ULOGA INTERLEUKINA 6, GENSKIH POLIMORFIZAMA INTERLEUKINA 6, TRANSKRIPCIJSKOG ČIMBENIKA STAT3 I RECEPTORA ZA INTERLEUKIN 23 U CROHNOVOJ BOLESTI I ULCEROZNOM KOLITISU UZ DJELOVANJE C-REAKTIVNOG PROTEINA

Takač, Boris

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:844803

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Boris Takač

ULOGA INTERLEUKINA 6, GENSKIH POLIMORFIZAMA INTERLEUKINA 6, TRANSKRIPCIJSKOG ČIMBENIKA STAT3 I RECEPTORA ZA INTERLEUKIN 23 U CROHNOVOJ BOLESTI I ULCEROZNOM KOLITISU UZ DJELOVANJE C-REAKTIVNOG PROTEINA

Doktorska disertacija

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Boris Takač

ULOGA INTERLEUKINA 6, GENSKIH POLIMORFIZAMA INTERLEUKINA 6, TRANSKRIPCIJSKOG ČIMBENIKA STAT3 I RECEPTORA ZA INTERLEUKIN 23 U CROHNOVOJ BOLESTI I ULCEROZNOM KOLITISU UZ DJELOVANJE C-REAKTIVNOG PROTEINA

Doktorska disertacija

Osijek, 2019.

Mentor rada: prof. dr. sc. Silvio Mihaljević, dr. med.

Komentor rada: izv. prof. dr. sc. Mario Štefanić, dr. med.

Rad ima 103 lista.

Predgovor

Disertacija je izrađena u Zavodu za transfuzijsku medicinu, Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja te Klinici za unutarnje bolesti Kliničkoga bolničkoga centra Osijek.

Veliku zahvalnost dugujem mentorima prof. dr. sc. Silviju Mihaljeviću, dr. med. i izv. prof. dr. sc. Mariju Štefaniću, dr. med na vodstvu, usmjeravanju i svesrdnoj pomoći u provođenju istraživanja i izradi disertacije.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac i dr. sc. Mirjani Suver-Stević na velikoj pomoći i suradnji tijekom analize genskih polimorfizama.

Zahvaljujem prijateljima i kolegama na savjetima tijekom izrade disertacije.

Veliko hvala mojoj supruzi Višnji i ocu Stjepanu na izuzetnoj pomoći, podršci i strpljenju.

SADRŽAJ

Popis kratica iii
Popis tablica v
Popis slika vii
1. UVOD 1
1.1. Crohnova bolest i ulcerozni kolitis: klinička i histopatološka prezentacija 1
1.2. Epidemiologija UBC-a 3
1.2.1. Genetička epidemiologija UBC-a 4
1.2.2. UBC u evolucijski divergentnim populacijama 5
1.3. Uloga polimorfizma jednoga nukleotida u UBC-u 6
1.4. Patogeneza UBC-a 7
1.4.1. Uloga IL- 6 i transkripcijskoga čimbenika STAT3 u UBC 8
1.4.2. Povezanost C-reaktivnoga proteina i IL-6 u UBC-u 10
1.4.3. Polimorfizmi gena za IL-6, STAT 3 i IL-23R 10
2. HIPOTEZA 13
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 14
4. MATERIJAL I METODE 15
4.1. Ustroj studije 15
4.2. Ispitanici 15
4.3. Metode 16
4.4. Biokemijska i hematološka mjerenja 16
4.4.1. Određivanje serumske koncentacije IL-6 16
4.4.1.1. Uzorci ispitanika 16
4.4.1.2. Metoda određivanja koncentarcije IL-6 17
4.4.2. Određivanje serumske koncentracije CRP-a 18
4.4.2.1. Uzorci ispitanika 18
4.4.1.2. Metoda određivanja koncentarcije CRP-a 18
4.4.3. Određivanje biokemijskih parametara 19
4.4.4. Određivanje hematoloških parametara 19
4.5. Analiza polimorfizma gena IL-6, STAT3 i IL-23R 19
4.5.1. Izolacija DNA iz pune krvi 20
4.5.2. Genotipizacija polimorfizma u genu za IL-6 20
4.5.3. Genotipizacija polimorfizma u genu za STAT3 23
4.5.4. Analiza polimorfizama u genu za IL-23R 26

