

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Biljana B. Stanković

**MOLEKULARNI MARKERI HRONIČNE
INFLAMACIJE I APOPTOZE KOD
INFLAMATORNIH BOLESTI CREVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Biljana B. Stanković

**MOLECULAR MARKERS OF CHRONIC
INFLAMMATION AND APOPTOSIS IN
INFLAMMATORY BOWEL DISEASES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentori:

dr Gordana Nikčević, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

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

Komisija:

dr Gordana Nikčević, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

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

dr Goran Brajušković, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____ 2015. godine

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se dr Sonji Pavlović koja mi je pružila mogućnost da uđem u svet nauke. Hvala na savetima, podršci, a posebno na beskrajnoj motivaciji i energiji koja je izradu ove doktorske teze uvek gurala napred.

Zahvaljujem se dr Gordani Nikčević koja me je vodila kroz ceo put koji je definisao ovu doktorsku tezu. Hvala na posvećenom vremenu, strpljenju i pomoći, kao i na ukazanom poverenju za slobodu u radu.

Zahvaljujem se profesoru dr Goranu Brajuškoviću na izdvojenom vremenu, sugestijama i kritičkom čitanju teze.

Hvala timu Odeljenja za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog centra Srbija, naročito profesoru dr Tomici Milosavljeviću, profesoru dr Draganu Popoviću i Sanji Dragašević na saradnji u ostvarivanju ovog projekta.

Hvala profesoru dr Nedeljku Radloviću i njegovom timu što je tezu obogatio jednom novom problematikom, i omogućio da ova tema dobije novu dimenziju.

Hvala svim mojim kolegama Laboratorije za molekularnu biomedicinu Branki, Maji, Dori, Mileni, Nataši, Vesni i Tanji na korisnim savetima, druženju i razgovorima pruženim od prvog dana stvaranja ove teze, do njenog finalnog slova. Hvala Jeleni, Aniti, Miši, Marini, Jovani, Ani, Dariji i Ljubici na pomoći i veseloj atmosferi koje su donele u naš veliki kolektiv. Hvala svim kolegama iz drugih laboratorija koji su uvek bili tu da podele svoje iskustvo kada je trebalo. Posebno hvala mojim omiljenim saradnicima, Nikoli, Kris, Sanji i Ireni na neizmernoj podršci i timskom radu.

Veliko hvala Željki, Mariji, Joci, Sonji, Ljilji, Marini, Nađi, Mladenu, Peđi, Vuku, Slavketu, Danilu, Nenadu, Duletu, Kumu, Jovani, Vladi, Grubačima, Lazi, Gruji, Saji, Cveletu, Lusi, Bobi, Sani, Ani, Stoletu, Mateji, Jelačiću, Vukašinu, Vanji, Tomici, Mrkiju, Jasmini i Neveni, na svemu što smo zajedno prošli i što nas je dovelo ovde gde smo sada.

Hvala Tomi, mami, tati i Danki.

Ovu tezu posvećujem svim mojim bliskim ljudima, bakama i deki.

Molekularni markeri hronične inflamacije i apoptoze kod inflamatornih bolesti creva

REZIME

Hronične inflamatorne bolesti creva (HIBC) predstavljaju rastući globalni zdravstveni problem, posebno u belim populacijama, uključujući i srpsku populaciju. Ova studija obuhvatila je dva tipa HIBC - inflamatornu bolest creva (IBC), koju čine Kronova bolest (KB) i ulcerozni kolitis (UK); i celijačnu bolest (CB). HIBC su kompleksne bolesti u čijoj, još uvek potpuno nerazjašnjenj etilogiji učestvuju genetički, sredinski i imunološki faktori.

Razvoj IBC je rezultat poremećenog imunološkog odgovora na crevnu mikrofloru kod genetički podložnih osoba. Ustanovljen je veliki broj asocijacija između IBC i varijanti u genima čiji proteinski produkti učestvuju u nespecifičnom imunskom odgovoru. Oštećenje intestinalne mukoze kod pacijenata sa IBC dešava se kao posledica deregulacije inflamatornih i apoptotskih procesa koji utiču na dugovečnost T ćelija i integritet epitelijalne barijere. Protein NF- κ B je jedan od ključnih regulatora transkripcije gena eksprimiranih tokom ovih patogenetskih promena. U mukozi pacijenata sa KB dolazi do formiranja granuloma, limfoidnih mikrostruktura karakterističnih i za druge inflamatorne bolesti, među kojima je reumatoidni artritis (RA). Zbog toga su KB i RA klasifikovane kao granulomatozne bolesti. U poređenju sa brojnim, još uvek nedovoljno definisanim genetičkim faktorima rizika za razvoj IBC, nasledna komponenta u razvoju CB je dobro okarakterisana i najviše je povezana sa specifičnim varijantama gena *HLA-DQ*.

Jedan od ciljeva ove studije je bio da ispita asocijaciju između HIBC i određenih genetičkih varijanti. Tačnije, analizirana je povezanost IBC sa varijantama u genima *NOD2*, *TLR4*, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* i *IL-1RN*, i ispitan je njihov prediktivni značaj za pojavu IBC. Varijanta u genu *IL-6* ispitana je kao faktor rizika za nastanak dve granulomatozne bolesti, KB i RA. Takođe, analizirana je distribucija genotipova *HLA-DQ* u grupi pedijatrijskih pacijenata obolelih od CB i procenjen je rizik za pojavu CB koju ovi genotipovi nose. Sledeći cilj je bila analiza nivoa transkripcije proinflamatornih gena *IL-6* i *TNF- α* , i apoptotskih gena *Bcl-2*, *Bax*, *Fas* i *FasL* u intestinalnoj mukozi i perifernoj krvi pacijenata obolelih od KB, kako bi se definisali ekspresioni profili gena uključenih u patogenezu KB i ispitaio njihov

dijagnostički potencijal. Poslednji cilj u okviru istraživanja vezanog za IBC odnosio se na analizu DNK vezujuće aktivnosti NF-κB iz jedarnih ekstrakata intestinalne mukoze pacijenata obolelih od KB.

U studiju je bilo uključeno 167 ispitanika obolelih od IBC, 73 obolelih od CB, 77 obolelih od RA i 101 kontrolni zdrav ispitanik. Genetičke varijante u svim gorepomenutim genima određene su metodama koje su bazirane na PCR analizi. Za ispitivanje nivoa ekspresije odabranih inflamatornih i apoptotskih gena korišćena je metoda qRT-PCR. Analiza DNK-proteinskih interakcija urađena je metodom usporene elektroforetske pokretljivosti.

Naši rezultati su pokazali da su manje učestale varijante u genu *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC, Arg684Trp) kao i genetičke varijante *TLR4* 299Gly, *TNF-α* -308A, *IL-6* -174C i *IL-1RN* VNTR A2, asocirane sa povećanim rizikom za nastanak KB, dok je genetička varijanta *IL-1RN* VNTR A2 povezana sa povećanim rizikom za nastanak UK. Pokazana je značajna razlika u alelskoj distribuciji *TNF-α* G-308A između pacijenata obolelih od KB i UK, gde je alel A povezan sa prisustvom KB, a alel G sa prisustvom UK. Prisustvo KB je asocirano sa kombinovanim efektom pola i manje učestalih varijanti u genu *TLR4*. Podaci o analiziranim genotipovima su korišćeni kao ulazne varijable za nekoliko klasifikacionih algoritama u cilju dizajniranja modela za predikciju IBC. Kao mera kvaliteta ovih modela korišćena je vrednost površine ispod *receiver operating* krive (eng. *the Area Under the receiver operating Curve*, AUC). Prediktivni model je pokazao najveći kvalitet kada su za njegov dizajn upotrebljeni podaci o svim analiziranim genotipovima (AUC od 0.69 za KB i 0.60 za UK). Takođe, naši rezultati su pokazali da *IL-6* G-174C može biti genetički marker dve ispitane granulomatozne bolesti, KB i RA. Što se tiče celijačne bolesti, pokazana je značajna asocijacija između kombinovanog prisustva alela *HLA-DQA1*05* i *DQB1*02* sa pojavom bolesti. Takođe, uočeno je postojanje gradijenta rizika za nastanak CB koji je vezan za specifične genotipove *HLA-DQ*.

Rezultati ekspresione analize su pokazali da postoji značajan porast nivoa *IL-6* i *TNF-α* iRNK, i značajan pad nivoa *Bcl-2* iRNK u upaljenoj ilealnoj mukozni pacijenata sa KB. Povećanje u nivou transkripcije je izraženije kod *IL-6* u odnosu na *TNF-α*. Rezultati su

ukazali i na potencijalni dijagnostički značaj nivoa *IL-6* i *Bcl-2* iRNK za aktivnu fazu KB. Pored analize transkripcije u intestinalnom tkivu, odredili smo nivo transkripcije istih gena i u mononuklearnim ćelijama periferne krvi. Naši rezultati su pokazali da je nivo *FasL* iRNK značajno snižen kod pacijenata sa KB, ali samo u uzorku krvi muškaraca. Pored toga, rezultati pokazuju da odnos *Fas/FasL* ima prediktivni značaj i predstavlja potencijalni dijagnostički biomarker aktivne faze KB kod muških pacijenata.

Analizom DNK vezujuće aktivnosti NF-κB iz jedarnih ekstrakata uzoraka intestinalne mukoze pacijenata sa KB, pokazano je da su snižen nivo NF-κB vezujuće aktivnosti i povišen nivo *TNF-α* iRNK povezani sa prisustvom fragilne intestinalne mukoze. Nasuprot tome, povišen nivo NF-κB vezujuće aktivnosti i snižen nivo *TNF-α* iRNK su pokazali asocijaciju sa prisustvom intestinalnih stenoza. Stoga smatramo da je status NF-κB vezujuće aktivnosti potencijalni marker apoptotskih i inflamatornih procesa koji se nalaze u osnovi ova dva klinička fenotipa.

Genetičke varijante ispitivane u ovoj studiji predstavljaju faktore rizika za pojavu HIBC i mogu se potencijalno koristiti u predikciji nastanka analiziranih bolesti. Takođe, ekspresioni profili odabranih proinflamatornih i apoptotskih gena, kao i nivo DNK vezujuće aktivnosti jednog od glavnih regulatora transkripcije ovih gena, NF-κB, mogu se smatrati potencijalnim dijagnostičkim i prognostičkim markerima KB. Ovo istraživanje je dalo doprinos molekularnoj karakterizaciji patoloških procesa koji se nalaze u osnovi HIBC.

Ključne reči: hronične inflamatorne bolesti creva; Kronova bolest; ulcerozni kolitis; celijačna bolest; granulomatozne bolesti; proinflamatorni geni; apoptotski geni; aleli *HLA-DQ*; prediktivni modeli; NF-κB.

Naučna oblast: Molekularna biologija eukariota

Uža naučna oblast: Molekularna genetika

UDK broj: 577.21 : [616-002.2 : 575.22] (043.3)

Molecular markers of chronic inflammation and apoptosis in inflammatory bowel diseases

ABSTRACT

Chronic inflammatory bowel diseases (CIBDs) remain an expanding global health problem, particularly in most Caucasian populations, including Serbian. The focus of this study included two types of chronic inflammatory bowel diseases - inflammatory bowel disease (IBD), which comprises Crohn's disease (CrD) and ulcerative colitis (UC); and celiac disease (CD). These are complex diseases with various genetic, environmental and immunological risk factors, whose etiologies are not yet fully resolved.

The development of IBD is a result of abnormal immune response that occurs in genetically susceptible individuals against the enteric flora. Many studies have investigated associations between IBD occurrence and variants in genes that encode proteins involved in nonspecific immune response. Intestinal mucosal damage in CrD patients occurs as a result of the deregulation of inflammatory and apoptotic processes, which influence T cell longevity and epithelial barrier integrity. Regulatory protein NF- κ B has a key role in the transcription of genes whose products are involved in these pathogenic events. Another property of CrD is formation of granulomas, which can also occur in other diseases, such as rheumatoid arthritis (RA). For that reason, CrD and RA are categorized as granulomatous diseases. Compared with numerous, still insufficiently defined genetic risk factors for the development of IBD, a genetic component in CD development is well characterized and mostly associated with specific variants of *HLA-DQ* genes.

One of the aims of this study was to evaluate disease-gene associations. More precisely, we examined IBD associations with several genetic variants - variants in *NOD2*, *TLR4*, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* and *IL-1RN* genes, and investigated their contribution in the prediction of IBD occurrence. Additionally, we analyzed variant in *IL-6* gene as a risk factor for two types of granulomatous diseases, CrD and RA. Also, we inspected the distribution of *HLA-DQ* genotypes in the group of pediatric celiac patients and estimated the risk of CD development that these genotypes confer. Another aim was the analysis of mRNA level of pro-

inflammatory *IL-6* and *TNF- α* , and apoptotic *Bcl-2*, *Bax*, *Fas* and *FasL* genes in intestinal mucosa, as well as in the peripheral blood of CrD patients, in order to reveal the expression patterns involved in the pathogenesis of CrD. Also, our goal was to investigate the diagnostic potential of these transcriptional products. The final aim within the IBD study was the analysis of the DNA binding activity of NF- κ B from the nuclear extracts of CrD patients' intestinal mucosal samples.

In this study, 167 IBD patients, 73 CD patients, 77 RA patients and 101 healthy subjects were enrolled. Genetic variants in above-mentioned genes were detected using PCR-based methodology. Gene expression levels of selected inflammatory and apoptotic genes were measured using qRT-PCR methodology. DNA-protein interactions were analyzed employing electrophoretic mobility shift assay.

Our results showed that minor variants of *NOD2* gene (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC, Arg684Trp), as well as *TLR4* 299Gly, *TNF- α* -308A, *IL-6* -174C and *IL-IRN* VNTR A2 variants, were associated with a higher risk of CrD, while the *IL-IRN* VNTR A2 variant was associated with a higher risk of UC incidence. CrD and UC showed a highly significant difference in the allelic distribution of *TNF- α* G-308A, where A allele was found to be related to CD, and G allele to UC occurrence. Among CrD patients, the combined effect of gender and *TLR4* variants was observed. Using obtained genotype data as input to various classification algorithms, we designed IBD prediction models. The Area Under the receiver operating Curve (AUC) was used as a measure of their performance. When all the analyzed genotype and gender data were used, the prediction performance achieved a maximum AUC of 0.69 for CD and 0.60 for UC dataset. We revealed that *IL-6* G-174C could be a genetic marker for two analyzed granulomatous diseases, CrD and RA. Considering CD-*HLA* relationship, the combined presence of *HLA-DQA1**05 and *-DQB1**02 alleles showed a highly significant association with CD. We observed a gradient of associated risk for CD occurrence determined by particular *HLA-DQ* genotypes.

Results of the expression analyses have shown that levels of *IL-6* and *TNF- α* mRNAs were significantly increased, while level of *Bcl-2* mRNA was significantly decreased in ileal

inflamed mucosa of CrD patients. The increase in the level of *IL-6* transcription was more prominent compared with *TNF- α* . We propose that levels of *IL-6* and *Bcl-2* mRNAs should be considered as potential diagnostic markers of the CrD active phase. In addition to the presented analyses at local levels of inflammation, we also assessed the level of transcription of the same genes in the peripheral blood mononuclear cells of CrD patients. Our results revealed that the level of *FasL* mRNA was significantly decreased, but only in blood samples from male patients. We found that *Fas/FasL* ratio had predictive significance and therefore, it could be considered as potential diagnostic biomarker of the CrD active phase in male patients.

The analysis of the DNA binding activity of NF- κ B from the nuclear extracts of CrD patients' intestinal mucosal samples revealed an association of decreased level of NF- κ B binding activity and increased level of *TNF- α* mRNA with intestinal mucosal fragility. In contrast, increased level of NF- κ B binding activity and decreased level of *TNF- α* mRNA were associated with intestinal strictures. Therefore, we propose the status of NF- κ B binding activity as a marker of apoptotic and inflammatory processes that underlie these two types of CrD clinical phenotypes.

The results of the presented study showed that examined genetic variants are genetic factors of importance in the susceptibility of analyzed CIBDs and these variants could be used as potential predictors of the CIBDs occurrence. Also, the expression profiles of selected proinflammatory and apoptotic genes, as well as the DNA binding activity status of one of the main transcription factors that is involved in the expression of these genes, NF- κ B, could be considered as potential CrD diagnostic and prognostic biomarkers. This research has contributed to the molecular characterization of pathological processes that underlie chronic inflammatory bowel diseases.

Keywords: chronic inflammatory bowel diseases; Crohn's disease; ulcerative colitis; celiac disease; granulomatous diseases; proinflammatory genes; apoptotic genes; *HLA-DQ* alleles; predictive modeling; NF- κ B.

Research area: Molecular biology of eukaryotes

Area of special interest: Molecular genetics

UDC number: 577.21 : [616-002.2 : 575.22] (043.3)

Lista skraćenica:

HIBC - hronične inflamatorne bolesti creva

IBC - inflamatorne bolesti creva

KB - Kronova bolest

UK - ulcerozni kolitis

CB - celijačna bolest

RA - reumatoidni artritis

NOD / CARD - nukleotid-vezujući oligomerizacioni domen / kaspaza regrutujući domen

PRR – receptori koji prepoznaju molekularne obrasce

LRR - ponovljeni motivi bogati leucinom

TLR - receptor analogan *Toll* proteinu

MDP – muramil dipeptid

LPS - lipopolisaharid

TNF- α - faktor nekroze tumora alfa

TNFR - receptor faktora nekroze tumora

TRAF- faktor asociran sa TNFR

IL - interleukin

IL-1Ra – antagonist receptora za interleukin 1

INF- γ - interferon gama

NF- κ B - nuklearni faktor kapa B

IKK - I kapa B kinaza

NEMO – esencijalni modulator nuklearnog faktora kapa B

HLA - humani leukocitni antigen

Bcl-2 - *B-cell CLL/lymphoma 2*

Bax - *Bcl2-associated X*

DISC - signalni kompleks koji indukuje smrt

DD – domen smrti

FADD - Fas pridruženi domen smrti

TRADD - domen smrti vezan za TNFR

5-ASA - 5-aminosalicilna kiselina

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Inflamatorne bolesti creva	2
1.1.1. Uloga NOD2 i TLR4 u razvoju IBC	3
1.1.2. Uloga citokina u razvoju IBC	7
1.1.2.1. TNF- α	7
1.1.2.2. IL-6	9
1.1.2.3. IL-1	12
1.1.3. Značaj procesa apoptoze u patogenezi IBC	14
1.1.3.1. Bcl-2 i Bax	16
1.1.3.2. Fas i FasL	18
1.1.3.3. Uloga citokina u modulaciji apoptotskih procesa kod IBC	21
1.1.4. Uloga NF- κ B u razvoju IBC	21
1.1.5. Kronova bolest i reumatoidni artritis kao granulomatozne bolesti	25
1.2. Celijačna bolest	27
2. CILJEVI	29
3. MATERIJAL I METODE	32
3.1. Ispitanici	33
3.2. Metode korišćene za detekciju genetičkih varijanti ispitivanih u studiji	34
3.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi	34
3.2.2. Analiza DNK na agaroznom gelu	35
3.2.3. Identifikacija varijanti u genima <i>NOD2</i> , <i>TLR4</i> , <i>TNF-α</i> , <i>IL-6</i> , <i>IL-1β</i> i <i>IL-1RN</i>	35
3.2.4. Identifikacija varijanti gena <i>HLA</i>	39
3.3. Metode korišćene za analizu nivoa ekspresije gena	42
3.3.1. Izolacija mononuklearnih ćelija pune periferne krvi	43
3.3.2. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija	43
3.3.3. Izolacija RNK iz uzoraka intestinalnog tkiva	45
3.3.4. Reverzna transkripcija	45
3.3.5. Provera kvaliteta cDNK	46
3.3.6. Kvantifikacija ekspresije gena metodom qRT-PCR	47
3.4. Metode korišćene za analizu DNK-proteinskih interakcija	50
3.4.1. Izolacija jedarnih ekstrakata iz uzoraka intestinalnog tkiva	50
3.4.2. Uslovi gajenja HeLa ćelijske linije	51

3.4.3. Izolacija jedarnih ekstrakata iz HeLa ćelijske linije	52
3.4.4. Određivanje koncentracije jedarnih proteina	52
3.4.5. Analiza DNK-proteinskih interakcija na gelu.....	53
3.5. Statistička obrada rezultata.....	56
4. REZULTATI.....	58
4.1. Ispitivanje uticaja genetičkih varijanti na rizik za nastanak hroničnih inflamatornih bolesti creva	59
4.1.1. Inflamatorne bolesti creva.....	59
4.1.1.1. Demografski i klinički opis ispitanika uključenih u studiju	59
4.1.1.2. Detekcija odabranih genetičkih varijanti.....	60
4.1.1.3. Analiza asocijacija ispitivanih genetičkih varijanti sa prisustvom IBC	62
4.1.1.4. Hardy-Vajnborgova ravnoteža	67
4.1.1.5. Prediktivni model	67
4.1.1.6. Ispitivanje genetičkih markera granulomatoznih bolesti - poređenje Kronove bolesti sa reumatoidnim artritisom	68
4.1.1.7. Sažetak rezultata.....	68
4.1.2. Celijačna bolest.....	69
4.1.2.1. Demografski opis ispitanika uključenih u studiju	69
4.1.2.2. Detekcija varijanti gena <i>HLA-DQ</i>	69
4.1.2.3. Imenovanje varijanti gena <i>HLA-DQ</i>	70
4.1.2.4. Analiza asocijacija genotipova <i>HLA-DQ</i> sa pojavom CB.....	71
4.1.2.5. Gradijent relativnog rizika vezan za genotip <i>HLA-DQ</i>	72
4.1.2.6. Sažetak rezultata.....	73
4.2. Ispitivanje nivoa ekspresije gena za inflamaciju i apoptozu relativnom kvantifikacijom iRNK kod pacijenata sa Kronovom bolešću	73
4.2.1. Karakteristike pacijenata sa KB i kontrolnih ispitanika.....	73
4.2.2. Nivo ekspresije gena u intestinalnom tkivu pacijenata sa KB i kontrolnih ispitanika. 74	
4.2.2.1. Biomarkeri Kronove bolesti u intestinalnom tkivu	75
4.2.2.2. Uticaj lokalizacije tkiva na nivo ekspresionih biomarkera KB	77
4.2.2.3. Odnos nivoa ekspresije gena <i>Bcl-2/Bax</i>	82
4.2.2.4. Sažetak rezultata.....	82
4.2.3. Nivo ekspresije gena za inflamaciju i apoptozu u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa KB i kontrolnih ispitanika.....	83
4.2.3.1. Biomarkeri Kronove bolesti u perifernoj krvi	83

4.2.3.2. Uticaj pola na nivo ekspresije gena <i>FasL</i>	85
4.2.3.3. Sažetak rezultata.....	86
4.3. Ispitivanje DNK vezujuće aktivnosti NF-κB iz intestinalnog tkiva pacijenata sa Kronovom bolešću.....	87
4.3.1. Sažetak rezultata	91
5. DISKUSIJA.....	92
5.1. Genetičke varijante asocirane sa hroničnim inflamatornim bolestima creva.....	93
5.1.1. Varijante u genima inflamacije kao markeri inflamatornih bolesti creva.....	93
5.1.2. Varijante gena <i>HLA-DQ</i> kao markeri celijačne bolesti	98
5.2. Ekspresija proinflamatornih i apoptotskih gena u Kronovoj bolesti.....	99
5.3. DNK vezujuća aktivnost NF-κB u Kronovoj bolesti	103
6. ZAKLJUČCI.....	107
7. LITERATURA.....	110

1. UVOD

Intestinalni trakt je konstantno izložen uticaju egzogenih i endogenih antigena. Zato je kontrolisana inflamacija ključni proces u održavanju homeostaze ovog organa. Ravnoteža može biti poremećena u nekoliko tačaka: kontroli propustljivosti epitelijalne membrane, reakciji urođenog imunskog sistema na prisustvo ugrožavajućeg antigena i finalno, aktivaciji i regulaciji funkcije efektorskih limfocita. Deregulacija ovih procesa može dovesti do razvoja hroničnih inflamatornih bolesti creva. Ova studija obuhvatila je dve hronične intestinalne inflamatorne bolesti - inflamatornu bolest creva i celijačnu bolest. U oba slučaja povećana propustljivost crevne mukoze indukuje aktivaciju i amplifikaciju imunskog odgovora, što kao posledicu ima oštećenje tkiva. Inflamatorne bolesti creva se u opštim crtama smatraju autoinflamatornim bolestima, dok je celijačna bolest autoimunska. Kod autoinflamatornih bolesti urođeni imunski sistem je taj koji direktno prouzrokuje inflamaciju, dok kod autoimunskih bolesti urođeni imunski sistem aktivira adaptivni, koji je onda odgovoran za procese inflamacije. Uzimajući ovu definiciju u obzir, tačnije bi bilo svrstati inflamatorne bolesti creva u tip bolesti koja ima odlike i autoinflamatornih i autoimunih bolesti.

1.1. Inflamatorne bolesti creva

Inflamatorne bolesti creva (IBC), koje se klinički manifestuju kao Kronova bolest (KB) i ulcerozni kolitis (UK), predstavljaju oboljenja koja u svojoj osnovi imaju hroničnu idiopatsku inflamaciju digestivnog trakta. KB i UK imaju klinički fenotip koji se razlikuje u nekoliko karakteristika, a jedna od njih je lokalitet inflamacije. Iako inflamacija kod KB može zahvatiti bilo koji deo intestinalnog tkiva, najčešće se javlja u terminalnom ileumu i kolonu. Bolesni, inflamacijom zahvaćeni regioni tkiva kod KB su diskontinuirani, što znači da se smenjuju sa delovima zdravog, inflamacijom nezahvaćenog tkiva. Kod UK inflamacija zahvata rektum, a može zahvatiti i deo kolona, ili ceo kolon (pankolitis), a promene su kontinuirane. U slučaju KB, zapaljenski proces je transmuralnog tipa, što znači da ceo zid creva može biti zahvaćen, dok su kod UK ovi procesi ograničeni na mukozu. Za KB je karakteristično prisustvo intestinalnih granuloma, stenoza i fistula, dok one nisu tipične za UK [Abraham i sar., 2009]. U 10% slučajeva nije moguće razlikovati KB i UK, i taj slučaj predstavlja specijalan klinički entitet nazvan indeterminisani kolitis [Hanauer 2006].

U našoj zemlji ne postoji tačan podatak o prevalenci ovih bolesti, ali se smatra da je približna prevalenci u drugim evropskim populacijama. Procenjeno je da 3% evropske populacije ima IBC, što iznosi 2.5 - 3 miliona ljudi [Burisch i sar., 2013]. Epidemiološke studije pokazuju porast u incidenci i prevalenci ovih bolesti tokom poslednjih godina u različitim delovima sveta, ukazujući na globalni zdravstveni problem [Molodecky i sar., 2012]. IBC uglavnom pogađa populaciju starosti od 15 - 30 godina, dok se drugi, manji, starosni pik može javiti kod ljudi starosti 55 - 65 godina. Kod belih populacija je učestalost KB veća kod žena u poređenju sa muškarcima, dok je učestalost UK slična među polovima. Treba uzeti u obzir da distribucija KB među polovima zavisi od starosti pacijenata - kod pedijatrijskih slučajeva dečaci, a kod adultnih žene češće oboljevaju [Brant i sar., 2008].

Inicirajući događaj u razvoju IBC je nepoznat, a trenutno aktuelna hipoteza se odnosi na neregulisani odgovor imunskog sistema na intestinalnu mikrofloru u kombinaciji sa nekim sredinskim okidačem. Ulogu u patogenezi ovih bolesti mogu imati faktori koji remete

intestinalnu homeostazu, tj. dovode do promena u epitelijalnoj barijeri, urođenom imunskom sistemu, citokinskoj signalizaciji, kao i regulaciji limfocitne funkcije [Abraham i sar., 2009].

Intestinalna barijera je dinamičan višeslojan sistem koji se sastoji od bakterijskog mikrofilma, mukusa, epitelijalnih ćelija i ćelija imunskog sistema. Narušavanjem ovog sistema može doći do razvoja hronične inflamacije kao posledice nekontrolisane bakterijske invazije [Hanauer 2006]. Da je intestinalni mikrobiom važan u patogenezi ovih bolesti pokazale su studije na životinjskim modelima kolitisa, kod kojih se inflamacija nije razvijala ukoliko su miševi gajeni u sredini bez bacila [Elson i sar., 2005]. Prodor bakterijskih i drugih luminalnih antigena u dublje slojeve intestinalnog tkiva sprečavaju epitelijalne ćelije zahvaljujući međućelijskim uskim vezama koje regulišu protok nutrijenata između ove dve niše. Kod IBC, epitelijalna barijera je oštećena i ima povećan permeabilitet [Turner 2006]. Smatra se da ovaj događaj predstavlja primarni poremećaj u inflamatornim bolestima creva [Olson i sar., 2006], ali može biti i posledica hronične inflamacije [Bruewer i sar., 2003]. Povećana propustljivost epitelijalne barijere uzrok je upalnih procesa i kod celijačne bolesti [Lionetti i sar., 2011].

Pored toga što predstavlja fizičku barijeru, intestinalni epitel ima ulogu medijatora između mikrobioma i imunskog odgovora domaćina. Interakcija je omogućena preko familije receptora koji prepoznaju opšte molekularne obrasce bakterijskih antigena (PRR receptori) [Wells i sar., 2011]. Ovi receptori su deo urođenog imunskog sistema i aktiviraju signalne puteve koji rezultiraju odgovorom domaćina potrebnim za eliminaciju invazivnih bakterija. Pored toga, oni imaju i važnu ulogu u procesu imunološke tolerancije prema intestinalnoj komensalnoj mikroflori [Otte i sar., 2004; Rakoff-Nahoum i sar., 2004; Tsai i sar., 2011]. Remećenje ravnoteže između ova dva procesa, aktivacije imunskog odgovora i održavanja tolerancije, može uticati na pojavu i razvoj IBC. NOD2 i TLR4 pripadaju ovom tipu receptora i povezani su sa razvojem IBC [Cario 2005].

1.1.1. Uloga NOD2 i TLR4 u razvoju IBC

NOD2/CARD15 (nukleotid-vezujući oligomerizacioni domen 2 / kaspaza regrutujući domen 15) je intracelularni receptor koga eksprimiraju intestinalne epitelijalne ćelije, Panetove

ćelije, mijeloidne ćelije, a kako je nedavno pokazano i T ćelije [Kaser i sar., 2010]. NOD2 prepoznaje peptidoglikanski muramil dipeptid (MDP), komponentu bakterijskog ćelijskog zida [Girardin i sar., 2003]. Nakon vezivanja bakterijskog antigena, NOD2 se homodimerizuje i aktivira RICK kinazu, što rezultuje ubikvitinacijom esencijalnog modulatora NF- κ B (NEMO) preko E3 ubikvitin ligaze TRAF6. Ubikvitirani NEMO regrutuje TGF- β aktivirajući kinazni (TAK1) kompleks koji fosforiliše I κ B kinazu (IKK). IKK kinaza stimuliše degradaciju I κ B i oslobađa NF- κ B njenog inhibitorynog dejstva. Krajnji rezultat ove signalne kaskade je translokacija NF- κ B u jedro i transkripcija proinflammatoryh gena, među kojima su i *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1* [Ogura i sar., 2001b; Abbott i sar., 2004]. Aktivacija NOD2 je povezana i sa transkripcijom anitmikrobnih peptida, defenzina, koji su sastavni deo mukusnog zaštitnog sloja [Tan i sar., 2015].

Receptor NOD2 sastoji se od: dva CARD domena (domeni kaspazne aktivacije i regrutovanja) na N-terminalnom kraju, koji imaju ulogu u vezivanju i aktivaciji RICK kinaze; centralnog NBD domena (nukleotidno-vezujući domen), koji je potreban za homodimerizaciju proteina; sekvence bogate leucinskim ponovcima (LRR) na C-terminalnom kraju koja vezuje bakterijski antigen [Ogura i sar., 2001b].

Varijante u genu *NOD2*, koji se nalazi u regionu hromozoma 16q21 (HGNC:5331), do sada su pokazale najjaču asocijaciju sa pojavom KB. Za razliku od KB, *NOD2* ne predstavlja faktor rizika za pojavu UK [Hugot i sar., 2001; Ahmad i sar., 2002; Protic i sar., 2008]. Najveći procenat ustanovljenih asocijacija između varijanti u genu *NOD2* i KB vezano je za genetičke varijante Arg702Trp, Gly908Arg i Leu1007fsinsC. Ove varijante se nalaze u delu gena koji kodira LRR domen [Lesage i sar., 2002]. Pokazano je da receptori NOD2 koji su kodirani pomenutim genskim varijantama slabije vezuju RICK kinazu, što smanjuje NEMO ubikvitinaciju i NF- κ B transaktivaciju [Abbott i sar., 2004]. Zabeleženo je da u belim populacijama 30 - 40% pacijenata sa KB nosi bar jedan rizični alel *NOD2* u poređenju sa oko 10% zdravih ljudi [Walters i sar., 2006; Hugot i sar., 2007; Kaser i sar., 2010]. Nosioci jednog rizičnog alela *NOD2* imaju tri puta veći rizik, dok nosioci dva rizična alela (složeni heterozigotni i homozigotni nosioci) imaju 40 puta veći rizik za pojavu KB u odnosu na nosioce učestalijeg alela [Hugot i sar., 2001; Ogura i sar., 2001a]. Prisustvo rizičnih varijanti

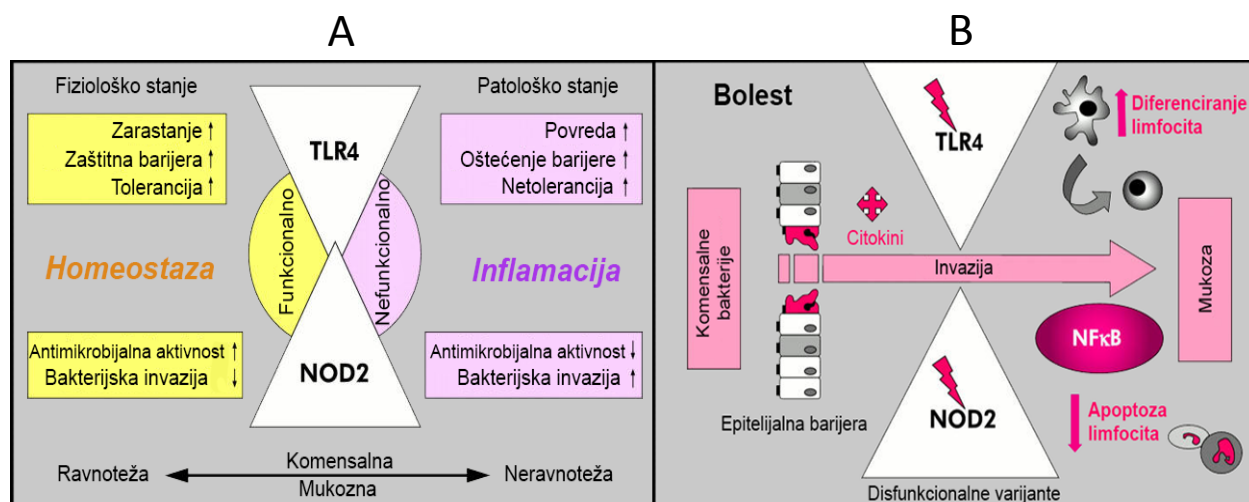
NOD2 nije dovoljno za razvoj KB, što ukazuje na multifaktorijalnu prirodu ove bolesti [Hugot i sar., 2007].

TLR4 je transmembranski receptor koji detektuje prisustvo bakterijskog lipopolisaharida (LPS) preko ekstracelularnog LRR domena. Ekspimiran je u intestinalnim epitelijalnim ćelijama i u raznim podgrupama imunskih ćelija, kao što su monociti/makrofagi i dendritske ćelije [Cario 2010]. Nakon formiranja LPS-TLR4 kompleksa dolazi do dimerizacije intracelularnog TIR domena (toll interleukin 1 receptorski domen) receptora TLR4 i započinjanja ćelijskog prenosa signala. Signalni put posredovan adapternim proteinom MyD88 aktivira kinazu IRAK, a ona TRAF6 i TAK1, koji su tačka ukrštanja sa *NOD2* signalnim putem. Kao i u prethodnom slučaju, ovo dovodi do aktivacije NF- κ B i transkripcije inflamatornih gena [Akira i sar., 2004; Miggin i sar., 2006]. Pokazano je da receptori TLR4 i *NOD2* kooperiraju u održavanju intestinalne homeostaze [Kobayashi i sar., 2005; Hedl i sar., 2007; Tsai i sar., 2011]. Pored regulacije imunskog odgovora, receptor TLR4 ima značajnu ulogu i u procesu zarastanja oštećenog epitelijalnog tkiva [Fukata i sar., 2005; Ungaro i sar., 2009].

Brojne studije opisuju povezanost upalnih procesa u intestinumu i deregulacije odgovora posredovanog receptorima TLR [Moossavi 2014]. U normalnim, fiziološkim uslovima, intestinalne epitelijalne ćelije ekspimiraju male količine receptora TLR4 kako bi se izbegla preterana aktivacija imunskog odgovora u prisustvu komensalnih bakterija [Abreu i sar., 2001; Otte i sar., 2004]. Nasuprot tome, u intestinalnoj mukozii pacijenata sa KB i UK zabeležen je značajan porast ekspresije TLR4 [Cario i sar., 2000; Hausmann i sar., 2002]. Još uvek je nepoznato da li je porast primarni defekt ili je posledica uticaja inflamatornih citokina, TNF- α i INF- γ , koji stimulišu ekspresiju ovog receptora [Abreu i sar., 2002a].

Sekvenciranjem gena *TLR4*, u regionu hromozoma 9q33.1 (HGNC:11850), pokazano je da se najveći broj varijacija koje uzrokuju nesinonimne aminokiselinske zamene nalazi u egzonu 3. S obzirom da egzon 3 kodira domen koji prepoznaje bakterijski antigen (LRR domen), ove varijante u genu *TLR4* verovatno predstavljaju rezultat evolucionog pritiska patogena na imunski sistem domaćina [Ferwerda i sar., 2008a]. Između 6 i 10% bele populacije nosi dve

kosegregirajuće varijante, Asp299Gly i Thr399Ile, čije je prisustvo povezano sa smanjenom aktivacijom NF- κ B i povećanom osetljivošću na gram negativne bakterije [Arbour i sar., 2000; Schwartz 2002]. Smatra se da varijanta Asp299Gly modifikuje konformaciju TLR4, što može remetiti interakciju ovog receptora sa LPS [Rallabhandi i sar., 2006] ili regrutaciju adapternih proteina i prenos signala [Figueroa i sar., 2012]. Asocijacija između varijanti Asp299Gly i Thr399Ile i oba tipa IBC je pokazana u više studija [Shen i sar., 2010].



Slika 1. (A) Uloga NOD2 i TLR4 receptora u fiziološkim i patofiziološkim procesima. (B) Trenutno važeći koncept o doprinosu varijanti NOD2/TLR4 koji se povezuju sa smanjenom aktivnošću u patogenezi IBC. Modifikovano iz rada *Cario E.* iz 2005. godine [Cario 2005].

Na slici 1 prikazani su događaji vezani za receptore NOD2 i TLR4 koji doprinose razvoju IBC. Narušavanje intestinalne barijere izazvano smanjenjem sinteze antimikrobijalnog mukusa i slabljenjem veza među epitelijalnim ćelijama, dovodi do nekontrolisane invazije bakterija u subepitelijalno tkivo. Promena funkcije receptora uslovljena aminokiselinskim zamenama remeti komunikaciju urođenog imunskog sistema sa luminalnim sadržajem, tako da prva linija odbrane domaćina ne uspeva da se izbori sa invazivnim patogenom. Zbog toga dolazi do regrutovanja imunskih efektorskih ćelija i razvijanja hronične inflamacije. Važnu ulogu u koordinisanju ovih događaja imaju inflamatorni citokini.

1.1.2. Uloga citokina u razvoju IBC

Citokini su signalni molekuli imunskog sistema koji modulišu diferencijaciju, proliferaciju, apoptozu, i druge ćelijske događaje važne za procese imunskog odgovora i inflamacije [Foster 2001]. Citokine uglavnom proizvode ćelije imunskog sistema, ali ih mogu proizvoditi i drugi tipovi ćelija, uključujući i epitelijalne ćelije creva.

U patogenezi IBC, neadekvatan odgovor urođenog imunskog sistema prevazilazi se dejstvom citokina koji izazivaju akumulaciju i diferencijaciju pomoćnih limfocita T (Th). Tip Th ćelija u hroničnoj fazi bolesti se razlikuje između KB i UK. Kod KB dolazi do diferencijacije Th1 i Th17 ćelija i sinteze citokina - interferona (INF)- γ , interleukina (IL)-17 i IL-22. Kod UK, prevladuje Th2-slična diferencijacija i ekspanzija T ćelija prirodnih ubica (NK) koje proizvode citokine IL-13 i IL-5 [Fuss i sar., 2004]. Ovaj specifični odgovor kod obe bolesti dovodi do porasta nivoa citokina TNF- α , IL-6 i IL-1 β [Strober i sar., 2007]. Oni deluju kao uzvodni stimulatori pomenutih procesa i nizvodni medijatori inflamacije.

1.1.2.1. TNF- α

TNF superfamilija (TNFSF) obuhvata grupu receptora i liganada koji su ekspimirani u ćelijama imunskog sistema i koji imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze kod imunskog odgovora posredovanog T limfocitima. TNF- α (TNFSF2) je pronflamatorni citokin čiji su glavni izvori makrofagi, T, B i NK ćelije, mada u manjoj meri mogu da ga sintetišu i druge ćelije, uključujući i intestinalne epitelijane ćelije [Jung i sar., 1995]. Svoju biološku funkciju TNF- α ostvaruje u formi homotrimernog transmembranskog ili solubilnog proteina [Caballero i sar., 2012] kojeg prepoznaju dve vrste receptora - TNFR1 (TNFRSF1A) i TNFR2 (TNFRSF1B). TNFR1 je konstitutivno prisutan na većini sisarskih ćelija sa jedrom i aktiviraju ga obe forme TNF- α , dok je TNFR2 (TNFRSF1B) prisutan uglavnom na hematopoetskim ćelijama, a aktivira ga transmembranska forma TNF- α [Wajant i sar., 2003; Aggarwal i sar., 2012]. Intracelularni domenii ovih receptora nemaju enzimsku aktivnost, pa zahtevaju citoplazmatske, adapterne proteine za inicijaciju signalizacije. TNFR1 sadrži intracelularni domen smrti (DD) koji uz kooperaciju sa adapternim proteinima FADD i TRADD, preko aktivacije kaspaza, vodi do apoptoze. Ukoliko u signalizaciji iniciranoj preko

TNFR1 posreduje protein TRAF2, aktivira se protein NF- κ B koji reguliše transkripciju gena za antiapoptotske proteine, inflamatorne citokine i hemokine [Aggarwal 2003]. Receptor TNFR2 preko adaptornog proteina TRAF2 takođe aktivira signalni put koji rezultuje aktivacijom proteina NF- κ B [Kim i sar., 2001]. Iako TNFR2 u poređenju sa TNFR1 ne sadrži DD domen, on može imati proapoptotske efekte [Bigda i sar., 1994]. Mehanizam kojim se odlučuje da li će TNF- α izazvati ćelijsku smrt ili preživljavanje zavisi od balansa između pro- i anti-apoptotskih faktora unutar ćelije i u njenoj okolini [Wajant i sar., 2003].

Prekomerna ekspresija TNF- α uključena je u patogenezu različitih humanih bolesti - sepe, cerebralne malarije, raznih autoimunskih i autoinflamatornih bolesti (neke od njih su multipla skleroza, reumatoidni artritis, IBC), kao i malignih bolesti [Aggarwal i sar., 2012]. Kod pacijenata sa IBC je detektovana povećana ekspresija TNF- α u serumu, stolici i intestinalnoj mukozi [Braegger i sar., 1992; Murch i sar., 1993; Komatsu i sar., 2001]. Smatra se da je inflamacija kod IBC zavisna od transmembranske forme TNF- α . Naime, pokazano je da neutralizacija transmembranske, a ne solubilne TNF- α forme dovodi do remisije eksperimentalnog kolitisa [Perrier i sar., 2013]. Takođe treba napomenuti da je povećana ekspresija TNFR2, receptora koji sa visokim afinitetom vezuje transmembranski TNF- α , nađena u epitelijalnim ćelijama kolona pacijenata sa IBC [Mizoguchi i sar., 2002]. U prilog pretpostavci da je transmembranska forma ključna u nastanku IBC ide i to što je etanercept, anti-TNF lek koji blokira solubilni ali ne i transmembranski TNF- α , neefikasan u lečenju IBC. Za razliku od etanercepta, infliksimab ima sposobnost blokiranja obe TNF- α forme i koristi se uspešno u terapiji IBC [van den Brande i sar., 2005].

