekurentnih oralnih ulceracija“ kod mentora prof. dr Ljiljane Janković.

Od 2014. godine zaposlen kao saradnik u nastavi na Fakultetu medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Parodontologija. U istoj ustanovi, 2016. godine, izabran je u zvanje istraživača pripravnika za užu naučnu oblast Oralna hirurgija. Trenutno angažovan na projektu ministarstva nauke br. 175-011 pod nazivom „Modifikatori biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima“.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Borivoj Bijelić

broj indeksa 4007/2009

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

SPECIFIČNOSTI HUMORALNE IMUNOSTI KOD OBOLELIH OD REKURENTNIH ORALNIH ULCERACIJA

- 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 autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, _____

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Borivoj Bijelić

Broj indeksa: 4007/2009

Studijski program: Doktorske akademske studije

Naslov rada: Specifičnosti humoralne imunosti kod obolelih od rekurentnih oralnih
ulceracija

Mentor: Prof. dr Ljiljana Janković

Potpisani: Borivoj Bijelić

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

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

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, _____

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: **Specifičnosti humoralne imunosti kod obolelih od rekurentnih oralnih ulceracija** 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 doktoranta

U Beogradu, _____