4.5.4.1. Polimorfizam rs11209026 (1_67705958_G_A) 26
4.5.4.2. Polimorfizam rs7530511 (1_67685387_T_C) 29
4.6. Statistička analiza 32
5. REZULTATI 34
5.1. Opća obilježja ispitanika 34
5.2. Deskriptivna analiza biokemijskih parametara 35
5.3. Interleukin 6 36
5.4. C-reaktivni protein 40
5.5. Genski polimorfizmi i sklonost obolijevanju 42
5.5.1. Hardy-Weinbergov ekvilibrij 42
5.5.2. IL-6 rs1800795 43
5.5.3. IL-23R rs11209026 i rs7530511 44
5.5.4. STAT3 rs744166 48
5.6. Epistatske interakcije polimorfizama i izgledi obolijevanja 49
5.7. Povezanost rs1800795 sa serumskom koncentracijom IL-6 49
5.8. Povezanost rs1800795 sa serumskom koncentracijom CRP-a 53
6. RASPRAVA 55
6.1. IL-6 55
6.2. C-reaktivni protein 59
6.3. Utjecaj polimorfizama gena u UBC-u 61
6.4. Polimorfizam IL-6 gena 62
6.5. IL-23R i STAT3 transkripcijski čimbenik 64
6.6. Utjecaj polimorfizma IL-23R i STAT3 transkripcijskoga čimbenika 64
6.7. Ograničenja studije 67
7. ZAKLJUČCI 68
8. SAŽETAK 69
9. SUMMARY 71
10. LITERATURA 73
11. ŽIVOTOPIS 100

Popis kratica

AHR	receptor za aril ugljikohidrat (prema engl. *aryl hydrocarbon receptor*)
ALB	albumini u serumu
ALT	alanin aminotransferaza
AP-1	aktivacijski protein 1
AST	aspartat aminotransferaza
CB	Crohnova bolest
CDAI	indeks aktivnosti Crohnove bolesti (prema engl. *Crohn's Disease Activity Indeks*)
cps	impuls po sekundi (prema engl. *counts per second*)
CRE/S	kreatinin u serumu
CRP	C-reaktivni protein
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *deoxyribonucleic acid*)
E	eritrociti
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (prema engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
EGFR	receptor za epidermalni faktor rasta (prema engl. *epidermal growth factor receptor*)
EM	(prema engl. *expectation maximisation*)
eQTL	(prema engl. *expression quantitative trait loci*)
FcγR	receptor Fcγ
FoxP3	transkripcijski čimbenik FoxP3 (prema engl. *forkhead box P3*)
FRET	prijenos energije uslijed fluorescentne rezonancije (prema engl. *Fluorescent Resonance Energy Transfer*)
gp130	glikoprotein 130
GWAS	cjelogenomska asocijacijska studija (prema engl. *genome wide association sudies*)
Hgb	hemoglobin
HIF1α	čimbenik induciran hipoksijom 1α (prema engl. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*)
HLA	humani leukocitni antigen
Htc	hematokrit
IFN-γ	interferon γ
IL-10	interleukin 10
IL-17A	interleukin 17A
IL-1R	receptor za interleukin 1
IL-1β	interleukin 1β