U toku patogeneze IBC, TNF- α utiče na aktivaciju efektorskih imunskih ćelija i na integritet epitelijalne barijere. Izlaganjem epitelijalnih ćelija dejstvu TNF- α dolazi do slabljenja međućelijskih uskih veza [Ma i sar., 2004; Su i sar., 2013], kao i indukcije apoptotskih procesa koji dovode do „ljuštenja“ epitela i nastanka „pukotina“ u intestinalnoj epitelijalnoj barijeri [Gitter i sar., 2000; Zeissig i sar., 2004]. Navedeni događaji za posledicu imaju prodor luminalnih antigena u dublje slojeve mukoze što utiče na pojačavanje inflamacije.

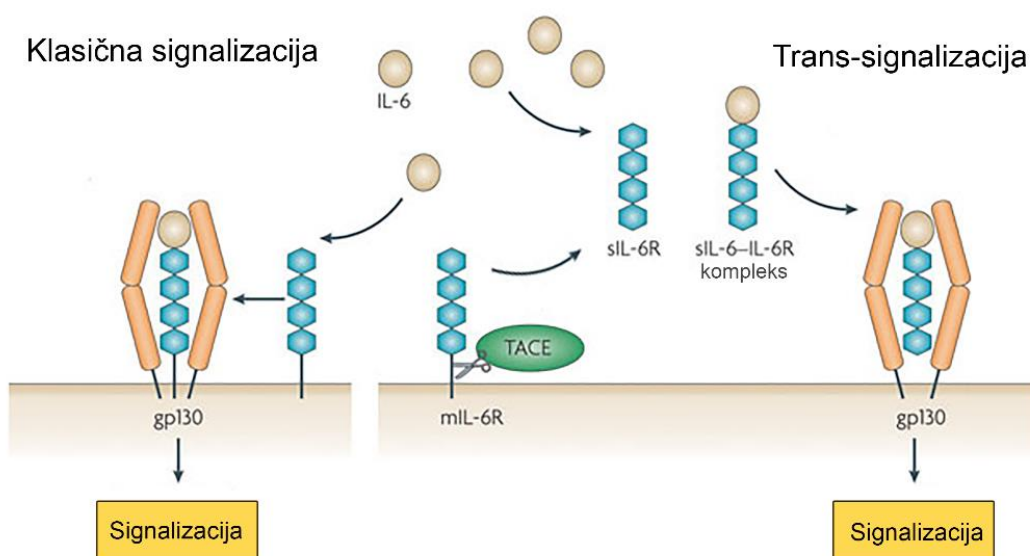
Gen *TNF- α* se nalazi na hromozomu 6 u regionu p21.3 (HGNC:11892), okružen genima koji kodiraju membranske molekule humanog leukocitnog antigena (HLA). Gen *TNF- α* , zajedno sa genima *TNF- β* (*LT- α*) i *LT- β* , nalazi se u lokusu glavnog kompleksa histokompatibilnosti (*MHC*) III. *MHC* je visoko varijabilni region sa velikim brojem gena koji određuju specifičnost imunskog odgovora [Trowsdale i sar., 2013]. U okviru gena *TNF- α* je identifikovano više bialelnih varijanti koje mogu direktno uticati na njegovu transkripciju, među kojima su i dve substitucije G u A na poziciji -308 i -238 u odnosu na start transkripcije. Ove dve genetičke varijante su asociirane sa povećanim rizikom za razvoj infektivnih, autoimunskih i autoinflamatornih bolesti [Elahi i sar., 2009]. Njihova asocijacija sa rizikom za razvoj IBC je kontraverzna [Ferguson i sar., 2008; Fan i sar., 2011; Xie i sar., 2012]. Neke studije su pokazale da kod pacijenata sa IBC prisustvo alela -308 A asociira sa većom [Gonzalez i sar., 2003], a alela -238 A sa manjom produkcijom *TNF- α* [Koss i sar., 2000]. Mnoge studije koje su ispitivale funkcionalni efekat ovih genetičkih varijanti dale su oprečne rezultate [Hajeer i sar., 2000]. Time je zaključeno da transkripcija *TNF- α* nije kontrolisana samo preko promotorskih sekvenci, već da u tome potencijalno učestvuju i *cis* DNK regulatorni elementi udaljeni od samog gena [Hajeer i sar., 2000]. U tom slučaju, genetičke varijante na poziciji -308 i -238 predstavljale bi indirektno markere za kontrolu transkripcije *TNF- α* .

1.1.2.2. IL-6

IL-6 je multifunkcionalni citokin koji ima važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora, hematopoezi, inflamaciji, onkogenezi i modulaciji odgovora akutne faze u jetri [Gauldie i sar., 1992; Peters i sar., 1998; Naugler i sar., 2008].

Svoje biološke aktivnosti IL-6 ostvaruje preko dva molekula, IL-6R i gp130, i to na dva načina - „klasičnom“ i „trans-“ signalizacijom [Rose-John i sar., 2004; Scheller i sar., 2006]. Kod klasične signalizacije IL-6 se prvo vezuje za membranski receptor (m)IL-6R, a zatim se oni zajedno vezuju za homodimerni receptor gp130 koji aktivira put prenosa signala (slika 2). Za razliku od gp130 koji je prisutan na svim ćelijama, IL-6R eksprimiraju samo neke vrste ćelija (neutrofili, monociti/makrofagi, neke vrste T ćelija, hepatociti, intestinalne

epitelijalne ćelije) [Scheller i sar., 2011]. Stimulacija ćelija koje nemaju mIL-6R omogućena je preko procesa trans-signalizacije. Dejstvom membranskih metaloproteinaza, mIL-6R se proteolitički oslobađa sa membrana ćelija i pretvara u solubilni receptor (s)IL-6R. Kada (s)IL-6R i IL-6 formiraju kompleks, vezuju se za membranski gp130 na ćelijama koje ne ekspimiraju IL-6R i tako kod njih iniciraju put prenosa signala [Rose-John i sar., 2004] (slika 2). Klasična i trans-signalizacija pokreću signalne puteve JAK/STAT, ERK/MAPK i PI3K/AKT [Scheller i sar., 2011].



Slika 2. IL-6 klasična i trans-signalizacija. Modifikovano iz rada *Kopf M.* i saradnika iz 2010. godine [Kopf i sar., 2010].

Kod pacijenata sa IBC su mononuklearne ćelije periferne krvi, intestinalne epitelijalne ćelije, kao i mononuklearne ćelije lamine proprije opisane kao izvor IL-6 [Suzuki i sar., 1990; Reinecker i sar., 1993; Kusugami i sar., 1995]. Povećan nivo IL-6 u serumu je povezan sa lošijom kliničkom slikom kod pacijenata sa KB i UK [Gross i sar., 1992; Hyams i sar., 1993]. Takođe, nivo IL-6 je preporučen kao potencijalni prognostički marker za relaps bolesti kod inaktivnih oblika KB [Louis i sar., 1997; Van Kemseke i sar., 2000]. Smatra se da IL-6 doprinosi patogenezi IBC tako što reguliše diferencijaciju, aktivaciju i životni vek limfocita, naročito limfocita Th17 [Kimura i sar., 2010]. IL-6 povećava preživljavanje limfocita

aktivacijom signalnog puta STAT3 i indukcijom ekspresije antiapoptotskih gena *Bcl-2* i *Bcl-xL* [Ina i sar., 1999; Atreya i sar., 2000; Musso i sar., 2005]. S obzirom da efektorski T limfociti ne eksprimiraju IL-6R, aktivacija puta STAT3 posredovana je trans-signalizacijom. Povećana ekspresija IL-6 zajedno sa sIL-6R u serumu i intestinalnoj mukozu pacijenata sa IBC ukazuje na značaj trans-signalizacije u patogenezi ovih inflamatornih oboljenja [Mitsuyama i sar., 1995; Hosokawa i sar., 1999].

Zbog važne uloge IL-6 u procesima inflamacije, inhibicija ovog signalnog puta postala je jedan od glavnih ciljeva u terapiji inflamatornih bolesti. Predloženo je nekoliko terapijskih strategija kojima bi se ili kompletno blokirali putevi zavisni od IL-6, ili specifično trans-signalizacija [Jones i sar., 2011]. Trenutno dostupne strategije uključuju anti-IL-6 i anti-IL-6R antitela, inhibitore Janus kinaze (JAK) i solubilni (s)gp130Fc koji specifično blokira kompleks IL-6-sIL-6R i na taj način inhibira samo proces trans-signalizacije [Mitsuyama i sar., 2007; Waetzig i sar., 2012]. Pokazano je da primena anti-IL-6R i sgp130Fc smanjuje intestinalnu inflamaciju i ublažuje kliničke simptome kod mišjeg modela kolitisa [Atreya i sar., 2000; Mitsuyama i sar., 2006]. Ovim je jasno demonstrirana važna uloga procesa trans-signalizacije u *in vivo* IBC modelu. Efekat pomenutih anti-IL-6 lekova još uvek nije dovoljno ispitan na ljudima.

Gen *IL-6* se nalazi na hromozomu 7 u regionu p21-p15 (HGNC:6018), u blizini genetičkog markera za koji je pokazano da je asociran sa pojavom IBC [Satsangi i sar., 1996a]. Pokazano je da varijanta G-174C u promotoru gena *IL-6* utiče na njegov nivo ekspresije, tako što je varijanta G asocirana sa višim, a varijanta C sa nižim nivoom ekspresije [Fishman i sar., 1998]. Asocijativne studije su pokazale povezanost ove genetičke varijante sa bolestima koje u svojoj patogenezi imaju povišen nivo IL-6, kao što su dijabetes tip 2, juvenilni idiopatski artritis, reumatoidni artritis i koronarne arterijske bolesti [Woo i sar., 2013]. Asocijativne studije koje su rađene na pacijentima sa IBC imale su oprečne rezultate [Klein i sar., 2001; Balding i sar., 2004; Cantor i sar., 2005].

1.1.2.3. IL-1

Familija citokina IL-1 obuhvata grupu citokina koji među prvima reaguju na ugrožavajući antigen u amplifikacionoj kaskadi inflamatornih događaja. IL-1 ima efekat na sve ćelije i organe i glavni je patogeni medijator autoinflamatornih, autoimunskih, infektivnih i degenerativnih bolesti [Dinarello 2011]. IL-1 čine agonisti IL-1 α i IL-1 β koji vezivanjem za zajednički receptor IL-1R aktiviraju iste nizvodne kaskadne događaje. Bez obzira na sličnu biološku funkciju, postoje razlike u ćelijskom poreklu i mehanizmu oslobađanja ovih citokina koje utiču na imunski odgovor i inflamaciju. IL-1 α je konstitutivno eksprimiran u skoro svim nehematopoetskim ćelijama i uglavnom deluje lokalno nakon nekroze ćelija u kojima je sintetisan [Rider i sar., 2013]. IL-1 β ima sistemski efekat i sintetišu ga hematopoetske ćelije (monociti/makrofagi, dendritske ćelije i mikroglia) u odgovoru na signalizaciju indukovanu receptorom TLR, u odgovoru na proteine komplementa i druge citokine kao što je TNF- α . Za razliku od IL-1 α , prekursor IL-1 β zahteva aktivaciju proteolitičkim dejstvom kaspaze-1 [Garlanda i sar., 2013]. Odgovor iniciran IL-1 počinje formiranjem kompleksa između citokina IL-1 i heterodimernog receptora IL-1RI/IL-1RAP, koji zatim preko TIR domena regrutuje Myd88, IRAK4, TRAF6 i ostale medijatore signalizacije, što dovodi do aktivacije NF- κ B i MAPK (mitogenom-aktivirane proteinske kinaze) puteva [O'Neill 2008]. S obzirom da i IL-1R i TLR poseduju domen TIR, postoji funkcionalna sličnost između signalnih puteva indukovanih ovim receptorima [Dinarello 2011].

IL-1 sistem aktivacije i prenosa signala koji čine citokini IL-1 α , IL-1 β i receptor IL-1RI, regulisan je IL-1 receptor antagonistom (IL-1Ra). IL-1Ra kompetira sa IL-1 α i IL-1 β u vezivanju za IL-1RI, ali za razliku od njih ne može da aktivira signalizaciju i zato predstavlja negativni regulator proinflamatornog IL-1 odgovora [Arend 1993]. Ekspresija IL-1Ra je indukovana u mnogim ćelijama dejstvom raznih citokina, među kojima su IL-1 i IL-6, i inflamatornim stimulusima kao što je LPS [Arend i sar., 1998]. Da bi došlo do potpunog biološkog odgovora ćelije na dejstvo IL-1 dovoljno je samo nekoliko IL-1RI-IL-1 interakcija. Zbog ove ekstremne senzitivnosti i velikog broja funkcionalnih receptora IL-1RI na većini ciljnih ćelija, potrebno je da IL-1Ra bude prisutan u 100 puta većoj koncentraciji u odnosu

na IL-1 da bi sprečio stimulaciju ćelija [Arend i sar., 1990]. Zato i manji disbalans u nivoima ekspresije ova dva citokina može doprineti patogenezi inflamatornih bolesti. S tim u vezi, kod dece koja imaju deficijenciju IL-Ra razvijaju se teške sistemske i lokalizovane inflamacije [Aksentijevich i sar., 2009; Reddy i sar., 2009]. O značajnoj ulozi ovog citokina u regulaciji inflamacije ukazuje i upotreba leka anakinra, rekombinantnog humanog IL-1Ra koji se koristi u terapiji reumatoidnog artritisa [Dinarello 2011].

Studije su pokazale da monociti lamine proprije pacijenata sa IBC povećano ekspimiraju IL-1 β [Reinecker i sar., 1993; McAlindon i sar., 1998]. Povišen nivo ekspresije IL-1 β u mukozni kolona obolelih korelira sa kliničkim parametrima koji ukazuju na veći stepen aktivnosti bolesti i povezan je sa prisustvom aktivnih mukoznih lezija [Ludwiczek i sar., 2004]. Kod pacijenata sa IBC postoji disbalans između IL-Ra i IL-1 na mestu inflamacije. Naime, značajno povećanje ekspresije IL-1 α i IL-1 β prati blago povećanje ekspresije IL-1Ra, što rezultuje smanjenjem odnosa IL-Ra/IL-1 [Casini-Raggi i sar., 1995; Dionne i sar., 1998]. Kod zečjeg i pacovskog modela kolitisa tretman IL-1-blokirajućim agensima ublažavao je akutne oblike intestinalnih oštećenja i smanjivao inflamaciju [Cominelli i sar., 1992; McCall i sar., 1994]. Poznato je da IL-1 β , zajedno sa IL-6 i IL-23, promovise diferencijaciju Th17 ćelija [Chung i sar., 2009; Coccia i sar., 2012]. Pokazano je da su inflamatorne bolesti koje karakteriše visok nivo IL-1 β asociirane sa izraženim odgovorom Th17 ćelija na mestu inflamacije [Aksentijevich i sar., 2009; Meng i sar., 2009; Reddy i sar., 2009].

Geni *IL-1* nalaze se na hromozomu 2 u regionu q14.2 (HGNC:5991, HGNC:5992), u kome se nalazi i gen *IL-1RN* (HGNC:6000) koji kodira IL-Ra. Varijante gena *IL-1 α* , *IL-1 β* i *IL-1RN* su u gametskoj neravnoteži vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*, LD) i zajedno se nasleđuju na istom hromozomu češće nego što je očekivano [Cox i sar., 1998]. Jedna od poznatih genetičkih varijanti nalazi se u promotoru *IL-1 β* , na poziciji -511 od starta transkripcije, i predstavlja tranziciju C u T. U genu *IL-1RN*, intron 2 sadrži varijabilni broj tandemskih ponovaka (VNTR), dužine 86 bp. Najčešći alel je imenovan kao alel 1 (A1) i ima 4 ponovaka, a ostali su A2 - 2 ponovka, A3 - 5 ponovaka, A4 - 3 ponovka i A5 koji ima 6 ponovaka [Tarlow i sar., 1993]. Nije još sa sigurnošću utvrđeno na koji način navedene genetičke varijante utiču na produkciju proteina. Jedna od sugestija je da postoji kooperativni

efekat oba varijantna mesta, *IL-1 β* C-511T i *IL-1RN* VNTR, u regulaciji produkcije kako *IL-1 β* , tako i *IL-1Ra* [Hurme i sar., 1998; Santtila i sar., 1998; Vamvakopoulos i sar., 2002]. Postoje dokazi da su pomenute genetičke varijante povezane sa IBC [Vijgen i sar., 2002]. Pored asocijacije sa IBC, studije su pokazale povezanost alela 2 gena *IL-1RN* sa više hroničnih inflamatornih bolesti, uglavnom vezanih za tkiva epitelijalnog porekla [Arend i sar., 2000; Witkin i sar., 2002].

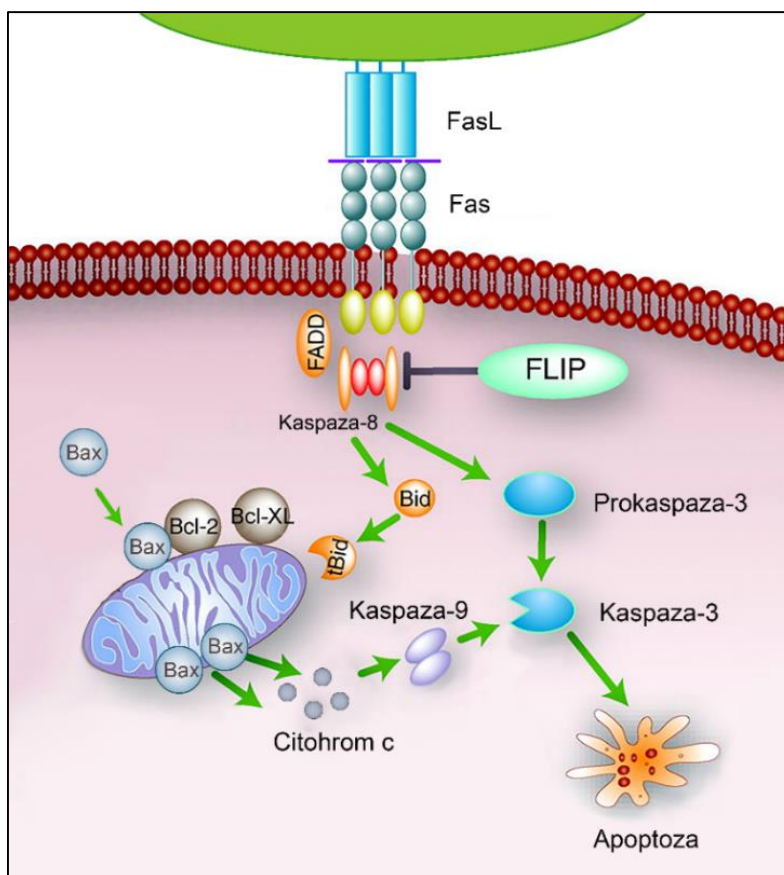
1.1.3. Značaj procesa apoptoze u patogenezi IBC

Centralnu ulogu u oštećenju intestinalne mukoze kod pacijenata sa IBC imaju limfociti T. Apoptoza je važan proces koji reguliše životni vek limfocita T i njihovo zadržavanje na mestu inflamacije [Mudter i sar., 2007]. Takođe, povećan nivo apoptoze epitelijalnih ćelija može dovesti do narušavanja intestinalne barijere i pojačane mukozne propustljivosti [Edelblum i sar., 2006]. Zato je postojanje balansa između proliferacije i apoptoze intestinalnih ćelija važno u održavanju homeostaze ovog tkiva.

Proces ćelijskog umiranja po tipu apoptoze karakteriše aktivacija kaspaza, familije intracelularnih cisteinskih proteaza. Ovi enzimi aktiviraju se proteolitičkom obradom nakon što ćelija dobije apoptotski signal. Kaspaze uključene u proces apoptoze dele se na inicijatorske tzv. „uzvodne“ (kaspaza -8, -2, -9 i -10) i efektorske tzv. „nizvodne“ kaspaze (kaspaza -3, -6 i -7). Postoje dva puta apoptoze, spoljašnji i unutrašnji. Oba puta dovode do aktivacije efektorskih kaspaza, ali su inicijatorske kaspaze koje učestvuju u ova dva apoptotska puta različite [Thornberry i sar., 1998].

Spoljašnji apoptotski put aktiviraju tzv. „receptori smrti“, vezivanjem odgovarajućeg liganda (Fas/FasL, TNF-R/TNF i TRAIL-R/TRAIL). Nakon vezivanja liganda, receptor menja konformaciju što mu omogućava da interaguje sa adaptivnim proteinom FADD preko „domena smrti“ (eng. *death domain*, DD). Protein FADD preko efektornog domena DD interaguje sa istim tim domenima na inicijatorskim prokaspazama -8 i -10 formirajući „kompleks signala smrti“ (eng. *Death Inducing Signaling Complex*, DISC). U okviru DISC kompleksa se inicijatorske kaspaze aktiviraju i dalje pokreću kaskadu efektorskih kaspaza -3, -6 i -7 koje vode ćelijskoj smrti [Mudter i sar., 2007].

Unutrašnji put ćelijske smrti posredovan je familijom proteina Bcl-2 koja reguliše propustljivost mitohondrijske membrane. Proapoptotski proteini ove familije (Bax, Bad) u membrani mitohondrija formiraju jonske kanale kroz koje se citohrom c iz mitohondrija oslobađa u citoplazmu. Citohrom c zajedno sa Apaf-1 (eng. *apoptotic protease activating factor*, APAF) i prokaspazom-9 formira apoptozom. U ovom kompleksu kaspaza-9 se aktivira. Aktivirana kaspaza-9 svojom proteolitičkom aktivnošću aktivira efektorske kaspaze (-3, -6, -7). Antiapoptotski proteini (Bcl-2, Bcl-xL) vezivanjem proapoptotskih proteina sprečavaju formiranje jonskih kanala i oslobađanje citohroma c. Odnos između nivoa ekspresije pro- i anti-apoptotskih proteina familije Bcl-2 određuje da li će ćelija ući u apoptozu ili će biti rezistentna na apoptotski stimulus [Zimmermann i sar., 2001]. Na slici 3 dat je uprošćen šematski prikaz spoljašnjeg i unutrašnjeg puta apoptoze.



Slika 3. Spoljašnji i unutrašnji put aktivacije apoptoze.

Modifikovano iz rada de Vries E.G. i saradnika iz 2006. godine [de Vries i sar., 2006].

Poremećaj u regulaciji apoptoze mukoznih T ćelija i epitelijalnih ćelija igra važnu ulogu u patogenezi IBC. Ova hipoteza je podržana brojnim studijama koje su ispitivale najvažnije faktore u kontroli apoptotskih procesa – Bcl-2/Bax proteine, Fas/Fas ligand sistem i NF- κ B faktor preživljavanja [Neuman 2004].

1.1.3.1. Bcl-2 i Bax

Proteini Bcl-2 (eng. *B-cell CLL/lymphoma 2*) i Bax (eng. *Bcl2-associated X*) pripadaju Bcl-2 familiji evolutivno konzervisanih pro- i anti-apoptotskih proteina koji učestvuju u regulaciji unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze [Adams i sar., 1998]. Za sve članove Bcl-2 familije je karakteristično prisustvo jednog do četiri konzervisana Bcl-2 homologa domena, koji se nazivaju BH domeni. BH domeni omogućavaju stvaranje homo- i hetero-dimera između članova Bcl-2 familije proteina, što predstavlja njihov glavni mehanizam regulacije procesa apoptoze. Bcl-2 familija je podeljena u 3 podfamilije, a to su: antiapoptotska (Bcl-2, Bcl-xL i Mcl-1), proapoptotska (Bax i Bak) i „BH3 only“ podfamilija (Hrk, Bim, Bad i Bid) čiji članovi imaju ulogu senzora i aktivatora proapoptotskog puta. Antiapoptotski proteini pokazuju očuvanost sekvenci u sva četiri domena, dok proapoptotski obično nemaju BH4 amino-terminalni domen. Domen BH3 imaju svi članovi Bcl-2 familije, a činjenica da su svi oni koji sadrže samo ovaj domen („BH3 only“) proapoptotski, govori o njegovoj funkciji „domena smrti“ [Burlacu 2003].

U odsustvu signala smrti, proteini Bcl-2 i Bax su lokalizovani u različitim intraćelijskim odeljcima. Bcl-2 je integralni membranski protein lokalizovan na membranama mitohondrija, endoplazmatičnog retikuluma i jedarnoj membrani. Nasuprot njemu, Bax je lokalizovan u citosolu [Krajewski i sar., 1993; Wolter i sar., 1997]. Nakon unutrašnjeg signala za inicijaciju ćelijske smrti, a to su najčešće oštećenja u molekulu DNK, Bax menja konformaciju, integriše se u spoljašnju mitohondrijalnu membranu u vidu homodimera i formira kanale putem kojih citohrom c napušta mitohondrije [Shamas-Din i sar., 2013]. Protein Bcl-2 neutrališe proapoptotsko dejstvo proteina Bax formirajući sa njim heterodimere. Zbog ovog svojstva, relativni odnos pro- i anti-apoptotskih homodimera i heterodimera smatra se vrstom „ćelijskog reostata“ koji određuje ćelijski odgovor na dejstvo

apoptotskog stimulusa [Antonsson 2001]. Apoptotska funkcija Bcl-2 familije regulisana je na više nivoa - na nivou transkripcije gena, fosforilacijom i proteolizom nekih od članova ove familije (Bad i Bid) i njihovom translokacijom iz citosola u membranu mitohondrija. Takođe, homo- i hetero-dimerizacija članova Bcl-2 familije određuje njihovu funkciju u regulaciji apoptoze [Burlacu 2003].

Proteini Bcl-2 i Bax se eksprimiraju u mnogim tipovima ćelija, pa i u limfocitima i intestinalnim epitelijalnim ćelijama [Hockenbery i sar., 1991; Krajewski i sar., 1994]. Gen *Bcl-2* se nalazi na hromozomu 18 u regionu q21.3 (HGNC:990), a *Bax* na hromozomu 19 u regionu q13.3-q13.4 (HGNC:959). Alternativnom obradom primarnih transkripata ovih gena dobijaju se dve izoforme (α i β) proteina Bcl-2 i osam diferencijalno eksprimiranih izoformi (α , β , γ , δ , ω , ϵ , σ , ψ) proteina Bax [Tsujimoto i sar., 1986; Oltvai i sar., 1993; Apte i sar., 1995; Zhou i sar., 1998; Shi i sar., 1999; Cartron i sar., 2002]. Bcl-2- α i Bax- α su glavni proteinski produkti ekspresije ova dva gena.

Limfociti T u intestinalnoj mukozii zdravih ispitanika eksprimiraju povećan nivo proteina Bax u odnosu na limfocite periferne krvi [Itoh i sar., 2001]. U poređenju sa zdravim ispitanicima, pokazano je da limfociti T u mukozii pacijenata sa KB imaju značajno niži nivo ekspresije proteina Bax [Itoh i sar., 2001]. Ovo sniženje je rezultovalo u povećanom Bcl-2/Bax, kao i Bcl-xL/Bax odnosu, [Ina i sar., 1999; Itoh i sar., 2001] i koreliralo je sa izraženom otpornošću na višestruke apoptotske stimulse [Ina i sar., 1999]. U mukoznim T limfocitima pacijenata sa UK zabeležen je obrnut odnos pro- i anti-apoptotskih faktora, sa povećanim nivoom ekspresije proteina Bax, i smanjenim nivoom ekspresije proteina Bcl-2 [Ina i sar., 1999]. Ovi podaci pokazuju da u razvoju intestinalne inflamacije kod KB i UK učestvuju različiti apoptotski mehanizmi. Uloga Bcl-2 familije istražena je i u regulaciji apoptoze neutrofila kod obolelih od KB [Catarzi i sar., 2008]. *Catarzi* i saradnici ispitali su neutrofile poreklom od pacijenata sa KB, tako što su deo ćelija gajili u suspenziji, a deo u adherentnim uslovima rasta. Na taj način je simulirana funkcija neutrofila u cirkulaciji i intestinalnom tkivu. Rezultati su pokazali da je nivo apoptoze neutrofila gajenih u suspenziji smanjen, dok je nivo apoptoze adherirajućih neutrofila povećan i korelira sa povećanom ekspresijom proteina Bax. U svetlu patogeneze KB, autori ovaj rezultat tumače na dva načina

- s jedne strane, odložena apoptoza kod cirkulišućih neutrofila pacijenata može biti odgovorna za njihovu preteranu transmigraciju u inflamacijom zahvaćene regione intestinalnog tkiva; s druge strane, povećana apoptoza adherirajućih neutrofila ukazuje na nemogućnost ovih ćelija da se u intestinalnom tkivu efikasno izbore sa akutnom inflamacijom, što bi dalje moglo da uzrokuje regrutaciju imunskih ćelija odgovornih za stanje hronične inflamacije [Catarzi i sar., 2008].

Integritet intestinalne barijere je kod obolelih od IBC oslabljen [Edelblum i sar., 2006]. Zato je važno ispitati uticaj proteina Bcl-2 i Bax na proces apoptoze intestinalnih epitelijalnih ćelija kod pacijenata sa KB i UK. Suprotno očekivanjima, *Imura* i saradnici su pokazali da je kod pacijenata sa UK nivo ekspresije Bax značajno smanjen u epitelijalnim ćelijama obolelog intestinalnog tkiva [Imura i sar., 2000]. Smanjenje nivoa proteina Bax može biti posledica dejstva inflamatornih citokina koji nemaju samo ulogu u indukciji inflamacije, već i u zaštiti ćelije od apoptoze. Pokazano je da IL-6, citokin čiji je receptor eksprimiran na epitelijalnim ćelijama creva, može smanjiti ekspresiju gena *Bax* [Lotem i sar., 1995]. Detaljnija istraživanja su neophodna za bolje razumevanje uloge proteina Bcl-2 i Bax u apoptozi intestinalnih epitelijalnih ćelija kod pacijenata sa IBC.

1.1.3.2. Fas i FasL

Fas receptor (CD 95/APO-1) je transmembranski glikoprotein koji pripada TNF familiji receptora i ima ulogu u indukciji procesa apoptoze. Fas je protein koji je normalno eksprimiran na širokom spektru ćelija, ali pre svega na aktiviranim limfocitima T i B periferne krvi. Fas receptor vezuje Fas ligand (CD95L / FasL), koji ima vrlo ograničenu ekspresiju. Eksprimiran je isključivo u aktiviranim limfocitima T u perifernoj krvi, u citotoksičnim limfocitima T, monocitima, NK ćelijama, na ćelijama testisa i očiju [Nagata i sar., 1995a], a pokazano je da ga mogu eksprimirati i epitelijane ćelije creva [Moller i sar., 1996; O'Connell i sar., 1996; Bonfoco i sar., 1998]. Ovi proteini kodirani su genima *Fas* i *FasL*, koji se nalaze na hromozomima 10q24.1 i 1q23 (HGNC:11920, HGNC:11936).

Fas poseduje tri domena: ekstraćelijski domen bogat cisteinom koji vezuje FasL, transmembranski hidrofobni domen i intracelularni „domen smrti“, neophodan za

trimerizaciju receptora i indukciju apoptotskog signala [Krammer 2000]. Fas receptor može postojati i u solubilnoj ekstraćelijskoj formi, koja se dobija alternativnom obradom primarnog transkripta. U takvom obliku solubilni Fas štiti ćeliju od apoptoze, vezujući FasL u kompeticiji sa Fas membranskim receptorom [Cheng i sar., 1994]. FasL pokazuje homologiju u građi ekstracelularnog domena sa ostalim ligandima TNF familije, kao što su TNF- α , limfotoksin-alfa (LTA) i drugi.

Vezivanjem homotrimernog Fas liganda za tri Fas receptora na površini ciljne ćelije dolazi do aktivacije njihovih citoplazmatskih domena smrti, DD, i interakcije sa domenom DD proteina FADD. Ovo vodi formiranju DISC kompleksa i aktivaciji kaspaze-8. Dalja kaskada događaja podrazumeva aktivaciju kaspaze-3, ili proteolizu citosolnog proteina Bid. Protein Bid u svojoj kraćoj formi heterodimerizacijom inaktivira protein Bcl-2. Na taj način indirektno utiče na povećano oslobađanje citohroma c iz mitohondrija i kaskadu procesa koji dovode do aktivacije proteina kaspaze-9 [de Vries i sar., 2006]. Interakcija kaspaze-8 i proteina Bid predstavlja tačku ukrštanja spoljašnjeg i unutrašnjeg apoptotskog puta (slika 3). Ova signalna kaskada pokreće niz morfoloških i biohemijskih promena, koje se završavaju smrću ćelije [de Vries i sar., 2006].

Fas/FasL-regulisana apoptoza predstavlja normalan imunoregulatorni mehanizam za uklanjanje autoreaktivnih limfocita T u perifernim tkivima koji su zaobišli centralnu kontrolu autoreaktivnosti u timusu, uklanjanje aktiviranih limfocita B i T nakon ostvarenog imunskog odgovora, normalno obavljanje funkcije citotoksičnih limfocita T i održavanje homeostaze u broju limfocita kao balans između konstantne proliferacije i uklanjanja ćelija [Lynch i sar., 1995; Abbas 1996]. Gubitak funkcije, kao i povećana aktivnost Fas/FasL sistema dovode do pojave raznih malignih, autoimunskih i imunodeficijentnih poremećaja [Lynch i sar., 1995; Abbas 1996; Xu i sar., 2014].

Limfociti T lamine proprije zdravih ljudi pokazuju viši nivo Fas-posredovane apoptoze u poređenju sa limfocitima T periferne krvi, a apoptoza je dodatno povećana stimulacijom ćelija preko receptora CD2 (membranski protein limfocita uključen u međućelijske interakcije) [Boirivant i sar., 1996]. Indukcija apoptoze sistemom Fas/FasL predstavlja

mehanizam kojim se reguliše aktivnost i ograničava ekspanzija limfocita T u neizmenjenom, fiziološkom stanju intestinalnog tkiva. Kod pacijenata sa IBC pokazano je da intestinalni limfociti T u patološki izmenjenom tkivu ekspimiraju istu količinu receptora Fas kao i limfociti u tkivu kontrolnih ispitanika, ali su zato manje senzitivni na Fas-indukovanu apoptozu. Stimulacija CD2 puta dodatno povećava preživljavanje limfocita, a ovaj poremećaj praćen je povišenim nivoom ekspresije proteina Bcl-2 [Boirivant i sar., 1999]. Dalja istraživanja pokazala su da je kontrola Fas-posredovane signalizacije kod KB narušena kao posledica povećane aktivnosti proteina FLIP, inhibitora kaspaze-8 [Sturm i sar., 2004; Monteleone i sar., 2006], što nije slučaj kod UK. U poređenju sa UK, kod pacijenata sa KB limfociti u patološki izmenjenom tkivu brže prolaze kroz ćelijski ciklus, imaju snižen nivo fosforilisanog proteina p53, odražavaju manju aktivnost kaspaza, a veću aktivnost telomeraza, imaju smanjenu stopu ćelijske smrti i sposobnost intezivne ćelijske ekspanzije [Sturm i sar., 2004]. Podaci ukazuju da postoji dihotomija između ove dve patologije, u kojoj je KB asocirana sa hiper-, a UK sa hipo-reaktivnošću mukoznih limfocita T.

Povećani proapoptotski procesi u intestinalnim epitelijalnim ćelijama pacijenata sa KB i UK, dovode do disfunkcije intestinalne barijere, što omogućava prodor raznih antigena (toksina, antigena iz hrane, bakterijskih antigena, itd.) u submukozne delove crevnog zida. U nekoliko gastrointestinalnih inflamatornih oboljenja kao što su celijakna bolest, gastritis i UK, odavno je prepoznat doprinos Fas/FasL sistema u procesima prekomerne apoptoze intestinalnih epitelijalnih ćelija [Strater i sar., 1997; Koyama 2000; Ciccocioppo i sar., 2001]. Uloga Fas/FasL sistema u patogenezi UK je u međuvremenu dovedena u pitanje [Seidelin i sar., 2008], pogotovo nakon što je ispitivanjem mišjeg modela kolitisa pokazano da ovaj sistem ima protektivnu ulogu [Park i sar., 2010]. Iako je jedna studija pokazala da Fas/FasL ne učestvuje u indukciji apoptoze epitelijanih ćelija creva kod pacijenata sa KB, potrebno je detaljnije ispitati njegovu ulogu u ovom procesu [Di Sabatino i sar., 2003].

Opisani apoptotski mehanizmi jasno sugerišu da je za sprečavanje hroničnih inflamatornih procesa u intestinalnoj mukozi važno očuvanje procesa programirane ćelijske smrti.

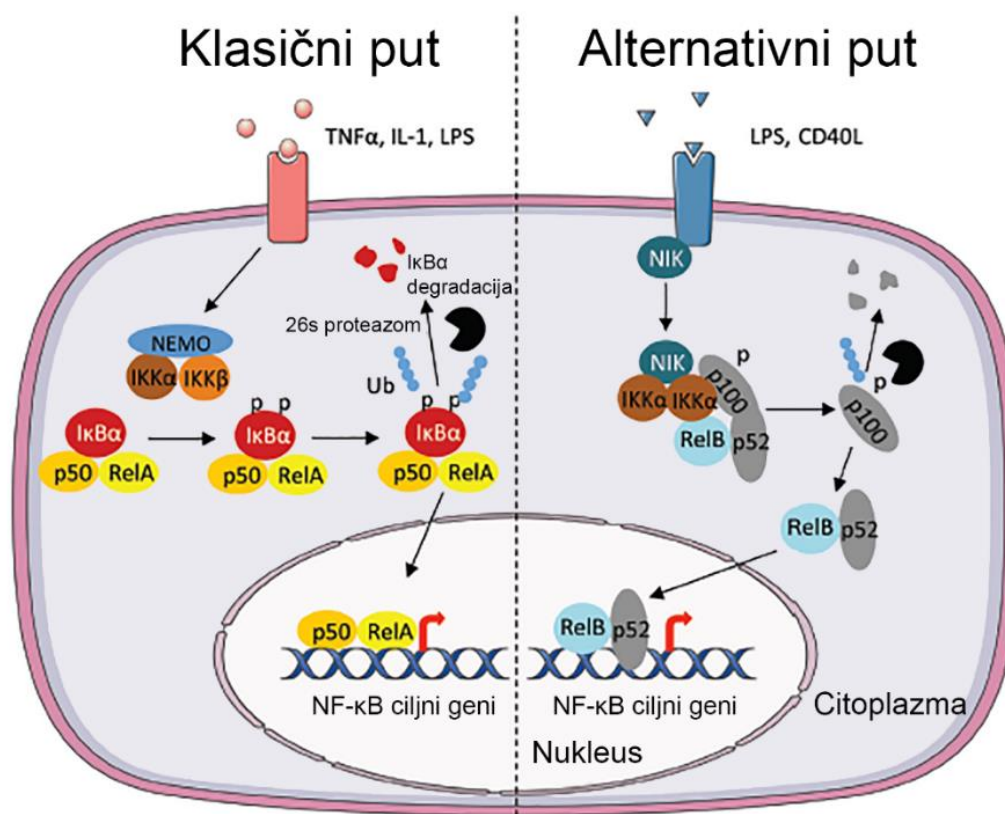
1.1.3.3. Uloga citokina u modulaciji apoptotskih procesa kod IBC

Citokini TNF- α i IL-6 regulišu apoptotske procese u ćelijama. Poznato je da IL-6 povećava preživljavanje ćelija preko regulatornog proteina STAT3 koji aktivira ekspresiju antiapoptotskih gena *Bcl-2* i *Bcl-xL* [Atreya i sar., 2000; Ito i sar., 2002]. Takođe, signalni put STAT indukovani IL-6 ima antiapoptotski efekat tako što smanjuje ekspresiju gena *Fas* [Ivanov i sar., 2001]. TNF- α ima dvostruki efekat na život ćelije - može indukovati njenu smrt ili povećati njeno preživljavanje. Transmembranski TNF- α ima visok afinitet prema receptoru TNFR2 i vezivanjem za njega indukuje antiapoptotske procese posredstvom regulatornog proteina NF- κ B. S druge strane, solubilni TNF- α se primarno vezuje za TNFR1 koji uglavnom aktivira proapoptotske signale na sličan način kao i receptori smrti [Varfolomeev i sar., 2004]. Da li će TNF- α izazvati apoptozu ili preživljavanje ćelije zavisi od drugih pro- i anti-apoptotskih faktora u ćeliji. Istraživanja koja su ispitivala efekat leka infliksimaba kod pacijenata sa IBC pokazala su da je antiinflamatorni i proapoptotski efekat ovog leka većim delom posledica njegove sposobnosti da inhibira membransku formu TNF- α . Apoptotski efekat infliksimaba bio je vidljiv u aktiviranim T limfocitima na mestu inflamacije, ali ne i u T limfocitima periferne krvi [ten Hove i sar., 2002; Di Sabatino i sar., 2004]. Ovaj podatak ukazuje da je uticaj TNF- α na regulaciju apoptotskih procesa u imunskim ćelijama različit na sistemskom i lokalnom nivou inflamacije.

1.1.4. Uloga NF- κ B u razvoju IBC

Familija proteina nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B) sastoji se od 5 članova - p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50 i p52. Svi članovi karakterišu se strukturno konzervisanim N-terminalnim regionom od 300 aminokiselina koji sadrži domene odgovorne za dimerizaciju, nuklearnu lokalizaciju i domen za vezivanje sa molekulom DNK [Siebenlist i sar., 1994]. Među njima, jedino p65, c-Rel i RelB mogu da aktiviraju transkripciju ciljnih gena [Pereira i sar., 2008]. Proteini p50 i p52 (inicijalno sintetisani kao prekursori p105 i p100) svoje biološko dejstvo kao aktivatora transkripcije ispoljavaju u formi heterodimera sa proteinima p65, c-Rel i RelB, a u formi homodimera predstavljaju represorne regulatore transkripcije. U nestimulisanim ćelijama, većina NF- κ B dimera je zadržana u citoplazmi kroz asocijaciju sa inhibitornim

molekulima I κ B α , I κ B β ili I κ B ϵ . Postoje dva različita intracelularna puta aktivacije NF- κ B - klasični i alternativni put, i oba rezultuju u oslobađanju NF- κ B od inhibitora i nuklearnoj translokaciji [Bonizzi i sar., 2004] (slika 4).



Slika 4. Klasični i alternativni put aktivacije NF- κ B.

Modifikovano iz rada Viennois E. i saradnika iz 2013. godine [Viennois i sar., 2013]

Klasična NF- κ B aktivacija može biti izazvana širokim spektrom stimulusa, uključujući komponente bakterijskog zida kao što je LPS i proinflamatorne citokine (TNF- α i IL-1). Alternativni put aktiviraju određeni članovi TNF familije citokina, ali ne i TNF- α . Preko TNFR i TLR-IL-1R superfamilije receptora inicira se signalna kaskada koja dovodi do aktivacije I κ B kinaznog kompleksa (IKK), sastavljenog od dve katalitičke subjedinice, IKK α i IKK β , i regulatornog proteina IKK γ (NEMO) [Zandi i sar., 1997; Li i sar., 2001]. Obe

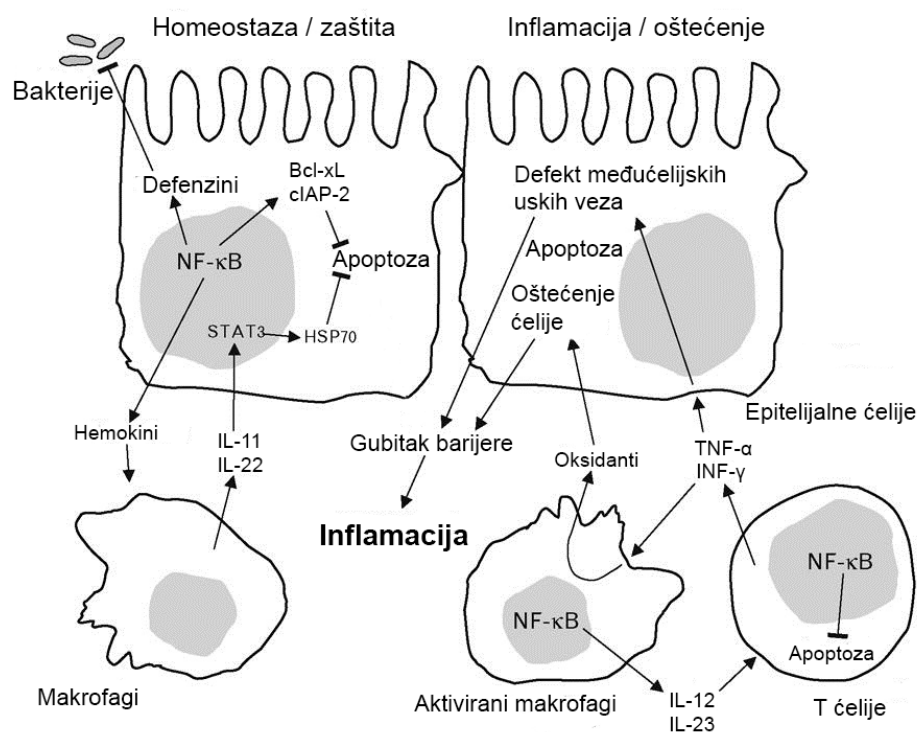
katalitičke jedinice mogu da fosforilišu specifične serinske ostatke u molekulu I κ B, dok NEMO ima ulogu adapternog proteina. U slučaju klasične aktivacije, ovaj proces je dominantno posredovan IKK β i zavistan od NEMO. Fosforilacijom I κ B inicira se njegova proteolitička razgradnja, a dimeri NF- κ B (u klasičnom putu najčešće p65/p50) translociraju se u nukleus. Nasuprot klasičnoj, NEMO nije neophodan za alternativnu aktivaciju, a umesto IKK β , glavnu ulogu u ovom procesu ima IKK α [Bonizzi i sar., 2004]. U alternativnom putu, fosforilacija prekursora p100 ne dovodi do njegove potpune degradacije, već ga prevodi u formu p52, a on najčešće kao RelB/p52 dimer biva translociran u nukleus. Dimeri NF- κ B se na način specifičan od sekvence vezuju za regulatorne elemente na molekulu DNK i indukuju ekspresiju ciljnih gena. Geni čija je transkripcija regulisana faktorom NF- κ B mogu biti kategorisani u četiri funkcionalne grupe: inflamatorni i imunoregulatorni geni, geni čiji proteinski produkti učestvuju u procesima regulacije ćelijskog ciklusa, antiapoptotski geni i geni koji kodiraju negativne regulatore NF- κ B [Greten i sar., 2004].