IL-23	interleukin 23
IL-23R	receptor za interleukin 23
IL-6	interleukin 6
IL-6R	receptor za interleukin 6
JAK2	Janusova kinaza 2
L	leukociti
MAPK	mitogenom-aktivirane proteinske kinaze
MDR1	protein otpornosti na višestruke lijekove 1 (prema engl. *multidrug resistance 1*)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (prema engl. *messenger ribonucleic acid*)
MTWSI	modificirani indeks prema Trueloveu i Wittsu (od engl. *Modified Truelove Witts Severity Index*)
mue	srednja nepristrana procjena (prema engl. *median unbiased estimate*)
NfκBiz	transkripcijski čimbenik kappa Biz (prema engl. *nuclear factor kappa Biz*)
NK	prirodnoubilačke, NK stanice (prema engl. *natural killer cells*)
NOD2	(prema engl. *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*)
PCR	lančana reakcija polimeraze (prema engl. *polimerase chain reaction*)
RORγt	transkripcijski čimbenik RORγt (prema engl. *retinoid-related orphan receptor γt*)
SCID	teška kombinirana imunodeficijencija (prema engl. *severe combined immunodeficiency*)
SE	brzine sedimentacije eritrocita
SH2	(prema engl. *src homology 2*)
SNP	polimorfizam jednoga nukleotida (prema engl. *single nucleotide polymorphism*)
STAT3	transkripcijski čimbenik aktivator transkripcije 3 (STAT3, prema engl. *signal transducer and activator of transcription 3*)
TGFβ	transformirajući faktor rasta β (prema engl. *transforming growth factor β*)
TLR	(prema engl. *toll-like receptor*)
TNFα	čimbenik nekroze tumora α (prema engl. *tumor necrosis factor α*)
Treg	T regulacijske stanice
TYK2	tirozinska kinaza 2 (prema engl. *non-receptor tyrosine-protein kinase 2*)
UBC	upalne bolesti crijeva
UC	ulcerozni kolitis (prema engl. *ulcerative colitis*)

Popis tablica

Tablica 4.1. Uvjeti PCR reakcije za analizu polimorfizma rs11209026 IL-23R gena. 22

Tablica 4.2. Uvjeti PCR reakcije za analizu polimorfizma rs744166 u genu za STAT3. 24

Tablica 4.3. Uvjeti PCR reakcije za analizu polimorfizma rs11209026 u IL-23R genu. 27

Tablica 4.4. Uvjeti PCR reakcije za analizu polimorfizma rs7530511 u genu za IL-23R. 30

Tablica 5.1. Demografska obilježja populacije oboljelih od Crohnove bolesti (CB) i oboljelih od ulceroznoga kolitisa (UC). 34

Tablica 5.2. Biokemijski parametri populacije oboljelih od Crohnove bolesti (n = 50) 35

Tablica 5.3. Biokemijski parametri populacije oboljelih od ulceroznoga kolitisa (n = 93).....36

Tablica 5.4. Koncentracija interleukina 6 (IL-6) u oboljelih od Crohnove bolesti (CB) i oboljelih od ulceroznoga kolitisa (UC) i zdrave populacije (KS)... 37

Tablica 5.5. Mann-Whitneyev test koncentracija interleukina 6 (IL-6) u oboljelih od Crohnove bolesti s prethodnom intestinalnom resekcijom i oboljelih od Crohnove bolesti bez intestinalne resekcije. 37

Tablica 5.6. Mann-Whitneyev test koncentracija interleukina 6 (IL-6) u ispitanika s neaktivnom Crohnovom bolesti (CB) i kontrolne skupine (zdravi)... 38

Tablica 5.7. Mann-Whitneyev test koncentracija interleukina 6 (IL-6) u muških i ženskih ispitanika. 38

Tablica 5.8. Spearmanov koeficijent korelacije ranga (ρ) za interleukin 6 (IL-6).. 39

Tablica 5.9. Spearmanov koeficijent korelacije ranga (ρ) za C-reaktivni protein (CRP). 40

Tablica 5.10. Mann-Whitneyev test koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) u muških i ženskih ispitanika. 40

Tablica 5.11. Mann-Whitneyev test koncentracija C-reaktivnoga proteina (CRP) u oboljelih od Crohnove bolesti i oboljelih od ulceroznoga kolitisa. 41