Protein NF- κ B je glavni regulator transkripcije gena čiji produkti učestvuju u kompleksnom sistemu interakcije između intestinalnih epitelijalnih ćelija, limfocita i makrofaga [Wullaert i sar., 2011]. Ekspresija i aktivacija NF- κ B je snažno indukovana u tkivu zahvaćenom inflamacijom kod pacijenata sa IBC. Naime, makrofagi i epitelijalne ćelije izolovane iz intestinalnog tkiva pacijenata imaju povećan nivo ekspresije proteina p65. Šta više, analize pokazuju da NF- κ B nije samo povećano ekspimiran u ovim ćelijama, već se nalazi u stanju aktivacije. Takođe, količina aktiviranog NF- κ B značajno korelira sa stepenom inflamacije intestinalnog tkiva [Rogler i sar., 1998]. Postoje podaci da fibroblasti lamine proprije imaju ulogu u razvoju IBC regulisanu proteinom NF- κ B [Gelbmann i sar., 2003]. Zbog različite uloge i funkcije makrofaga, epitelijalnih ćelija i fibroblasta u mukoznom imunitetu, kao i širokom spektru gena koje NF- κ B aktivira, neophodno je definisati NF- κ B-posredovane efekte specifične za svaki tip ćelija koje doprinose patogenezi IBC.

Centralna uloga NF- κ B u imunskim ćelijama je indukcija i kontrola ekspresije proinflamatornih citokina kao što su TNF- α , IL-6 i IL-1. U prilog ovome ide značajno smanjenje produkcije pomenutih citokina nakon primene *antisens* oligonukleotida specifičnih za p65 iRNK u makrofagima pacijenata sa IBC [Neurath i sar., 1998].

Predominantni efekat sintetisanih citokina je dalja stimulacija, aktivacija i diferencijacija imunskih ćelija lamine proprije, čime se održava stanje neprekidne inflamacije u intestinalnom tkivu. Ovi citokini mogu dodatno da aktiviraju NF- κ B, u vidu pozitivne povratne sprege [Pereira i sar., 2008].

Uloga NF- κ B u održavanju intestinalne homeostaze je višestruka i nije ograničena samo na regulaciju proinflamatornih procesa (slika 5). Studije na različitim životinjskim modelima demonstrirale su antiinflamatornu funkciju NF- κ B u epitelijalnim ćelijama kolona. Naime, kod *knockout* miševa za regulator NEMO inhibirana je aktivacija NF- κ B, što je dovelo do spontanog razvoja teške hronične inflamacije creva. Intestinalne epitelijalne ćelije ovih transgenih životinja pokazale su povećan nivo apoptoze i smanjenu produkciju antimikrobnih peptida. Ovaj nedostatak izazvao je smanjen integritet epitelijalne barijere, prodor invazivnih bakterija i pojačavanje imunskog odgovora [Nenci i sar., 2007]. NF- κ B štiti ćelije od smrti indukovane dejstvom TNF- α [Wang i sar., 1998], pa intestinalne epitelijalne ćelije kojima nedostaje aktivacija NF- κ B lakše podležu apoptozi [Wullaert i sar., 2011]. Takođe, pokazano je da miševi, kojima je u crevnom epitelu specifično isključen IKK β , imaju izmenjen Th2 odgovor i ne uspevaju da eliminišu parazitsku infekciju kojoj su izloženi. Ovi miševi pokazuju veću produkciju Th1/Th17 proinflamatornih citokina i razvijaju hroničnu intestinalnu inflamaciju [Zaph i sar., 2007]. Oba modela pokazuju da NF- κ B ima esencijalnu regulatornu ulogu u održavanju epitelijalnog integriteta i intestinalne homeostaze.



Slika 5. Funkcije NF- κ B u procesima intestinalne homeostaze i inflamacije. Šema predstavlja uprošćeni pregled glavnih funkcija NF- κ B u uslovima homeostaze (levo) i oštećenja (desno) intestinalnog tkiva. U fiziološkim uslovima NF- κ B predominantno indukuje transkripciju antimikrobijalnih i antiapoptotskih produkata u epitelijalnim ćelijama creva. U toku hronične inflamacije NF- κ B predominantno indukuje produkciju citokina i antiapoptotskih faktora u makrofagima i T ćelijama. Modifikovano iz rada *Spehlmann M.E.* i saradnika iz 2009. godine [Spehlmann i sar., 2009].

1.1.5. Kronova bolest i reumatoidni artritis kao granulatozne bolesti

Jedna od karakteristika KB je formiranje limfoidnih mikrostrukture, zvanih granulomi. Granulomi predstavljaju sferični kompleks makrofaga i drugih inflamatornih ćelija, kao što su limfociti i dendritske ćelije, koje okružuju infektivni agens. Frekvencija granuloma kod pacijenata sa KB varira. Njihovo prisustvo detektovano je u biopsiranom tkivu 15 - 36% pacijenata [Keller i sar., 1990], i u 40 - 60% odstranjenih intestinalnih segmenata pacijenata sa hirurškim tretmanom [Wolfson i sar., 1982]. Uloga i značaj ove specifične histološke formacije i dalje je nepoznata. Jedna od hipoteza definiše granulome kao mesta prodora etiološkog agensa, gde je došlo do specifikacije i diferencijacije Th1 limfocita [Kakazu i sar., 1999]. Zbog nemogućnosti imunskog sistema da se efikasno reši infekcije, imunske ćelije

enkapsuliraju ugrožavajući agens kako se ne bi dalje širio. Vremenom, ćelije bivaju privučene preko hemokina i citokina ovim inicijalnim formacijama, granulomi sazrevaju i rezultuju fuzijom makrofaga i dendritskih ćelija koje formiraju multinuklearne džinovske ćelije. [Molnar i sar., 2005]. Nije puno istraživanja urađeno na temu granuloma kod KB, ali postoje indikacije da se njihovo prisustvo može koristiti kao prognostički marker ove bolesti [Markowitz i sar., 1989; Ramzan i sar., 2002; Molnar i sar., 2005]. Pored KB, u ovaj tip bolesti spadaju i tuberkuloza, sarkoidoza, reumatoidni artritis, i druge [Perez i sar., 2003].

Reumatoidni artritis (RA) je hronično inflamatorno oboljenje koje uglavnom zahvata zglobove, ali može zahvatiti i druge organe. Inflamacija počinje u sinovijalnoj membrani - opni koja oblaže unutrašnjost zgloba i koja obezbeđuje ishranu zglobne hrskavice i stvaranje zglobne tečnosti [Burmester i sar., 2014]. Inicijalni uzrok ovih inflamatornih promena je još uvek nepoznat i pretpostavlja se da je izazvan nekim infektivnim agensima [Terato i sar., 2015]. Potpuno manifestovana bolest se odlikuje procesima oštećenja tkiva koji izazvaju aktivirani makrofagi i T ćelije, i ekspresijom proinflamatornih citokina među kojima su IL-6 i TNF- α [Burmester i sar., 2014]. Kod pacijenata sa RA, povećan nivo IL-6 se povezuje sa lošijom kliničkom slikom [Dasgupta i sar., 1992], a primena anti-IL-6 lekova značajno doprinosi poboljšanju kliničkih simptoma [Choy i sar., 2002]. Ispitivanjem nasledne osnove RA ustanovljeno je da ova bolest deli genetičke faktore rizika sa KB [Richard-Miceli i sar., 2012]. Pacijenti sa RA, kao i pacijenti sa KB, razvijaju granulomatozne strukture, tzv. reumatoidne čvoriće [Ziff 1990]. Ove vanzglobne manifestacije se javljaju kod 20 - 30% pacijenata i mogu se formirati u potkožnom tkivu, mestima lokalnog pritiska iznad koštanih prominencija, ali i u unutrašnjim organima. Analizom citokinskih profila u reumatoidnim čvorićima ustanovljeno je da su ove strukture granulomi za koje je specifičan Th1 inflamatorni odgovor [Hessian i sar., 2003].

Najviše znanja o granulomima potiče iz istraživanja model sistema infekcije *M. tuberculosis*. Studije na TNF- α -deficijentnim miševima pokazale su da ovi miševi imaju mnogo težu infekciju izazvanu *M. tuberculosis* zbog poremećaja u formiranju granuloma i lakšeg širenja patogena [Bean i sar., 1999]. Pored TNF- α , na optimalnu funkciju granuloma utiču citokini Th1 i Th17 ćelijskog odgovora, kao što su IFN- γ i IL-6 [Christophi i sar., 2014]. Pokazano

je da humani monociti tretirani sa IFN- γ razvijaju multinuklearnost [Weinberg i sar., 1984], kao i da se fuzija dendritskih ćelija u jednom tipu granulomatozne bolesti, tzv. histiocitozi Langerhansovih ćelija, dešava pod dejstvom citokina IL-17A i IFN- γ [Coury i sar., 2008].

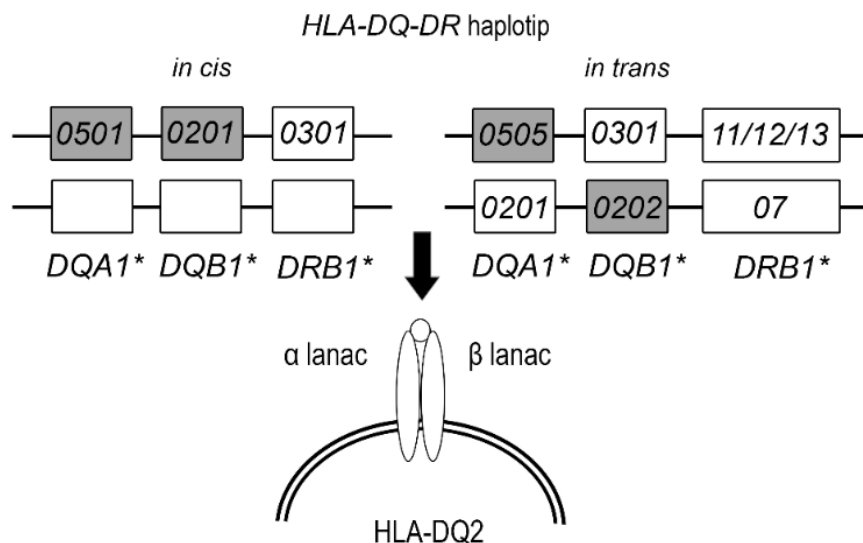
1.2. Celijačna bolest

Celijačna bolest (CB) je hronična inflamatorna bolest tankog creva izazvana unosom glutena. Za sada jedini efektivni tretman ove bolesti predstavlja stroga doživotna dijeta hranom bez glutena. Procenjena prevalenca CB je oko 1% u belim populacijama [Fasano i sar., 2003; Mustalahti i sar., 2010], a smatra se da je procenat veći, s obzirom da je veliki broj slučajeva nedijagnostikovani. Ranije se smatralo da se CB razvija isključivo kod dece, ali zbog rastućeg broja adultnih slučajeva, danas se smatra bolešću svih uzrasta [Leeds i sar., 2008]. CB je dva puta češća kod žena u poređenju sa muškarcima. Veća učestalost CB među bliskim rođacima pacijenata (prevalenca 3 - 17%) i visoka konkordantnost među monozigotnim blizancima (~75%) naglašavaju jak doprinos genetičkih faktora u razvoju ove bolesti [Greco i sar., 2002; Esteve i sar., 2006].

CB ima multifaktorijalnu prirodu. Glutenski makromolekuli predstavljaju kritični sredinski faktor, dok određene varijante gena *HLA-DQ*, a u manjoj meri i drugih gena, predstavljaju genetičke faktore koji nose rizik za razvoj bolesti [Greco i sar., 2002]. Pacijenati sa CB imaju oslabljen integritet intestinalne barijere, tako da teško svarljiva komponenta glutena, gliadin, prolazi kroz epitel creva i interaguje sa antigen prezentujućim ćelijama u lamini proprijii [Lionetti i sar., 2011]. CD4⁺ T ćelije prepoznaju glutenske peptide vezane za proteinske molekule HLA-DQ2 i HLA-DQ8 koji se nalaze na površini antigen prezentujućih ćelija, i indukuju imunsku reakciju [Lionetti i sar., 2011].

Rezultati velikog broja studija pokazali su da oko 90 - 95% pacijenata sa CB ekspirira protein HLA-DQ2, a skoro svi ostali ekspiriraju protein HLA-DQ8 [Karell i sar., 2003; Margaritte-Jeannin i sar., 2004]. Ovi proteini su kodirani visoko polimorfnim genima *HLA-DQA1* i *HLA-DQB1* koji se nalaze u lokusu *MHC II* na hromozomu 6, u regionu p21.3 (HGNC:4942, HGNC:4944). Gen *HLA-DQA1* kodira α lanac, dok *DQB1* kodira β lanac proteina HLA-DQ. Među alelima gena *HLA* postoji jaka gametska neravnoteža u

nasleđivanju (LD), i oni formiraju jasno definisane haplotipove. Protein HLA-DQ2 je kodiran alelima *DQA1*05* i *DQB1*02* koji se mogu nalaziti na istom hromozomu u okviru haplotipa *DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02* (tzv. *in cis* konfiguracija) ili na različitim hromozomima, najčešće u okviru haplotipova *DRB1*11/12/13-DQA1*05-DQB1*03:01* i *DRB1*07-DQA1*02-DQB1*02* (tzv. *in trans* konfiguracija) (slika 6). DQ8 protein je kodiran alelima *DQA1*03* i *DQB1*03:02*, u okviru haplotipa *DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03:02*. Pokazano je da među nosiocima HLA-DQ2, homozigoti za alel *DQB1*02* imaju povećan rizik za razvoj CB [Clerget-Darpoux i sar., 1994; Vader i sar., 2003]. Takođe, homozigotnost alela koji formiraju *HLA-DQ2* asocirana je sa razvojem ozbiljnih komplikacija kod ove bolesti, što ukazuje na efekat „genske doze“ [Al-Toma i sar., 2006]. Prisustvo navedenih *HLA-DQ* varijanti je neophodno, ali ne i dovoljno za razvoj CB, s obzirom da 25 - 40% opšte populacije nosi ove genotipove i ne razvija bolest [Green i sar., 2007]. Zbog toga što varijante gena *HLA-DQ* pokazuju jaku asocijaciju sa pojavom bolesti, *HLA* genotipizacija se rutinski radi kao genetički test za CB. Prisustvo rizičnih varijanti gena *HLA-DQ* ne može da predvidi siguran razvoj bolesti, ali njihovo odsustvo čini CB malo verovatnom, sa negativnom prediktivnom vrednošću od skoro 100% [Kaukinen i sar., 2002; Wolters i sar., 2008].



Slika 6. *HLA-DQ* kodiranje. HLA-DQ2 heterodimerni protein može biti kodiran varijantama *DQA1*05* i *DQB1*02* na istom hromozomu („*in cis*“), ili na različitim hromozomima („*in trans*“).

2. CILJEVI

Kronova bolest (KB), ulcerozni kolitis (UK) i celijačna bolest (CB) su hronične inflamatorne bolesti creva sa preklapajućom etiologijom. Poznato je da najveći genetički udeo u patogenezi CB imaju geni lokusa *HLA*, dok naslednu komponentu u nastanku KB i UK deli veći broj gena. Genetički faktori rizika koji doprinose razvoju KB i UK su najčešće promene u genima čiji proteinski produkti učestvuju u održavanju intestinalne homeostaze. Do sada su varijante u genu *NOD2* pokazale najjaču asocijaciju sa KB. KB spada u bolesti granulomatoznog tipa, u koje se ubraja i reumatoidni artritis (RA). Pokazano je da iste genetičke varijante mogu biti faktori rizika za nastanak KB i RA. Bez obzira na inicijalni uzrok, oštećenje intestinalne mukoze nastaje kao posledica deregulacije dva procesa, inflamacije i apoptoze, zbog čega su istraživanja usmerena ka molekularnoj karakterizaciji ovih procesa izuzetno aktuelna. Navedena istraživanja dala bi bolji uvid u molekularnu patogenezu hroničnih inflamatornih bolesti creva. Pored toga, identifikovali bi se genetički i ekspresioni markeri za predviđanje i dijagnozu ovih bolesti. Takođe, ustanovljeni biomarkeri bi omogućili da se pacijenti molekularno klasifikuju, što bi moglo da doprinese preciznijoj prognozi i boljem terapijskom pristupu.

S tim u vezi, ciljevi postavljeni u ovoj tezi su:

1. Ispitivanje asocijacija odabranih genetičkih varijanti sa rizikom za pojavu hroničnih inflamatornih bolesti creva i ispitivanje njihovog prediktivnog značaja. Ovaj cilj biće ostvaren kroz sledeće faze:

- Ispitivanje asocijacija varijanti u genima *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC, Arg684Trp), *TLR4* (Asp299Gly, Thr399Ile), *TNF- α* (G-308A, G-238A), *IL-6* (G-174C), *IL-1 β* (C-511T) i *IL-1RN* (intron 2 VNTR) sa pojavom KB i UK.
- Ispitivanje kvaliteta modela za predikciju KB i UK, baziranim na rezultatima genotipizacije.
- Ispitivanje asocijacije genetičke varijante *IL-6* G-174C sa inflamatornim bolestima granulomatoznog tipa u koje spadaju KB i RA.

- Ispitivanje distribucije genotipova *HLA-DQ* kod pacijenata sa CB i definisanje rizika za pojavu CB koji određeni genotipovi nose.
2. Analiza nivoa ekspresije inflamatornih i apoptotskih gena kod pacijenata sa KB, u cilju definisanja njihove uloge u patogenezi bolesti i ispitivanja dijagnostičkog potencijala. Ovaj cilj biće ostvaren kroz sledeće faze:
- Identifikovanje biomarkera lokalne inflamacije kod pacijenata u aktivnoj fazi KB određivanjem nivoa ekspresije proinflamatornih (*IL-6*, *TNF- α*) i apoptotskih gena (*Bcl-2*, *Bax*, *Fas*, *FasL*) u inflamacijom zahvaćenoj i nezahvaćenoj mukozi sa različitog intestinalnog lokaliteta (kolon i ileum).
 - Identifikovanje biomarkera sistemske inflamacije kod pacijenata u aktivnoj fazi KB određivanjem nivoa ekspresije prethodno navedenih proinflamatornih i apoptotskih gena u mononuklearnim ćelijama periferne krvi.
3. Ispitivanje DNK vezujuće aktivnosti regulatornog proteina NF- κ B iz jedarnih ekstrakata intestinalne mukoze pacijenata u aktivnoj fazi KB i poređenje inteziteta formiranih NF- κ B-DNK kompleksa između pacijenata koji nose ređi i učestaliji genotip *NOD2*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

U ovu studiju je bilo uključeno ukupno 167 pacijenata sa IBC. Od toga, 72 pacijenta je obolelo od KB, a 95 od UK. Uzorci periferne krvi i intestinalnog tkiva, kao i klinički parametri bolesti ovih pacijenata obezbeđeni su u saradnji sa Odeljenjem za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog centra Srbija (KCS), u Beogradu.

Od svakog pacijenta sa IBC su tokom endoskopskog pregleda uzimane dve biopsije - iz mukoze zahvaćene inflamacijom i mukoze koja nije zahvaćena inflamacijom, sa istog intestinalog lokaliteta. Uzorkovano tkivo se odmah uranjalo u rastvor *Allprotect Tissue Reagent (Qiagen, Hilden, Germany)*, koji je namenjen stabilizaciji RNK i očuvanju nativnih proteina do njihove izolacije. Biopsijom se dobijalo oko 8 - 15 mg intestinalnog tkiva koje je čuvano u 200 µl navedenog rastvora. Uzorci su inkubirani preko noći na 4°C i dalje čuvani na -20°C. Od pacijenata je takođe uzimana periferna krv koja je mešana sa 3.8% natrijum citratom kao antikoagulansom, u zapreminskom odnosu 9:1. Iz krvi su izolovane mononuklearne ćelije, koje su čuvane u *Tri Reagent* rastvoru (*Ambion, Austin, TX, USA*) na -80°C. Iz mononuklearnih ćelija je izolovana RNK. Deo uzorka krvi je korišćen za izolaciju DNK.

Kontrolanu grupu je činio 101 zdrav ispitanik, regrutovan sa više različitih lokacija u Beogradu. Od ovih ispitanika je uzimana krv za izolaciju DNK. Jedan broj kontrolnih ispitanika, njih 38, činili su ispitanici kod kojih je na endoskopskom pregledu isključena IBC, kao i druge inflamatorne bolesti. Ovi ispitanici su predstavljali kontrolnu grupu u analizi nivoa genske ekspresije i analizi DNK-proteinskih interakcija. Biopsije intestinalnog tkiva i krv ovih ispitanika su prikupljeni i tretirani na isti način kao i uzorci pacijenata. Kontrolna grupa ispitanika bila je usklađena po polu i uzrastu sa grupom pacijenata.

Ova studija je takođe uključila 73 dece obolele od CB. Uzorci i klinički parametri ovih pacijenata su obezbeđeni u saradnji sa Odeljenjem za gastroenterološke i nutritivne poremećaje, Univerzitetske dečje klinike (UDK) u Beogradu. Od dece sa CB je uzimana periferna krv iz koje je izolovana DNK. Za ovaj deo istraživanja, prikupljeni su uzorci krvi

62 zdrava ispitanika koja su činila kontrolnu grupu. Kod jednog broja kontrolnih ispitanika (n = 36), prisustvo CB je bilo i endoskopski isključeno.

Studija je obuhvatila i grupu od 77 ispitanika obolelih od reumatoidnog artritisa (RA). Uzorci ovih pacijenata su prikupljeni u Institutu za reumatologiju, Medicinskog fakulteta, u Beogradu. Od ispitanika je uzimana periferna krv, koja je korišćena za izolaciju DNK.

Studija je odobrena od strane Etičkih komiteta KCS i UDK. Od svih učesnika u studiji dobijena je saglasnost, a ukoliko su ispitanici bili maloletni, saglasnost je dobijena od staratelja.

3.2. Metode korišćene za detekciju genetičkih varijanti ispitivanih u studiji

Za detekciju genetičkih varijanti izučavanih u ovoj studiji korišćena je metoda PCR-RFLP (eng. *Polimerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism*), i metoda PCR-SSP (eng. *PCR with sequence specific primers*) praćena fragment analizom. Ovim metodama je prethodila izolacija DNK iz uzoraka periferne krvi pacijenata i zdravih ispitanika.

3.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi

Izolacija DNK isoljavanjem

Na dno mikrotube od 1.5 ml dodavano je 300 - 400 µl periferne nekoagulisane krvi i 700 µl pufera ELB (eng. *Erythrocyte Lysis Buffer*; 10.95% saharoza, 0.01 M tris-HCl pH = 7.5, 0.01% Triton X, 0.005 M MgCl₂), a zatim su se krv i pufer dobro mešali nastavkom. Smeša je centrifugirana na 13000 rotacija po minuti (rpm), 30 s, na sobnoj temperaturi (ST). Nakon centrifugiranja, beli talog rastvaran je sa dodatnih 1000 µl pufera ELB, a onda je centrifugiran na 13000 rpm, 30 s, na sobnoj temperaturi (ST). Leukociti u formiranom talogu lizirani su sa 300 µl pufera LLB (eng. *Leukocyte Lysis Buffer*; 0.01 M tris-HCl pH = 8.0, 0.4 M NaCl, 0.002 M Na₂EDTA, pH=8). Nakon toga, dodavano je 20 µl 10% SDS i 20 µl proteinaze K (1mg/ml). Nakon temeljnog mešanja na vorteksu, suspenzija je inkubirana 45 min do 1 h na 56°C. Posle inkubacije je dodavano 120 µl 5 M NaCl i smeša je vorteksovana i centrifugirana na 13000 rpm, 3 min. Supernatant se zatim prebacivao u nove 1.5 ml mikrotube i dodavan je 1 ml apsolutnog etanola sa višestrukim invertovanjem mikrotube. Posle centrifugiranja na

13000 rpm, 2 min, supernatant se odlivao, a DNK talog prelivao sa 1 ml 70% etanola sa višestrukim invertovanjem mikrotube. Nakon centrifugiranja na 13000 rpm, 2 min, supernatant je odlivan a talog sušen i rastvaran u 100 µl destilovane vode. Rastvori izlovene DNK su se do dalje upotrebe čuvali na -20°C.

Izolacija DNK na koloni

Izolacija DNK na koloni vršena je prema uputstvu proizvođača kolona [*QIAamp DNA Mini Kit - Qiagen*].

Na dno mikrotube od 1.5 ml dodavano je 20 µl *Qiagen* proteaze K, 200 µl pune periferne krvi, 200 µl pufera AL, nakon čega su promešani vorteksovanjem. Smeša je zatim inkubirana u vodenom kupatilu 10 min na 56°C. Nakon dodavanja 200 µl 100% etanola, smeša je vorteksovana. Ovako pripremljen uzorak je nanošen na *QIAamp Mini spin* kolonu i centrifugiran na 8000 rpm, 1 min, kako bi se DNK vezala za kolonu, a eluat je odbacivan. Na kolonu je zatim nanošeno 500 µl pufera AW1 i kolona je centrifugirana na 8000 rpm, 1 min, kako bi se DNK koja je vezana za kolonu isprala od nečistoća, dok je eluat odbacivan. Ispiranje vezane DNK je ponovljeno sa 500 µl pufera AW2, nakon čega je kolona centrifugirana na 13000 rpm, 3 min, a eluat odbacivan. Nakon toga, kolona je prebacivana u novu mikrotubu i ponovo centrifugirana na istoj brzini u toku 1 min. Kolona je na kraju prebacivana u čistu, 1.5 ml mikrotubu. DNK je spirana sa kolone dodavanjem 200 µl AE pufera za eluciju. Kolona je inkubirana 1 min na ST, a zatim je centrifugirana na 8000 rpm, 1 min. Dobijeni eluat u kome je rastvorena DNK je čuvan do daljnjeg na -20°C.

Prinos i čistoća izolovane DNK su mereni na spektrofotometru *NanoVue (GE Healthcare Life sciences, Amersham, UK)*, po uputstvu za rad na aparatu.

3.2.2. Analiza DNK na agaroznom gelu

Analiza DNK je vršena elektroforezom na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (2 - 4%). U gelove je pre polimerizacije dodavan etidijum bromid (finalne koncentracije 0.7 µg/mL). Elektroforeza je vršena u TAE puferu (40 mM Tris, 20 mM sirćetna kiselina, 1 mM Na₂EDTA), pri naponu od 5 V/cm i amperaži od 5 A/cm.

Vizuelizacija DNK vršena je osvetljavanjem gela UV svetlom na CCD kameri sa *BioDocAnalyze* sistemom. Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćeni su odgovarajući komercijalni DNK markeri.

3.2.3. Identifikacija varijanti u genima *NOD2*, *TLR4*, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* i *IL-1RN*

Varijante u genima *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC, Arg684Trp), *TLR4* (Asp299Gly, Thr399Ile), *TNF- α* (G-308A, G-238A), *IL-6* (G-174C) i *IL-1 β* (C-511T) u ovoj studiji su ispitivane PCR-RFLP metodom, dok je varijanta u genu *IL-1RN* (intron 2 VNTR) analizirana PCR reakcijom.

Parovi prajmera korišćenih za umnožavanje sekvenci koje sadrže ispitivane genetičke varijante navedeni su u tabeli 1.

Tabela 1. Prajmeri korišćeni za detekciju genetičkih varijanti ispitivanih u studiji

Naziv	Sekvenca (5' - 3' smer)	Genetičke varijante	Ref.
NOD2_4_F	AGGTCAGCCTGATGACATTTC	Arg702Trp (rs2066844) Arg684Trp (rs5743276)	[Giachino i sar., 2004]
NOD2_4_R	CGGGATGGAGTGGAAAGT		
NOD2_8_F	CACTGACACTGTCTGTTGACTC	Gly908Arg (rs2066845)	[Giachino i sar., 2004]
NOD2_8_R	AAGACCTTCATAAGTGGCCCC		
NOD2_11_F	CTGGCTAACTCCTGCAGT	Leu1007fs insC (rs2066847)	[Giachino i sar., 2004]
NOD2_11_R	ACTGAGGTTTCGGAGAGCT		
TLR4_299_F	GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG	Asp299Gly (rs4986790)	[Lorenz i sar., 2001]
TLR4_299_R	GATCAACCTTCTGAAAAGCATTCCCAC		
TLR4_399_F	GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA	Thr399Ile (rs4986791)	[Lorenz i sar., 2001]
TLR4_399_R	ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT		
TNF α _308_F	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	G-308A (rs1800629)	[Wilson i sar., 1992]
TNF α _308_R	ACACTCCCCATCCTCCCTGCT		

Naziv	Sekvenca (5' - 3' smer)	Genetičke varijante	Ref.
TNF α _238_F	AGAAGACCCCCCTCGGAACC	G-238A (rs361525)	[Mossbock i sar., 2009]
TNF α _238_R	ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG		
IL-6_F	GGAGTCACACACTCCACCT	G-174C (rs1800795)	[Pascual i sar., 2000]
IL-6_R	CTGATTGGAAACCTTATTAAG		
IL-1 β _F	TGGCATTGATCTGGTTCATC	C-511T (rs16944)	[Sainz i sar., 2008]
IL-1 β _R	GTTTAGGAATCTTCCCCTT		
IL-1RN_F	CTCAGCAACACTCCTAT	VNTR	[Sainz i sar., 2008]
IL-1RN_R	TCCTGGTCTGCAGGTAA		

Napomena: podvučeni nukleotid predstavlja mesto nukleotidne promene koje uvodi prajmer, a koje se nalazi u okolini varijabilnog mesta od interesa, kako bi se formirala konsenzus sekvenca restrikcione endonukleaze. Skraćenice: F - (eng. *forward*) uzvodni prajmer, R - (eng. *reverse*) nizvodni prajmer, Ref - referenca

Komponente PCR smeše zajedničke za detekciju svih navedenih genetičkih varijanti i njihove finalne koncentracije bile su:

- 1 x PCR puffer (*Qiagen*)
- 1 x Q rastvor (*Qiagen*)
- 0.5 μ M prajmera (uzvodni i nizvodni)
- 0.5 U *Taq* polimeraze (*Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA*)
- 80 ng genomske DNK

PCR reakcije vršene su u finalnoj zapremini od 20 μ l, osim za *TLR4* Thr399Ile (25 μ l) i *IL-1RN* VNTR (50 μ l). Temperaturni profil PCR reakcije za sve ispitivane varijante bio je:

- 95°C - 5 min
 - 94°C - 30 s
 - Ta - 30 s
 - 72°C - 30 s
 - 72°C - 5 min
- } 35 ciklusa

U tabeli 2 prikazane su temperature hibridizacije prajmera sa matricom (temperatura anilinga, Ta), kao i finalne koncentracije MgCl₂ (*Qiagen*) i nukleotida (dNTP) (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*), korišćene za svaku PCR reakciju. Takođe, navedeni su i specifični uslovi potrebni za neke PCR reakcije, koji se razlikuju od zajedničkih.

Tabela 2. PCR uslovi za genotipizaciju ispitivanih genetičkih varijanti

Genska varijanta	Ta (°C)	MgCl ₂ (mM)	dNTP (mM)	Specifični PCR uslovi ¹
<i>NOD2</i> ²	55	2.5	0.25	
<i>TLR4</i> Asp299Gly	55	2.5	0.25	
<i>TLR4</i> Thr399Ile	56.5	3.0	0.5	1 U <i>Taq</i>
<i>TNF-α</i> G-308A	56	2.75	0.5	1 μM prajmera
<i>TNF-α</i> G-238A	62	2.125	0.2	
<i>IL-6</i> G-174C	56	2.75	0.5	bez Q-rastvora
<i>IL-1β</i> C-511T	54.5	2.5	0.4	0.8 μM prajmera
<i>IL-1RN</i> intron 2 VNTR	52	1.5	0.2	1.5 U <i>Taq</i> , bez Q-rastvora, elongacija - 90 s

¹ Specifični uslovi PCR reakcije koji se razlikuju od PCR profila zajedničkog za sve varijante

² Arg702Trp, Arg684Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC

Nakon provere uspešnosti PCR reakcija elektroforezom na 2% agaroznom gelu, pristupalo se detekciji genetičkih varijanti sečenjem PCR fragmenata odgovarajućim restrikcionim endonukleazama (tzv. „digestijama“). Sastavi smeša za digestiju finalne zapremine 20 μl optimizovani su prema uputstvu proizvođača (*Thermo Scientific*). U reakciji digestije PCR produkta za varijantu *TLR4* Thr399Ile korišćen je u finalnoj koncentraciji 1 x pufer R, za *IL-6* G-174C 1 x pufer G, a za sve ostale PCR produkte 1 x pufer Tango. Za svaku reakciju digestije je upotrebljeno 2 U restrikcionog enzima i 150-200 ng PCR produkta. Smeše za digestiju inkubirane su 16 h na 37°C. U tabeli 3 su za svaku analiziranu genetičku varijantu prikazane očekivane dužine PCR produkata, restrikcioni enzimi, fragmenti koji nastaju sečenjem, kao i odgovarajući procenat gela korišćen za razdvajanje fragmenata.

Tabela 3. Pregled dužina PCR produkata i fragmenata koji nastaju nakon PCR-RFLP analize genetičkih varijanti ispitivanih u ovoj studiji

Gen	Varijanta	PCR (bp)	RE	RF (bp)	Agarozna (%)	Ref.
<i>NOD2</i>	Arg702Trp	449	<i>MspI</i>	Arg: 329+66+54 Trp: 329+120	2	[Giachino i sar., 2004]
	Arg684Trp	449	<i>MspI</i>	Arg: 329+66+54 Trp: 383+66	2	[Giachino i sar., 2004]
	Gly908Arg	202	<i>HhaI</i>	Gly: 202 Arg: 156+46	3	[Giachino i sar., 2004]
	Leu1007fsinsC	217	<i>NlaIV</i>	Leu: 180+37 fsinsC: 140+40+37	3	[Giachino i sar., 2004]
<i>TLR4</i>	Asp299Gly	275	<i>NcoI</i>	Asp: 275 Gly: 249+36	3	[Lorenz i sar., 2001]
	Thr399Ile	407	<i>HinfI</i>	Thr: 407 Ile: 379+29	3	[Lorenz i sar., 2001]
<i>TNF-α</i>	G-308A	117	<i>NcoI</i>	G: 97+20 A: 117	4	[Wilson i sar., 1992]
	G-238A	152	<i>MspI</i>	G: 133+19 A: 152	4	[Mossock i sar., 2009]
<i>IL-6</i>	G-174C	527	<i>HinIII</i>	G: 331+167+29 C: 331+122+45+29	3	[Pascual i sar., 2000]
<i>IL-1β</i>	C-511T	304	<i>AvaI</i>	C: 190+114 T: 304	2	[Sainz i sar., 2008]
<i>IL-1RN</i>	86bp-VNTR	A1: 410 A2: 240 A3: 500 A4: 325 A5: 525			3	[Sainz i sar., 2008]

Skraćenice: RE - restrikciona endonukleaza, RF - restrikcioni fragmenti, Ref-referenca

3.2.4. Identifikacija varijanti gena *HLA*

[Lavant i sar., 2011]

Genotipizacija *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* i *HLA-DRB1* vršena je metodom multipleks PCR-SSP, u kojoj se koriste prajmeri specifični za svaku varijantu gena *HLA*. Diskriminacija

različitih alela vršena je na osnovu prisustva ili odsustva produkata PCR reakcije odnosno prisustva PCR produkata različite dužine.

Za genotipizaciju *HLA* korišćene su tri multipleks PCR-SSP reakcije. Svaka reakcija je imala bar jedan zajednički lokus-specifični prajmer koji je bio fluorescento obeležen (NED fluorofora za *DQA1*, VIC za *DQB1* i FAM za *DRB1*), dok su ostali prajmeri bili specifični za pojedinačne alele. Prajmeri korišćeni u *HLA* genotipizaciji prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za detekciju varijanti gena *HLA* [Lavant i sar., 2011]

Naziv	Sekvenca (5' - 3' smer)
DQA1*NED_F	NED -GCCTCTTCAGGTGTAAACTTGTACCAGT
DQB1*05/*06 L*VIC_R	VIC -CGACGACGCTCACCTCTCCT
DQB1*02/*03/*04*VIC_R	VIC -GTCGTGCGGAGCTCCAAC
DRB1*FAM_R	FAM -CTAAATGCTCACAGATGGCGCTCTCTCTC
DQA1*01_R	GCCATGTTTCTCAGTGCACC
DQA1*02_R	ATTGCGGGTCAAATCTAAGTCTGTG
DQA1*03_R	CAAATCTCTAAATCTGCGGAACAG
DQA1*04/*05/*06_R	CTAAATTGTCTGAGAACAGGCAAACA
DQA1*05_R	CGCAGACTGTTCAAGTTATGTTTTAGG
DQB1*05_F	GTGCGGGGTGTGACCAGAC
DQB1*06_F	GGAGCGCGTGCCTTGTAA
DQB1*06:01_F	GACGGAGCGCGTGCCTTA
DQB1*02_F	CGTGCGTCTTGTGAGCAGAA
DQB1*04_F	GCGGGGTGTGACCAGATACA
DQB1*03:01/*03:03_F	GCTGGGGCCGCCTGA
DQB1*03:01/*03:04_F	GACAGCGACGTGGAGGTGTAC
DQB1*03:02/*03:03_F	GAGCGCATGCGTCTTGTGAC
DRB1*03/*11/*13/*14_F	CACGTTTCTTGGAGTACTCTACGTC
DRB1*04_F	CGGAGGCCGCTTCTGTA

Naziv	Sekvenca (5' - 3' smer)
DRB1*07_F	CACGTTTCCTGTGGCAGGG
DRB1*09_F	CGGTATCTGCACAGAGGCAT

Napomena: NED, VIC i FAM predstavljaju fluorofore kojima su obeleženi prajmeri. Skraćenice: F - uzvodni prajmer, R - nizvodni prajmer

U tabeli 5 prikazan je sastav smeša prajmera za sve tri multipleks PCR-SSP reakcije, kao i volumen svakog dodatog prajmera. Takođe, prikazane su i očekivane dužine PCR fragmenata.

Tabela 5. Sastav smeša prajmera korišćenih u *HLA* genotipizaciji i očekivane dužine dobijenih PCR fragmenata

HLA smeše prajmera	Naziv prajmera	Volumen (μ l)	Dužina fragmenta (bp)
Smeša prajmera 1 <i>DQA1/DQB1 *05/*06</i>	<i>DQA1 *NED F</i>	-	0.40
	<i>DQA1*01 R</i>	176	0.24
	<i>DQA1*02 R</i>	154	0.10
	<i>DQA1*03 R</i>	148	0.22
	<i>DQA1*04/*05/*06 R</i>	140	0.28
	<i>DQA1*05 R</i>	204	0.16
	<i>DQB1*05 F</i>	227	0.15
	<i>DQB1*06 F</i>	234	0.30
	<i>DQB1*06:01 F</i>	236	0.15
	<i>DQB1*05/*06 *VIC R</i>	-	0.40
Smeša prajmera 2 <i>DQB1 *02/*03/*04</i>	<i>DQB1*02 F</i>	201	0.32
	<i>DQB1*04 F</i>	198	0.16
	<i>DQB1*03:01/*03:03 F</i>	114	0.28
	<i>DQB1*03:01/*03:04 F</i>	149	0.10
	<i>DQB1*0302/*03:03 F</i>	206	0.36
	<i>DQB1*02/*03/*04 *VIC R</i>	-	0.80
Smeša prajmera 3 <i>DRB1</i>	<i>DRB1*03/*11/*13/*14 F</i>	407	0.40
	<i>DRB1*04 F</i>	454-475	0.40
	<i>DRB1*07 F</i>	375	0.40
	<i>DRB1*09 F</i>	345	0.30
	<i>DRB1 *FAM R</i>	-	0.80

Napomena za tabelu 5: Svi navedeni prajmeri su prethodno rastvoreni u koncentraciji od 2.5 mM. Skraćenice: F - uzvodni prajmer, R - nizvodni prajmer

Sve tri PCR reakcije, finalnog volumena 6 µl, imale su isti sastav, a razlikovale su se samo u dodatoj smeši prajmera:

- 1 x PCR pufera (*Qiagen*)
- 1.25 mM MgCl₂ (*Qiagen*)
- 0.25 mM dNTPs (*Thermo Scientific*)
- 0.25 U HotStar *Taq* DNK polymeraze (*Qiagen*)
- 2 µl smeše prajmera 1 / 2 / 3
- 4 ng genomske DNK

Temperaturni profil za sve tri PCR reakcije je bio isti:

- 95°C 10 min
 - 94°C 1 min
 - 66°C 30 s
 - 72°C 1 min
 - 72°C 10 min
- } 45 ciklusa

Nakon PCR-SSP reakcije, pristupalo se fragment analizi (FA) na aparatu 3130 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems, California, USA*).

FA je tehnika kojom se umnoženi fluorescentno obeleženi PCR fragmenti razdvajaju na osnovu svoje dužine kapilarnom elektroforezom. Prednost ove metode je u njenoj rezolucionoj moći, koja iznosi 1 bp. Fragment analizom vrši se procena dužina umnoženih PCR fragmenata u odnosu na standard koji čine fluorescentno obeleženi DNK fragmenati poznate dužine. Standard se kombinuje sa uzorkom, nakon čega se zajedno nanose na sistem za kapilarnu elektroforezu.

Zbog osetljivosti sistema, PCR smeše su razblaživane u de-mi vodi u zapreminskom odnosu 1:10 za smešu prajmera 1, 1:20 za smešu prajmera 2 i 1:5 za smešu prajmera 3. Nakon toga,

1 µl razblažene PCR smeše je mešan sa 9 µl 2.5% *GeneScan500 LIZ* standarda (*Applied Biosystems*) u HiDi formamidu (*Applied Biosystems*). Ovaj standard je pogodan za određivanje dužine DNK fragmenata u opsegu 35-500 bp i sastoji se od 16 jednolančanih i fluorescentno obeleženih (LIZ) fragmenata dužine 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 i 500 baza, koji se nakon završene elektroforeze detektuju u vidu jedinstvenih pikova. Pripravljeni uzorak je denaturisan 5 min na 95°C, a zatim analiziran na aparatu. Korišćenjem *GeneMapper v.4* softvera aleli su identifikovani na osnovu boje pika i njegove pozicije. Zbog jake gametske neravnoteže u nasleđivanju (LD) između lokusa *DQA1*, *DQB1* i *DRB1*, sa velikom verovatnoćom se moglo utvrditi prisustvo određenog haplotipa *HLA-DQ* bez poznavanja roditeljskog genotipa (uz korišćenje elektronske baze podataka vezane za varijante gena *HLA*).

3.3. Metode korišćene za analizu nivoa ekspresije gena

Nivo ekspresije selektovanih gena je analiziran jednom varijantom metode PCR u realnom vremenu (eng. *real-time* PCR), metodom qRT-PCR (eng. *quantitative RT-PCR*), u kojoj se kao matrica za amplifikaciju specifične sekvence koristi cDNK i koja omogućava merenje količine PCR produkta u toku svakog PCR ciklusa, tj. u realnom vremenu. Metodi qRT-PCR prethodile su metode za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi i intestinalnog tkiva, kao i metoda reverzne transkripcije.

3.3.1. Izolacija mononuklearnih ćelija pune periferne krvi

Za izolaciju mononuklearnih ćelija, u koje spadaju limfociti i monociti, korišćeni su sveži uzorci pune periferne krvi. Za izolaciju je korišćen rastvor fikola (*Ficoll-Paque Plus*, *GE Healthcare Life sciences*) u cilju razdvajanja krvnih ćelija centrifugiranjem.

Uzorak pune periferne krvi (4 ml krvi razblažene u fiziološkom rastvoru, 0.9% NaCl, u odnosu 1:1), nanošen je na 3 ml fikola, prethodno dodatog u tubu od 10 ml. Uzorak je pažljivo naslojen iznad fikola, tako da se dve faze ne mešaju. Nakon centrifugiranja (1500 rpm, 25 min, bez kočenja), prikupljan je beličasti sloj mononuklearnih ćelija i prenošen u čistu tubu od 10 ml, u koju je zatim dodato 8 ml 1 x pufera PBS (eng. *Phosphate Buffered Saline*; 137

mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄), i sadržaj je promešan invertovanjem tube. Nakon centrifugiranja (1500 rpm, 15 min) supernatant je odlivan, a talog rastvaran u 1 ml rastvora *TRI Reagent* (Ambion). Uzorak je do dalje upotrebe čuvan na -80°C.

3.3.2. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija

Za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija korišćen je rastvor *TRI Reagent* (Ambion). *TRI reagent* predstavlja monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, a proces izolacije predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK [Chomczynski i sar., 1987].

Uzorak mononuklearnih ćelija čuvan u rastvoru *TRI Reagent* homogenizovan je špricom i iglom, uvlačenjem uzorka kroz iglu prečnika 0.7 mm, 5 - 10 puta. Zatim je dodavano 200 µl hloroforma, nakon čega je smeša snažno mučkana rukom. Uzorak je inkubiran 15 min na ST i centrifugiran na 12000 rcf (eng. *relative centrifugal force*), 15 min, na 4°C. Nakon centrifugiranja se izdvajala gornja vodena faza sa rastvorenim RNK, koja je prebacivana u čistu tubu od 1.5 ml. Dodavano je 500 µl izopropanola (na 1ml *TRI Reagent* rastvora), nakon čega je uzorak mešan invertovanjem i ostavljan 15 min na ST. Nakon centrifugiranja na 12000 rcf, 15 min, na 4°C, supernatant je odlivan, a talog, u kome se nalazila RNK, prečišćavan dodavanjem 1 ml 70% etanola koji je razblažen destilovanom vodom tretiranom 0.1% dietilpirokarbonatom (DEPC). DEPC voda je prethodno pripremljena po sledećem uputstvu: 0.1% rastvor DEPC vode je inkubiran na 37°C preko noći, nakon čega je autoklaviran 1 h na 100°C. Nakon centrifugiranja na 12000 rcf, 10 min, na 4°C, supernatant je uklanjan. Potrebno je bilo potpuno ukloniti ostatke etanola uparavanjem. Talog RNK je rastvaran u 40 µl DEPC vode. Uzorak se do dalje upotrebe čuvao na -80°C.

3.3.3. Izolacija RNK iz uzoraka intestinalnog tkiva

Izolacija molekula RNK iz uzoraka intestinalnog tkiva vršena je prema protokolu proizvođača kita za izolovanje molekula RNK [*Rneasy Mini Kit - Qiagen*]

Biopsije intestinalnog tkiva čuvane na -20°C su pre izolacije otopljene 15 - 30 minuta na ST. Za izolaciju molekula RNK korišćeno je oko 3 - 5 mg tkiva. Selektovano tkivo stavlja se u 10 ml tubu napunjenu sa 350 μl denaturišućeg pufera RTL (10 μl β -merkaptoetanol, 1 ml pufera RTL), a zatim homogenizovano homogenizatorom *TissueRuptor (Qiagen)* na maksimalnoj brzini u trajanju od 30 - 60 s. Nakon homogenizacije lizat je prebacivan u mikrotubu od 1.5 ml i centrifugiran na 13200 rpm, 3 min. Supernatant je pažljivo prelivan u novu 1.5 ml mikrotubu. Da bi se RNK vezala za kolonu, ukupan volumen supernatanta je pomešan sa istim volumenom 70% DEPC etanola (etanol razblažen sa 0.1% DEPC vodom). Na kolonu je nanošeno maksimalno 700 μl smeše, koja je zatim centrifugirana na 13000 rpm, 15 s, a eluat je odbacivan. Kolona sa vezanom RNK ispirana je sa 700 μl pufera RW1, a zatim centrifugirana na 13000 rpm, 15 s, a eluat je odbacivan. Nakon toga, na kolonu je dodavano 500 μl pufera RPE, kolona je centrifugirana na 13000 rpm, 15 s, a eluat je odbacivan. U poslednjem ispiranju kolone dodavano je 500 μl pufera RPE i kolona je centrifugirana na 13000 rpm, 2 min. Kolona je zatim stavljana u novu 1.5 ml mikrotubu i centrifugirana na maksimalnoj brzini 1 min. Nakon centrifugiranja, kolona je stavljana u novu 1.5 ml mikrotubu i RNK je sa kolone eluirana sa 30 μl vode oslobođene od RNaza (*RNase-free*). Rastvorena RNK je do dalje upotrebe čuvana na -80°C .

Prinos i čistoća izolovane RNK su mereni na spektrofotometru *NanoVue*, po uputstvu za rad na aparatu.

3.3.4. Reverzna transkripcija

Metoda reverzne transkripcije kojom je iz izolovane RNK sintetisana cDNK vršena je prema uputstvu proizvođača kita koji je korišćen [*RevertAid Reverse Transcriptase, Thermo Scientific*].

Reakciona smeša ukupnog volumena od 20 μ l se sastojala iz:

- 1 μ g RNK
- 5 μ M nasumični heksamerni kao prajmeri (*Thermo Scientific*)
- 1 x RT pufera (*Thermo Scientific*)
- 20 U *Ribo-Lock* RNaznog inhibitora (*Thermo Scientific*)
- 1 mM dNTP (*Thermo Scientific*)
- 200 U *RevertAid* reverzne transkriptaze (*Thermo Scientific*)

Reakciona smeša pripremana je na sledeći način: RNK i prajmeri su u volumenu od 11 μ l inkubirani 5 min na 70°C, a zatim prebacivani na led. Dok su uzorci stajali na ledu, u svaki je dodato po 9 μ l smeše koja se sastojala iz RT pufera, *Ribo-Lock* RNaznog inhibitora, dNTP i *RevertAid* reverzne transkriptaze. Finalna smeša je inkubirana 10 min na 25°C, a zatim 1 h na 42°C. Reakcija je zaustavljena inkubiranjem 10 min na 70°C. Uzorak cDNK koncentracije 50 ng/ μ l je do dalje upotrebe čuvan na -20°C.

3.3.5. Provera kvaliteta cDNK

Kvalitet sintetisane cDNK se proveravao umnožavanjem regiona gena *Ab11* koji je konstitutivno eksprimiran. Na ovaj način je indirektno potvrđivan integritet izolovane RNK koja je korišćena za sintezu cDNK, kao i efikasnost reverzne transkripcije. Za umnožavanje su korišćeni prajmeri Ia i D čije su sekvence prikazane u tabeli 6.

Tabela 6. Prajmeri korišćeni za proveru kvaliteta cDNK

Naziv	Sekvenca (5' - 3' smer)
Ia	ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCT
D	TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG

Reakcija volumena 25 μ l sastojala se od:

- 100 ng cDNK
- 1 x PCR pufer (*Qiagen*)
- 1 x Q rastvor (*Qiagen*)
- 3 mM MgCl₂ (*Qiagen*)
- 0.2 μ M dNTP (*Thermo Scientific*)
- 0.4 μ M prajmera (uzvodni i nizvodni)
- 1 U *Taq* polimeraze (*KAPA Biosystems*)

Ukoliko je u PCR reakciji umnožen fragment dužine od 277 bp, smatralo se da je cDNK odgovarajućeg kvaliteta za analizu ekspresije metodom qRT-PCR.

3.3.6. Kvantifikacija ekspresije gena metodom qRT- PCR

Za merenje nivoa ekspresije gena u uzorcima krvi i intestinalnog tkiva korišćena je metoda qRT-PCR sa komparativnom ddCt analizom [Livak i sar., 2001]. Za normalizaciju sintetisane cDNK u uzorcima je korišćena endogena kontrola gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (*GAPDH*), a kao kalibrator je odabrana medijana normalizovanih vrednosti za ekspresiju gena u intestinalnom tkivu kontrolnih ispitanika.

Formula po kojoj je izračunata relativna vrednost količine ekspresije ciljnog gena je:

$$Q = 2^{-ddCt}, \text{ gde je } ddCt = dCt_{\text{uzorak}} - dCt_{\text{kalibrator}} = \\ (Ct_{\text{ciljni gen}} - Ct_{\text{endogena kont.}}) - (Ct_{\text{ciljni gen, kalibrator}} - Ct_{\text{endogena kont., kalibrator}})$$

Svi eksperimenti su rađeni u duplikatu. Ukoliko su se Ct vrednosti (ciklus u kojem intenzitet fluorescencije prelazi zadati prag intenziteta) za isti uzorak značajno razlikovale, eksperiment je ponavljan u duplikatu.

Nivoi ekspresije gena *TNF- α* , *IL-6*, *Bcl-2* i *Bax* su praćeni upotrebom *Sybr-Green* tehnike (protokol po uputstvu *KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal*, *KAPA*

Biosystems). Nukleotidne sekvence *TNF- α* , *IL-6*, *Bcl-2*, *Bax* i *GAPDH* prajmera navedene su u tabeli 7.

Tabela 7. Prajmeri i probe korišćeni za qRT-PCR analizu

Naziv	Sekvenca (5' - 3' smer)	Ref.
IL-6_SYBR_F	GCAAAGAGGCACTGGCAGAA	Dizajnirano u ovoj studiji
IL-6_SYBR_R	GGCAAGTCTCCTCATTGAATCC	
TNF α _SYBR_F	CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC	[Moriconi i sar., 2007]
TNF α _SYBR_R	AGCTGCCCCCTCAGCTTGA	
Bcl2_SYBR_F	TCGCCCTGTGGATGACTGA	[Floros i sar., 2006]
Bcl2_SYBR_R	CAGAGACAGCCAGGAGAAATC	
Bax_SYBR_F	TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC	[Floros i sar., 2006]
Bax_SYBR_R	TCACCCAACCACCCTGGTCTT	
GAPDH_SYBR_F	GTGAAGGTCGGAGTCAACG	[Baluchamy i sar., 2007]
GAPDH_SYBR_R	TGAGGTCAATGAAGGGGTC	
GAPDH_Taq_F	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	[Clark i sar., 2008]
GAPDH_Taq_R	GAAGATGGTGATGGGATTTC	
GAPDH_Taq_proba	FAM-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-TAMRA	
Fas TaqMan Gene Expression Assay	*Hs00163653_m1	AB
FasL TaqMan Gene Expression Assay	*Hs00181225_m1	

Napomena: prajmeri označeni sa „SYBR“ korišćeni su za *Sybr-Green*, a prajmeri označeni sa „Taq“ u *TaqMan* qRT-PCR analizi, *komercijalno dostupni prajmeri i njihov kataloški broj (AB - *Applied Biosystems, USA*). Skraćenice: F - uzvodni prajmer, R - nizvodni prajmer

Reakciona smeša ukupnog volumena 10 μ l sastojala se od sledećih komponenti u finalnim koncentracijama:

- 20 ng cDNK
- 1 x *Kapa Syber Fast Universal qPCR Master Mix*
- 1 x *ROX Low* referentna boja
- Prajmeri (za analizu ciljnog gena *TNF- α* : 200 nM F i R prajmera; za analizu *IL-6*: 300 nM F i R prajmera; za analizu *Bcl-2* i *Bax*: 50 nM F i R prajmera; za analizu endogene kontrole *GAPDH*: 400 nM F i R prajmera)

Temperaturni profil reakcije korišćene za amplifikaciju gena *IL-6*, *Bcl-2*, *Bax* i *GAPDH* bio je isti:

1. 2 min / 50°C
2. 3 min / 95°C
3. 40 ciklusa:
 - 15 s / 95°C
 - 1 min / 60°C (aniling)

Temperturni profil reakcije za *TNF- α* razlikovao se jedino u temperaturi hibridizacije prajmera za matricu, koja je bila 62°C.

Ekspresija gena *Fas* i *FasL* praćena je upotrebom *TaqMan* tehnike (protokol po uputstvu *KAPA PROBE FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal, KAPA Biosystems*). Prajmeri za *Fas* i *FasL* su komercijalno dizajnirani i korišćeni u okviru *Fas* i *FasL TaqMan Gene Expression Assay* (tabela 7). Kao endogena kontrola korišćen je *GAPDH*. Reakciona smeša finalnog volumena 10 μ l sastojala se od sledećih komponenti:

- 20 ng cDNK
- 1 x *KAPA PROBE FAST Universal qPCR Master Mix (KAPA Biosystems)*
- 1 x *ROX Low* referentna boja (*KAPA Biosystems*)
- 1 x *Fas (FasL) TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)* / u slučaju endogene kontrole *GAPDH*: 300 nM F i R prajmera i 200 nM probe

Temperaturni profil reakcije korišćene za amplifikaciju *Fas*, *FasL* i *GAPDH* bio je isti:

1. 2 min / 50°C
2. 3 min / 95°C
3. 40 ciklusa:
 - 15 s / 95°C
 - 1 min / 60°C

Nivoi ekspresije navedenih gena mereni su na 7500 *Real-time* PCR aparatu (*Applied Biosystems*).

3.4. Metode korišćene za analizu DNK-proteinskih interakcija

U ovoj studiji ispitivana je DNK vezujuća aktivnost NF- κ B iz jedarnih ekstrakata uzoraka intestinalnog tkiva bolesnih i kontrolnih ispitanika, korišćenjem metode usporene elektroforetske pokretljivosti (eng. *electrophoretic mobility shift assay* - EMSA), dok je prisustvo proteina p65, sastavne komponente NF- κ B dimera, ispitivano *supershift* metodom uz upotrebu specifičnog antitela. Ovim analizama su prethodile metode za izolaciju jedarnih ekstrakata iz intestinalnih biopsija ispitanika i HeLa ćelijske linije - čiji su jedarni ekstrakti služili kao pozitivne kontrole i standard za metodu EMSA.

3.4.1. Izolacija jedarnih ekstrakata iz uzoraka intestinalnog tkiva

Izolacija jedarnih ekstrakata iz uzoraka intestinalnog tkiva vršena je prema uputstvu proizvođača kita za izolaciju jedarnih proteina [*Qproteome Nuclear Protein Kit* - Qiagen].

Oko 5 mg intestinalnog tkiva iskorišćeno je za izolaciju jedarnih proteina. Pre izolacije, tkivo je oslobođeno rastvora u kome je čuvano i isprano sa 1 ml hladnog PBS. Svi koraci u izolaciji su rađeni brzo i na ledu, da proteini ne bi denaturisali. Tkivo je zatim prebacivano u 10 ml tube sa 500 μ l prethodno pripremljenog pufera za liziranje NL i zatim homogenizovano u trajanju od 10 s na najmanjoj brzini (*TissueRuptor*). Nakon dodavanja još 500 μ l pufera NL, smeša je inkubirana na ledu 15 min, a onda je ceo lizat prebacivan u prethodno ohlađenu 1.5 ml mikrotubu. Posle dodavanja 50 μ l rastvora deterdženta NP, smeša je vorteksovana 10 s, a

zatim centrifugirana na 10000 rcf, 5 min, na 4°C. Supernatant, u kome se nalazila citosolna frakcija proteina, podeljen je u mikrotube od 0.5 ml i čuvan na -80°C. Talog, u kome su se nalazila ćelijska jedra, rastvaran je u 500 µl pufera NL vorteksovanjem 5 s na najvećoj brzini. Sadržaj liziranih ćelijskih jedara centrifugiran je na 10000 rcf, 5 min, na 4°C, nakon čega je supernatant odbacivan. Talog, u kome su se nalazili jedarni proteini, rastvaran je u 100 µl prethodno pripremljenog pufera za ekstrakciju NX1. Ova suspenzija je inkubirana 30 min u termomikseru ohlađenom na 4°C, uz blago mućkanje, a nakon toga centrifugirana na 12000 rcf, 10 min, na 4°C. Supernatant, u kome su rastvoreni jedarni proteini, podeljen je u 0.5 ml mikrotube i čuvan do dalje upotrebe na -80°C.

Za izolaciju jednog uzorka bilo je potrebno pripremiti pufere po sledećem uputstvu: pufer NL - 1500 µl pufera NL, 15 µl proteaznog inhibitora, 7.5 µl 0.1 M ditioneitol – DTT; pufer NX1 - 100 µl pufera NX1, 1 µl proteaznog inhibitora.

3.4.2. Uslovi gajenja HeLa ćelijske linije

U ovoj studiji korišćeni su jedarni ekstrakti izolovani iz uzgajenih HeLa ćelija (ATCC br. CCL-2, DSMZ br. ACC 57) kao pozitivne kontrole u analizi DNK vezujuće aktivnosti NF-κB. HeLa ćelijska linija je dobijena ljubaznošću Laboratorije za humanu molekularnu genetiku, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Za gajenje permanentne ćelijske linije HeLa korišćen je medijum DMEM sa niskim sadržajem glukoze (1 g/L) (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Paisley, UK*) sa natrijum piruvatom i stabilizovanim glutaminom, 10% fetalnog telećeg seruma (eng. *fetal calf serum, FCS, PAA Laboratories, Austria*), 1 x neesencijalnim amino kiselinama (*Sigma-Aldrich, USA*), kao i sa mešavinom antibiotika penicilin – streptomycin (*Sigma-Aldrich, USA*) u finalnoj koncentraciji od 1%. Zasejavanje ćelija vršeno je brzim odmrzavanjem alikvota ćelija čuvanih u tečnom azotu (-196°C) i resuspendovanjem u medijumu zagrejanom na 37°C. Ćelije su gajene u odgovarajućim sterilnim sudovima u inkubatoru sa automatskim protokom 5% CO₂ na temperaturi od 37°C. Pasažiranje ćelija vršilo se pri konfluentnosti od približno 80%, u toku kojeg su ćelije ispirane puferom 1 x PBS, a nakon toga tretirane 0.1% rastvorom tripsina u puferu 1 x PBS. Nakon kraćeg delovanja enzima (1-2 min) na 37°C, reakcija se

zaustavljala dodavanjem medijuma sa serumom. Čelije su resuspendovane, a zatim brojane pod mikroskopom. Brojanje se vršilo na *Bürker-Türk* pločici korišćenjem boje tripan-plavo (0.1%) koja omogućava razlikovanje živih od mrtvih ćelija. Nakon brojanja, odgovarajući broj ćelija prebačen je u tube od 10 ml, ispiran puferom 1 x PBS i dalje korišćen za izolaciju jedarnih proteina.

3.4.3. Izolacija jedarnih ekstrakata iz HeLa ćelijske linije

Za izolaciju jedarnih proteina iz ćelijske linije HeLa korišćeno je oko 1×10^6 ćelija. Talog prikupljenih HeLa ćelija resuspendovan je u 400 μ l hladnog pufera A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) i inkubiran 15 min na ledu, nakon čega je dodavano 25 μ l 10% rastvora *Nonidet* NP-40. Posle intenzivnog vorteksovanja, homogenat je centrifugiran na 13000 rpm, 30 s, na 4°C. Talog, u kome su se nalazila ćelijska jedra, resuspendovan je u 50 μ l hladnog pufera C (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) i nakon toga snažno mućkan 15 min na 4°C (*MultiBio RS-24, LKB*). Jedarni ekstrakt centrifugiran je na 13000 rpm, 5 min, na 4°C, a supernatant je u alikvotima čuvan na -80°C [Schreiber i sar., 1989].

3.4.4. Određivanje koncentracije jedarnih proteina

Koncentracija proteina u jedarnom ekstraktu određivana je tako što je 10 μ l svakog uzorka rastvarano u 790 μ l vode, a zatim je dodavano 200 μ l Bradford reagensa (*Protein Assay Dye Reagent, Bio-Rad, Munich, Germany*). Nakon inkubacije od 5 min u mraku na ST, apsorbancija je merena spektrofotometrijski, na talasnoj dužini od 595 nm (*Ultrospec 3300 Pro, Amersham Biosciences*). Uporedo sa uzorcima su pripremani blank i standardi, i pravljena je standardna kriva. Standard su činile rastuće koncentracije govedeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumin* -BSA 1 mg/ml, *NE BioLabs, Massachusetts, USA*) [Bradford 1976].

3.4.5. Analiza DNK-proteinskih interakcija na gelu

Interakcija jedarnih proteina sa konsenzus sekvencom za NF- κ B ispitivana je metodom EMSA. Metoda se zasniva na tome da radioaktivno obeleženi DNK fragment koji formira kompleks sa proteinima iz jedarne ćelijske frakcije, migrira sporije od slobodnih DNK fragmenata u nednaturišućem poliakrilamidnom gelu (što je na gelu vidljivo kao pomeraj - *shift*) [Fried i sar., 1981; Wall i sar., 1988].

Kada se u reakcionu smešu doda antitelo koje specifično prepoznaje neki od proteina u formiranom kompleksu protein-DNK, novonastali kompleks ima još slabiju elektroforetsku pokretljivost i dodatno zaostaje na gelu (*supershift*). Ukoliko dodato antitelo prepoznaje DNK vezujući domen proteina iz kompleksa, ono kompetira za vezivno mesto sa obeleženom probom što rezultuje u tzv. „hlađenju“ kompleksa – formirani kompleks na gelu ima manji intenzitet.

U izvedenim EMSA reakcijama korišćen je fragment DNK veličine 21 bp, koji sadrži konsenzus sekvencu NF- κ B. Ovaj fragment DNK sintetisan je hibridizacijom dva oligonukleotida - oligonukleotida koji sadrži konsenzus sekvencu, tzv. „sense“ i komplementarnog, tzv. „antisense“ oligonukleotida (tabela 8), od kojih je „sense“ prethodno radioaktivno obeležen na 5' kraju. U *supershift* analizi korišćeno je komercijalno anti-p65 antitelo (Kat. broj Ab7970, *Abcam, Cambridge, UK*),

Tabela 8. Sekvence oligonukleotida od kojih je formirana NF- κ B proba za EMSA analizu [Stronati i sar., 2008]

Naziv	Sekvenca (5' - 3' smer)
NF- κ B_sense	AGTTGAGGGGACTTTCCCAGG
NF- κ B_antisense	CCTGGGAAAGTCCCCTCAACT

Napomena: Podvučeni nukleotidi predstavljaju konsenzus sekvencu NF- κ B.

Reakcija obeležavanja vršena je pomoću T4 polinukleotidne kinaze (*Thermo Scientific*), prema uputstvu proizvođača. Reakciona smeša za obeležavanje, finalne zapremine 20 µl, sastojala se od sledećih komponenti:

- 10 pmol „sense“ oligonukleotida
- 1.6 pmol γ -³²P dATP-a (6000Ci/mmol)
- 1 x pufer A
- 4.8% PEG 6000 rastvora
- 10 U T4 polinukleotidne kinaze

Smeša je inkubirana na 37°C, 30 min, nakon čega su se neugrađeni radioaktivni nukleotidi uklanjali iz smeše metodom molekuskog sejanja kroz G-25 sefadeks kolonice (*GE Healthcare Life sciences*). Obeleženi jednolančani oligonukleotid je u potpunosti uparavan u vakuum centrifugi i potom rastvaran u 25 µl 10 puta razblaženog pufera za renaturaciju (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Zatim je u smešu dodavan komplementarni oligonukleotid („antisense“) u velikom višku (5 puta veća količina), kako bi sve jednolančane obeležene probe bile uključene u reakciju hibridizacije. Hibridizacija obeleženog i neobeleženog oligonukleotida postignuta je kratkom denaturacijom na temperaturi od 90°C u toku 3 min i renaturacijom - sporim hlađenjem do ST. Specifični aktivitet oligonukleotidne probe određivan je merenjem na scintilacionom brojaču (*LKB*). U svakoj EMSA reakciji korišćeno je 10000 cpm obeležene probe. Pripremljena obeležena proba čuvana je na -20°C. Reakcija prevođenja neobeleženih proba u dvolančanu formu vršena je na isti način.

Metodom EMSA ispitivana je DNK vezujuća aktivnost jedarnih proteina izolovanih iz intestinalnog tkiva pacijenata, kontrolnih ispitanika i HeLa ćelija. HeLa DNK-proteinski kompleks je služio kao „standard“ u svim elektroforezama. Između ispitanika je na ovaj način bilo moguće porediti intezitete DNK vezujuće aktivnosti NF-κB, detektovane tokom različitih elektroforeza [van den Berg i sar., 2001].

Reakciona smeša za EMSA analizu, finalne zapremine 25 μ l, sastojala se iz:

- 10000 cpm 32 P obeležene dvolančane probe
- 2 μ g jedarnih proteina
- 1 x pufera za vezivanje (10 x pufer: 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 250 mM NaCl, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 50 % glicerola)
- 50 ng nespecifičnog dvolančanog kompetitora, Poly(dI-dC) (*Sigma-Aldrich*)

U zavisnosti od vrste EMSA eksperimenta, smeši su dodavane i sledeće komponente:

- Specifični kompetitor - hladna proba (neobeležena NF- κ B dvolančana proba, dodata u molarnom višku od 10 - 100 puta)
- Antitelo anti-p65 (0.2 μ g/ μ l), 2 μ g po reakciji (*Abcam, Cambridge, UK*)

Reakciona smeša pripremana je na ledu, a potom inkubirana na 37°C tokom 30 min. U slučaju *supershift* analize, antitelo i proteini su pre dodavanja radioaktivno obeležene probe inkubirani na ledu 30 min, a zatim još 30 min na ST. Nakon inkubacije jedarnih proteina sa probom, reakcionoj smeši je dodavano 6 μ l boje (0.25%, brom fenol plavo, 0.25% ksilen cijanol, 30% glicerol) i potom je smeša nanošena na gel. Za elektroforetsko razdvajanje fragmenata korišćen je 4% poliakrilamidni gel (akrilamid : N,N'-metilenbisakrilamid, u odnosu 29 : 1). Kao inicijatori polimerizacije korišćeni su 0.1% amonijumpersulfat (APS) i 0.01% tetrametiletildiamin (TEMED), dok je za pripremanje gela korišćen 0.5 x TBE pufer (100 mM Tris, 83 mM borna kiselina, 1 mM EDTA pH 8.0), koji je takođe korišćen i kao pufer za elektroforezu. Elektroforeza se odvijala pri konstantnom naponu od 250 V i struji od 65 mA u toku jednog sata. Poliakrilamidni gel je sušen i analiziran na aparatu *Phosphor Imager* (*Cyclone, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA*) ili eksponiranjem radiografskih filmova.

Razvijeni filmovi su skenirani u visokoj rezoluciji (600 dpi) i analizirani u *GelQuant NET* softveru, programu za denzitometrijsku semikvantifikaciju (*Biochem Lab Solutions*). U programu su izmereni inteziteti formiranih DNK-proteinskih kompleksa i predstavljeni relativno u odnosu na HeLa standard.

3.5. Statistička obrada rezultata

Za testiranje razlika u zastupljenosti genotipova između pacijenata i kontrolnih ispitanika korišćeni su Pearsonov hi-kvadrat (χ^2) test nezavisnosti i Fisherov egzaktni test. Tabela kontigencije 2x2 korišćena je za računanje količnika verovatnoće (eng. *odds ratio* - OR) sa odgovarajućim 95% intervalom poverenja (eng. *confidence interval* - CI). Testiranja su vršena korišćenjem dominantnog genetičkog modela po kome se heterozigotni i homozigotni nosioci ređeg alela zajedno analiziraju u odnosu na homozigotne nosioce učestalijeg alela. U cilju smanjenja greške koja nastaje višestrukim testiranjem, za svaku grupu testova izvršena je korekcija nivoa značajnosti upotrebom *Benjamini–Hochberg* procedure (B-H), kojom se uvodi nivo lažnog otkrića (eng. *false discovery rate* - FDR) [Benjamini i sar., 1995]. Usvojen nivo FDR je bio 0.1, što znači da je u proseku 10% značajnih asocijacija dobijenih nakon korekcije bilo lažno pozitivno. Za svaki analizirani genski lokus ispitano je da li distribucija genotipova prati Hardy-Vajnbergovu ravnotežu upotrebom χ^2 testa za ponašanje po distribuciji (eng. *goodness of fit*).

Za pravljenje modela koji predviđa prisustvo bolesti, rezultati dobijeni analizom varijanti gena ispitivanih u ovoj studiji, kao i informacije o polu ispitanika, poslužili su kao set podataka (eng. *input*) za analizu predikcije, korišćenjem nekoliko algoritama „mašinskog učenja“. Modeli su napravljeni korišćenjem dve grupe podataka: prvu grupu je činilo 72 pacijenta sa KB i 101 kontrolni ispitanik (KB set podataka, n = 173); drugu grupu je činilo 95 pacijenata sa UK i 101 kontrolni ispitanik (UK set podataka, n = 196). Kao mera kvaliteta modela korišćena je vrednost površine ispod *receiver operating* krive (eng. *the area under the receiver operating curve*, AUC) [Fawcett 2006], s obzirom da se ona najčešće koristi u genetičkim prediktivnim modelima [Janssens i sar., 2006]. AUC predstavlja procenjenu verovatnoću da će između dve nasumično izabrane osobe model dodeliti pozitivan rezultat bolesnoj, a negativan rezultat zdravoj osobi. AUC vrednost varira između 0.5 (nasumična klasifikacija) i 1 (savršena klasifikacija). Da bismo izabrali najoptimalniji model, primenili smo *k-fold* validaciju [Krstajic i sar., 2014], kao metod koji odgovara veličini našeg uzorka. Upotrebljene su 4 klasifikujuće metode u statističkom programu R (*R Development Core Team*):

1. *Elastic Net* - glmnet R paket, v. 1.9.8 [Friedman i sar., 2010]
2. *Neural Net* - nnet R paket, v. 7.3-8 [Venables i sar., 2002]
3. *Random Forest* - randomForest R paket, v. 4.6-10 [Liaw i sar., 2002]
4. dva tipa SVM (eng. *support vector machine*): linearni i rbf (eng. *radial basis function*) - R e1071 paket, v. 1.6-3 [Dimitriadou i sar., 2009]

Za statističku analizu nivoa ekspresije odabranih gena u ispitivanim grupama korišćene su mere centralne tendencije (srednja vrednost, standardna devijacija, medijana), dok su za testiranje razlika između grupa korišćeni neparametarski testovi - Kruskal-Volisov (sa Dan-Bonferoni *post-hoc* testom), Vilkoksonov test ranga i Man-Vitnijev *U* test. Za ispitivanje prediktivnog značaja analiziranih parametara korišćena je metoda logističke regresije i ROC analiza (eng. *receiver operating curve*).

Za statističku analizu izmerenih inteziteta NF- κ B-DNK kompleksa u ispitivanim grupama je korišćena medijana sa 95% intervalom poverenja. Za testiranje razlika u intezitetu formiranih kompleksa između grupa korišćen je Kruskal-Volisov test (sa Dan-Bonferoni *post-hoc* testom).

Statističke analize urađene su pomoću programa SPSS v.21 (*IBM SPSS Statistics, Chicago, USA*), dok je za dizajn prediktivnih modela korišćen program R v.3.0.3. Nivo statističke značajnosti je bio 0.05, a svi testovi su bili nedirekcioni (dvostrani).

4. REZULTATI

4.1. Ispitivanje uticaja genetičkih varijanti na rizik za nastanak hroničnih inflamatornih bolesti creva

U ovoj studiji ispitana je asocijacija varijanti u genima *NOD2*, *TLR4*, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* i *IL-IRN* sa pojavom KB i UK. Zatim su napravljeni modeli za predikciju KB i UK u koje su uključeni podaci o svim analiziranim genetičkim varijantama, kao i informacija o polu ispitanika. Takođe, ispitana je asocijacija varijante u genu *IL-6* sa granulomatoznim bolestima, u koje spadaju KB i RA. Na kraju je ispitana asocijacija varijanti gena *HLA-DQ* sa rizikom za nastanak CB.

4.1.1. Inflamatorne bolesti creva

4.1.1.1. Demografski i klinički opis ispitanika uključenih u studiju

Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa IBC prikazane su u tabeli 9. Demografske karakteristike zdravih ljudi, koji su u ovoj studiji korišćeni kao kontrolni ispitanici, prikazani su u tabeli 10. Kontrolna grupa je po uzrastu i polu usaglašena sa grupom pacijenata.

Tabela 9. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa IBC

Karakteristike	KB	UK
Ukupan broj pacijenata	N = 72	N = 95
Pol (muškarci/žene), br.	38/34	48/47
Starost (god.), medijana (opseg)	35.5 (19 - 64)	43.0 (20 - 78)
Pacijenti u aktivnoj fazi bolesti , br. (%)	44 (61.1%)	63 (66.3%)
Pacijenti u neaktivnoj fazi bolesti , br. (%)	28 (38.9%)	32 (33.7%)
Porodična istorija bolesti , br.(%)	8 (11.0%)	10 (10.5%)
Operacije , br. (%)	29 (40.3%)	3 (3.1%)
EIM^s , br. (%)	12 (16.6%)	19 (20.0%)
Terapija , br. (%)		
• Bez terapije [‡]	11 (15.3%)	12 (12.6%)
• 5-Aminosalicilna kiselina (5-ASA)	28 (38.9%)	51 (53.7%)
• Kortikosteroidi i/ili Imunomodulatori	32 (44.4%)	28 (29.5%)
• Infliksimab	1 (1.4%)	4 (4.2%)

Početak bolesti[†]			
KB - br. (%)		UK - br. (%)	
A1 (< 16 god.)	1 (1.4%)	A1 (< 16 god.)	1 (1.1%)
A2 (17 - 40 god.)	59 (81.9%)	A2 (17 - 40 god.)	76 (80.0%)
A3 (> 40 god.)	12 (16.7%)	A3 (> 40 god.)	18 (18.9%)
Lokalizacija bolesti[†]			
KB - br. (%)		UK - br. (%)	
L1 (ileum)	25 (34.7%)	E1 (proktitis)	16 (16.8%)
L2 (kolon)	19 (26.4%)	E2 (levostrani kolitis)	28 (29.5%)
L3 (ileum i kolon)	28 (38.8%)	E3 (prošireni kolitis)	51 (53.7%)
L4 (gornji GI trakt)*	0 (0.0%)		
Fenotip bolesti[†]			
KB - br. (%)		UK - br. (%)	
B1 (nestrikturirajući, nepenetrirajući)	38 (52.8%)	S0 (remisija)	24 (25.2%)
B2 (strikturirajući)	17 (23.6%)	S1 (blag oblik)	40 (42.1%)
B3 (penetrirajući)	11 (15.3%)	S2 (umeren oblik)	21 (22.1%)
B2 + B3	6 (8.3%)	S3 (teški oblik)	10 (10.5%)
P (perianalna bolest) [†]	10 (13.9%)		

Napomena:

§EIM – Ekstraintestinalne manifestacije

≠ Pacijenti koji nisu bili izloženi bilo kojoj vrsti terapije u trenutku uzimanja uzorka

†Montrealska klasifikacija bolesti

ⁱ „p” se dodaje fenotipu B1 - B3 ako uz njega postoji i pridružena perianalna bolest

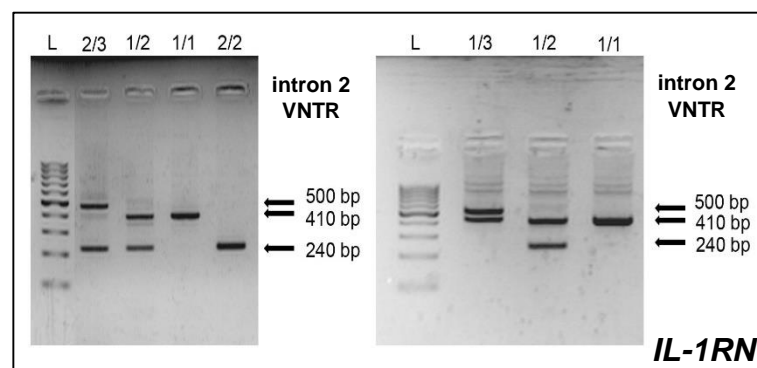
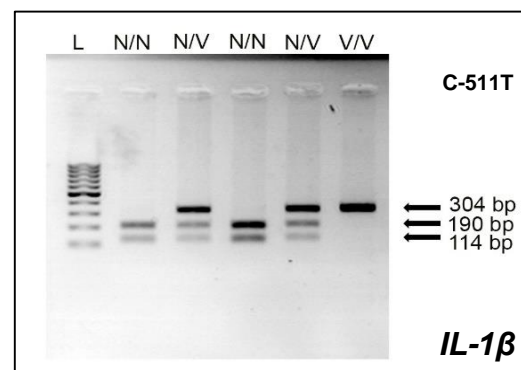
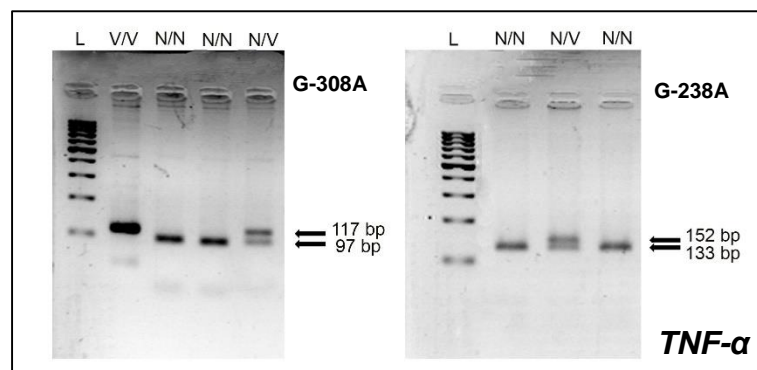
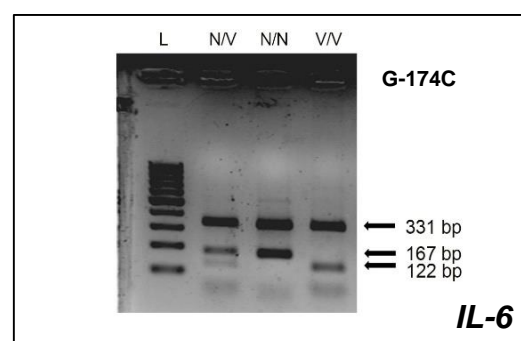
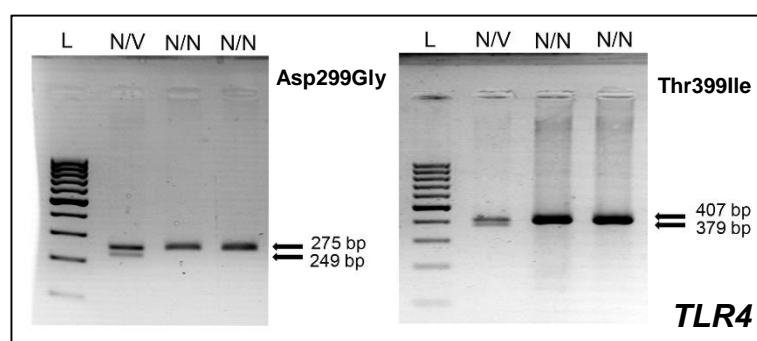
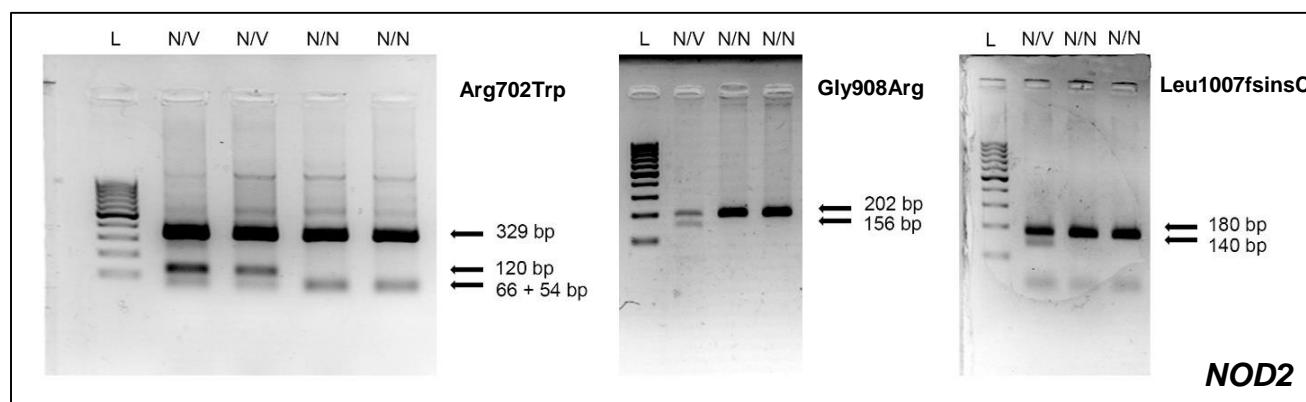
* Može biti dodat lokalizaciji L1 - L3 ako uz nju postoji i bolest gornjeg gastrointestinalnog (GI) trakta

Tabela 10. Demografske karakteristike zdravih ispitanika uparenih sa IBC grupom

Karakteristike	Kontrolni ispitanici
Ukupan broj ispitanika	N = 101
Pol (muškarci/žene), br.	50/51
Starost (god.), medijana (opseg)	38.0 (21 - 83)

4.1.1.2. Detekcija odabranih genetičkih varijanti

Korišćenjem metode PCR-RFLP ispitano je prisustvo 10 genetičkih varijanti. Na slici 7 prikazani su profili fragmenata DNK koji se dobijaju nakon izvršene digestije.



Slika 7. Detekcija ispitivanih genetičkih varijanti primenom metode PCR-RFLP. Iznad svakog uzorka na gelu naznačeno je da li je ispitanik homozigotni nosilac češćeg („normalnog“) alela (N/N), heterozigotni nosilac (N/V) ili homozigotni nosilac ređeg („varijantnog“) alela (V/V). U slučaju *IL-1RN*, jedna PCR reakcija je bila dovoljna za detekciju A1/2/3 alela (kombinacije su prikazane na slici). Za procenu dužine dobijenih fragmenata korišćena je DNK molekulska lestvica od 100 bp (L).

4.1.1.3. Analiza asocijacija ispitivanih genetičkih varijanti sa prisustvom IBC

Genotipizacijom pacijenata sa KB i UK, kao i zdravih ispitanika, utvrđena je distribucija genotipova i alela za *NOD2*, *TLR4*, *TNF-α*, *IL-6*, *IL-1β* i *IL-1RN* u ove tri grupe (tabela 11).

Tabela 11. Učestalost genotipova i alela vezanih za ispitivane genetičke varijante u grupama pacijenata sa KB, UK i u kontrolnoj grupi

Genetičke varijante	Genotip	Učestalost genotipova (%)			Učestalost alela				<i>p</i> vrednost		
		KB n = 72	UK n = 95	Kontr n = 101	Alel	KB	UK	Kontr	<i>p</i> *	<i>p</i> **	<i>p</i> ***
<i>NOD2</i> Arg702Trp Gly908Arg Leu1007fsinsC Arg684Trp	Wt	56 (77.8)	/	95 (94.0)	702Trp	0.03	/	0.01	0.2 [†]	/	/
	Ht	14 (19.4)	/	6 (6.0)	908Arg	0.03	/	0.005	0.03 [†]	/	/
	sHt	2 (2.8)	/	0 (0.0)	1007fs	0.06	/	0.01	0.03 [†]	/	/
					684Trp [‡]	0.01	/	0.00	/	/	/
<i>TLR4</i> Asp299Gly	Asp/Asp	60 (83.3)	80 (84.2)	94 (93.1)	Asp	0.91	0.92	0.97	0.03	0.06	0.71
	Asp/Gly	11 (15.3)	15 (15.8)	7 (6.9)	Gly	0.09	0.08	0.03			
	Gly/Gly	1 (1.4)	0 (0.0)	0 (0.0)							
<i>TLR4</i> Thr399Ile	Thr/Thr	61 (84.7)	79 (83.2)	91 (90.1)	Thr	0.92	0.92	0.95	0.20	0.17	1.00
	Thr/Ile	10 (13.9)	16 (16.8)	10 (9.9)	Ile	0.08	0.08	0.05			
	Ile/Ile	1 (1.4)	0 (0.0)	0 (0.0)							
<i>TNF-α</i> G-308A	GG	47 (65.3)	85 (89.5)	80 (79.2)	G	0.82	0.95	0.89	0.06	0.04	0.0002
	GA	24 (33.3)	10 (10.5)	20 (19.8)	A	0.18	0.05	0.11			
	AA	1 (1.4)	0 (0)	1 (1)							
<i>TNF-α</i> G-238A	GG	68 (94.4)	89 (93.7)	94 (93.1)	G	0.97	0.97	0.97	0.77 [†]	1.00	1.00 [†]
	GA	4 (5.6)	6 (6.3)	7 (6.9)	A	0.03	0.03	0.03			
	AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)							
<i>IL-6</i> G-174C	GG	24 (33.3)	40 (42.1)	51 (50.5)	G	0.61	0.66	0.69	0.14	0.52	0.38
	GC	40 (55.6)	45 (47.4)	37 (36.6)	C	0.39	0.34	0.31			
	CC	8 (11.1)	10 (10.5)	13 (12.9)							
<i>IL-1β</i> C-511T	CC	33 (45.8)	36 (37.9)	42 (41.6)	C	0.67	0.63	0.64	0.50	0.81	0.37
	CT	31 (43.1)	47 (49.5)	45 (44.5)	T	0.33	0.37	0.36			
	TT	8 (11.1)	12 (12.6)	14 (13.9)							
<i>IL-1RN</i> VNTR	A1A1	34 (47.2)	47 (49.5)	68 (67.3)	A1	0.68	0.71	0.79	0.05 [†]	0.17 [†]	0.76 [†]
	A1A2	28 (38.9)	39 (41.1)	22 (21.8)	A2	0.30	0.26	0.19			
	A2A2	7 (9.7)	4 (4.2)	7 (6.9)	A3	0.02	0.03	0.02			
	A1A3	2 (2.8)	2 (2.1)	2 (2.0)							
	A2A3	1 (1.4)	3 (3.2)	2 (2.0)							

Napomena za tabelu 11:

- Za ispitivanje razlika između KB i kontrolne grupe ^{*}, UK i kontrolne grupe ^{**}, KB i UK grupe ^{***} korišćen je Pearsonov χ^2 test. Neka poređenja zahtevala su Fisherov egzaktni test[†]. [‡] U slučaju *NOD2* 684Trp varijante test nije primenjen s obzirom da je ova genetička varijanta detektovana samo kod jednog pacijenta.

- Istaknuta *p* vrednost predstavlja jedinu statistički značajnu razliku nakon *Benjamini-Hochberg* korekcije za višestruka testiranja. Prihvaćen procenat lažnih otkrića (FDR) je 10%. Pod ovim uslovom, korigovani nivo značajnosti za testiranja između KB i UK iznosio je *pk* = 0.01. Nakon korekcije, razlike između KB i kontrolne grupe, kao i UK i kontrolne grupe, nisu bile statistički značajne.

- Skraćenice: Wt – učestaliji, „wild type“ genotip; Ht - heterozigot; sHt - složeni heterozigot; Kontr - kontrolna grupa

Aleli asocirani sa pojavom IBC

Nađena je asocijacija *NOD2* 908Arg i 1007fsinsC alela sa KB (*F*, *p* = 0.03 i *p* = 0.03), dok alel 702Trp nije pokazao značajno veću učestalost u grupi bolesnih u odnosu na kontrolnu grupu (*F*, *p* = 0.2). Kod jednog pacijenta detektovana je retka genetička varijanta *NOD2* 684Trp.

Učestalost *TLR4* 299Gly alela je bila značajno veća kod pacijenata sa KB u odnosu na kontrolne ispitanike (χ^2 (1) = 4.78, *p* = 0.03). Učestalost ovog alela je takođe bila viša kod pacijenata sa UK u odnosu na kontrolne ispitanike, ali razlika nije pokazala statističku značajnost (χ^2 (1) = 3.63, *p* = 0.06).

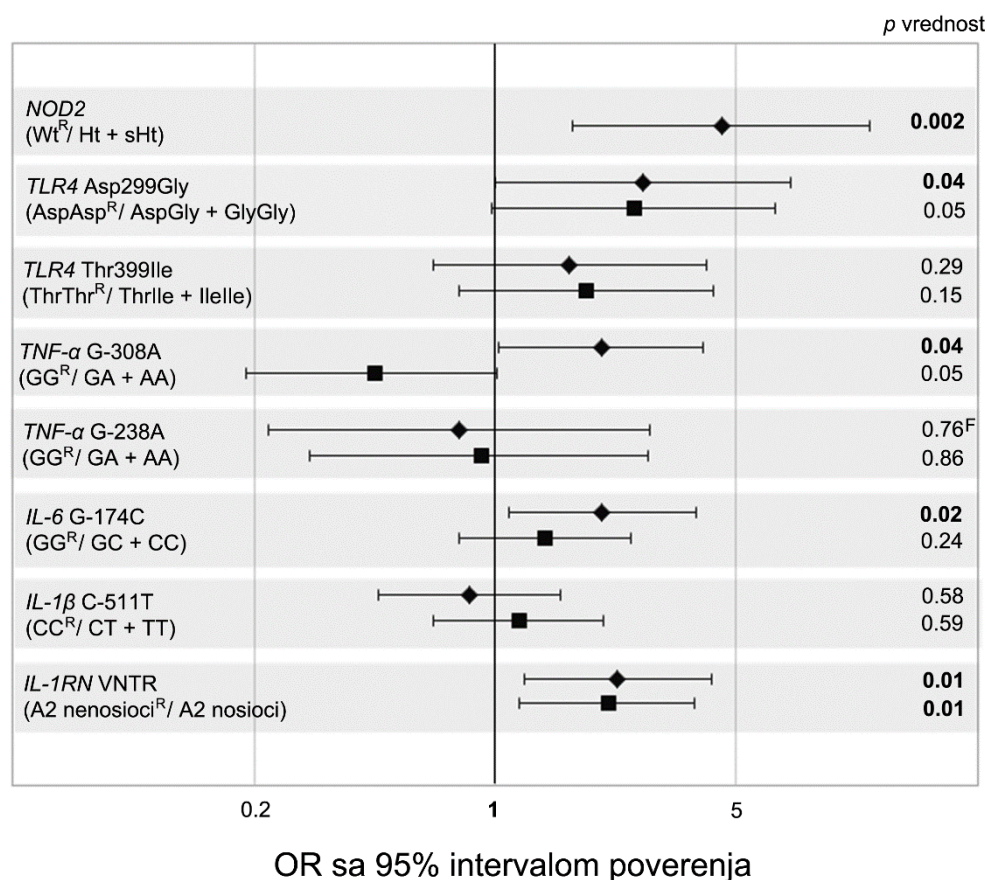
Analiza vezana za varijantu *TNF α* G-308A je pokazala da je alel A povezan sa KB (χ^2 (1) = 3.61, *p* = 0.06), dok je alel G povezan sa UK (χ^2 (1) = 4.14, *p* = 0.04). Kada je distribucija alela upoređena između pacijenata sa KB i UK, razlika je pokazala visok nivo statističke značajnosti (χ^2 (1) = 13.94, *p* = 0.0002).

Nakon genotipizacije VNTR u intronu gena *IL-1RN*, u celokupnom uzorku su detektovani samo aleli A1, A2 i A3. Alel A1 je bio dominantniji u grupi zdravih, a A2 u grupi bolesnih. Razlika u distribuciji alela A1, A2 i A3 između pacijenata sa KB i kontrolnih ispitanika je bila na granici statističke značajnosti (*F*, *p* = 0.05).

Uvođenjem *Benjamini-Hochberg* korekcije za višestruka testiranja (B-H, FDR = 10%), sve značajne razlike su bile izgubljene, sem za razliku u distribuciji alela *TNF α* G-308A između KB i UK grupe.

Genotipovi asocirani sa pojavom IBC

Da bismo ispitali rizik koji genotipovi nose za razvoj IBC, izračunali smo količnik verovatnoće, OR (eng. *odds ratio*), i njegov 95% interval poverenja, uz pomoć 2x2 tabela kontigencije i primenom dominantnog genetičkog modela. Slika 8 prikazuje izračunte OR, 95% intervale poverenja i *p* vrednosti vezane za ispitivane genotipove za poređenja - KB : kontrolna grupa i UK : kontrolna grupa.



Slika 8. Asocijacija ispitivanih genotipova sa prisustvom KB i UK. Za svaki genotip procenjena OR vrednost je predstavljena kao simbol (♦ - poređenje između KB i kontrolne grupe, ■ - poređenje između UK i kontrolne grupe). Linijama je pokriven 95% interval poverenja za odgovarajuću OR vrednost. Vrednost veća od 1 predstavlja pozitivnu asocijaciju, dok vrednost manja od 1 predstavlja

negativnu asocijaciju. Ukoliko 95% interval poverenja ne uključuje vrednost 1, smatra se da asocijacija ima statističku značajnost. Odgovarajuće p vrednosti dobijene su Pirsonovim χ^2 i Fišerovim egzaktnim testom (F). Nakon usvojenog FDR od 10%, korigovani nivo statističke značajnosti iznosio je $pk = 0.06$ za višestruka testiranja između KB i kontrolne grupe, a $pk = 0.01$ za višestruka testiranja između UK i kontrolne grupe. Istaknute p vrednosti su ostale značajne i nakon korekcije. Skraćenice: Wt – učestaliji, „wild type“ genotip; Ht - heterozigot; sHt - složeni heterozigot; R-referentni genotip.

U proceni rizika za nastanak KB uzete su u obzir sve četiri manje učestale varijante u genu *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC, Arg684Trp), bilo da su prisutne u heterozigotnom ili složenom heterozigotnom genotipu. Nosioci ređih genotipova *NOD2* imali su 4.5 puta veću šansu da razviju KB u odnosu na nosioce učestalijeg genotipa (OR = 4.52, 95% CI 1.67-12.23; $\chi^2(1) = 10.04$, $p = 0.002$).

Rezultati su pokazali da je kod nosioca genotipova *TLR4* 299 Asp/Gly i Gly/Gly šansa za dobijanje KB bila 2.7 puta veća (OR = 2.69, 95% CI 1.00-7.21; $\chi^2(1) = 4.08$, $p = 0.04$), a za UK 2.5 puta veća (OR = 2.52, 95% CI 0.98-6.48; $\chi^2(1) = 3.86$, $p = 0.05$) u poređenju sa nosiocima genotipa Asp/Asp.

Genotipovi *TNF- α* -308 GA i AA pokazali su pozitivnu asocijaciju sa KB (OR = 2.03, 95% CI 1.02-4.0, $\chi^2(1) = 4.18$; $p = 0.04$), ali negativnu sa UK (OR = 0.45, 95% CI 0.19-1.01; $\chi^2(1) = 3.87$, $p = 0.05$).

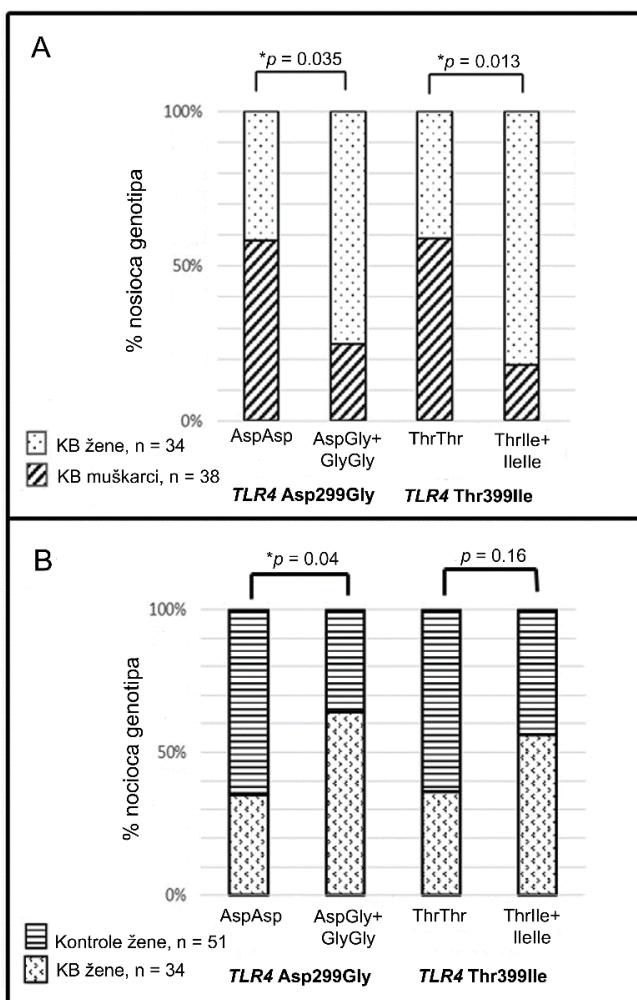
Na osnovu dobijenih rezultata za *IL-6* -174, procenjeno je da su nosioci genotipova GC i CC imali 2 puta veću šansu da razviju KB u odnosu na nosioce genotipa GG (OR = 2.04, 95% CI 1.09-3.81; $\chi^2(1) = 5.04$, $p = 0.02$).

Takođe, pokazano je da genotipovi *IL-1RN* koji sadrže alel A2 (A1A2, A2A2 i A2A3) nose veći rizik za razvoj KB (OR = 2.26, 95% CI 1.21-4.22, $\chi^2(1) = 6.6$, $p = 0.01$), kao i UK (OR = 2.12, 95% CI 1.18-3.80, $\chi^2(1) = 6.45$, $p = 0.01$) u odnosu na genotipove koji ga ne sadrže (A1A1, A1A3).

Nakon uvedene korekcije za višestruka testiranja (B-H, FDR = 10%), asocijacije između KB i ispitivanih varijanti u genima *NOD2*, *TLR4* (299), *TNF- α* (-308), *IL-6* i *IL-1RN* ostale su značajne, dok je kod UK značajna asocijacija zadržana samo sa varijantom u genu *IL-1RN*.

Interakcija pola i genotipa *TLR4* u pojavi KB

Rezultati su ukazali na značajnu polnu razliku u distribuciji ispitivanih genotipova *TLR4* među pacijentima sa KB (Slika 9A). Uzimajući u obzir genetičke varijante Asp299Gly i Thr399Ile, utvrđeno je da su nosioci manje učestalog alela među pacijentima većinom bile žene. U KB grupi, identifikovano je 26.5% žena-nosioca alela 299Gly u poređenju sa 7.9% muškaraca ($\chi^2(1) = 4.46, p = 0.035$). Slično, kod 26.5% obolelih žena i 5.3% obolelih muškaraca identifikovan je alel 399Ile ($\chi^2(1) = 6.24, p = 0.013$). Razlika u distribuciji genotipova *TLR4* između polova nije nađena u grupi zdravih ispitanika. Takođe, poređenjem učestalosti nosioca alela 299Gly između zdravih žena i onih obolelih od KB, nađena je značajna razlika - 9.8% žena u kontrolnoj grupi nosilo je alel 299Gly u odnosu na 26.5% žena u grupi obolelih od KB ($\chi^2(1) = 4.12, p = 0.04$) (slika 9B).



Slika 9. Razlike u distribuciji genotipova *TLR4* između polova kod KB pacijenata

- A. Grafikon prikazuje razliku u distribuciji genotipova vezanih za genetičke varijante *TLR4* Asp299Gly i Thr399Ile između polova u grupi obolelih od KB. Među nosiocima genotipova 299 Asp/Gly i Gly/Gly, kao i genotipova 399 Thr/Ile i Ile/Ile, žene su bile učestalije nego muškarci. Ove razlike su pokazale statističku značajnost ($p = 0.035$ i $p = 0.013$).
- B. Razlike u distribuciji genotipova *TLR4* prikazane su između kontrolne grupe i KB grupe. Žene sa KB češće su bile nosioci genotipova 299 Asp/Gly i Gly/Gly ($p = 0.04$), kao i genotipova 399 Thr/Ile i Ile/Ile (bez statističke značajnosti) u poređenju sa zdravim ženama.

4.1.1.4. Hardy-Vajnbergova ravnoteža

Na osnovu distribucije analiziranih genotipova je utvrđeno da su KB, UK i kontrolna grupa u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži za sve ispitivane genetičke varijante, izuzev za varijantu u genu *IL1-RN* u kontrolnoj grupi, gde su homozigoti (A1A1 i A2A2) bili zastupljeni više, a heterozigoti (A1A2) manje nego što je očekivano ($p = 0.04$).

4.1.1.5. Prediktivni model

U pravljenju modela za predikciju KB i UK koristili smo pet klasifikacionih metoda. Kvalitet predikcije ispitan je kroz sposobnost modela da klasifikuje individue kao bolesne ili zdrave. Mera preciznosti klasifikacije modela izražena je preko AUC vrednosti. U model za predikciju KB uključili smo podatke dobijene analizom varijanti u genima *NOD2*, *TLR4*, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* i *IL-1RN*, kao i podatke vezane za pol ispitanika. Model za predikciju UK uključivao je sve genetičke varijante kao za KB, osim varijanti u genu *NOD2*. Najveća preciznost klasifikacije je postignuta kada su sve analizirane genetičke varijante bile uključene, a ne samo one koje su pokazale značajnu asocijaciju sa KB i UK.

U tabeli 12 prikazane su AUC vrednosti za KB i UK set podataka, za pet korišćenih klasifikatora. Poredeći učinak klasifikacionih metoda, pokazano je da rbf SVM metod daje predikciju sa najvećim kvalitetom (AUC = 0.69 za KB i AUC = 0.60 za UC set podataka). Ovo znači da prediktivni model u koji su uključene informacije o ispitivanim genetičkim varijantama, zajedno sa podacima o polu ispitanika, može razlikovati pacijente sa KB od zdravih ispitanika u 69% slučajeva, a pacijente sa UK od zdravih ispitanika u 60% slučajeva.

Tabela 12. AUC vrednosti korišćenih modela za predikciju KB i UK baziranih na informacijama o genotipu i polu ispitanika

Algoritam	KB <i>AUC</i>	UK <i>AUC</i>
<i>Elastic Net</i>	0.653	0.551
<i>Neural Net</i>	0.655	0.555
<i>Random forest</i>	0.642	0.534
<i>linear SVM</i>	0.656	0.576
<i>rbf SVM</i>	0.690	0.601

4.1.1.6. Ispitivanje genetičkih markera granulomatoznih bolesti - poređenje Kronove bolesti sa reumatoidnim artritisom

Jedna od karakteristika KB je prisustvo granulomatoznih formacija u intestinalnoj mukози. Granulomatозна inflamacija je karakteristična i za druge bolesti, uključujući reumatoidni artritis (RA). Poznato je da postoji preklapanje genetičkih markera između KB i RA [Richard-Miceli i sar., 2012]. S tim u vezi, naš cilj je bio da ispitamo da li je *IL-6* G-174C zajednički genetički marker ova dva tipa granulomatoznih bolesti.

Distribucija genetičke varijante *IL-6* G-174C u analiziranoj grupi pacijenata sa RA [Jancic i sar., 2013] upoređena je sa grupom pacijenata sa KB i kontrolnim ispitanicima, i prikazana u tabeli 13.

Tabela 13. Distribucija *IL-6* genotipova u KB, RA i kontrolnoj grupi

Genotip, n (%)		KB	RA	Kontrole
<i>IL-6</i> G-174C	GG	24 (33.3)	23 (29.8)	51 (50.5)
	GC	40 (55.6)	45 (58.4)	37 (36.6)
	CC	8 (11.1)	9 (11.7)	13 (12.9)

Slično kao kod pacijenata sa KB, učestalost nosioca alela -174C bila je značajno veća kod pacijenata sa RA u poređenju sa kontrolnim ispitanicima ($\chi^2 (2) = 7.65, p = 0.006$).

4.1.1.7. Sažetak rezultata

Rezultati pokazuju da su analizirane varijante u genima *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC, Arg684Trp), *TLR4* (Asp299Gly), *TNF- α* (G-308A), *IL-6* (G-174C) i *IL-1RN* (A2 VNTR) asocirane sa pojavom KB, dok je pojava UK asocirana samo sa varijantom u genu *IL-1RN* (A2 VNTR). Kod pacijenata sa KB je pokazana asocijacija pola i genotipa *TLR4*. Prediktivni model koji uključuje podatke o svim ispitivanim genetičkim varijantama, kao i podatke o polu ispitanika, pokazuje bolji kvalitet u predikciji KB u odnosu na predikciju UK. Ovaj model razlikuje ispitanike sa KB u odnosu na zdrave ispitanike u 69% slučajeva, a ispitanike sa UK u odnosu na zdrave ispitanike u 60% slučajeva.

Genetička varijanta *IL-6 G-174C* je asocirana sa pojavom KB i RA. S obzirom da su obe patologije granulomatoznog tipa, *IL-6 G-174C* može biti potencijalni marker inflamatornih poremećaja koji u svojoj osnovi imaju granulomatoznu formaciju.

4.1.2. Celijačna bolest

4.1.2.1. Demografski opis ispitanika uključenih u studiju

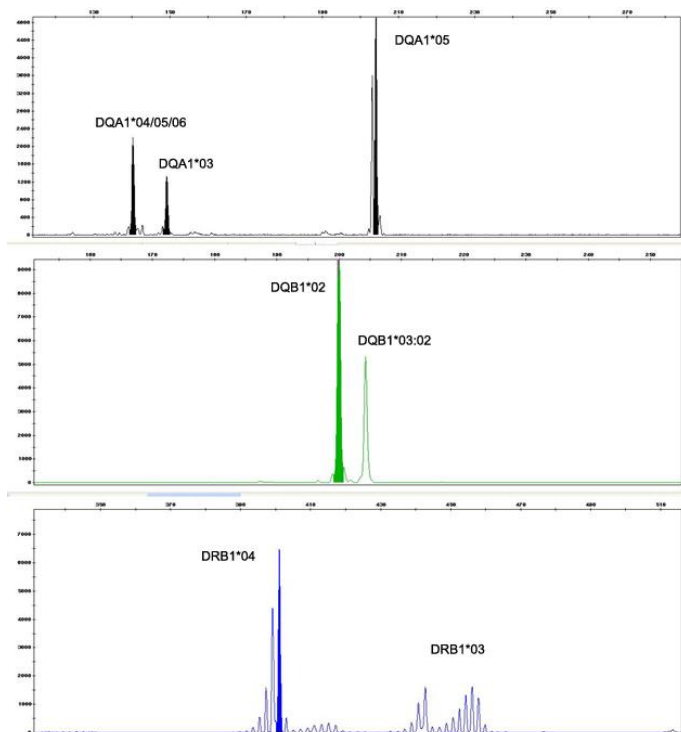
Demografske karakteristike pacijenata sa CB i zdravih ispitanika čiji su uzorci korišćeni u ovoj studiji prikazane su u tabeli 14.

Tabela 14. Demografske karakteristike pacijenata sa CB i kontrolnih ispitanika

Karakteristike	CB	Kontrolni ispitanici
Ukupan broj pacijenata	N = 73	N = 62
Pol (muškarci/žene), br.	19/54	27/35
Starost (god.), medijana (opseg)	12 (1 - 22)	11 (1 - 53)

4.1.2.2. Detekcija varijanti gena *HLA-DQ*

Korišćenjem metode PCR-SSP praćene fragment analizom (FA), kod pacijenata sa CB i kontrolnih ispitanika ispitano je prisustvo *HLA-DQA1*, *-DQB1* i *-DRB1* genskih varijanti. Zahvaljujući visokom stepenu neravnoteže u nasleđivanju ova tri alela, haplotipovi svakog pacijenta se mogu utvrditi dedukcionom analizom. Slika 10 prikazuje profile analiziranih alela nakon FA.



Slika 10. Elektroforegram na kome su prikazani pikovi karakteristični za različite *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* i *HLA-DRB1* alele. Prikazani ispitanik je heterozigotni nosilac dva rizična haplotipa *DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02* i *DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03:02*.

4.1.2.3. Imenovanje varijanti gena *HLA-DQ*

Nakon utvrđivanja haplotipova, *HLA-DRB1-DQA1-DQB1* varijante su klasifikovane na osnovu prisustva i hromozomske pozicije alela povezanih sa rizikom za nastanak CB. Metod klasifikacije i imenovanja je prihvaćen iz prethodnih studija [Megiorni i sar., 2009; Piccini i sar., 2012] i prikazan u tabeli 15.

Tabela 15. Sistem klasifikacije *HLA-DRB1-DQA1-DQB1* varijanti

<i>DQ2.5</i>	<i>DQA1*05</i> i <i>DQB1*02</i> su prisutni na istom hromozomu („ <i>in cis</i> “ konfiguracija)
$\beta 2$	prisustvo <i>DQB1*02</i> / odsustvo <i>DQA1*05</i>
$\alpha 5$	prisustvo <i>DQA1*05</i> / odsustvo <i>DQB1*02</i>
$\alpha 5/\beta 2$	<i>DQA1*05</i> i <i>DQB1*02</i> su prisutni na različitim hromozomima („ <i>in trans</i> “ konfiguracija)
<i>DQ8</i>	<i>DQA1*03</i> i <i>DQB1*03:02</i> su prisutni na istom hromozomu
<i>X</i>	odsustvo oba <i>DQA1*05</i> i <i>DQB1*02</i> alela

4.1.2.4. Analiza asocijacija genotipova *HLA-DQ* sa pojavom CB

Kod dece obolele od CB i kod zdravih ispitanika je izvršena identifikacija *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* i *HLA-DRB1* alela, a zatim je utvrđen haplotip ispitanika. U tabeli 16A prikazana je distribucija genotipova *HLA-DQ* u grupi bolesnih i kontrolnoj grupi. Razlike u frekvenci genotipova između grupa su testirane Fišerovim egzaktnim testom.

Test je pokazao pozitivnu asocijaciju između CB i genotipova *DQ2.5/DQ2.5*, *DQ2.5/β2* i *DQ2.5/X* ($p = 0.006$, $p = 0.02$ i $p = 4.5 \times 10^{-6}$). Negativna asocijacija je nađena između pojave CB i prisustva alela *DQA1*05* ($p = 4.6 \times 10^{-7}$), ali samo ukoliko je ovaj alel prisutan nezavisno od alela *DQB1*02* ($\alpha5/X$). Genotipovi koji u svom sastavu nisu imali alele *DQA1*05* i *DQB1*02* (označeni kao *X/X*), pokazali su jasnu negativnu asocijaciju sa pojavom CB ($p = 3 \times 10^{-6}$).

Tabela 16. Distribucija genotipova *HLA-DQ* kod pacijenata sa CB i zdravih ispitanika

	<i>HLA-DQ</i> genotip	CB (n=73)		Kontrole (n=62)		<i>p</i>
		n	%	n	%	
A	<i>DQ2.5/DQ2.5</i>	14	19.2	2	3.2	0.006
	<i>DQ2.5/β2</i>	12	16.4	2	3.2	0.02
	<i>DQ2.5/X</i>	38	52.1	9	14.5	4.5×10^{-6}
	<i>DQ8/DQ8</i>	0	0.0	1	1.6	0.46
	<i>DQ8/X</i>	2	2.7	10	16.1	0.01
	$\alpha5/\beta2$	5	6.8	3	4.8	0.73
	$\beta2/X$	2	2.7	3	4.8	0.66
	$\alpha5/X$	0	0.0	17	27.4	4.6×10^{-7}
	<i>X/X</i>	0	0.0	15	24.2	3×10^{-6}
	B	<i>DQ2, DQ8</i> pozitivni	71	97.3	27	43.5
<i>DQ2</i> pozitivni		69	94.5	16	25.8	9.6×10^{-18}
<i>DQ8</i> pozitivni		2	2.7	11	17.7	0.004
<i>DQ2, DQ8</i> negativni		2	2.7	35	56.5	3.6×10^{-13}

Napomena: *p* vrednosti su rezultat Fišerovog egzaktnog testa, a prihvaćen nivo za statističku značajnost bio je 0.05

Frekvence nosioca genotipova koji daju DQ2 fenotip (označeni kao genotipovi *DQ2*) i oni koji daju DQ8 fenotip (označeni kao *DQ8*) sumirane su u tabeli 16B. Genotipovi *DQ2* nađeni su kod 94.5% pacijenata u poređenju sa 25.8% kontrolnih ispitanika, ukazujući na statistički značajnu razliku između ove dve grupe ($p = 9.6 \times 10^{-18}$). Genotip *DQ8* nađen je samo kod 2.7% pacijenata, u poređenju sa 17.7% zdravih ispitanika. U ovom slučaju *DQ8* je bio značajno češći u kontrolnoj u poređenju sa CB grupom ($p = 0.004$).

4.1.2.5. Gradijent relativnog rizika vezan za genotip *HLA-DQ*

Ispitanici su bili podeljeni u grupe u zavisnosti od genotipa koji nose. Za svaku grupu je procenjen relativni rizik za pojavu CB koji predstavlja rizik određenog genotipa u odnosu na genotip sa najvećim rizikom. Primećeno je postojanje gradijenta, sa najvećim rizikom u *DQ2.5/DQ2.5* grupi, koji je praćen rizikom *DQ2.5/β2* i *DQ2.5/X* grupe. Genotip $\alpha5/\beta2$ je pokazao srednji nivo rizika, a najmanji rizik dobijen je za genotipove *DQ8/DQ8* i *DQ8/X*, kao i za $\beta2$, $\alpha5$ i *X/X*, u odnosu na genotip *DQ2.5/DQ2.5* (tabela 17).

Tabela 17. Procenjeni relativni rizik za pojavu CB vezan za određeni genotip *HLA-DQ*

Grupa	<i>HLA-DQ</i> genotip	RR	1/RR
G1	<i>DQ2.5/DQ2.5</i>	1.000	1
G2	<i>DQ2.5/β2</i>	0.857	1.2
G3	<i>DQ2.5/X</i>	0.603	1.7
G4	$\alpha5/\beta2$	0.238	4.2
G5	<i>DQ8/DQ8, DQ8/X</i>	0.026	38.5
G6	$\beta2, \alpha5, X/X$	0.008	125

Napomena: Rizik je izračunat kao procenat određenog genotipa *HLA-DQ* u grupi pacijenata u odnosu na procenat tog genotipa u kontrolnoj grupi ((% genotipa kod pacijenata / % genotipa kod kontrola) x verovatnoća da se bolest javi u opštoj populaciji). Ovako izračunat rizik je za svaku grupu prikazan relativno (RR) u odnosu na grupu sa najvećim procenjenim rizikom. Zbog jednostavnosti, u tabeli je data i vrednost 1/RR, koja prikazuje koliko puta iznosi smanjenje RR vezanog za određeni genotip *HLA-DQ* u odnosu na genotip sa najvećim RR, u ovom slučaju *DQ2.5/DQ2.5*.

4.1.2.6. Sažetak rezultata

Rezultati su pokazali da je prisustvo genotipova *DQ2* (*DQ2.5/DQ2.5*, *DQ2.5/β2*, *DQ2.5/X* i *α5/β2*) jako asocirano sa CB. Iako je *DQ8* detektovan u grupi pacijenata, njegova učestalost je bila veća kod zdravih ispitanika. Takođe, procenjeno je da nosioci *DQ2* imaju različit rizik za dobijanje CB, što zavisi od prisustva jednog ili dva haplotipa *DQ2.5*, jednog ili dva alela *DQB1*02*, kao i međusobne pozicije alela *DQA1*05* i *DQB1*02* (na istom ili različitim hromozomima).

4.2. Ispitivanje nivoa ekspresije gena za inflamaciju i apoptozu relativnom kvantifikacijom iRNK kod pacijenata sa Kronovom bolešću

4.2.1. Karakteristike pacijenata sa KB i kontrolnih ispitanika

U ovoj studiji ispitivana je ekspresija gena za inflamaciju (*IL-6*, *TNF-α*) i apoptozu (*Bcl-2*, *Bax*, *Fas*, *FasL*) u intestinalnom tkivu i mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata u aktivnoj fazi KB, kao i kontrolnih ispitanika. Od svakog pacijenta uzeta je uparena biopsija intestinalnog tkiva, tako što je sa istog intestinalnog lokaliteta tkivo uzorkovano sa dva mesta - sa dela zahvaćenog inflamacijom („bolesno“ tkivo) i sa dela nezahvaćenog inflamacijom („zdravo“ tkivo“). Kod dva pacijenta biopsije nisu bile sa istog lokaliteta, tačnije, zdravo tkivo je uzorkovano iz mukoze kolona, a bolesno iz mukoze ileuma. Kontrolnu grupu su činili ispitanici kod kojih je prisustvo IBC isključeno, i kojima su biopsije uzete iz tkiva kolona. Demografski opis ispitivanih grupa, lokalitet bolesti i uzetih biopsija, kao i lekovi kojima su pacijenti bili tretirani u momentu uzimanja biopsija, predstavljeni su u tabeli 18. Grupe bolesnih i zdravih ispitanika usklađene su starosno i po polu.

Tabela 18. Opis pacijenata sa KB i kontrolnih ispitanika čiji su uzorci korišćeni u studiji

Karakteristike	KB (n = 24)		Kontrole (n = 21)
Starost (medijana, opseg)	38 (19 - 49)		40 (21 - 66)
Pol (muški/ženski)	11/13		11/10
Lokacija bolesti			
Ileum	10		/
Ileum i kolon	11		/
Kolon	3		/
Lokacija biopsiranog tkiva	Z	B	K
Terminalni ileum	15	17	/
Kolon	9	7	21
Terapija			
Bez terapije*	7		/
5-ASA**	13		/
5-ASA+***	4		/

Napomena: *- pacijenti bez prethodno uvedene terapije, **- pacijenti koji su tretirani aminosalicilatima (5-ASA), ***- 2 pacijenta su tretirana aminosalicilatima u kombinaciji sa kortikosteroidima ili tiopurinskim lekovima, 1 pacijent je primao tiopurinski lek, dok je 1 pacijent imao kombinaciju kortikosteroidne i tiopurinske terapije (5-ASA+); Z - zdravo tkivo pacijenata sa KB, B - bolesno tkivo pacijenata sa KB, K - kontrolno tkivo

4.2.2. Nivo ekspresije gena u intestinalnom tkivu pacijenata sa KB i kontrolnih ispitanika

Ekspresija ispitivanih gena merena je u tkivu kolona 21 kontrolnog ispitanika. Kod pacijenata, ekspresija je merena u 9 biopsija zdravog i 7 bolesnog tkiva kolona, i 15 biopsija zdravog i 17 bolesnog tkiva ileuma. Tabela 19 sadrži podatke o merama centralne tendencije za ekspresiju svakog gena u zavisnosti od statusa tkiva (kontrolno / zdravo KB / bolesno KB) i njegovog lokaliteta (kolon / ileum).

Tabela 19. Ekspresija inflamatornih i apoptotskih gena u intestinalnom tkivu pacijenata sa KB i kontrolnih ispitanika

Status tkiva	Lokalizacija	MCT	<i>IL-6</i>	<i>TNF-α</i>	<i>Bcl-2</i>	<i>Bax</i>	<i>Fas</i>	<i>FasL</i>
Kontrolno	Kolon	<i>M</i>	1.149	1.137	1.080	1.024	1.133	1.059
		<i>SD</i>	0.866	0.512	0.304	0.304	0.635	0.507
		<i>Md</i>	1.000	1.065	1.000	1.000	1.000	1.000
Zdravo KB	Kolon	<i>M</i>	1.412	1.851	1.328	0.943	0.969	0.943
		<i>SD</i>	1.087	1.470	0.540	0.383	0.460	0.423
		<i>Md</i>	1.067	1.369	1.312	0.895	0.851	0.881
	Ileum	<i>M</i>	1.109	1.178	0.822	0.822	1.242	1.224
		<i>SD</i>	0.673	0.672	0.390	0.278	0.564	0.668
		<i>Md</i>	1.292	1.117	0.666	0.832	1.167	1.188
Bolesno KB	Kolon	<i>M</i>	1.813	1.508	0.923	0.888	0.956	0.768
		<i>SD</i>	1.194	1.060	0.496	0.409	0.758	0.371
		<i>Md</i>	1.660	0.953	0.991	0.950	0.820	0.602
	Ileum	<i>M</i>	31.731	3.513	0.627	0.792	1.086	1.590
		<i>SD</i>	81.249	5.591	0.528	0.274	0.553	1.022
		<i>Md</i>	3.331	1.802	0.484	0.850	1.101	1.471

Napomena: MCT - mere centralne tendencije, *M* - srednja vrednost, *SD* - standardna devijacija, *Md* - medijana

4.2.2.1. Biomarkeri Kronove bolesti u intestinalnom tkivu

Da bismo ispitali da li se nivoi ekspresije inflamatornih i apoptotskih gena mogu smatrati biomarkerima KB u intestinalnom tkivu, izmerene relativne vrednosti iRNK su iskorišćene za pravljenje prediktivnog modela koji bi mogao da razlikuje prisustvo i odsustvo bolesti. Model bi ukazao na biomarkere specifične za procese koji se dešavaju tokom aktivne faze bolesti u mukozi zahvaćenoj inflamacijom.

Postavljena je hipoteza da ekspresija inflamatornih i apoptotskih gena ima izmenjen profil u bolesnoj, ali ne i u zdravoj mukozi pacijenata sa KB u odnosu na mukožu kontrolnih ispitanika. Za testiranje hipoteze formirane su dve grupe: prvu grupu činili su podaci o ekspresiji iz tkiva kontrolnih ispitanika i bolesnog tkiva pacijenata; drugu grupu su činili podaci o ekspresiji iz tkiva kontrolnih ispitanika i zdravog tkiva pacijenata.

Podaci iz prve grupe (tkivo kontrolnih ispitanika i bolesno tkivo pacijenata) korišćeni su za pravljenje prediktivnog modela upotrebom logističke regresije. Postepeno su uključivani sledeći geni - *IL-6*, *TNF- α* , *Bcl-2*, *Bax*, *Fas* i *FasL* kako bi se odabrao najbolji model koji bi na osnovu nivoa ekspresije gena razlikovao prisustvo ili odsustvo bolesti. Model koji je selektovan za dalju obradu uključivao je ekspresiju *IL-6* i *Bcl-2*. Ovaj model je bio statistički značajan ($\chi^2(2) = 25.428, p < 0.001$), što znači da je razlikovao bolesne i kontrolne ispitanike. Model u celini objašnjava 43.2% (r^2 Koksia i Snela) i 57.6% (r^2 Nagelkerkea) varijanse u statusu pacijent / kontrola, i tačno klasifikuje 84.4% slučajeva. Oba faktora, *IL-6* i *Bcl-2*, značajano su doprinosila modelu, što se može videti u tabeli 20 ($p = 0.003$ i $p = 0.006$). Model pokazuje da će za svaku dodatnu jedinicu ekspresije *IL-6*, šansa za pojavu KB biti 3.6 puta veća, a za svaku jedinicu ekspresije *Bcl-2*, 22 puta manja.

Tabela 20. Predviđanje verovatnoće pojave KB u zavisnosti od nivoa *IL-6* i *Bcl-2* iRNK u bolesnoj mukozi

	B	Stand. Greška	Stepeni slobode	<i>p</i>	Količnik verovatnoće (OR)	95% Interval poverenja za količnik verovatnoće	
<i>IL-6</i>	1.291	0.439	1	0.003	3.638	1.538	8.603
<i>Bcl-2</i>	-3.080	1.116	1	0.006	0.046	0.005	0.409
Konstanta	0.658	0.913	1	0.471	1.932		

Model sa istim ulaznim faktorima, *IL-6* i *Bcl-2*, napravljen je i za drugu grupu (tkivo kontrolnih ispitanika i zdravo tkivo pacijenata). Ovaj model nije bio značajan ($\chi^2(2) = 0.505, p = 0.777, r^2 = 0.011$ Koksia i Snela, $r^2 = 0.015$ Nagelkerkea), sa tačnošću klasifikacije od samo 57.8%. Model je pokazao da nivoi ekspresije *IL-6* i *Bcl-2* u zdravom tkivu pacijenata nemaju prediktivni značaj (tabela 21).

Tabela 21. Predviđanje verovatnoće pojave KB u zavisnosti od nivoa *IL-6* i *Bcl-2* iRNK u zdravoj mukozi

	B	Stand. greška	Stepeni slobode	<i>p</i>	Količnik verovatnoće (OR)	95% Interval poverenja za količnik verovatnoće	
<i>IL-6</i>	0.168	0.375	1	0.654	1.183	0.567	2.467
<i>Bcl-2</i>	-0.484	0.755	1	0.522	0.616	0.140	2.709
Konstanta	0.440	0.853	1	0.606	1.553		

Rezultat pokazuje da se nivoi ekspresije *IL-6* i *Bcl-2* mogu koristiti u predikciji KB, ali samo kada se mere u tkivu koje je zahvaćeno inflamatornim promenama. To ukazuje na jedinstveni ekspresioni profil bolesnog tkiva u odnosu na zdravo tkivo pacijenata.

4.2.2.2. Uticaj lokalizacije tkiva na nivo ekspresionih biomarkera KB

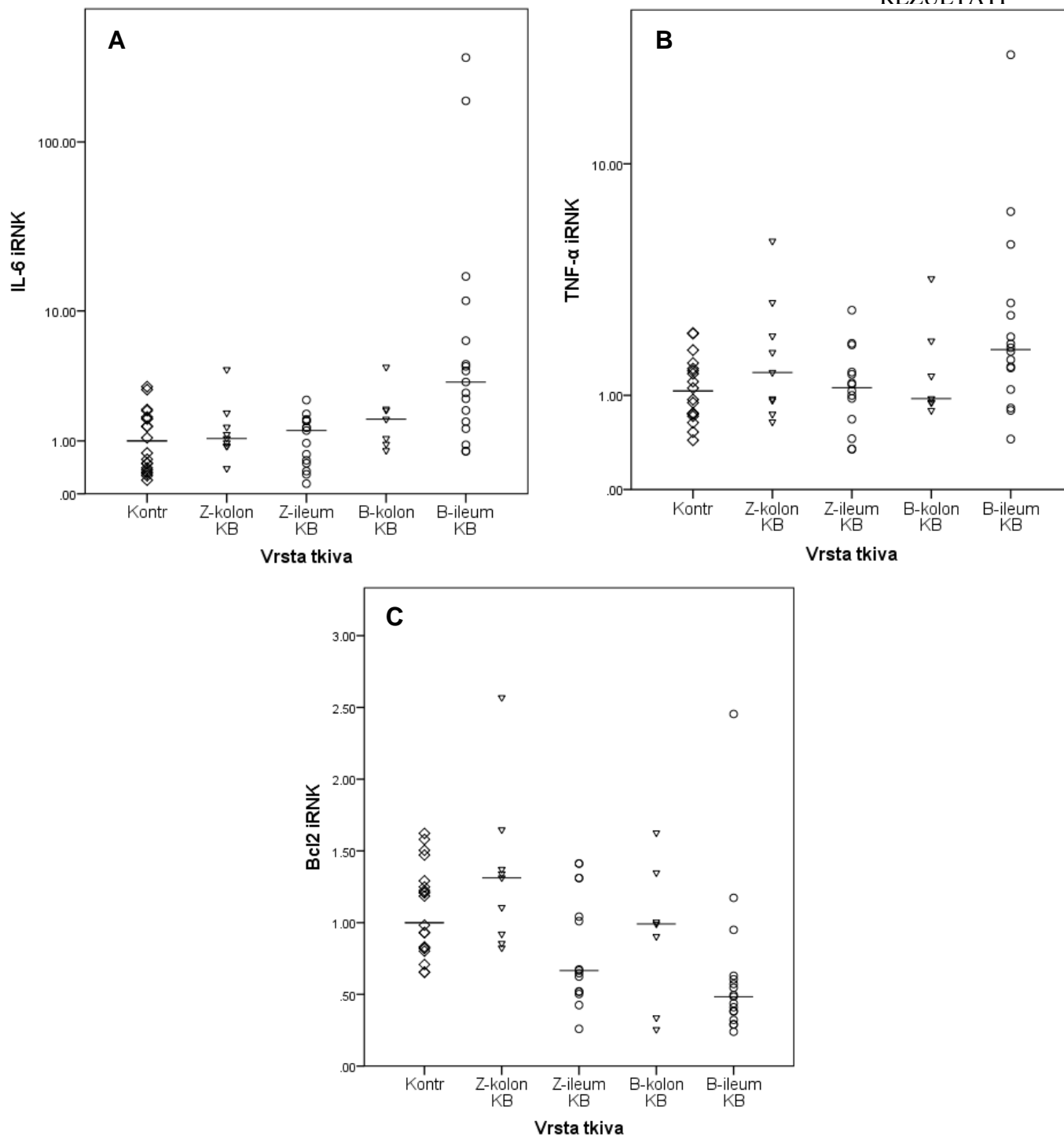
S obzirom da je kod jednog broja pacijenata tkivo uzorkovano iz kolona, a kod ostalih iz ileuma, u sledećem koraku smo hteli da ispitamo na koji način je nivo ekspresije ispitivanih biomarkera uslovljen intestinalnim lokalitetom. Kruskal-Volisonim testom (K-V) testirane su razlike između: 1- tkiva kontrolnih ispitanika, zdravog tkiva kolona pacijenata i zdravog tkiva ileuma pacijenata; 2- tkiva kontrolnih ispitanika, bolesnog tkiva kolona pacijenata i bolesnog tkiva ileuma pacijenata. Ukoliko je K-V test pokazao značajan rezultat, razlike su između parova grupa naknadno ispitane *post-hoc* testom (Dan-Bonferoni).

- 1- K-V test je pokazao da između tkiva kontrolnih ispitanika, zdravog tkiva kolona pacijenata i zdravog tkiva ileuma pacijenata, nivo ekspresije *Bcl-2* značajno varira ($\chi^2(2) = 7.486, p = 0.024$). U poređenju sa nivoom ekspresije u tkivu kontrolnih ispitanika ($Md = 1.000$), u zdravom tkivu kolona pacijenata izmeren je viši ($Md = 1.312$), a u zdravom tkivu ileuma niži ($Md = 0.666$) nivo ekspresije gena *Bcl-2*. Nakon *post-hoc* testa, statistički značajna razlika je utvrđena jedino između zdravog tkiva kolona i zdravog tkiva ileuma pacijenata ($p = 0.026$).
- 2- K-V test je pokazao da između tkiva kontrolnih ispitanika, bolesnog tkiva kolona i bolesnog tkiva ileuma pacijenata postoje značajne razlike u nivou ekspresije gena *IL-6* ($\chi^2(2) = 13.768, p = 0.001$), *TNF- α* ($\chi^2(2) = 7.250, p = 0.027$) i *Bcl-2* ($\chi^2(2) = 14.587, p = 0.001$). U poređenju sa tkivom kontrolnih ispitanika ($Md = 1.000$), bolesno tkivo ileuma pokazalo je najveći nivo ekspresije *IL-6* ($Md = 3.331$), dok je u bolesnom tkivu kolona nivo bio niži ($Md = 1.659$). *Post-hoc* test je pokazao statistički značajnu razliku u ekspresiji *IL-6* jedino između tkiva kontrolnih ispitanika i bolesnog tkiva ileuma ($p = 0.001$). Nivo ekspresije *TNF- α* je takođe bio najveći u bolesnom tkivu ileuma ($Md = 1.802$), dok je u bolesnom tkivu kolona i tkivu kontrolnih ispitanika imao slične vrednosti ($Md = 0.953$ i $Md = 1.000$). I u ovom slučaju je *post-*

hoc test značajnu razliku pokazao samo između tkiva kontrolnih ispitanika i bolesnog tkiva ileuma ($p = 0.022$). *Bcl-2* je najviši nivo ekspresije pokazao u tkivu kontrolnih ispitanika ($Md = 1.000$), sličan u bolesnom tkivu kolona ($Md = 0.991$), a znatno manji u bolesnom tkivu ileuma ($Md = 0.484$). *Post-hoc* testom je značajna razlika nađena jedino između tkiva kontrolnih ispitanika i bolesnog tkiva ileuma ($p < 0.001$).

Rezultati pokazuju da je postojanje značajne razlike između bolesnog tkiva pacijenata i tkiva kontrolnih ispitanika u nivou ekspresije gena *IL-6* i *Bcl-2* vezano za ileum, a ne za kolon. Ovog puta se i *TNF- α* pokazao kao biomarker bolesnog tkiva ileuma, sa značajno višim nivoom ekspresije u odnosu na tkivo kontrolnih ispitanika. Značaj *TNF- α* u prediktivnom modelu nije prepoznat jer u obzir nije bio uzet lokalitet biopsija. Takođe, promena *TNF- α* iRNK u bolesnom tkivu ileuma nije tako izrazita kao kod *IL-6* i *Bcl-2*, pa je njegov uticaj na kvalitet predikcije slabiji.

Rezultati su pokazali da nivo ekspresije *Bcl-2* zavisi od lokaliteta ne samo u bolesnom, već i u zdravom tkivu pacijenata. Naime, u tkivu kolona je izmeren viši nivo ekspresije ovog gena u odnosu na ileum. Osim za *Bcl-2*, zdravo tkivo je za ostale gene pokazalo uniformnost u ekspresiji koja nije zavisila od lokaliteta, ali ni od porekla tkiva (pacijent / kontrola). Na slici 11 je prikazana distribucija relativnih vrednosti iRNK za *IL-6*, *TNF- α* i *Bcl-2* u zavisnosti od mesta sa kog je biopsija uzeta.



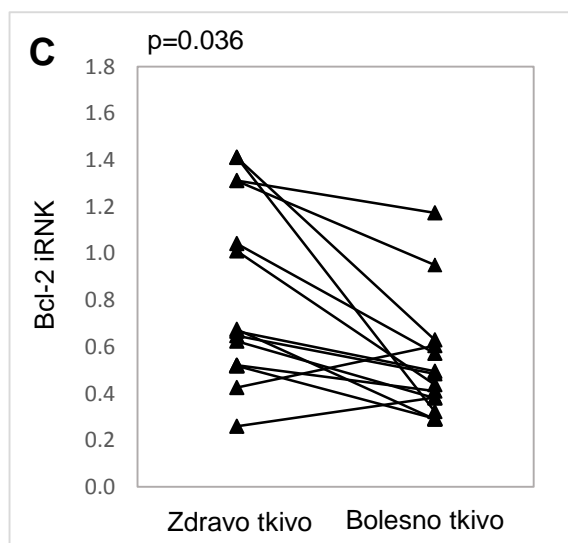
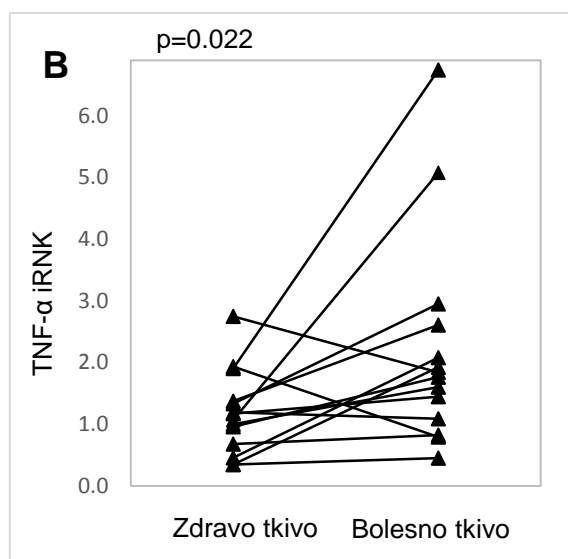
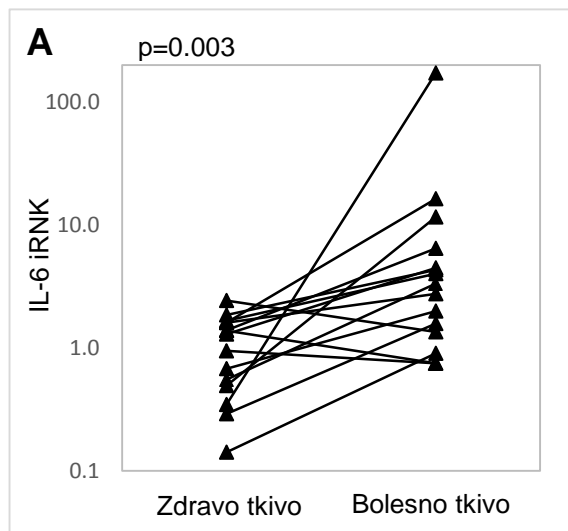
Slika 11. Ekspresija gena (A) *IL-6*, (B) *TNF- α* , (C) *Bcl-2* u tri vrste tkiva - tkivu kontrolnih ispitanika, mukozi kolona i mukozi ileuma pacijenata sa KB. Kod pacijenata je prikazana ekspresija u zdravom i bolesnom tkivu sa svake lokacije (kolon i ileum). Ekspresija gena je merena metodom qRT-PCR i predstavljena u relativnim jedinicama koje su dobijene metodom ddCt gde je kao kalibrator korišćena medijana ekspresije gena u tkivu kontrolnih ispitanika. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane. Skraćenice: Kontr-tkivo kontrola, Z-zdravo tkivo, B-bolesno tkivo, KB-Kronova bolest.

Da bi se ispitalo da li je nizak nivo ekspresije *Bcl-2* u bolesnom tkivu ileuma zaista marker KB ili je samo odraz histoloških razlika između kolona i ileuma, njegova ekspresija je upoređena između zdravog i bolesnog tkiva svakog pacijenta. Za analizu je korišćen neparametrijski test za ponovljena merenja - Vilkoksonov test ranga. Dodatno, u cilju potvrde prethodnih rezultata, istim testom su proverene razlike u nivou ekspresije *IL-6* i *TNF- α* . Na slici 12 prikazani su nivoi iRNK u zdravom i bolesnom tkivu ileuma i kolona, sa linijama koje povezuju uzorke poreklom od istog pacijenta.

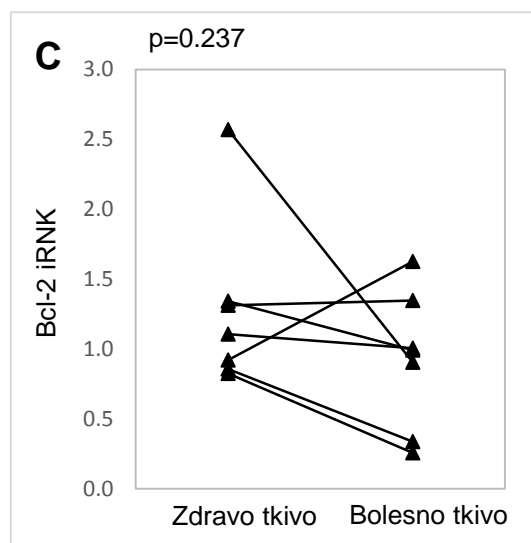
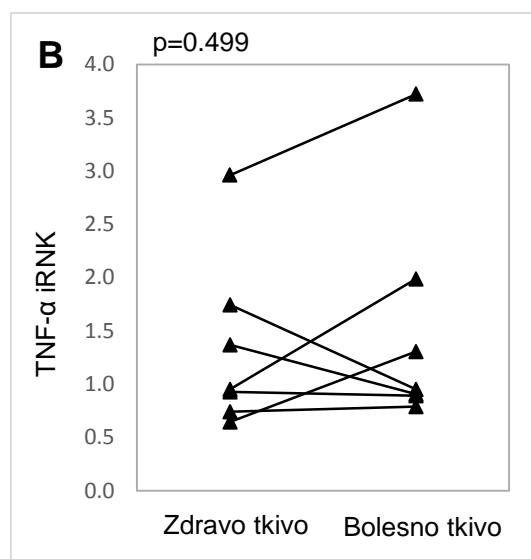
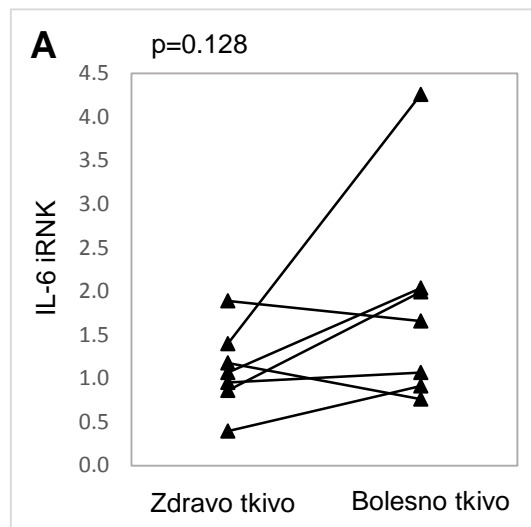
Rezultati su pokazali da je u ileumu nivo ekspresije *IL-6* u bolesnom tkivu pacijenata bio značajno viši u odnosu na zdravo tkivo ($Z = -3.010$, $p = 0.003$) (slika 12, 1A). U poređenju sa *IL-6*, porast ekspresije *TNF- α* je bio manje izražen, ali takođe značajan ($Z = -2.291$, $p = 0.022$) (slika 12, 1B). Rezultati su pokazali značajan pad nivoa ekspresije *Bcl-2* u bolesnom u odnosu na zdravo tkivo ileuma pacijenata ($Z = -2.101$, $p = 0.036$) (slika 12, 1C).

Kada je reč o mukozi kolona, primećen je trend u porastu nivoa ekspresije *IL-6* u bolesnom u odnosu na zdravo tkivo pacijenata, ali razlika nije dostigla značajnost. Značajne razlike u nivou ekspresije *TNF- α* i *Bcl-2* između zdravog i bolesnog tkiva kolona nisu pokazane.

1. ILEUM (uparene biopsije)



2. KOLON (uparene biopsije)



(sa prethodne strane) Slika 12. Efekat lokalne inflamacije na ekspresiju gena (A) *IL-6*, (B) *TNF- α* , (C) *Bcl-2* u mukozi ileuma (1) i kolona (2) pacijenata sa KB. Nivo iRNK je izmeren metodom qRT-PCR i predstavljen u relativnim jedinicama dobijenim metodom ddCt u kojoj je medijana ekspresije u tkivu kontrolnih ispitanika korišćena kao kalibrator. Upareni uzorci zdravog i bolesnog tkiva dobijeni su od svakog pacijenta. Vrednosti ekspresije poreklom od istog ispitanika su povezane linijom. Razlike u ekspresiji gena između zdravog i bolesnog tkiva ispitane su Vilkoksonovim testom ranga za ponovljena neparametrijska merenja, a rezultati poređenja su predstavljeni odgovarajućim p vrednostima. Razlika je smatrana statistički značajnom ukoliko je $p < 0.05$.

4.2.2.3. Odnos nivoa ekspresije gena *Bcl-2/Bax*

Iako nivo ekspresije *Bax* nije pokazao značaj u predikciji bolesti, ispitan je odnos nivoa ekspresije *Bcl-2/Bax* između tkiva kontrolnih ispitanika i tkiva bolesnih ispitanika poreklom iz različitih intestinalnih segmenata (ileum i kolon). Razlike su ispitane korišćenjem K-V testa.

K-V test je pokazao značajnu razliku u odnosu ekspresije *Bcl-2/Bax* jedino između bolesne mukoze ileuma, bolesne mukoze kolona i tkiva kontrolnih ispitanika ($\chi^2 (2) = 6.964, p = 0.031$). *Post-hoc* test je pokazao značajan pad nivoa *Bcl-2/Bax* ekspresije samo između bolesne mukoze ileuma pacijenata i tkiva kontrolnih ispitanika ($p = 0.03$). Iako je *Bax* ekspresija bila niža kod pacijenata nego kod kontrolnih ispitanika, odnos je rezultirao padom jer je smanjenje *Bcl-2* bilo dominantnije.

4.2.2.4. Sažetak rezultata

Analiza ekspresije gena je pokazala da se procesi inflamacije i apoptoze razlikuju u intestinalom tkivu kontrolnih ispitanika i tkivu pacijenata sa KB, kao i da su promene karakteristične za lokalitet intestinalne mukoze. Rezultati su pokazali da geni *IL-6*, *TNF- α* i *Bcl-2* imaju specifičan profil ekspresije u tkivu koje je zahvaćeno inflamacijom, i da se zbog toga nivoi iRNK ovih gena mogu smatrati biomarkerima KB, ali samo u bolesnoj mukozi ileuma, a ne i kolona. Takođe, na mestu inflamacije je promena nivoa ekspresije *IL-6* izraženija nego *TNF- α* .

4.2.3. Nivo ekspresije gena za inflamaciju i apoptozu u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa KB i kontrolnih ispitanika

Ista grupa pacijenata je korišćena za analizu nivoa ekspresije u mononuklearnim ćelijama periferne krvi. S obzirom da jedan pacijent nije imao RNK odgovarajućeg kvaliteta za qRT-PCR analizu, grupu pacijenata je činilo 23 ispitanika, a kontrolnu grupu, kao i u prethodnom slučaju, 21 ispitanik. Rezultati analize su sumirani u tabeli 22, u kojoj su prikazane mere centralne tendencije za svaki ispitivani gen.

Tabela 22. Ekspresija inflamatornih i apoptotskih gena u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kontrolnih ispitanika i pacijenata sa KB

Status	MCT	<i>IL-6</i>	<i>TNF-α</i>	<i>Bcl-2</i>	<i>Bax</i>	<i>Fas</i>	<i>FasL</i>	<i>Bcl-2/Bax</i>	<i>Fas/FasL</i>
Kontrolni ispitanici	<i>M</i>	14.802	46.628	5.010	1.293	2.582	10.058	4.603	0.292
	<i>SD</i>	18.852	57.405	2.627	0.682	1.408	5.969	3.715	0.181
	<i>Md</i>	3.665	17.065	4.193	0.997	2.588	8.700	3.511	0.236
KB	<i>M</i>	11.253	31.521	5.635	1.097	2.816	7.478	5.192	1.118
	<i>SD</i>	11.767	31.635	4.074	0.438	1.839	8.576	3.942	1.913
	<i>Md</i>	5.148	14.182	5.506	1.142	2.247	4.640	4.569	0.468

Napomena: MCT - mere centralne tendencije, *M* - srednja vrednost, *SD* - standardna devijacija, *Md* - medijana

4.2.3.1. Biomarkeri Kronove bolesti u perifernoj krvi

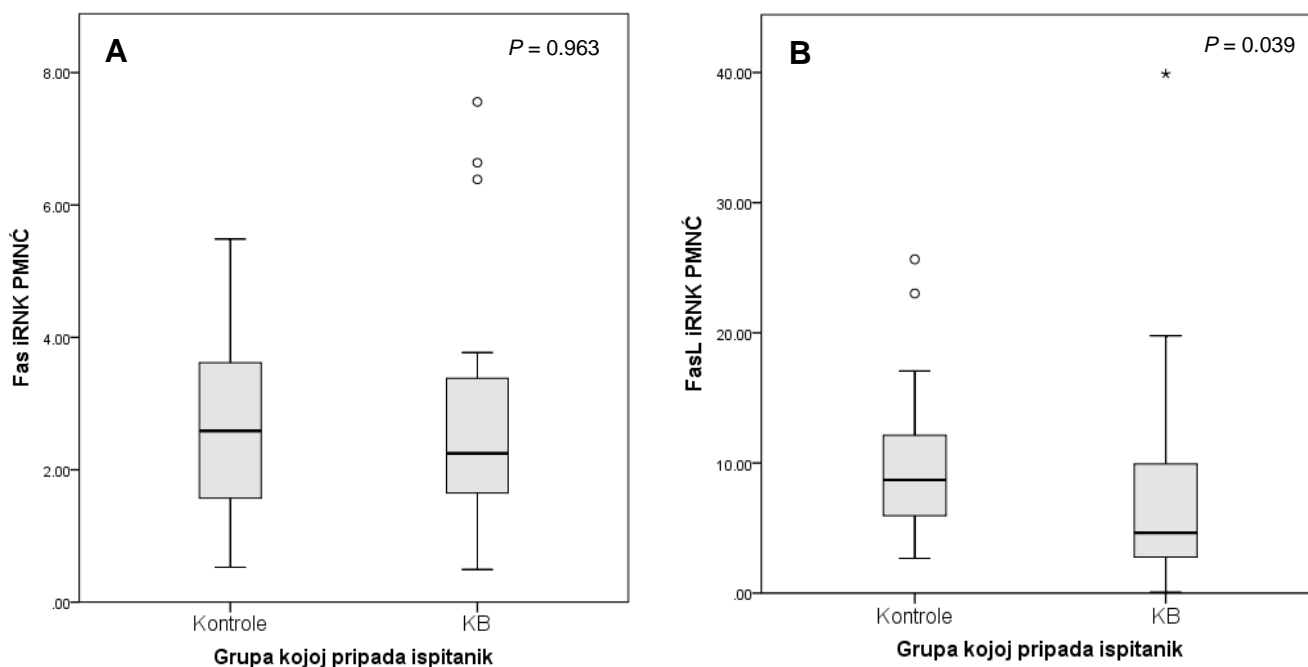
U ovoj studiji je ispitivano da li se nivoi ekspresije analiziranih gena, izmereni u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, mogu koristiti kao biomarkeri KB. Osim predikcije, nivoi ekspresije ovih gena su ukazali na molekularne procese koji su u patogenezi KB na sistemskom nivou.

Podaci o relativnoj količini iRNK ispitanika upotrebljeni su za pravljenje modela koji će razlikovati pacijente i kontrolne ispitanike, metodom logističke regresije. Od faktora *IL-6*, *TNF- α* , *Bcl-2*, *Bax*, *Fas*, *FasL*, *Bcl-2/Bax* i *Fas/FasL*, samo je *Fas/FasL* selektovan kao značajan u predikciji ($p = 0.02$). Model koji uključuje odnos *Fas/FasL* je statistički značajan ($\chi^2(1) = 11.193$, $p = 0.001$), objašnjava 22.5% (r^2 Koxsa i Snela) i 30.0% (r^2 Nagelkerkea) varijanse u statusu pacijent / kontrola, i tačno klasifikuje 70.5% slučajeva. Model pokazuje da će sa svakom dodatnom jedinicom *Fas/FasL*, šansa za pojavu KB biti 39 puta veća (tabela 23).

Tabela 23. Predviđanje verovatnoće pojave KB u zavisnosti od odnosa *Fas/FasL* iRNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi

	B	Stand. greška	Stepeni slobode	<i>p</i>	Količnik verovatnoće (OR)	95% Interval poverenja za količnik verovatnoće	
<i>Fas/FasL</i>	3.668	1.571	1	0.020	39.158	1.800	851.651
Konstanta	-1.443	0.656	1	0.028	0.236		

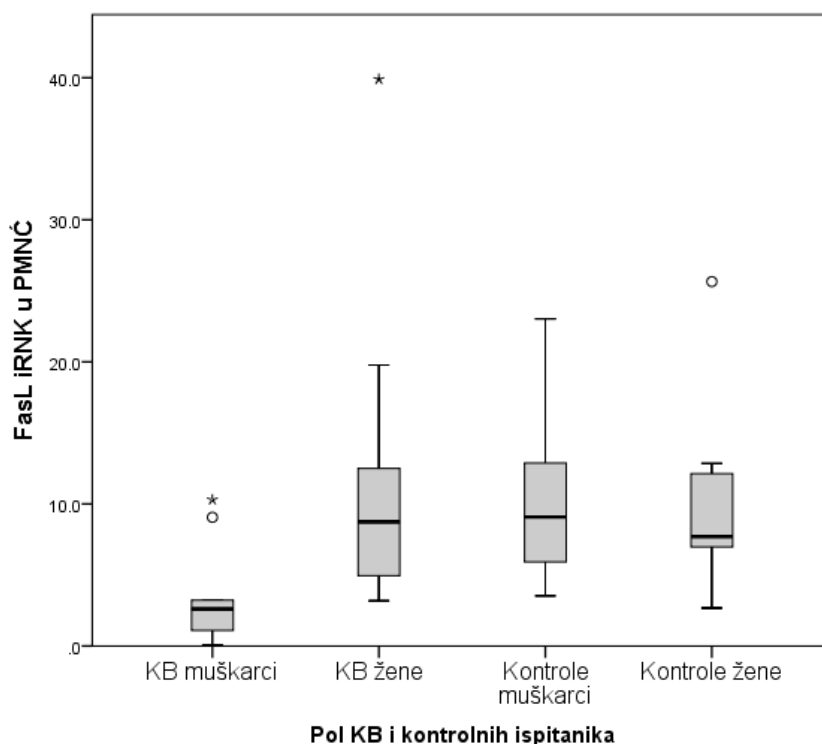
Kako faktori u odnosu *Fas/FasL* doprinose predikciji, ispitali smo dodatno Man-Vitnijevim *U* testom. Kod bolesnih, nivo ekspresije gena *FasL* je bio značajno niži ($Md = 4.639$) u poređenju sa kontrolnom grupom ($Md = 8.699$) ($U = 153.5$, $Z = -2.068$, $p = 0.039$). Razlike u nivou ekspresije gena *Fas* između bolesnih i kontrolnih ispitanika nisu nađene. Distribucija vrednosti nivoua ekspresije gena *Fas* i *FasL* u grupi pacijenata i kontrolnih ispitanika prikazana je na slici 13.



Slika 13. Nivo ekspresije gena (A) *Fas* i (B) *FasL* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PMNC) kod pacijenata sa KB i kontrolnih ispitanika. Predstavljeni nivoi ekspresije izraženi su u relativnim jedinicama dobijenim metodom qRT-PCR uz pomoć metode ddCt gde je kao kalibrator korišćena medijana ekspresije gena u tkivu kontrolnih ispitanika. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane. Razlike među grupama ispitane su Man-Vitnijevim *U* testom za neparametrijska merenja, a rezultati poređenja predstavljeni su *p* vrednostima. Uslov za statistički značajnu razliku bio je $p < 0.05$.

4.2.3.2. Uticaj pola na nivo ekspresije gena *FasL*

U daljoj analizi ispitali smo uticaj pola na nivo ekspresije *FasL* kod pacijenata sa KB i kontrolnih ispitanika. Ispitanici su bili podeljeni u 4 grupe (KB muškarci / KB žene / Kontrole muškarci / Kontrole žene), a razlika između grupa je ispitana Kruskal-Voliovim (K-V) testom i naknadno između parova *post-hoc* testom (Dan-Bonferoni). Na slici 14 prikazan je nivo ekspresije *FasL* u zavisnosti od pola bolesnih i kontrolnih ispitanika.

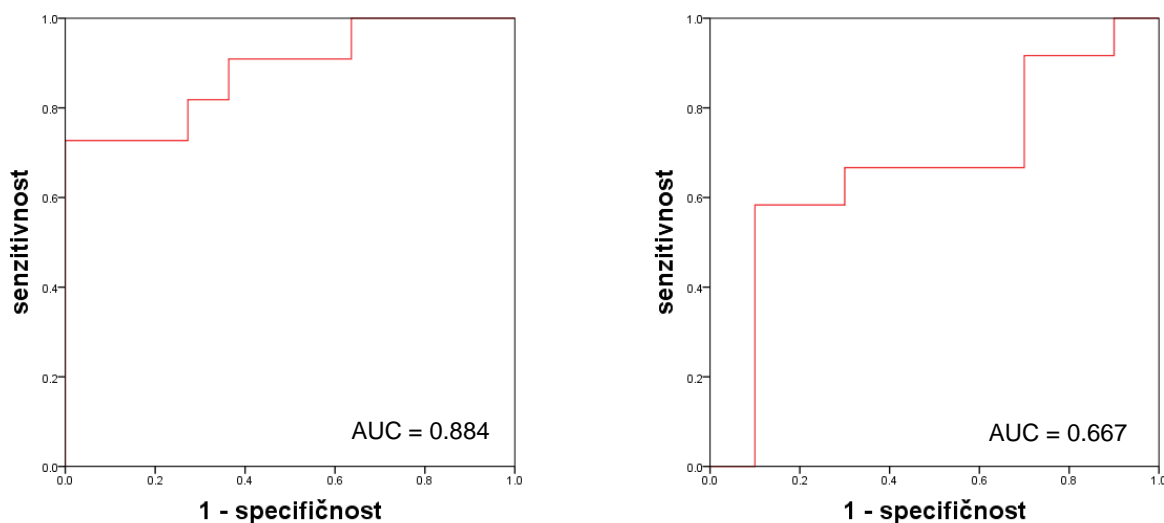


Slika 14. Nivo ekspresije *FasL* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PMNĆ) kod pacijenata sa KB i kontrolnih ispitanika u zavisnosti od njihovog pola. Ekspresija je izražena u relativnim jedinicama.

K-V test pokazao je značajnu razliku između grupa ($\chi^2(3) = 13.82, p = 0.003$). Medijana ekspresije *FasL* je bila najniža u grupi bolesnih muškaraca ($n = 11, Md = 2.614$), dok je kod bolesnih žena bila viša ($n = 12, Md = 8.742$), i približna vrednostima medijana ekspresije *FasL* kod muškaraca i žena iz kontrolne grupe (M : $n = 11, Md = 9.076$ i Ž : $n = 10, Md = 7.704$). *Post-hoc* test je pokazao da se ekspresija kod bolesnih muškaraca značajno razlikuje u odnosu na ostale grupe - zdrave muškarace ($p = 0.008$), zdrave žene ($p = 0.033$), ali i bolesne žene ($p = 0.013$). Ovaj rezultat

ukazuje da nivo ekspresije *FasL* kod muškaraca dominantno doprinosi razlici između bolesnih i kontrolnih ispitanika.

Uz pomoć ROC analize ispitali smo koliku moć diskriminacije između pacijenata i kontrolnih ispitanika ima odnos nivoa *Fas/FasL* ekspresije, kada se uzme u obzir pol ispitanika (slika 15).



Slika 15. ROC analiza odnosa ekspresije *Fas/FasL* kod pacijenata i kontrolnih ispitanika muškog pola (A) i ženskog pola (B). A. *Fas/FasL cut-off* = 0.387; senzitivnost = 0.82; specifičnost = 0.73; 95% CI 0.741-1.000; $p = 0.002$. B. *Fas/FasL cut-off* = 0.265; senzitivnost = 0.67; specifičnost = 0.70; 95% CI 0.425-0.907; $p = 0.18$.

Rezultati ROC analize ukazuju da odnos *Fas/FasL* ekspresije diskriminiše bolesne i zdrave u grupi muških ispitanika. Kao referentna *Fas/FasL* vrednost (*cut-off*) u ovom testu je odabrana vrednost od 0.387, za koju je odnos senzitivnosti (0.82) i specifičnosti (0.73) bio najoptimalniji. U grupi ženskih ispitanika *Fas/FasL* je pokazao slabiju diskriminativnu moć, pa su i performanse testa bile slabije.

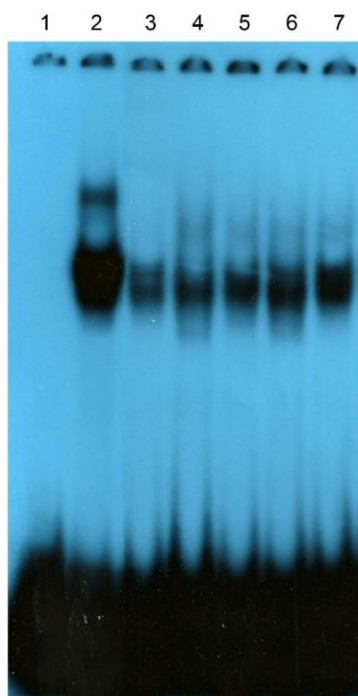
4.2.3.3. Sažetak rezultata

Analiza ekspresije inflamatornih i apoptotskih gena izdvojila je odnos *Fas/FasL* iRNK kao biomarker inflamacije u perifernoj krvi pacijenata sa KB, pogotovo kod osoba muškog pola. Smanjenje nivoa *FasL* iRNK je pokazalo dominantan uticaj na postojanje razlike u odnosu *Fas/FasL* između pacijenata i kontrolnih ispitanika.

4.3. Ispitivanje DNK vezujuće aktivnosti NF- κ B iz intestinalnog tkiva pacijenata sa Kronovom bolešću

U daljem ispitivanju molekularne patogeneze KB merena je DNK vezujuća aktivnost NF- κ B iz intestinalnog tkiva pacijenata i kontrolnih ispitanika. S obzirom da je poznato da su promene u genu *NOD2* povezane sa poremećenom funkcijom NF- κ B, za ovu analizu su pacijenti podeljeni u dve grupe - na pacijente kod kojih je utvrđeno prisustvo ređih varijanti u genu *NOD2* i na pacijente sa učestalijim varijantama u genu *NOD2*. Za ovaj deo istraživanja korišćeni su jedarni proteinski ekstrakti izolovani iz zdravog i bolesnog dela ilealne mukoze 10 pacijenata. Takođe, jedarni proteini su izolovani iz mukoze kolona 5 kontrolnih ispitanika (2 su imala ređi, a 3 učestaliji genotip *NOD2*).

Na slici 16 su prikazani DNK-proteinski kompleksi dobijeni nakon EMSA analize.

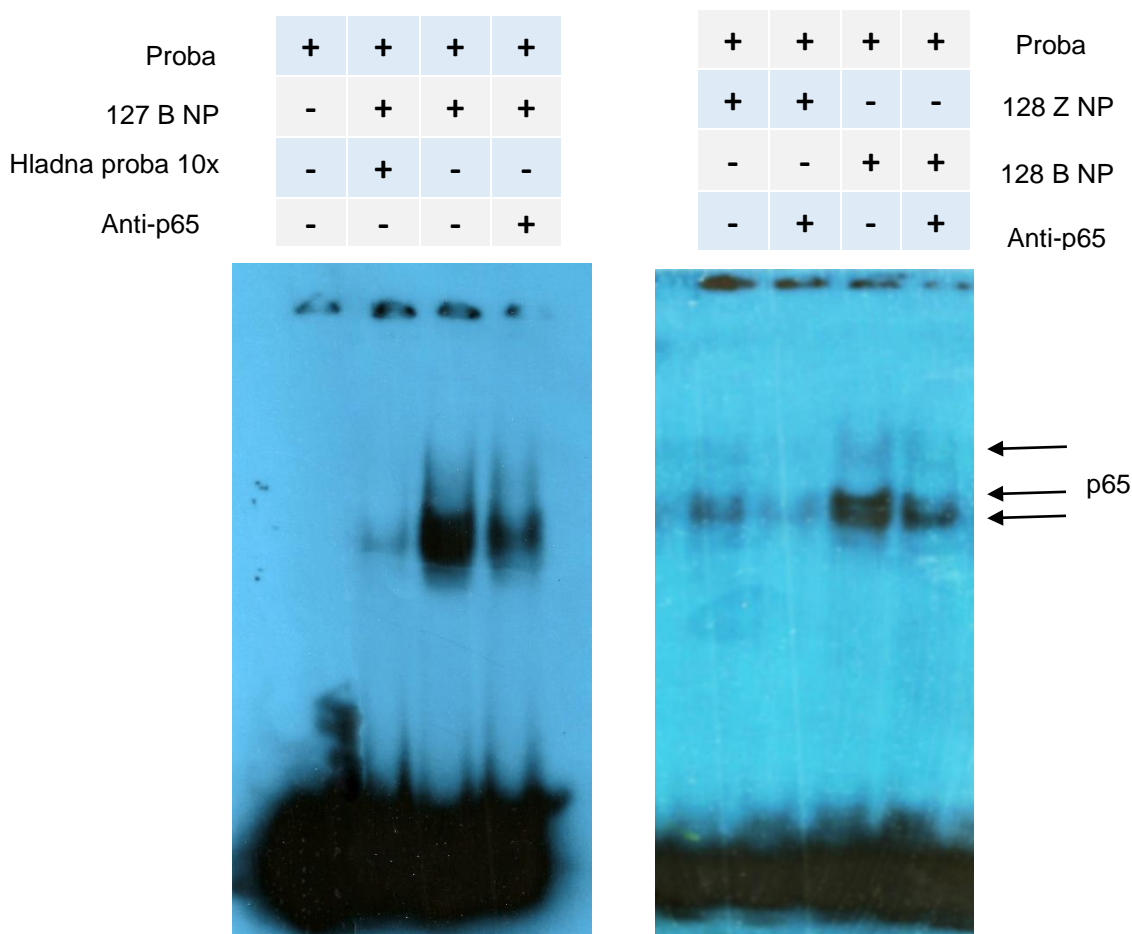


Slika 16. Analiza NF- κ B-DNK interakcije u intestinalnoj mukozi pacijenata i kontrolnih ispitanika. 2 μ g jedarnog proteinskog ekstrakta inkubirano je sa radioaktivno obeleženom probom veličine 21 bp, koja sadrži NF- κ B konsenzus sekvencu. Inkubacija je vršena u prisustvu nespecifičnog dvolančanog kompetitora (50 ng Poly dI-dC). Jedarni proteini iz HeLa ćelija služili su kao „standard“ u svakoj elektroforezi. Formirani NF- κ B-DNK kompleksi obeleženi su strelicama na slici.

1 - slobodna proba; 2 - HeLa; 3 - kontrolno tkivo (6k); 4 - zdravo tkivo pacijenta (127); 5 - zdravo tkivo pacijenta (128); 6 - bolesno tkivo pacijenta (127); 7- bolesno tkivo pacijenta (128).

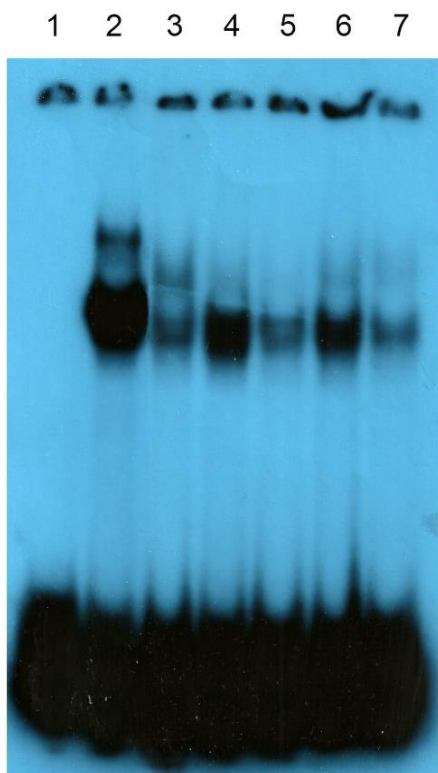
Napomena: Brojevi u zagradama predstavljaju redne brojeve pod kojima se ispitanici vode. Klinički podaci za ispitanike ovog istraživanja prikazani su u tabeli 24.

Kako bi se potvrdila specifičnost formiranog kompleksa, izvršeni su kompeticioni eseji sa neobebeženom probom, nakon čega je pokazano da dolazi do „hlađenja“ formiranih kompleksa (slika 17). Takođe, za identifikaciju proteina p65, urađena je EMSA *supershift* analiza. Dodavanjem anti-p65 antitela došlo je do nestajanja specifičnog NF-κB-DNK kompleksa, čime je pokazano da dodato antitelo prepoznaje DNK-vezujući domen proteina, i na taj način ga „odvlači“ iz kompleksa sa obebeženom probom (slika 17). Hlađenje antitelom se moglo uočiti u sva tri formirana kompleksa. Prisustvo više različitih kompleksa na gelu može predstavljati razne p65 proteinske interakcije.



Slika 17. Ispitivanje specifičnosti NF-κB-DNK interakcija i identifikacija p65 proteina u formiranim kompleksima. Za reakciju inkubacije sa radioaktivno obebeženom probom korišćeno je 2 μg jedarnog ekstrakta u prisustvu nespecifičnog dvolančanog kompetitora (50 ng Poly dI-dC). Na slici levo prikazano je iščezavanje DNK-proteinskog kompleksa prilikom dodavanja hladne probe u 10 puta većem molarnom odnosu u odnosu na obebeženu probu. Dodavanjem 2 μg anti-p65 antitela došlo je do smanjenja inteziteta kompleksa DNK i nuklearnih proteina (NP) poreklom iz zdrave (128 Z NP) i bolesne intestinalne mukoze pacijenata (127 B NP i 128 B NP).

Rezultati ovih eksperimenata su pokazali da je DNK vezujuća NF-κB aktivnost iz jedarnih ekstrakata intestinalne mukoze pacijenata u jednom broju uzoraka izrazito povećana, a u drugom umanjena. Iako smo očekivali da će se te dve grupe formirati na osnovu genotipa *NOD2*, primećeno je da status NF-κB vezujuće aktivnosti grupu pacijenata jasno deli na osnovu promena u intestinalnoj mukozu - na one sa fragilnom sluznicom i one sa stenozom (slika 18). Manje učestali genotip *NOD2*, povezan sa većim rizikom za KB, bio je prisutan u obe kliničke grupe, ali češći u grupi sa stenoznim promenama (3 od ukupno 4 pacijenta). Fragilna sluznica je naziv za mukozu pacijenata koja tokom endoskopskog pregleda krvari na blaži dodir. Stenoza predstavlja suženje lumena creva koje nastaje kao posledica neadekvatnog zarastanja tkiva nakon oštećenja izazvanih inflamacijom. Ova dva fenotipa na makroskopskom nivou odlikavaju procese zastupljene u intestinalnom tkivu pacijenata sa KB - apoptozu i inflamaciju.



Slika 18. EMSA kompleksa obeležene probe sa NF-κB konsenzus sekvencom i jedarnih proteina iz mukoze kontrolnih ispitanika i mukoze pacijenata sa različitim intestinalnim promenama.

1 - slobodna proba; 2 - HeLa; 3 - kontrolno tkivo (7k); 4 - zdrava mukoza pacijenta sa stenozom creva (30); 5 - zdrava mukoza pacijenta sa fragilnom sluznicom (7); 6 - bolesna mukoza pacijenta sa stenozom creva (30); 7 - bolesna mukoza pacijenta sa fragilnom sluznicom (30).

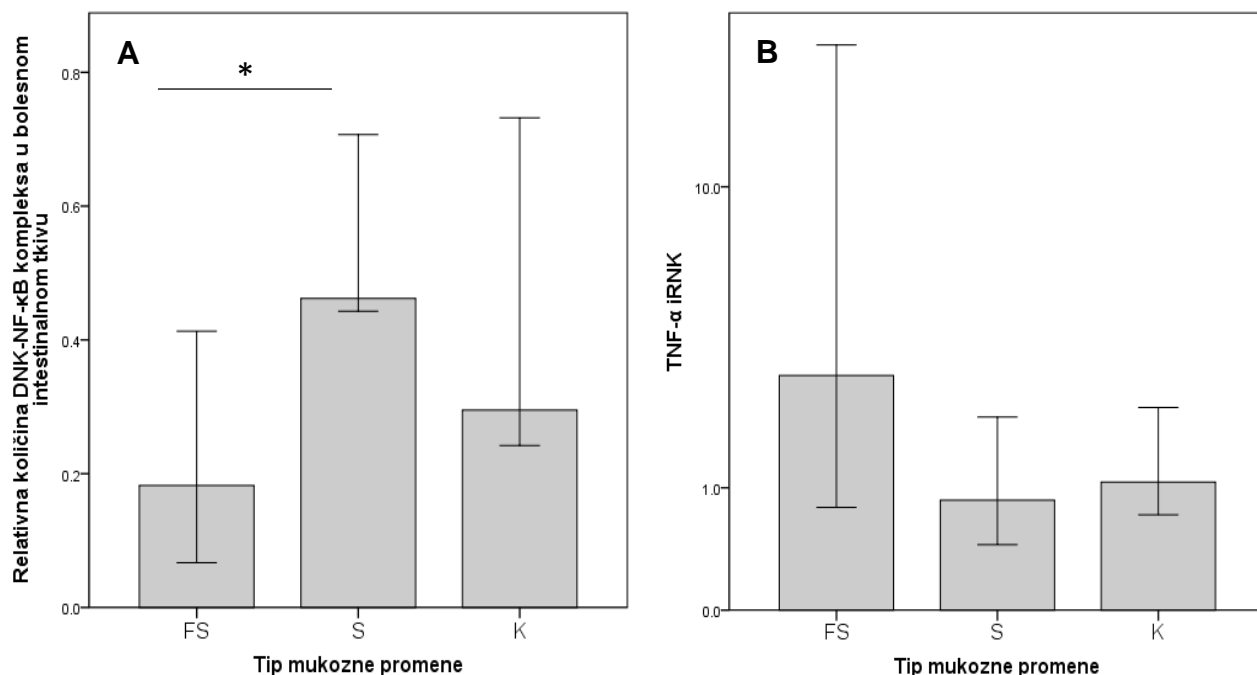
Iz navedenih razloga, ispitanici su podeljeni ne na osnovu genotipa *NOD2*, već na osnovu promena u intestinalnoj mukozu (tabela 24). U tabeli su prikazani podaci o endoskopskom nalazu, genotipu *NOD2* (nosioci manje učestalih alela označeni su kao „+“, a nosioci učestalijeg alela kao „-“), terapiji pacijenata, kao i o polu i uzrastu ispitanika.

Tabela 24. Opis ispitanika uključenih u ispitivanje DNK vezujuće aktivnosti NF-κB

Redni br. uzorka	Promene u intestinalnoj mukozi	<i>NOD2</i> status	Terapija	Pol	Godine
27	fragilna sluznica	+	BT	ž	46
50	fragilna sluznica	+	BT	ž	41
7	fragilna sluznica	-	BT	m	34
55	fragilna sluznica	-	BT	m	36
138	fragilna sluznica	-	5-ASA	m	38
111	fragilna sluznica	-	5-ASA	ž	38
114	stenoza	+	5-ASA	ž	24
30	stenoza	-	5-ASA	m	28
127	stenoza	+	5-ASA	m	29
128	stenoza	+	5-ASA	ž	40
6k	bez promena	-	/	ž	49
7k	bez promena	-	/	ž	21
8k	bez promena	-	/	m	27
13k	bez promena	+	/	ž	66
20k	bez promena	+	/	m	38

Skraćenice: k – kontrolni ispitanici; BT - bez terapije; 5-ASA - 5-aminosalicilat

Denzitometrijskim semikvantifikovanjem sva tri formirana NF-κB-DNK kompleksa (tipičan primer je označen strelicama na slici 16), dobijeni su rezultati prikazani na slici 19A. Kruskal-Volisonov test je pokazao razliku između grupe pacijenata sa fragilnom sluznicom (FS), pacijenata sa stenoznim promenama (S), i kontrolne grupe (K) ($\chi^2(2) = 8.24, p = 0.016$), a nakon *post-hoc* testa je pokazana značajna razlika samo između FS i S grupe ($p = 0.014$). Kada je između navedenih grupa upoređen intestinalni nivo ekspresije *TNF-α*, odnos je bio obrnut, pacijenti sa fragilnom sluznicom imali su visok nivo *TNF-α* iRNK, dok su oni sa stenoznim promenama imali niži, i sličan nivou iRNK kod kontrolnih ispitanika (slika 19B). Važno je istaći da su totalna iRNK i jedarni proteinski ekstrakti izolovani istovremeno, što nam je omogućilo da diskutujemo o relativnom odnosu izmerene *TNF-α* iRNK i detektovane DNK vezujuće aktivnosti NF-κB u selektovanim tkivima.



Slika 19. Intenziteti izmerenih NF-κB-DNK interakcija i nivo ekspresije *TNF-α* u bolesnoj mukozi pacijenata i mukozi kontrolnih ispitanika. Nivo stubića predstavlja medijanu, a linije 95% interval poverenja. (A) Relativni intenzitet NF-κB-DNK kompleksa u gupi pacijenata sa fragilnom sluznicom (FS), sa stenoznim promenama (S) i u kontrolnoj grupi (K). Vrednosti su izražene relativno u odnosu na intenzitet NF-κB-DNK kompleksa kod HeLa ćelija. (B) U istim grupama analiziran je nivo ekspresije *TNF-α*. Vrednosti su izražene u relativnim jedinicama, dobijenim qRT-PCR ddCt metodom, gde je kao kalibrator služila medijana ekspresije gena u tkivu kontrolnih ispitanika. * - statistički značajna razlika ($p < 0.05$).

4.3.1. Sažetak rezultata

Analiza DNK vezujuće aktivnosti NF-κB je ukazala da ovaj regulatorni protein transkripcije može imati različit uticaj na patogenezu KB. S jedne strane, njegova smanjena vezujuća aktivnost se pokazala kao marker fragilne sluznice, stanja KB u kome je narušena epitelijalna barijera creva. Ovaj fenotip je istovremeno asociran sa visokim nivoom ekspresije *TNF-α*. S druge strane, povećana NF-κB vezujuća aktivnost i smanjen nivo ekspresije *TNF-α* su izraženi kod pacijenata sa stenoznim promenama, koje su posledica neregulisanog zarastanja tkiva tokom hronične inflamacije. Prisustvo manje učestalih varijanti u genu *NOD2* kod pacijenata sa višim nivoom NF-κB-DNK kompleksa i stenoznim komplikacijama ukazuje na potencijalni, NF-κB-posredovani efekat ovih genetičkih varijanti na fenotip bolesti.

5. DISKUSIJA

5.1. Genetičke varijante asocirane sa hroničnim inflamatornim bolestima creva

5.1.1. Varijante u genima inflamacije kao markeri inflamatornih bolesti creva

Inflamatorna bolest creva je sve zastupljeniji zdravstveni problem današnjice. Iako je identifikovan veliki broj gena asociranih sa ovim bolestima, njihova patogeneza i dalje nije u potpunosti razjašnjena [Liu i sar., 2014b]. Nedovoljno razjašnjene genotip-fenotip asocijacije zahtevaju detaljnije ispitivanje na većem broju različitih populacija. Meta-studije koje objedinjuju rezultate dobijene ispitivanjem različitih populacija daju pouzdaniji uvid o postojanju genetičkih asocijacija. Doprinos naše studije je u tome što je po prvi put, osim za *NOD2*, ispitana asocijacija varijanti u genima *NOD2*, *TLR4*, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* i *IL-1RN* sa KB i UK na srpskoj grupi pacijenata. Takođe, prvi put je analiziran zbirni efekat ispitivanih genetičkih varijanti na predikciju ovih bolesti.

Naša hipoteza je bila da varijante u analiziranim genima doprinose poremećaju mukoznih odbrambenih procesa. Rezultati su potvrdili jaku asocijaciju između varijanti u genu *NOD2* i KB. Ova asocijacija je pokazana u velikom broju belih populacija [Economou i sar., 2004], uključujući i srpsku populaciju [Protic i sar., 2008]. Tačan mehanizam kojim varijante u genu *NOD2* doprinose patogenezi KB nije potpuno razjašnjen. Većina studija predlaže model „gubitka funkcije“ receptora *NOD2*, što bi moglo da objasni asocijaciju varijanti u genu *NOD2* sa: smanjenom produkcijom antimikrobnih proteina - defenzina [Wehkamp i sar., 2004; Kobayashi i sar., 2005; Wehkamp i sar., 2005], nedostatkom negativne regulacije receptora *TLR* [Watanabe i sar., 2004; Strober i sar., 2006; Watanabe i sar., 2008], smanjenim autofagnim odgovorom [Cooney i sar., 2010] i defektom u procesovanju *IL-1 β* [Ferwerda i sar., 2008b]. *In vitro* i *ex vivo* studije su pokazale da stimulacija ćelija koje nose rizične varijante u genu *NOD2* sa peptidoglikanskim komponentama, rezultuje smanjenom aktivacijom *NF- κ B* i smanjenom produkcijom proinflamatornih citokina [Bonen i sar., 2003; van Heel i sar., 2005]. Promene u pomenutim procesima onemogućavaju održavanje intestinalne homeostaze.

Uzimajući u obzir ključnu ulogu urođenog imunskog sistema u patogenezi ovih bolesti, smatrali smo da je od značaja ispitati asocijaciju genetičkih varijanti *TLR4* Asp299Gly i Thr399Ile sa pojavom IBC. Studije sugerišu da navedene genetičke varijante menjaju strukturu receptora čime utiču na njegovu smanjenu sposobnost prepoznavanja bakterijskih antigena i započinjanja signalne

kaskade [Rallabhandi i sar., 2006; Figueroa i sar., 2012]. Ovim se može objasniti podložnost nosioca manje učestalog genotipa *TLR4* infekcijama prouzrokovanim gram-negativnim bakterijama [Arbour i sar., 2000; Agnese i sar., 2002].

Rezultati dosadašnjih asocijativnih studija vezanih za genetičke varijante Asp299Gly i Thr399Ile kod IBC su kontradiktorni. Jedan broj studija je pokazao asocijaciju navedenih genetičkih varijanti sa KB i UK [Franchimont i sar., 2004], neke studije su pokazale samo sa KB [Brand i sar., 2005; Gazouli i sar., 2005; De Jager i sar., 2007], a neke ni sa jednim tipom IBC [Arnott i sar., 2004; Lakatos i sar., 2005; Rigoli i sar., 2008]. Naša studija je pokazala značajnu asocijaciju jedino između Asp299Gly i KB. Ova nekonzistentnost među rezultatima u literaturi se može objasniti genetičkom heterogenošću populacija ili greškom u uzorkovanju [Arnott i sar., 2005]. Ipak, skorašnja meta-analiza koja je obuhvatila veći broj studija na belim populacijama, pokazala je značajnu asocijaciju obe varijante u genu *TLR4* kako sa KB, tako i sa UK [Shen i sar., 2010].

Naša studija je pokazala vezu između genetičkih varijanti Asp299Gly i Thr399Ile i ženskog pola među pacijentima sa KB. Odavno je primećena veća podložnost ženskog pola brojnim inflamatornim bolestima, uključujući i KB, što može biti rezultat uticaja estrogena [Garcia Rodriguez i sar., 2005; Saleiro i sar., 2012; Khalili i sar., 2013]. Istraživanja su pokazala da signalizacija posredovana estrogenskim receptorom utiče na odgovor indukovani receptorom *TLR4* [Calippe i sar., 2010; Cunningham i sar., 2012]. Još uvek nije poznat efekat estrogena na odgovor stimulisan sa LPS u ćelijama koje imaju različite varijante receptora *TLR4*, zbog čega je potrebno sprovesti dodatna ispitivanja. Ipak, ovaj rezultat ukazuje na to da informaciju o polu, zajedno sa *TLR4* statusom, treba uzeti u obzir prilikom procene rizika za razvoj KB.

Male promene u nivou produkcije citokina, koje nastaju kao posledica varijacija u regulatornim elementima citokinskih gena, mogu uticati na podložnost razvoju IBC. Genetičke varijante analizirane u ovoj studiji prethodno su okarakterisane kao funkcionalne. Jedne su povezane sa smanjenim (*TNF- α* G-238A, *IL-6* G-174C, *IL-1RN* alel 2) [Tarlow i sar., 1993; Tountas i sar., 1999; Kaluza i sar., 2000; Koss i sar., 2000; Hegedus i sar., 2007], a druge sa povećanim nivoom ekspresije citokina (*TNF- α* G-308A, *IL-1 β* C-511T) [Wilson i sar., 1997; Gonzalez i sar., 2003; Hall i sar., 2004].

U ovoj studiji nije detektovana asocijacija između genetičke varijante *TNF- α* G-238A i KB, niti UK, ali je zato pokazana veza između alela -308 A i KB, i alela -308 G i UK. Iako ova dihotomija u asocijaciji alela nije univerzalano potvrđena, neke studije su pokazale slične rezultate [Bouma i sar., 1996b; Balding i sar., 2004]. Razlika u tipu alela koji je asociiran sa KB i UK može se objasniti njihovom vezom sa različitim varijantama gena *HLA* koje nose rizik za nastanak jedne ili druge bolesti, a sa kojima je *TNF- α* G-308A u haplotipskom bloku [Bouma i sar., 1996a]. Generalno, smatra se da *MHC* regioni učestvuju sa visokim procentom u totalnom genetičkom riziku vezanom za KB, a naročito za UK [Satsangi i sar., 1996b; Yang i sar., 1999].

Što se tiče *IL-6*, pokazano je da nosioci alela -174 C imaju povećan rizik za pojavu KB. S obzirom da je alel C asociiran sa nižom ekspresijom *IL-6*, rezultati su naočigled kontradiktorni sa ulogom ovog citokina u proinflamatornim procesima kod KB. Treba uzeti u obzir da je *IL-6* plejotropni citokin sa širokim spektrom fizioloških funkcija. Važan je ne samo za proinflamatorne procese, već i za održavanje imunološke tolerancije [Frick i sar., 2010]. Uzimajući ovo u obzir, niži nivo ekspresije *IL-6* bi mogao poremetiti intestinalnu imunsku homeostazu. Takođe, važno je razgraničiti ulogu citokina u inicijalnoj i hroničnoj fazi inflamacije. U inicijalnoj fazi, proinflamatorni citokini imaju ulogu u koordinaciji ćelija imunskog sistema sa ciljem eliminacije invazivnih agenasa. Hipotetički, ukoliko bi nivo ekspresije proinflamatornih citokina bio niži, efikasnost ovog procesa bi bila smanjena, a mogućnost širenja invazivnog patogena veća. U prilog ovoj hipotezi ide i nejednaka zastupljenost *IL-6* -174 C alela u različitim delovima sveta. Naime, u geografskim regionima gde je prevalenca patogena veća, učestalost alela C je skoro jednaka nuli, dok u evropskim populacijama njegova učestalost dostiže 50% [Borinskaya i sar., 2013]. Iz perspektive inicijalne odbrane domaćina, koja je kod pacijenata sa IBC kompromitovana, asocijacija između alela koji produkuje manje *IL-6* i bolesti nije kontradiktorna.

Za razliku od *IL-1 β* C-511T varijante, koja nije pokazala asocijaciju ni sa jednim tipom IBC, A2 VNTR varijanta u genu *IL-IRN* je bila značajno zastupljenija kod KB i UK u poređenju sa zdravim ispitanicima. VNTR se sastoji od ponovaka dužine 86 bp koji sadrže tri potencijalna mesta za vezivanje regulatornih proteina: utišavač α -interferona A, utišavač β -interferona B i regulatorni element odgovora akutne faze. Pretpostavilo se da bi broj ovih regulatornih sekvenci u okviru različitih VNTR alela mogao usloviti različit transkripcioni odgovor [Tarlow i sar., 1993]. Međutim, VNTR verovatno nije jedini faktor koji utiče na ishod transkripcije, pošto su studije koje

su ispitivale funkcionalnost VNTR alela dobijale kontradiktorne rezultate. Naime, asocijacija alela A2 je pokazana i sa povećanom, i sa smanjenom, a u nekim studijama i sa sličnom količinom proteina IL-1Ra u poređenju sa drugim alelima *IL-RN*. S obzirom na kompleksnost citokinskih interakcija i diverzitet ispitivanih populacija, nije začuđujuće što su rezultati bili kontradiktorni [Witkin i sar., 2002]. Pacijenati sa UK koji su nosili alel A2 su imali smanjenu ekspresiju IL-1Ra u mukozi kolona, u odnosu na one koje su nosili alel A1 [Carter i sar., 2004]. Takođe, ispitivana je veza između genotipa *IL-1RN* i koncentracije proteina IL-1 β . Jedna *in vitro* studija je pokazala asocijaciju alela A2 sa povećanom ekspresijom IL-1 β u mononuklearnim ćelijama zdravih donora [Santtila i sar., 1998]. Moguće je da prisustvo varijante A2 utiče na ekspresiju IL-1Ra i IL-1 β , a njihov rezultujući odnos pomera ravnotežu ka proinflamatornim procesima.

Za sve analizirane varijante u citokinskim genima ustanovljena je velika nekonzistentnost po pitanju asocijacija sa IBC [Craggs i sar., 2001; Vijgen i sar., 2002; Balding i sar., 2004; Cantor i sar., 2005; Fan i sar., 2011; Xie i sar., 2012]. Zbog toga treba uzeti u obzir postojanje drugih varijanti u istom genu ili hromozomskom regionu, koje nose stvarni rizik za pojavu IBC. Ove istinski „rizične“ genetičke varijante mogu biti povezane sa „marker“ varijantama u nekim populacijama, a u drugim ne, što bi objasnilo prijavljene kontradiktorne rezultate. Takođe, moguće je da blisko povezane genetičke varijante međusobno kooperiraju doprinoseći finalnom fenotipu.

Treba naglasiti da je ova studija uključila relativno mali uzorak pacijenata sa IBC. Smatramo da je nivo od 10% tzv. lažnog otkrića dovoljan da spreči gubitak rezultata koji su „tačno pozitivni“ nakon korekcije za višestruka testiranja. Ipak, da bismo sa sigurnošću potvrdili dobijene pozitivne rezultate, potrebno je validirati ih na većoj grupi pacijenata sa IBC.

Fokus novijih studija koje se bave kompleksnim bolestima usmeren je ka pravljenju prediktivnih modela baziranih na genetičkim varijantama ispitanika [Evans i sar., 2009; Jostins i sar., 2011; Kruppa i sar., 2012]. Algoritmi mašinskog učenja, oblika veštačke inteligencije koja uči da predviđa buduće događaje na osnovu prošlih zapažanja, koriste se sve češće za predviđanje kliničkih ishoda. U ovoj studiji ispitali smo efikasnost nekoliko algoritama ove vrste (*elastic net*, *neural net*, *random forest*, *support vector machine*) da bismo odabrali prediktivni model koji ima najveću diskriminativnu moć. Kvalitet predikcije se može ispitati na nekoliko načina, a procena AUC vrednosti predstavlja najčešći pristup. Izračunata AUC vrednost za metod koji najbolje klasifikuje bolesne i zdrave u našoj studiji (sbf SVM) bila je 0.69 za KB i 0.60 za UK grupu

podataka. Nekoliko skorašnjih studija koje su ispitivale kvalitet KB prediktivnih modela imalo je AUC vrednost između 0.66 - 0.77. Pomenute studije su u prediktivnom modelovanju koristile podatke samo za nekoliko genetičkih varijanti [Jakobsdottir i sar., 2009], ili podatke dobijene u asocijativnim studijama na genomskom nivou (eng. *Genome-wide association study*, GWAS) [Evans i sar., 2009; Kang i sar., 2011; Wang i sar., 2013]. Koliko nam je poznato, do sada nijedna studija nije objavila model sa prikazanom kombinacijom genetičkih faktora. U model su uključene i varijante u genima koje u prikazanoj studiji nisu pokazale značajnu asocijaciju sa IBC. Odlučili smo se za ovakav pristup s obzirom da mašinsko učenje ima sposobnost prepoznavanja marginalnih faktora rizika koji mogu imati klinički značaj [Waljee i sar., 2010; Singal i sar., 2013]. Ova pojava u prediktivnom modelovanju je važna jer neke genetičke varijante, iako ne pokazuju značajnu asocijaciju sa bolešću, i dalje imaju značajnu prediktivnu vrednost. Zaista, model koji smo koristili za testiranje KB i UK je pokazao najbolji kvalitet predikcije kada su korišćene sve analizirane genetičke varijante.

Naši rezultati su pokazali da je, uzimajući u obzir varijante u genima *NOD2*, *TLR4*, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* i *IL-RN*, moguće razlikovati ispitanike obolele od KB i zdrave sa verovatnoćom koja je veća od slučajne. Takođe, zaključili smo da analizirane genetičke varijante u ovoj studiji predstavljaju bolje prediktivne varijable za pojavu KB u odnosu na pojavu UK.

Dodatno, jedan od ciljeva ove studije je bio da istraži „preklapanje“ genetičkih markera kod dve granulomatozne bolesti, KB i RA. Pokazali smo da je prisustvo genetičke varijante *IL-6* G-174C značajan faktor rizika za obe bolesti. Stvaranje granuloma na mestu infekcije je važno za odbranu od proliferišućih bakterija, a proces nastanka ovih struktura je regulisan proinformativnim citokinima, naročito *TNF- α* i *INF- γ* [Cooper i sar., 1993; Roach i sar., 2002; Ehlers 2005]. Takođe, pokazano je da na formiranje granuloma utiče i *IL-6* [Yimin i sar., 2003]. Naime, *IL-6*^{-/-} miševi zaraženi bakterijom *Rhodococcus aurantiacus* su imali značajno izraženiju granulomatoznu infekciju u odnosu na *wild type* miševe. Ista studija je pokazala da *IL-6* ima supresivnu funkciju u formiranju granuloma jer redukuje ekspresiju *TNF- α* i *INF- γ* u ranim fazama infekcije. Uzimajući ove rezultate u obzir, naša pretpostavka je da transkripciono manje aktivna varijanta *IL-6* -174 C potencijalno doprinosi granulomatoznom fenotipu. Niži nivo *IL-6* bi u tom slučaju mogao da utiče na izraženiju indukciju granulomatozne infekcije posredovanu citokinima *TNF- α* i *INF- γ* .

5.1.2. Varijante gena *HLA-DQ* kao markeri celijačne bolesti

CB je česta bolest u evropskim populacijama, a smatra se da postoji veliki broj subkliničkih slučajeva koji ostaju nedijagnostikovani. Iako je CB kompleksna bolest, njeno prisustvo se najviše dovodi u vezu sa određenim varijantama gena *HLA-DQ*. Zbog toga se genotipizacijom *HLA* može ustanoviti rizik i uspostaviti pravovremena dijagnoza CB, naročito u rizičnim grupama [Megiorni i sar., 2012]. Cilj ove studije je bio da ispita distribuciju genotipova *HLA-DQ* i proceni rizik koji oni nose za nastanak CB u srpskoj populaciji.

Rezultati ove studije su pokazali da 94.5% pacijenata sa CB nosi alele *DQA1*05* i *DQB1*02* na istom („*in cis*“) ili različitim („*in trans*“) hromozomima. To je ukazalo na postojanje jake asocijacije između alela koji doprinose genotipu *HLA-DQ2* i pojave CB. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u drugim evropskim zemljama: u skandinavskoj grupi je 92%, francuskoj 87%, italijanskoj 84%, i u britanskoj 88% pacijenata nosilo genotip *HLA-DQ2* [Karell i sar., 2003; Margaritte-Jeannin i sar., 2004]. Međutim, druge dve studije na italijanskoj populaciji su pokazale manji procenat - 80.8% i 64% [Megiorni i sar., 2009; Piccini i sar., 2012]. Dakle, primećen je geografski gradijent u distribuciji *HLA*, sa većim *HLA-DQ2* procentom u severnoevropskim u odnosu na južnoevropske populacije. Isti geografski trend prati i zastupljenost „*in trans*“ varijante *HLA-DQ2*. Podaci za našu grupu su slični podacima dobijenim ispitivanjem obolelih od CB u zemljama severne Evrope. Uočene razlike među populacijama se mogu objasniti prisustvom nekog dodatnog genetičkog faktora (*MICA*, *TNF*) koji bi podelio haplotipove *DQA1-DQB1* u podhaplotipove različitog rizika za razvoj CB [Bolognesi i sar., 2003; Louka i sar., 2003a; Louka i sar., 2003b]. Rezultati ove studije su pokazali sličnost sa rezultatima dobijenim u populacijama geografski bliskim našoj, kao što su hrvatska (93.7%) i slovenačka (88,8%) [Žunec i sar., 2004; Dolinšek i sar., 2006].

Najveći rizik za pojavu CB imaju nosioci genotipa *DQ2.5/DQ2.5*. Skorašnja prospektivna studija koja je obuhvatila veliki broj dece praćene od rođenja do, u najvećem broju slučajeva, 8 godine života, potvrdila je da *DQ2.5* homozigotnost nosi visok rizik za pojavu CB i to u ranom uzrastu ispitanika [Liu i sar., 2014a]. U našoj studiji, visok rizik su pokazali i nosioci haplotipa *DQ2.5* sa dodatnim alelom *DQB1*02* na drugom hromozomu. Srednji nivo rizika su imali heterozigotni nosioci *DQ2*, dok su najmanji rizik imale osobe koje nisu nosioci *DQ2*. Ovi podaci ukazuju na efekat „genske doze“, s obzirom da su grupe sa dve kopije alela *DQB1*02* pokazale veći rizik za

pojavu CB. Efekat doze alela *DQB1*02* je već pokazan u ranijim studijama [Vader i sar., 2003]. Iako se *DQ8* smatra genetičkim faktorom rizika za nastanak CB, u našoj grupi je ovaj haplotip bio češći kod kontrolnih ispitanika nego kod pacijenata i bio je povezan sa niskim rizikom za pojavu CB. Važno je istaći da čak 5.8% pacijenata koji nemaju *DQ2* ili *DQ8* nose alel *DQB1*02*. Bez obzira na nizak rizik sa kojim je „samostalno“ prisustvo ovog alela povezano, on ipak predstavlja bitan genetički marker CB [Mubarak i sar., 2013].

Naši rezultati potvrđuju preporuke ESPGHAN organizacije (Evropsko udruženje za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i ishranu), koja ističe značaj *HLA* genotipizacije kao pomoćnog kriterijuma u dijagnozi CB, pogotovo u visokorizičnim grupama [Megiorni i sar., 2012]. Nedavno je jedna prospektivna studija pokazala da praćenje genetički podložnih odojčadi može dijagnostikovati CB u ranom uzrastu [Liu i sar., 2014a]. Pored gena *HLA*, takođe treba ispitati ulogu drugih genskih lokusa u nastanku CB, naročito onih koji učestvuju u kontroli adaptivnog imunskog odgovora, a ne treba zanemariti ni podatke o porodičnoj istoriji celijačne bolesti, polu i zemlji porekla ispitanika.

5.2. Ekspresija proinflamatornih i apoptotskih gena u Kronovoj bolesti

U ovoj studiji je na odabranoj grupi pacijenata sa KB i kontrolnim ispitanicima analizirana ekspresija proinflamatornih gena *TNF- α* i *IL-6*, i apoptotskih gena *Bcl-2*, *Bax*, *Fas* i *FasL*. Pošto KB karakteriše diskontinuitet inflamacijom zahvaćenog tkiva, ekspresija je merena u biopsijama i obolelog i zdravog tkiva pacijenata sa KB. Takođe, ekspresija je merena u mononuklearnim ćelijama periferne krvi. Naš cilj je bio da ispitamo promene u proinflamatornim i apoptotskim procesima na lokalnom i sistemskom nivou kod pacijenata sa KB i identifikujemo biomarkere ovih patoloških procesa.

Rezultati studije su pokazali značajno povećanje nivoa ekspresije *IL-6* i *TNF- α* u bolesnoj mukozi ileuma pacijenata u poređenju sa tkivom kontrolnih ispitanika. Takođe, nivoi ekspresije ovih citokina su bili značajno veći u oboleloj u odnosu na zdravu mukožu pacijenata sa KB. Ovo je u skladu sa pretpostavkom da *IL-6* i *TNF- α* imaju važnu ulogu u koordinisanju proinflamatornih procesa koji su u osnovi patologije KB [Strober i sar., 2007]. Naši rezultati su u saglasnosti sa drugim studijama kada je u pitanju ekspresija *IL-6* i *TNF- α* u mukozi koja je aktivno zahvaćena inflamacijom [Stevens i sar., 1992; Reimund i sar., 1996; Leon i sar., 2009; Bogaert i sar., 2010;

Drastich i sar., 2011]. Ipak, nekonzistentnost postoji po pitanju nivoa ekspresije u zdravoj mukozi pacijenata, kao i mukozi različitih intestinalnih segmenata. U našoj grupi, zdravo tkivo pacijenata nije pokazalo promene u nivou iRNK analiziranih citokina u odnosu na tkivo kontrolnih ispitanika, a dobijene razlike su bile značajne samo u obolelom tkivu ileuma, a ne i kolona. Bez obzira na odsustvo značajnosti, bolesno tkivo kolona je i dalje imalo viši nivo *IL-6* iRNK u odnosu na kontrolno tkivo. Treba uzeti u obzir da je zbog malog uzorka statistička moć testa bila niska. Moguće je da bi sa povećanjem broja analiziranih biopsija ova razlika dostigla nivo statističke značajnosti. Specifičnost ekspresionih profila u bolesnoj mukozi kolona i ileuma pokazana je i ranije [Bogaert i sar., 2010; Drastich i sar., 2011]. Ovaj rezultat ukazuje da nivo *IL-6* iRNK u intestinalnoj mukozi ima potencijal da postane dijagnostički biomarker aktivne faze bolesti, što bi moglo da utiče i na bolji terapijski odabir.

U bolesnom intestinalnom tkivu je povećanje nivoa ekspresije *IL-6* bilo dosta izraženije u odnosu na povećanje *TNF- α* . Ovo nije neočekivano, s obzirom da je *IL-6* ključni citokin u diferencijaciji Th17 ćelija, glavne subpopulacije limfocita u patogenezi KB [Zhou i sar., 2007; Holtta i sar., 2008; Sarra i sar., 2010]. Takođe, *IL-6* doprinosi preživljavanju limfocita na mestu inflamacije [Atreya i sar., 2000]. Nivo ekspresije *IL-6*, a ne *TNF- α* , asociran je sa endoskopskim i histološkim stepenom inflamacije tkiva [Reimund i sar., 1996]. Jedna studija je pokazala da je citokinski profil specifičan za različite faze KB, tako da ranu fazu karakteriše Th1 odgovor i veća produkcija *TNF- α* , a kasniju fazu Th1/Th17 odgovor uz indukciju ekspresije *IL-6* i smanjenu ekspresiju *TNF- α* [Zorzi i sar., 2013]. Naša studija je pokazala da je *IL-6* dobar prediktivni marker patoloških procesa u tkivu, bez obzira na lokalizaciju inflamacije. O ključnoj ulozi *IL-6* u patogenezi KB govori i predlog da se nivo ovog citokina u serumu koristi kao prognostički marker za relaps bolesti [Louis i sar., 1997; Van Kemseke i sar., 2000]. Pored serumskog, i mukozni nivo *IL-6* se pokazao kao prognostički marker toka bolesti. Naime, pacijenti sa neophodnim operativnim tretmanom i perianalnim tipom KB imali su značajno viši nivo *IL-6* [Ruffolo i sar., 2008]. Takođe, praćenjem pacijenata nakon resekcije creva pokazano je da nivo *IL-6* predstavlja značajan prediktivni marker relapsa ilealnog tipa bolesti [Yamamoto i sar., 2004]. U našoj studiji nije bilo razlike u nivou ekspresije *IL-6* i *TNF- α* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi između pacijenata i kontrolnih ispitanika, što ukazuje na različite mehanizme regulacije inflamacije na lokalnom i sistemskom nivou. Međutim, treba uzeti u obzir da je ova studija ispitivala ekspresiju na nivou iRNK, i da je

moгуće da na proteinskom nivou postoje razlike u ekspresiji analiziranih citokina, ne samo lokalno, već i sistemski.

Ispitivanjem apoptotskih gena dobijene su značajne razlike u nivou ekspresije *Bcl-2* između bolesnog ilealnog tkiva pacijenata i tkiva kontrolnih ispitanika, kao i između ilealnih regiona zahvaćenih i nezahvaćenih inflamacijom. Pošto je za sudbinu ćelije važan odnos anti- i proapoptotskih gena, dodatno je ispitan *Bcl-2/Bax* iRNK odnos, i pokazan je njegov značajan pad kod pacijenata sa KB u odnosu na kontrolne ispitanike. Ovo ukazuje na postojanje izraženih proapoptotskih procesa u tkivu koje je aktivno zahvaćeno inflamacijom. Studije koje su ispitivale apoptotske procese u T limfocitima lamine proprije kod pacijenata sa KB, pokazale su povećan *Bcl-2/Bax* i *Bcl-xL/Bax* odnos koji je bio povezan sa apoptotskom rezistencijom T limfocita [Ina i sar., 1999; Itoh i sar., 2001]. U našoj studiji ekspresija je merena u celokupnom uzorkovanom tkivu koje pored infiltriranih limfocita sadrži i epitelijalne ćelije. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa skorašnjom studijom koja je takođe pokazala snižen transkripcioni nivo kako *Bcl-2*, tako i *Bax* u intestinalnoj mukozi pacijenata sa KB [Dias i sar., 2014]. Međutim, na proteinskom nivou, značajan pad je postojao samo u nivou ekspresije proteina Bax [Dias i sar., 2014]. Na osnovu naših rezultata, smatramo da je smanjenje nivoa *Bcl-2* iRNK događaj koji određuje proapoptotsku sudbinu ćelija intestinalnog tkiva. Takođe, pokazali smo da on ima značajan potencijal za predikciju aktivne faze bolesti u intestinalnoj mukozi pacijenata.

U brzo-obnavljajućim tkivima za koje je karakteristična promena u apoptotskom statusu ćelija, tzv. apoptotski preokret, ekspresija *Bcl-2* je topografski ograničena na dugoživeće proliferativne ćelijske zone [Hockenbery i sar., 1991]. Pokazano je da *Bcl-2* učestvuje u održavanju matičnih ćelija u bazama intestinalnih kripti, ali je njegova ekspresija različita u različitim delovima creva. Njegova produkcija je minimalna u tankom crevu, dok je u bazi kripti kolona jako izražena [Merritt i sar., 1995; Renehan i sar., 2001]. Ovo bi moglo da objasni dobijenu razliku u nivou *Bcl-2* ekspresije između zdrave mukoze kolona i ileuma u našoj grupi pacijenata. Međutim, i pored razlika u nivou ekspresije *Bcl-2* između kolona i ileuma, značajno smanjenje *Bcl-2* iRNK dobijeno je između zdrave i bolesne mukoze ileuma. Uzimajući u obzir funkciju proteina *Bcl-2* u održavanju germinativne epitelijalne linije, zabeleženo smanjenje ekspresije *Bcl-2* moglo bi rezultovati poremećenim odnosom apoptoze i obnavljanja intestinalnih epitelijalnih ćelija. Ovo je u skladu sa pretpostavkom da narušavanje epitelijalne barijere predstavlja jedan od događaja u patogenezi KB.

Nedavna studija ispitivala je uticaj Bcl-2 na održavanje epitelijalne barijere kod IL-10-deficijentnih miševa, životinjskog model-sistema KB. U eksperimentu su IL-10-deficijentni miševi ukršteni sa transgenim miševima koji su prekomerno sintetisali humani Bcl-2 u intestinalnim epitelijalnim ćelijama. Protein Bcl-2 je kod ovako ukrštenih miševa inhibirao prekomernu apoptozu epitelijalnih ćelija, bolje je održao integritet mukozne barijere, redukovao je Th17 populaciju limfocita, kao i totalni broj limfocita u lamini propriji, i na taj način sprečio intestinalnu inflamaciju i povećao preživljavanje miševa [Mizushima i sar., 2013]. Ova studija je jasno pokazala važnu ulogu Bcl-2 u inhibiciji apoptoze intestinalnih epitelijalnih ćelija i u sprečavanju razvoja hronične inflamacije.

Za razliku od *Bcl-2/Bax*, nivoi ekspresije *Fas* i *FasL* nisu pokazali značajne razlike u mukozi pacijenata sa KB u poređenju sa mukozom kontrolnih ispitanika. Nema puno studija na temu ekspresije ova dva gena u tkivu KB pacijenata, a naši rezultati su u saglasnosti sa objavljenim [Di Sabatino i sar., 2003].

Rezultati ispitivanja ekspresije apoptotskih gena u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pokazali su izmenjen *Fas/FasL* odnos kod pacijenata sa KB u odnosu na kontrolne ispitanike. Ovaj odnos se u našoj studiji pokazao kao dobar prediktivni marker aktivne faze bolesti na sistemskom nivou, pogotovo kod ispitanika muškog pola. Postojanje ove razlike prvenstveno je posledica značajnog smanjenja nivoa *FasL* iRNK kod pacijenata sa KB u poređenju sa kontrolnim ispitanicima. Poznato je da FasL učestvuje u održavanju imunske homeostaze tako što kroz Fas-FasL interakciju dovodi do eliminisanja perifernih aktiviranih limfocita mehanizmom takozvane „ćelijske smrti izazvane aktivacijom“ (eng. *activation-induced cell death*, AICD). Na taj način se, u normalnim uslovima, sprečava hiperaktivacija imunosti posredovane T ćelijama [Suda i sar., 1997; De Panfilis i sar., 2001]. Deregulacija Fas/FasL sistema je asocirana sa patofiziološkim stanjima. Miševi kojima nedostaju funkcionalni Fas (*lpr*) ili FasL (*gld*) oboljevaju od teških limfoproliferativnih i autoimunskih poremećaja [Watanabe-Fukunaga i sar., 1992; Nagata i sar., 1995b]. Defekti u ovim genima imaju slične posledice i kod ljudi [Price i sar., 2014].

Da bi se pokrenuli protektivni mehanizmi protiv enteričnih patogena, „naivne“ T ćelije moraju biti aktivirane, polarizovane i umnožene u limfoidnim tkivima asociranim sa intestinalnim traktom. Nakon toga, efektorski limfociti ulaze u sistemsku cirkulaciju i odlaze u tkivo creva gde pomažu u uklanjanju invazivnih patogena [Koboziev i sar., 2010]. Smanjenje nivoa ekspresije *FasL*

zabeleženo u cirkulišućim mononuklearnim ćelijama pacijenata sa KB moglo bi da utiče na duže preživljavanje aktiviranih limfocita i samim tim povećanu akumulaciju efektorskih ćelija u intestinalnoj mukozii. Da li je smanjenje *FasL* ekspresije primarni defekt ili je posledica hroničnih inflamatornih procesa kod KB, ostaje nerazjašnjeno.

U našoj studiji značajno niža ekspresija *FasL* asocirana je sa muškim polom. Koliko nam je poznato, u dosadašnjim studijama ne postoje podaci koji objašnjavaju ovu vezu. Poznato je da seksualni hormoni, naročito estrogen, modulišu imunski odgovor. Takođe, pokazano je da estrogen povećava ekspresiju *FasL* gena u monocitima *in vitro* [Mor i sar., 2003]. U kontekstu naših rezultata, ovo bi moglo da objasni viši nivo ekspresije *FasL* kod bolesnih žena u odnosu na bolesne muškarace. Međutim, polna razlika u *FasL* ekspresiji nije primećena u kontrolnoj grupi. Razlog ovome može biti izmenjen sastav imunskih ćelija periferne krvi kod pacijenata. Naime, pacijenti sa KB u poređenju sa zdravim ispitanicima imaju mnogo veći udeo monocita i neutrofila u odnosu na udeo limfocita u ukupnom sadržaju mononuklearnih ćelija periferne krvi [Burczynski i sar., 2006]. Zbog toga bi efekat smanjene ekspresije *FasL* gena kod muškaraca u odnosu na žene bio mnogo izraženiji u grupi bolesnih ispitanika.

Jedan od ciljeva ove studije bio je identifikovanje biomarkera u perifernoj krvi koji bi mogli na manje invazivan i ekonomski isplativ način da predvide prisustvo aktivne faze bolesti. Odnos *Fas/FasL* iRNK se u ispitivanoj grupi pokazao kao dovoljno diskriminišući, ali samo kod pacijenata muškog pola. Potrebno je ispitati značaj ovog markera na većem uzorku pacijenata kako bi se validirao njegov značaj i opravdala potencijalna klinička upotreba.

5.3. DNK vezujuća aktivnost NF- κ B u Kronovoj bolesti

NF- κ B je regulatorni protein koji indukuje ekspresiju imunskih i antiapoptotskih gena. On ima dvostruku ulogu u održavanju intestinalne homeostaze - učestvuje u odbrani od invazivnih patogena i doprinosi očuvanju integriteta epitelijalne barijere [Spehlmann i sar., 2009]. Ova dva procesa su kompromitovana kod obolelih od KB. Poremećena aktivnost NF- κ B je povezana sa promenama u genu *NOD2* [Abbott i sar., 2004]. Zbog toga je primarna ideja naše studije bila da se ispita DNK vezujuća aktivnost NF- κ B iz jedarnih ekstrakata intestinalnog tkiva kod dve grupe pacijenata - nosioca manje učestalih genotipova *NOD2* (Arg702Trp / Gly908Arg / Leu1007fsinsC) i nosioca učestalijeg genotipa. Analizom rezultata smo ustanovili da nivo vezujuće aktivnosti NF-

κ B nije bio u direktnoj asocijaciji sa genotipom *NOD2*, već je pokazao vezu sa fenotipom bolesti. Naime, rezultati su pokazali da je kod pacijenata sa fragilnom sluznicom relativna količina NF- κ B-DNK kompleksa bila značajno niža u poređenju sa pacijentima koji su imali stenozne promene. Fragilna sluznica predstavlja osetljivu intestinalnu mukozu koja krvari na blaži dodir, dok su stenozne promene posledica hroničnih inflamatornih procesa zbog kojih zid creva postaje zadebljan, a crevni lumen sužen. Ova dva tipa intestinalnih komplikacija upravo odlikavaju procese u kojima NF- κ B učestvuje - apoptozu i inflamaciju.

Supershift analizom je potvrđeno da je u sastavu detektovanih kompleksa bio prisutan protein p65. Ranije studije su pokazale da je p65 povišen kod pacijenata sa IBC [Rogler i sar., 1998] i da utiče na transkripciju inflamatornih citokina *TNF- α* , *IL-6* i *IL-1* [Neurath i sar., 1998]. Uzimajući ovu činjenicu u obzir, kontradiktorno je bilo to što je u našoj grupi pacijenata smanjena vezujuća aktivnost NF- κ B bila povezana sa višim nivoom *TNF- α* iRNK. Takođe, ovaj NF- κ B:*TNF- α* odnos je bio povezan sa fenotipom fragilne sluznice koji je ukazivao na apoptotske procese u intestinalnoj mukozu. Poznato je da NF- κ B sprečava apoptozu ćelija iniciranu TNF-signalizacijom. Vezivanje *TNF- α* za TNFR1 pokreće proinflamatorne događaje aktivacijom signalnog puta NF- κ B i MAPK, ali takođe aktivira i kaspazu-8 [Aggarwal 2003]. Aktivacija NF- κ B štiti ćelije od apoptoze pokrenute preko TNFR1 indukujući ekspresiju proteina sa antiapoptotskim i antioksidantskim funkcijama [Wang i sar., 1998; Micheau i sar., 2001; Papa i sar., 2004]. Smatra se da aktivacija NF- κ B na ovaj način određuje odgovor ćelija na *TNF- α* stimulaciju, tako što *TNF- α* pokreće proinflamatorni odgovor u NF- κ B kompetentnim ćelijama, ali zato dovodi do smrti ćelija koje su NF- κ B deficijentne [Wullaert i sar., 2011]. Takođe, *TNF- α* može povratno da utiče kako na aktivaciju, tako i na inhibiciju NF- κ B puta, indukcijom ekspresije negativnih regulatora NF- κ B kao što je protein A20 [Vereecke i sar., 2010]. Pored apoptoze ćelija, *TNF- α* signalizacija utiče i na smanjenje ekspresije proteina koji ulaze u sastav međućelijskih uskih veza čime se narušava integritet epitelijalne barijere [Mankertz i sar., 2000; Gitter i sar., 2001]. Pokazano je da anti-*TNF- α* terapija značajno redukuje apoptozu epitelijalnih ćelija u kolonu pacijenata sa KB i povećava otpor epitelijanog sloja [Zeissig i sar., 2004]. Još jedan dokaz za važnu ulogu NF- κ B u očuvanju intestinalne homeostaze je primer miševa deficijentnih za p65 (delecija *Rela* gena) u epitelijalnim ćelijama creva, koji su imali povećan bazalni nivo epitelijalne apoptoze i proliferacije, kao i povećanu osetljivost na hemijsku indukciju kolitisa [Steinbrecher i sar., 2008]. S tim u vezi, smanjena vezujuća aktivnost NF- κ B i povećan nivo *TNF- α* iRNK u ispitivanoj grupi pacijenata sa

KB mogu biti marker preterane smrti intestinalnih epitelijalnih ćelija, što može da objasni pojavu fragilne sluznice. Treba naglasiti da većina pacijenata sa fragilnom sluznicom (4/6) u trenutku endoskopskog pregleda nije bila tretirana lekovima, pa smanjen nivo vezujuće aktivnosti NF- κ B nije bio posledica primenjene terapije.

Intestinalna stenoza je u ovoj studiji povezana sa većom količinom NF- κ B-DNK kompleksa. Uloga NF- κ B u formiranju ovih struktura potvrđena je ranije primenom p65 *antisense*-oligonukleotida čime je smanjena pojava fibroznih stenoza kod mišjeg modela hroničnog kolitisa [Wu i sar., 2007]. Međutim, nije jasno zašto je nivo *TNF- α* iRNK kod pacijenata sa stenoznim promenama bio sličan nivou u kontrolnom tkivu. Možda je u hroničnoj fazi inflamacije u kojoj se formiraju stenozne uloga *TNF- α* manje važna, a aktivacija NF- κ B vezana za indukciju ekspresije drugih, za tu fazu specifičnih, medijatora inflamacije. Tako je jedna *ex vivo* studija pokazala značajno viši nivo citokina IL-17A u stenoznom tkivu pacijenata sa KB u poređenju sa nestenoznim, dok razlika nije uočena za produkciju *TNF- α* i IL-6 [Biancheri i sar., 2013]. Zanimljiv je podatak da iako anti-*TNF- α* terapija pomaže u brzom zarastanju oštećene intestinalne mukoze, ona nije efikasna u sprečavanju pojave stenoznih komplikacija. Smatra se čak da *TNF- α* , zajedno sa INF- γ , ima anti-stenozni efekat [Van Assche i sar., 2004].

Otpriblike jedna trećina pacijenata sa KB razvija stenozne komplikacije, a velika većina njih će biti podvrgnuta makar jednoj operaciji. U formiranju stenoza učestvuju fibroblasti, miofibroblasti i glatke mišićne ćelije. Ove ćelije sintetišu prekomernu količinu komponenti ekstraćelijskog matriksa (E \acute CM), pri tome stvarajući fibrozno tkivo na mestu koje je oštećeno inflamacijom [Stallmach i sar., 1992; Lawrance i sar., 2001]. Danas je poznato da fibroblasti, osim sinteze E \acute CM, mogu aktivno učestvovati i u regulaciji imunskog odgovora [Goke i sar., 1998; Lawrance i sar., 2001; Vogel i sar., 2004]. Fibroblasti konstitutivno ekspimiraju membranski receptor CD40 i nakon interakcije sa CD40 ligandom na površini CD4⁺ T limfocita iniciraju NF- κ B posredovanu ekspresiju IL-1, IL-6, IL-8, hemokina, intercelularnih adhezionih molekula (ICAM)-1, ciklo-oksigenaze 2 (COX)-2 i drugih [Fries i sar., 1995; Sempowski i sar., 1998; Zhang i sar., 1998; Gelbmann i sar., 2003]. Takođe, fibroblasni faktori promovišu preživljavanje T limfocita indukujući ekspresiju gena *Bcl-2* i *Bcl-xL* i omogućavaju im da funkcionišu duže na mestu inflamacije [Scott i sar., 1990; Gombert i sar., 1996]. Na ovaj način, fibroblasti doprinose razvoju hronične inflamacije.

Ranije je pokazano da su varijante u genu *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg i Leu1007insC) asocirane sa razvojem stenoznog tipa bolesti i operativnim tretmanom [Abreu i sar., 2002b; Brant i sar., 2003; Economou i sar., 2004; Alvarez-Lobos i sar., 2005]. Ovaj podatak je u saglasnosti sa zapažanjima naše studije. U ispitivanoj grupi, 3 od 4 pacijenta sa stenoznim fenotipom nosilo je jednu od pomenutih genetičkih varijanti.

Rezultati naše studije pokazuju da je razvoj patoloških promena u intestinalnom tkivu pacijenata sa KB dinamičan proces u kome učestvuju intestinalne epitelijalne ćelije, ćelje imunskog sistema i različite ćelije mezenhinskog porekla. Zato je za optimalnu terapiju, koja uključuje regulaciju inflamatornog odgovora i rekonstituisanje epitelijalne barijere, važno utvrditi terapijski pristup koji će biti specifičan i ciljano primenjen za tip promena i vrstu ćelija koje u tim promenama učestvuju, kao i za različite faze bolesti.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata moguće je izvesti sledeće zaključke:

1. Nosioци manje učestalih varijanti u genima *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC, Arg684Trp), *TLR4* (Asp299Gly), *TNF- α* (G-308A), *IL-6* (G-174C) i *IL-1RN* (A2 VNTR) imaju povećan rizik za pojavu KB. Nosioци genetičke varijante *IL-1RN* A2 imaju povećan rizik za pojavu UK. Pokazana je značajna razlika u distribuciji genetičke varijante *TNF- α* G-308A između grupe pacijenata sa KB i UK, pri čemu je alel A asociiran sa pojavom KB, a alel G sa pojavom UK. Manje učestale varijante u genu *TLR4*, Asp299Gly i Thr399Ile, pokazale su asocijaciju sa ženskim polom kod pacijenata sa KB.
2. Prediktivni model koji uključuje podatke o svim analiziranim genotipovima, kao i podatke o polu ispitanika, klasifikuje ispitanike na bolesne i zdrave sa verovatnoćom većom od slučajne, s tim što pokazuje bolji kvalitet u predikciji KB u odnosu na predikciju UK. Model razlikuje ispitanike sa KB i zdrave ispitanike u 69% slučajeva, a ispitanike sa UK i zdrave ispitanike u 60% slučajeva.
3. Genetička varijanta *IL-6* G-174C asociirana je sa pojavom inflamatornih bolesti granulomatoznog tipa - KB i RA.
4. Genotipovi koji rezultuju fenotipom DQ2 pokazuju jaku asocijaciju sa CB. Najveći rizik za pojavu CB imaju homozigotni nosioци haplotipa *DQ2.5*, a zatim heterozigotni nosioци haplotipa *DQ2.5*. Srednji rizik imaju nosioци alela *DQA1*05* i *DQB1*02*, pozicioniranih na različitim hromozomima. Najniži rizik imaju nosioци haplotipa *DQ8*, pojedinačnih varijanti gena *DQA1*05* ili *DQB1*02*, kao i ostalih varijanti gena *HLA-DQ*.
5. Nivo ekspresije *IL-6* i *TNF- α* je značajno povišen, a *Bcl-2* značajno snižen u ilealnoj mukozi zahvaćenoj inflamacijom, što ukazuje na aktivnost proinflamatornih i proapoptotskih procesa u intestinalnom tkivu pacijenata sa KB. Porast nivoa ekspresije *IL-6* je izraženiji nego *TNF- α* . Nivoi iRNK ovih gena se mogu smatrati biomarkerima aktivne faze KB u mukozi ileuma, ali ne i kolona. *IL-6* i *Bcl-2* iRNK imaju prediktivni značaj, i mogu se smatrati potencijalnim dijagnostičkim biomarkerima.
6. Nivo ekspresije *FasL* je značajno snižen u mononuklearnim ćelijama periferne krvi muških pacijenata u aktivnoj fazi KB. Odnos *Fas/FasL* ima prediktivni značaj, i može se smatrati potencijalnim dijagnostičkim biomarkerom, ali samo kod ispitanika muškog pola.

7. Smanjen nivo DNK vezujuće aktivnosti NF- κ B i visok nivo ekspresije *TNF- α* asocirani su sa fenotipom fragilne sluznice, dok je povećan nivo DNK vezujuće aktivnosti NF- κ B i niži nivo ekspresije *TNF- α* asociran sa stenoznim promenama. Stoga se NF- κ B vezujuća aktivnost može smatrati markerom apoptotskih i inflamatornih procesa koji su u osnovi ova dva klinička fenotipa.

7. LITERATURA

- Abbas AK. Die and let live: eliminating dangerous lymphocytes. *Cell* 1996; 84: 655-657.
- Abbott DW, Wilkins A, Asara JM, Cantley LC. The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol* 2004; 14: 2217-2227.
- Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 2066-2078.
- Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS *et al.* TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002a; 277: 20431-20437.
- Abreu MT, Taylor KD, Lin YC *et al.* Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002b; 123: 679-688.
- Abreu MT, Vora P, Faure E *et al.* Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001; 167: 1609-1616.
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 745-756.
- Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012; 119: 651-665.
- Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ *et al.* Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002; 186: 1522-1525.
- Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M *et al.* The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 854-866.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511.
- Aksentijevich I, Masters SL, Ferguson PJ *et al.* An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med* 2009; 360: 2426-2437.
- Al-Toma A, Goerres MS, Meijer JW *et al.* Human leukocyte antigen-DQ2 homozygosity and the development of refractory celiac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 315-319.

- Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M *et al.* Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg* 2005; 242: 693-700.
- Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 347-361.
- Apte SS, Mattei MG, Olsen BR. Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics* 1995; 26: 592-594.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC *et al.* TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-191.
- Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 1993; 54: 167-227.
- Arend WP, Guthridge CJ. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis* 2000; 59 Suppl 1: i60-64.
- Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 27-55.
- Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J Clin Invest* 1990; 85: 1694-1697.
- Arnott ID, Ho GT, Nimmo ER, Satsangi J. Toll-like receptor 4 gene in IBD: further evidence for genetic heterogeneity in Europe. *Gut* 2005; 54: 308; author reply 309.
- Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE *et al.* NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* 2004; 5: 417-425.
- Atreya R, Mudter J, Finotto S *et al.* Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 583-588.
- Balding J, Livingstone WJ, Conroy J *et al.* Inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms. *Mediators Inflamm* 2004; 13: 181-187.
- Baluchamy S, Sankar N, Navaraj A, Moran E, Thimmapaya B. Relationship between E1A binding to cellular proteins, c-myc activation and S-phase induction. *Oncogene* 2007; 26: 781-787.

- Bean AG, Roach DR, Briscoe H *et al.* Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* 1999; 162: 3504-3511.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B* 1995; 57: 289-300.
- Biancheri P, Pender SL, Ammoscato F *et al.* The role of interleukin 17 in Crohn's disease-associated intestinal fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013; 6: 13.
- Bigda J, Beletsky I, Brakebusch C *et al.* Dual role of the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF cytotoxicity. *J Exp Med* 1994; 180: 445-460.
- Bogaert S, Laukens D, Peeters H *et al.* Differential mucosal expression of Th17-related genes between the inflamed colon and ileum of patients with inflammatory bowel disease. *BMC Immunol* 2010; 11: 61.
- Boirivant M, Marini M, Di Felice G *et al.* Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* 1999; 116: 557-565.
- Boirivant M, Pica R, DeMaria R *et al.* Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2616-2622.
- Bolognesi E, Karell K, Percopo S *et al.* Additional factor in some HLA DR3/DQ2 haplotypes confers a fourfold increased genetic risk of celiac disease. *Tissue Antigens* 2003; 61: 308-316.
- Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL *et al.* Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003; 124: 140-146.
- Bonfoco E, Stuart PM, Brunner T *et al.* Inducible nonlymphoid expression of Fas ligand is responsible for superantigen-induced peripheral deletion of T cells. *Immunity* 1998; 9: 711-720.
- Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25: 280-288.
- Borinskaya SA, Gureev AS, Orlova AA *et al.* [Allele frequency distributions of -174G/C polymorphism in regulatory region of interleukin 6 gene (IL6) in Russian and worldwide populations]. *Genetika* 2013; 49: 113-124.
- Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M *et al.* Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR

- alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996a; 43: 456-463.
- Bouma G, Xia B, Crusius JB *et al.* Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1996b; 103: 391-396.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992; 339: 89-91.
- Brand S, Staudinger T, Schnitzler F *et al.* The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 645-652.
- Brant SR, Nguyen GC. Is there a gender difference in the prevalence of Crohn's disease or ulcerative colitis? *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14 Suppl 2: S2-3.
- Brant SR, Picco MF, Achkar JP *et al.* Defining complex contributions of NOD2/CARD15 gene mutations, age at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 281-289.
- Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T *et al.* Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003; 171: 6164-6172.
- Burczynski ME, Peterson RL, Twine NC *et al.* Molecular classification of Crohn's disease and ulcerative colitis patients using transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells. *J Mol Diagn* 2006; 8: 51-61.
- Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL, EpiCom E. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis* 2013; 7: 322-337.
- Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 249-257.
- Burmester GR, Feist E, Dorner T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10: 77-88.
- Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 2012; 24: 1297-1305.

- Calippe B, Douin-Echinard V, Delpy L *et al.* 17Beta-estradiol promotes TLR4-triggered proinflammatory mediator production through direct estrogen receptor alpha signaling in macrophages in vivo. *J Immunol* 2010; 185: 1169-1176.
- Cantor MJ, Nickerson P, Bernstein CN. The role of cytokine gene polymorphisms in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1134-1142.
- Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005; 54: 1182-1193.
- Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1583-1597.
- Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68: 7010-7017.
- Carter MJ, Jones S, Camp NJ *et al.* Functional correlates of the interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in the colonic mucosa in ulcerative colitis. *Genes Immun* 2004; 5: 8-15.
- Cartron PF, Oliver L, Martin S *et al.* The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 675-687.
- Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ *et al.* Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 1995; 154: 2434-2440.
- Catarzi S, Marcucci T, Papucci L *et al.* Apoptosis and Bax, Bcl-2, Mcl-1 expression in neutrophils of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 819-825.
- Cheng J, Zhou T, Liu C *et al.* Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263: 1759-1762.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- Choy EH, Isenberg DA, Garrod T *et al.* Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3143-3150.
- Christophi GP, Caza T, Curtiss C *et al.* Gene expression profiles in granuloma tissue reveal novel diagnostic markers in sarcoidosis. *Exp Mol Pathol* 2014; 96: 393-399.

- Chung Y, Chang SH, Martinez GJ *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 2009; 30: 576-587.
- Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Parroni R *et al.* Increased enterocyte apoptosis and Fas-Fas ligand system in celiac disease. *Am J Clin Pathol* 2001; 115: 494-503.
- Clark JP, Munson KW, Gu JW *et al.* Performance of a single assay for both type III and type VI TMPRSS2:ERG fusions in noninvasive prediction of prostate biopsy outcome. *Clin Chem* 2008; 54: 2007-2017.
- Clerget-Darpoux F, Bouguerra F, Kastally R *et al.* High risk genotypes for celiac disease. *C R Acad Sci III* 1994; 317: 931-936.
- Coccia M, Harrison OJ, Schiering C *et al.* IL-1beta mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *J Exp Med* 2012; 209: 1595-1609.
- Cominelli F, Nast CC, Duchini A, Lee M. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. *Gastroenterology* 1992; 103: 65-71.
- Cooney R, Baker J, Brain O *et al.* NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 2010; 16: 90-97.
- Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA *et al.* Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993; 178: 2243-2247.
- Coury F, Annels N, Rivollier A *et al.* Langerhans cell histiocytosis reveals a new IL-17A-dependent pathway of dendritic cell fusion. *Nat Med* 2008; 14: 81-87.
- Cox A, Camp NJ, Nicklin MJ, di Giovine FS, Duff GW. An analysis of linkage disequilibrium in the interleukin-1 gene cluster, using a novel grouping method for multiallelic markers. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1180-1188.
- Craggs A, West S, Curtis A *et al.* Absence of a genetic association between IL-1RN and IL-1B gene polymorphisms in ulcerative colitis and Crohn disease in multiple populations from northeast England. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 1173-1178.
- Cunningham MA, Naga OS, Eudaly JG, Scott JL, Gilkeson GS. Estrogen receptor alpha modulates Toll-like receptor signaling in murine lupus. *Clin Immunol* 2012; 144: 1-12.
- Dasgupta B, Corkill M, Kirkham B, Gibson T, Panayi G. Serial estimation of interleukin 6 as a measure of systemic disease in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992; 19: 22-25.

- De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A *et al.* The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun* 2007; 8: 387-397.
- De Panfilis G, Caruso A, Sansoni P *et al.* Identification of Fas-L-expressing apoptotic T lymphocytes in normal human peripheral blood : in vivo suicide. *Am J Pathol* 2001; 158: 387-391.
- de Vries EG, Gietema JA, de Jong S. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand pathway and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2390-2393.
- Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cinque B *et al.* Defective mucosal T cell death is sustainably reverted by infliximab in a caspase dependent pathway in Crohn's disease. *Gut* 2004; 53: 70-77.
- Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O *et al.* Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1498-1507.
- Dias CB, Milanski M, Portovedo M *et al.* Defective apoptosis in intestinal and mesenteric adipose tissue of Crohn's disease patients. *PLoS One* 2014; 9: e98547.
- Dimitriadou E, Hornik K, Leisch F, Meyer D, Weingessel A. e1071: Misc Functions of the Department of Statistics (e1071), TU Wien. 2009.
- Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011; 117: 3720-3732.
- Dionne S, D'Agata ID, Hiscott J, Vanounou T, Seidman EG. Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 435-442.
- Dolinšek J, Micetik-turk D, Urlep-Žužej D *et al.* Importance of celiac disease patients lacking Hla Dq2 or Dq8 heterodimer in Slovenia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 18-19.
- Drastich P, Frolova-Brizova L, Zanvit P, Spicak J, Tlaskalova-Hogenova H. Spontaneous in vitro IL-6 production in various intestinal segments in patients with inflammatory bowel disease. *Folia Microbiol (Praha)* 2011; 56: 185-190.
- Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2393-2404.
- Edelblum KL, Yan F, Yamaoka T, Polk DB. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 413-424.

- Ehlers S. Tumor necrosis factor and its blockade in granulomatous infections: differential modes of action of infliximab and etanercept? *Clin Infect Dis* 2005; 41 Suppl 3: S199-203.
- Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 163-172.
- Elson CO, Cong Y, McCracken VJ *et al.* Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* 2005; 206: 260-276.
- Esteve M, Rosinach M, Fernandez-Banares F *et al.* Spectrum of gluten-sensitive enteropathy in first-degree relatives of patients with coeliac disease: clinical relevance of lymphocytic enteritis. *Gut* 2006; 55: 1739-1745.
- Evans DM, Visscher PM, Wray NR. Harnessing the information contained within genome-wide association studies to improve individual prediction of complex disease risk. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 3525-3531.
- Fan W, Maoqing W, Wangyang C *et al.* Relationship between the polymorphism of tumor necrosis factor-alpha-308 G>A and susceptibility to inflammatory bowel diseases and colorectal cancer: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 432-437.
- Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T *et al.* Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* 2003; 163: 286-292.
- Fawcett T. An Introduction to ROC Analysis. *Pattern Recognition Letters* 2006; 27: 861-874
- Ferguson LR, Huebner C, Petermann I *et al.* Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4652-4661.
- Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K *et al.* Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Mol Med* 2008a; 14: 346-352.
- Ferwerda G, Kramer M, de Jong D *et al.* Engagement of NOD2 has a dual effect on proIL-1beta mRNA transcription and secretion of bioactive IL-1beta. *Eur J Immunol* 2008b; 38: 184-191.
- Figuroa L, Xiong Y, Song C *et al.* The Asp299Gly polymorphism alters TLR4 signaling by interfering with recruitment of MyD88 and TRIF. *J Immunol* 2012; 188: 4506-4515.

- Fishman D, Faulds G, Jeffery R *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369-1376.
- Floros KV, Thomadaki H, Florou D, Talieri M, Scorilas A. Alterations in mRNA expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, FAS, caspase-3, and the novel member BCL2L12 after treatment of human leukemic cell line HL60 with the antineoplastic agent etoposide. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1090: 89-97.
- Foster JR. The functions of cytokines and their uses in toxicology. *Int J Exp Pathol* 2001; 82: 171-192.
- Franchimont D, Vermeire S, El Housni H *et al.* Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53: 987-992.
- Frick JS, Grunebach F, Autenrieth IB. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 19-24.
- Fried M, Crothers DM. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1981; 9: 6505-6525.
- Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *J Stat Softw* 2010; 33: 1-22.
- Fries KM, Sempowski GD, Gaspari AA *et al.* CD40 expression by human fibroblasts. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 77: 42-51.
- Fukata M, Michelsen KS, Eri R *et al.* Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1055-1065.
- Fuss IJ, Heller F, Boirivant M *et al.* Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497.
- Garcia Rodriguez LA, Gonzalez-Perez A, Johansson S, Wallander MA. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 309-315.
- Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 2013; 39: 1003-1018.

- Gauldie J, Richards C, Baumann H. IL6 and the acute phase reaction. *Res Immunol* 1992; 143: 755-759.
- Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A *et al.* 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; 11: 681-685.
- Gelbmann CM, Leeb SN, Vogl D *et al.* Inducible CD40 expression mediates NFkappaB activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts. *Gut* 2003; 52: 1448-1456.
- Giachino D, van Duist MM, Regazzoni S *et al.* Analysis of the CARD15 variants R702W, G908R and L1007fs in Italian IBD patients. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 206-212.
- Girardin SE, Boneca IG, Viala J *et al.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; 278: 8869-8872.
- Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB J* 2000; 14: 1749-1753.
- Gitter AH, Wullstein F, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology* 2001; 121: 1320-1328.
- Goke M, Kanai M, Podolsky DK. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol* 1998; 274: G809-818.
- Gombert W, Borthwick NJ, Wallace DL *et al.* Fibroblasts prevent apoptosis of IL-2-deprived T cells without inducing proliferation: a selective effect on Bcl-XL expression. *Immunology* 1996; 89: 397-404.
- Gonzalez S, Rodrigo L, Martinez-Borra J *et al.* TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1101-1106.
- Greco L, Romino R, Coto I *et al.* The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002; 50: 624-628.
- Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med* 2007; 357: 1731-1743.
- Greten FR, Karin M. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 2004; 206: 193-199.
- Gross V, Andus T, Caesar I, Roth M, Scholmerich J. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992; 102: 514-519.

- Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 216-228.
- Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA *et al.* Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1976-1983.
- Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12 Suppl 1: S3-9.
- Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S *et al.* Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002; 122: 1987-2000.
- Hedl M, Li J, Cho JH, Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 19440-19445.
- Hegedus CM, Skibola CF, Bracci P, Holly EA, Smith MT. Screening the human serum proteome for genotype-phenotype associations: an analysis of the IL6 -174G>C polymorphism. *Proteomics* 2007; 7: 548-557.
- Hessian PA, Highton J, Kean A, Sun CK, Chin M. Cytokine profile of the rheumatoid nodule suggests that it is a Th1 granuloma. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 334-338.
- Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 6961-6965.
- Holtta V, Klemetti P, Sipponen T *et al.* IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1175-1184.
- Hosokawa T, Kusugami K, Ina K *et al.* Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 987-996.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
- Hugot JP, Zaccaria I, Cavanaugh J *et al.* Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1259-1267.
- Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2598-2602.
- Hyams JS, Fitzgerald JE, Treem WR, Wyzga N, Kreutzer DL. Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; 104: 1285-1292.

- Iimura M, Nakamura T, Shinozaki S *et al.* Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut* 2000; 47: 228-235.
- Ina K, Itoh J, Fukushima K *et al.* Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* 1999; 163: 1081-1090.
- Ito H, Hirotsu T, Yamamoto M, Ogawa H, Kishimoto T. Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody inhibits leukocyte recruitment and promotes T-cell apoptosis in a murine model of Crohn's disease. *J Gastroenterol* 2002; 37 Suppl 14: 56-61.
- Itoh J, de La Motte C, Strong SA, Levine AD, Fiocchi C. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* 2001; 49: 35-41.
- Ivanov VN, Bhoomik A, Krasilnikov M *et al.* Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol Cell* 2001; 7: 517-528.
- Jakobsdottir J, Gorin MB, Conley YP, Ferrell RE, Weeks DE. Interpretation of genetic association studies: markers with replicated highly significant odds ratios may be poor classifiers. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000337.
- Jancic I, Arsenovic-Ranin N, Sefik-Bukilica M *et al.* -174G/C interleukin-6 gene promoter polymorphism predicts therapeutic response to etanercept in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2013; 33: 1481-1486.
- Janssens AC, Gwinn M, Valdez R, Narayan KM, Khoury MJ. Predictive genetic testing for type 2 diabetes. *BMJ* 2006; 333: 509-510.
- Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* 2011; 121: 3375-3383.
- Jostins L, Barrett JC. Genetic risk prediction in complex disease. *Hum Mol Genet* 2011; 20: R182-188.
- Jung HC, Eckmann L, Yang SK *et al.* A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995; 95: 55-65.
- Kakazu T, Hara J, Matsumoto T *et al.* Type 1 T-helper cell predominance in granulomas of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2149-2155.
- Kaluza W, Reuss E, Grossmann S *et al.* Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 1180-1183.

- Kang J, Kugathasan S, Georges M *et al.* Improved risk prediction for Crohn's disease with a multi-locus approach. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 2435-2442.
- Karell K, Louka AS, Moodie SJ *et al.* HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol* 2003; 64: 469-477.
- Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 573-621.
- Kaukinen K, Partanen J, Maki M, Collin P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 695-699.
- Keller KM, Bender SW, Kirchmann H *et al.* Diagnostic significance of epithelioid granulomas in Crohn's disease in children. Multicenter Paediatric Crohn's Disease Study Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 10: 27-32.
- Khalili H, Higuchi LM, Ananthakrishnan AN *et al.* Oral contraceptives, reproductive factors and risk of inflammatory bowel disease. *Gut* 2013; 62: 1153-1159.
- Kim EY, Teh HS. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J Immunol* 2001; 167: 6812-6820.
- Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1830-1835.
- Klein W, Tromm A, Griga T *et al.* The polymorphism at position -174 of the IL-6 gene is not associated with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 45-47.
- Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y *et al.* Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307: 731-734.
- Koboziev I, Karlsson F, Grisham MB. Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1207 Suppl 1: E86-93.
- Komatsu M, Kobayashi D, Saito K *et al.* Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clin Chem* 2001; 47: 1297-1301.
- Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 703-718.
- Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls:

- differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000; 1: 185-190.
- Koyama S. Apoptotic depletion of infiltrating mucosal lymphocytes associated with Fas ligand expression by *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosal epithelium: human glandular stomach as a site of immune privilege. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 773-780.
- Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A *et al.* Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 1994; 145: 1323-1336.
- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S *et al.* Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993; 53: 4701-4714.
- Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407: 789-795.
- Krstajic D, Buturovic LJ, Leahy DE, Thomas S. Cross-validation pitfalls when selecting and assessing regression and classification models. *J Cheminform* 2014; 6: 10.
- Kruppa J, Ziegler A, Konig IR. Risk estimation and risk prediction using machine-learning methods. *Hum Genet* 2012; 131: 1639-1654.
- Kusugami K, Fukatsu A, Tanimoto M *et al.* Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 949-959.
- Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F *et al.* Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1489-1495.
- Lavant EH, Agardh DJ, Nilsson A, Carlson JA. A new PCR-SSP method for HLA DR-DQ risk assessment for celiac disease. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 782-784.
- Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 226-236.
- Leeds JS, Hopper AD, Sanders DS. Coeliac disease. *Br Med Bull* 2008; 88: 157-170.
- Leon AJ, Gomez E, Garrote JA *et al.* High levels of proinflammatory cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD. *Mediators Inflamm* 2009; 2009: 580450.
- Lesage S, Zouali H, Cezard JP *et al.* CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 845-857.

- Li XH, Fang X, Gaynor RB. Role of IKK γ /nemo in assembly of the Ikappa B kinase complex. *J Biol Chem* 2001; 276: 4494-4500.
- Liaw A, Wiener M. Classification and Regression by randomForest. *R News* 2002; 2: 18-22.
- Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol* 2011; 30: 219-231.
- Liu E, Lee HS, Aronsson CA *et al.* Risk of pediatric celiac disease according to HLA haplotype and country. *N Engl J Med* 2014a; 371: 42-49.
- Liu JZ, Anderson CA. Genetic studies of Crohn's disease: past, present and future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014b; 28: 373-386.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
- Lorenz E, Frees KL, Schwartz DA. Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR. *Biotechniques* 2001; 31: 22-24.
- Lotem J, Sachs L. Regulation of bcl-2, bcl-XL and bax in the control of apoptosis by hematopoietic cytokines and dexamethasone. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 647-653.
- Louis E, Belaiche J, van Kemseke C *et al.* A high serum concentration of interleukin-6 is predictive of relapse in quiescent Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9: 939-944.
- Louka AS, Lie BA, Talseth B *et al.* Coeliac disease patients carry conserved HLA-DR3-DQ2 haplotypes revealed by association of TNF alleles. *Immunogenetics* 2003a; 55: 339-343.
- Louka AS, Moodie SJ, Karell K *et al.* A collaborative European search for non-DQA1*05-DQB1*02 celiac disease loci on HLA-DR3 haplotypes: analysis of transmission from homozygous parents. *Hum Immunol* 2003b; 64: 350-358.
- Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 1995; 16: 569-574.
- Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT *et al.* TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G367-376.
- Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H *et al.* Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 11): 2085-2090.

- Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M *et al.* HLA-DQ relative risks for coeliac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigens* 2004; 63: 562-567.
- Markowitz J, Kahn E, Daum F. Prognostic significance of epithelioid granulomas found in rectosigmoid biopsies at the initial presentation of pediatric Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989; 9: 182-186.
- McAlindon ME, Hawkey CJ, Mahida YR. Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 214-219.
- McCall RD, Haskill S, Zimmermann EM *et al.* Tissue interleukin 1 and interleukin-1 receptor antagonist expression in enterocolitis in resistant and susceptible rats. *Gastroenterology* 1994; 106: 960-972.
- Megiorni F, Mora B, Bonamico M *et al.* HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Hum Immunol* 2009; 70: 55-59.
- Megiorni F, Pizzuti A. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci* 2012; 19: 88.
- Meng G, Zhang F, Fuss I, Kitani A, Strober W. A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses. *Immunity* 2009; 30: 860-874.
- Merritt AJ, Potten CS, Watson AJ *et al.* Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 6): 2261-2271.
- Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 5299-5305.
- Miggin SM, O'Neill LA. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 220-226.
- Mitsuyama K, Matsumoto S, Masuda J *et al.* Therapeutic strategies for targeting the IL-6/STAT3 cytokine signaling pathway in inflammatory bowel disease. *Anticancer Res* 2007; 27: 3749-3756.
- Mitsuyama K, Matsumoto S, Rose-John S *et al.* STAT3 activation via interleukin 6 trans-signalling contributes to ileitis in SAMP1/Yit mice. *Gut* 2006; 55: 1263-1269.
- Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E *et al.* Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut* 1995; 36: 45-49.

- Mizoguchi E, Mizoguchi A, Takedatsu H *et al.* Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 2002; 122: 134-144.
- Mizushima T, Arakawa S, Sanada Y *et al.* Inhibition of epithelial cell death by Bcl-2 improved chronic colitis in IL-10 KO mice. *Am J Pathol* 2013; 183: 1936-1944.
- Moller P, Walczak H, Reidl S, Strater J, Krammer PH. Paneth cells express high levels of CD95 ligand transcripts: a unique property among gastrointestinal epithelia. *Am J Pathol* 1996; 149: 9-13.
- Molnar T, Tiszlavicz L, Gyulai C, Nagy F, Lonovics J. Clinical significance of granuloma in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3118-3121.
- Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012; 142: 46-54 e42; quiz e30.
- Monteleone I, Monteleone G, Fina D *et al.* A functional role of flip in conferring resistance of Crohn's disease lamina propria lymphocytes to FAS-mediated apoptosis. *Gastroenterology* 2006; 130: 389-397.
- Moossavi S. Gliadin is an uncatalogued Toll-like receptor ligand. *Journal of Medical Hypotheses and Ideas* 2014; 8: 44-47.
- Mor G, Sapi E, Abrahams VM *et al.* Interaction of the estrogen receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes. *J Immunol* 2003; 170: 114-122.
- Moriconi F, Raddatz D, Ho NA *et al.* Quantitative gene expression of cytokines in peripheral blood leukocytes stimulated in vitro: modulation by the anti-tumor necrosis factor-alpha antibody infliximab and comparison with the mucosal cytokine expression in patients with ulcerative colitis. *Transl Res* 2007; 150: 223-232.
- Mossbock G, Renner W, El-Shabrawi Y *et al.* TNF-alpha -308 G>A and -238 G>A polymorphisms are not major risk factors in Caucasian patients with exfoliation glaucoma. *Mol Vis* 2009; 15: 518-522.
- Mubarak A, Spierings E, Wolters V *et al.* Human leukocyte antigen DQ2.2 and celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 56: 428-430.
- Mudter J, Neurath MF. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *Gut* 2007; 56: 293-303.
- Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1993; 34: 1705-1709.

- Musso A, Dentelli P, Carlino A *et al.* Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway: an essential mediator of inflammatory bowel disease and other forms of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 91-98.
- Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A *et al.* The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med* 2010; 42: 587-595.
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995a; 267: 1449-1456.
- Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 1995b; 16: 39-43.
- Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med* 2008; 14: 109-119.
- Nenci A, Becker C, Wullaert A *et al.* Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 2007; 446: 557-561.
- Neuman MG. Signaling for inflammation and repair in inflammatory bowel disease. *Rom J Gastroenterol* 2004; 13: 309-316.
- Neurath MF, Fuss I, Schurmann G *et al.* Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 859: 149-159.
- O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996; 184: 1075-1082.
- O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev* 2008; 226: 10-18.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001a; 411: 603-606.
- Ogura Y, Inohara N, Benito A *et al.* Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001b; 276: 4812-4818.
- Olson TS, Reuter BK, Scott KG *et al.* The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Exp Med* 2006; 203: 541-552.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.

- Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2004; 126: 1054-1070.
- Papa S, Zazzeroni F, Bubici C *et al.* Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 146-153.
- Park SM, Chen L, Zhang M *et al.* CD95 is cytoprotective for intestinal epithelial cells in colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1063-1070.
- Pascual M, Nieto A, Mataran L *et al.* IL-6 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2000; 1: 338-340.
- Pereira SG, Oakley F. Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1425-1430.
- Perez RL, Rivera-Marrero CA, Roman J. Pulmonary granulomatous inflammation: From sarcoidosis to tuberculosis. *Semin Respir Infect* 2003; 18: 23-32.
- Perrier C, de Hertogh G, Cremer J *et al.* Neutralization of membrane TNF, but not soluble TNF, is crucial for the treatment of experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 246-253.
- Peters M, Muller AM, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 1998; 92: 3495-3504.
- Piccini B, Vascotto M, Serracca L *et al.* HLA-DQ typing in the diagnostic algorithm of celiac disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2012; 104: 248-254.
- Price S, Shaw PA, Seitz A *et al.* Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood* 2014; 123: 1989-1999.
- Protic MB, Pavlovic ST, Bojic DZ *et al.* CARD15 gene polymorphisms in Serbian patients with Crohn's disease: genotype-phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 978-984.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118: 229-241.
- Rallabhandi P, Bell J, Boukhvalova MS *et al.* Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol* 2006; 177: 322-332.
- Ramzan NN, Leighton JA, Heigh RI, Shapiro MS. Clinical significance of granuloma in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 168-173.

- Reddy S, Jia S, Geoffrey R *et al.* An autoinflammatory disease due to homozygous deletion of the IL1RN locus. *N Engl J Med* 2009; 360: 2438-2444.
- Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S *et al.* Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* 1996; 39: 684-689.
- Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T *et al.* Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993; 94: 174-181.
- Renehan AG, Bach SP, Potten CS. The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine. *Can J Gastroenterol* 2001; 15: 166-176.
- Richard-Miceli C, Criswell LA. Emerging patterns of genetic overlap across autoimmune disorders. *Genome Med* 2012; 4: 6.
- Rider P, Carmi Y, Voronov E, Apte RN. Interleukin-1alpha. *Semin Immunol* 2013; 25: 430-438.
- Rigoli L, Romano C, Caruso RA *et al.* Clinical significance of NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 gene single nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4454-4461.
- Roach DR, Bean AG, Demangel C *et al.* TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 2002; 168: 4620-4627.
- Rogler G, Brand K, Vogl D *et al.* Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998; 115: 357-369.
- Rose-John S, Neurath MF. IL-6 trans-signaling: the heat is on. *Immunity* 2004; 20: 2-4.
- Ruffolo C, Scarpa M, Faggian D *et al.* Cytokine network in rectal mucosa in perianal Crohn's disease: relations with inflammatory parameters and need for surgery. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1406-1412.
- Sainz J, Perez E, Gomez-Lopera S, Jurado M. IL1 gene cluster polymorphisms and its haplotypes may predict the risk to develop invasive pulmonary aspergillosis and modulate C-reactive protein level. *J Clin Immunol* 2008; 28: 473-485.
- Saleiro D, Murillo G, Benya RV *et al.* Estrogen receptor-beta protects against colitis-associated neoplasia in mice. *Int J Cancer* 2012; 131: 2553-2561.
- Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand J Immunol* 1998; 47: 195-198.

- Sarra M, Pallone F, Macdonald TT, Monteleone G. IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1808-1813.
- Satsangi J, Parkes M, Louis E *et al.* Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996a; 14: 199-202.
- Satsangi J, Welsh KI, Bunce M *et al.* Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996b; 347: 1212-1217.
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 878-888.
- Scheller J, Rose-John S. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol* 2006; 195: 173-183.
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 6419.
- Schwartz DA. The genetics of innate immunity. *Chest* 2002; 121: 62S-68S.
- Scott S, Pandolfi F, Kurnick JT. Fibroblasts mediate T cell survival: a proposed mechanism for retention of primed T cells. *J Exp Med* 1990; 172: 1873-1876.
- Seidelin JB, Nielsen OH. Attenuated apoptosis response to Fas-ligand in active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1623-1629.
- Sempowski GD, Rozenblit J, Smith TJ, Phipps RP. Human orbital fibroblasts are activated through CD40 to induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol* 1998; 274: C707-714.
- Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a008714.
- Shen X, Shi R, Zhang H *et al.* The Toll-like receptor 4 D299G and T399I polymorphisms are associated with Crohn's disease and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Digestion* 2010; 81: 69-77.
- Shi B, Triebe D, Kajiji S *et al.* Identification and characterization of baxepsilon, a novel bax variant missing the BH2 and the transmembrane domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 779-785.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 405-455.

- Singal AG, Mukherjee A, Elmunzer BJ *et al.* Machine learning algorithms outperform conventional regression models in predicting development of hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 1723-1730.
- Spehlmann ME, Eckmann L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 92-99.
- Stallmach A, Schuppan D, Riese HH, Matthes H, Riecken EO. Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992; 102: 1920-1929.
- Steinbrecher KA, Harmel-Laws E, Sitcheran R, Baldwin AS. Loss of epithelial RelA results in deregulated intestinal proliferative/apoptotic homeostasis and susceptibility to inflammation. *J Immunol* 2008; 180: 2588-2599.
- Stevens C, Walz G, Singaram C *et al.* Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 818-826.
- Strater J, Wellisch I, Riedl S *et al.* CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997; 113: 160-167.
- Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 514-521.
- Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 9-20.
- Stronati L, Negroni A, Merola P *et al.* Mucosal NOD2 expression and NF-kappaB activation in pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 295-302.
- Sturm A, Leite AZ, Danese S *et al.* Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53: 1624-1631.
- Su L, Nalle SC, Shen L *et al.* TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology* 2013; 145: 407-415.
- Suda T, Nagata S. Why do defects in the Fas-Fas ligand system cause autoimmunity? *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: S97-101.
- Suzuki Y, Saito H, Kasanuki J *et al.* Significant increase of interleukin 6 production in blood mononuclear leukocytes obtained from patients with active inflammatory bowel disease. *Life Sci* 1990; 47: 2193-2197.

- Tan G, Zeng B, Zhi FC. Regulation of human enteric alpha-defensins by NOD2 in the Paneth cell lineage. *Eur J Cell Biol* 2015; 94: 60-66.
- Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A *et al.* Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993; 91: 403-404.
- ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002; 50: 206-211.
- Terato K, Do CT, Shionoya H. Slipping through the Cracks: Linking Low Immune Function and Intestinal Bacterial Imbalance to the Etiology of Rheumatoid Arthritis. *Autoimmune Dis* 2015; 2015: 636207.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- Tountas NA, Casini-Raggi V, Yang H *et al.* Functional and ethnic association of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999; 117: 806-813.
- Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2013; 14: 301-323.
- Tsai WH, Huang DY, Yu YH, Chen CY, Lin WW. Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages. *Cell Microbiol* 2011; 13: 717-730.
- Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 5214-5218.
- Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* 2006; 169: 1901-1909.
- Ungaro R, Fukata M, Hsu D *et al.* A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1167-1179.
- Vader W, Stepniak D, Kooy Y *et al.* The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12390-12395.
- Vamvakopoulos J, Green C, Metcalfe S. Genetic control of IL-1beta bioactivity through differential regulation of the IL-1 receptor antagonist. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2988-2996.

- Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P. Medical therapy for Crohn's disease strictures. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 55-60.
- van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 2001; 86 Suppl 1: S121-127.
- van den Brande J, Hommes DW, Peppelenbosch MP. Infliximab induced T lymphocyte apoptosis in Crohn's disease. *J Rheumatol Suppl* 2005; 74: 26-30.
- van Heel DA, Ghosh S, Butler M *et al.* Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet* 2005; 365: 1794-1796.
- Van Kemseke C, Belaiche J, Louis E. Frequently relapsing Crohn's disease is characterized by persistent elevation in interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor serum levels during remission. *Int J Colorectal Dis* 2000; 15: 206-210.
- Varfolomeev EE, Ashkenazi A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* 2004; 116: 491-497.
- Venables WN, Ripley BD, 2002 Modern Applied Statistics with S, pp. 498. Springer, New York.
- Vereecke L, Sze M, Mc Guire C *et al.* Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis. *J Exp Med* 2010; 207: 1513-1523.
- Viennois E, Chen F, Merlin D. NF-kappaB pathway in colitis-associated cancers. *Transl Gastrointest Cancer* 2013; 2: 21-29.
- Vijgen L, Van Gysel M, Rector A *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist VNTR-polymorphism in inflammatory bowel disease. *Genes Immun* 2002; 3: 400-406.
- Vogel JD, West GA, Danese S *et al.* CD40-mediated immune-nonimmune cell interactions induce mucosal fibroblast chemokines leading to T-cell transmigration. *Gastroenterology* 2004; 126: 63-80.
- Waetzig GH, Rose-John S. Hitting a complex target: an update on interleukin-6 signalling. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16: 225-236.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10: 45-65.
- Waljee AK, Joyce JC, Wang S *et al.* Algorithms outperform metabolite tests in predicting response of patients with inflammatory bowel disease to thiopurines. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 143-150.

- Wall L, deBoer E, Grosveld F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev* 1988; 2: 1089-1100.
- Walters TD, Silverberg MS. Genetics of inflammatory bowel disease: current status and future directions. *Can J Gastroenterol* 2006; 20: 633-639.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281: 1680-1683.
- Wang MH, Fiocchi C, Ripke S *et al.* A novel approach to detect cumulative genetic effects and genetic interactions in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 1799-1808.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; 356: 314-317.
- Watanabe T, Asano N, Murray PJ *et al.* Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest* 2008; 118: 545-559.
- Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 800-808.
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M *et al.* NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004; 53: 1658-1664.
- Wehkamp J, Salzman NH, Porter E *et al.* Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18129-18134.
- Weinberg JB, Hobbs MM, Misukonis MA. Recombinant human gamma-interferon induces human monocyte polykaryon formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 4554-4557.
- Wells JM, Rossi O, Meijerink M, van Baarlen P. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 Suppl 1: 4607-4614.
- Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 353.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3195-3199.

- Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 204-209.
- Wolfson DM, Sachar DB, Cohen A *et al*. Granulomas do not affect postoperative recurrence rates in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1982; 83: 405-409.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL *et al*. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139: 1281-1292.
- Wolters VM, Wijmenga C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 190-195.
- Woo P, Humphries SE. IL-6 polymorphisms: a useful genetic tool for inflammation research? *J Clin Invest* 2013; 123: 1413-1414.
- Wu F, Chakravarti S. Differential expression of inflammatory and fibrogenic genes and their regulation by NF-kappaB inhibition in a mouse model of chronic colitis. *J Immunol* 2007; 179: 6988-7000.
- Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. NF-kappaB in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res* 2011; 21: 146-158.
- Xie C, Liu XF, Yang MS. A meta-analysis on the association between three promoter variants of TNF-alpha and Crohn's disease. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 1575-1583.
- Xu Y, He B, Li R *et al*. Association of the polymorphisms in the Fas/FasL promoter regions with cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis of 52 studies. *PLoS One* 2014; 9: e90090.
- Yamamoto T, Umegae S, Kitagawa T, Matsumoto K. Mucosal cytokine production during remission after resection for Crohn's disease and its relationship to future relapse. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 671-678.
- Yang H, Plevy SE, Taylor K *et al*. Linkage of Crohn's disease to the major histocompatibility complex region is detected by multiple non-parametric analyses. *Gut* 1999; 44: 519-526.
- Yimin, Kohanawa M, Minagawa T. Up-regulation of granulomatous inflammation in interleukin-6 knockout mice infected with *Rhodococcus aurantiacus*. *Immunology* 2003; 110: 501-506.
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 1997; 91: 243-252.

- Zaph C, Troy AE, Taylor BC *et al.* Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* 2007; 446: 552-556.
- Zeissig S, Bojarski C, Buergel N *et al.* Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut* 2004; 53: 1295-1302.
- Zhang Y, Cao HJ, Graf B *et al.* CD40 engagement up-regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts. *J Immunol* 1998; 160: 1053-1057.
- Zhou L, Ivanov, II, Spolski R *et al.* IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8: 967-974.
- Zhou M, Demo SD, McClure TN, Crea R, Bitler CM. A novel splice variant of the cell death-promoting protein BAX. *J Biol Chem* 1998; 273: 11930-11936.
- Ziff M. The rheumatoid nodule. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 761-767.
- Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: S99-103.
- Zorzi F, Monteleone I, Sarra M *et al.* Distinct profiles of effector cytokines mark the different phases of Crohn's disease. *PLoS One* 2013; 8: e54562.
- Žunec R, Grubić Z, Jurčić Z *et al.* Hla-DQ2 heterodimer in the diagnosis of celiac disease. *Biochemia Medica* 2004; 14: 3-4.

Elektronske baze podataka:

- Allele Frequency Net Database (<http://www.allelefrequencies.net/>)
- National Marrow Donor Program Bioinformatics (<http://bioinformatics.nmdp.org/>)
- HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org/>)

BIOGRAFIJA

Biljana Stanković je rođena 22.09.1983. godine u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 2002/2003. godine, a diplomirala je u septembru 2009. godine sa prosečnom ocenom 9.2 i diplomskim radom pod nazivom „Uloga FasR/FasL sistema u patogenezi mijeloproliferativnih neoplazija“. Doktorske studije je upisala školske 2009/2010. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota. Od aprila 2010. je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu hematologiju (od 2013. godine Laboratorija za molekularnu biomedicinu), Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Učestvovala je na nacionalnom projektu „Strukturni elementi genoma u modulaciji fenotipa“ (Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, ev. br. 143051, 2006-2010.g.), a trenutno učestvuje na nacionalnom projektu „Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti“ (Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ev. br. III41004, 2011-2015. g.). Učesnik je i bilateralnog projekta između Republike Srbije i Republike Slovenije, pod nazivom „Farmakogenomički markeri u imunosupresivnoj i imunomodulatorskoj terapiji: od validiranih markera do kitova za genotipizaciju i kliničkih algoritama“ (451-03-3095/2014-09/45, 2014-2015. g.).

Biljana Stanković je do sada objavila 7 radova u časopisima međunarodnog značaja i imala 23 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i 1 saopštenje na skupu nacionalnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Биљана Станковић

број уписа M3013/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларни маркери хроничне инфламације и апоптозе код инфламаторних болести црева

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 11.05.2015.

Станковић Биљана

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Биљана Станковић

Број уписа М3013/2009

Студијски програм Молекуларна биологија, модул молекуларна биологија
еукариота

Наслов рада Молекуларни маркери хроничне инфламације и апоптозе
код инфламаторних болести црева

Ментор др Гордана Никчевић, др Соња Павловић

Потписани Биљана Станковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 11.05.2015.

Stankovic Biljana

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Молекуларни маркери хроничне инфламације и апоптозе код инфламаторних болести црева

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 11.05.2015.

Stankovic' Bica