Tablica 5.12. Mann-Whitneyev test koncentracije C-reaktivnoga proteina (CRP) u oboljelih od Crohnove bolesti s prethodnom intestinalnom resekcijom i bez intestinalne resekcije. 41

Tablica 5.13. Mann-Whitneyev test indeksa aktivnosti Crohnove bolesti (CDAI) u oboljelih od Crohnove bolesti s prethodnom intestinalnom resekcijom i bez intestinalne resekcije). 42

Tablica 5.14. Usporedba alelnih frekvencija IL-6 rs1800795 inačice (SNP) između ispitanika oboljelih od upalnih bolesti crijeva (UBC) i kontrolne skupine. 42

Tablica 5.15. Usporedbe alela genskih polimorfizama (SNP) IL-23R između UBC ispitanika i kontrolne skupine. 43

Tablica 5.16. Razdioba alela genskih STAT3 polimorfizama (SNP) između UBC ispitanika i kontrolne skupine 43

Tablica 5.17. Usporedba učestalosti genotipova i alela interleukin 6 (IL-6) rs1800795 između ispitanika oboljelih od upalnih bolesti crijeva (UBC) i kontrolne skupine. 44

Tablica 5.18. Usporedbe alela polimorfizma jednoga nukleotida (SNP) receptora za interleukin 23 (IL-23R) između oboljelih od upalnih bolesti crijeva (UBC) i kontrolne skupine prema fenotipu bolesti. 45

Tablica 5.19. Usporedba polimorfizma jednoga nukleotida (SNP) receptora za interleukin 23 (IL-23R) prema genotipu i fenotipu bolesti. 46

Tablica 5.20. Genotipske asocijacije, IL-23R gen, inačice rs11209026 i rs7530511. 47

Tablica 5.21. Analiza IL-23R rs11209026-rs7530511 haplotipa. 47

Tablica 5.22. Usporedba učestalosti genotipova i alela između oboljelih od upalnih bolesti crijeva UBC i kontrolne skupine (STAT3 gen, inačica rs744166).....48

Tablica 5.23. Epistatske interakcije između parova lokusa, W-test. 49

Tablica 5.24. Usporedba koncentracije interleukina 6 (IL-6) između rs1800795 genotipova (GG, GC i CC) s obzirom na fenotip bolesti (podatci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom, Kruskal-Wallisov test). 50

Tablica 5.25. Usporedba koncentracije interleukina 6 (IL-6) između nositelja rs1800795 GG+GC genotipa i CC genotipa (podatci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom, Mann-Whitneyev U test).....52

Tablica 5.26. Usporedba koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) između rs1800795 genotipova (GG, GC i CC) s obzirom na fenotip bolesti (podatci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom, Kruskal-Wallisov test) 53

Tablica 5.27. Usporedba koncentracije C-reaktivnoga proteina (CRP) između rs1800795 GG+GC genotipa i CC genotipa (podatci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom, Mann-Whitneyev U test).....54

Popis slika

Slika 1.1. Interakcija čimbenika u razvoju UBC-a (autorsko djelo) 2

Slika 4.1. Genotipizacija temeljena na analizi temperature taljenja PCR produkta za SNP rs1800795.....21

Slika 4.2. Genotipizacija temeljena na analizi temperature taljenja PCR produkta za SNP rs744166.....24

Slika 4.3. Genotipizacija temeljena na analizi temperature taljenja PCR produkta za SNP rs11209026 u genu za IL-23R 27

Slika 4.4. Genotipizacija temeljena na analizi temperature taljenja PCR produkta za SNP rs7530511.....30

Slika 5.1. Polimorfizmi IL-6 regije gena (autorsko djelo) 49

Slika 5.2 Serumska masena koncentracija interleukina 6 (IL-6) u oboljelih od ulceroznoga kolitisa prema rs1800795 genotipu. 51

Slika 5.3. Koncentracija interleukina 6 (IL-6) u oboljelih od ulceroznoga kolitisa prema rs1800795 genotipu IL-6 (GG+GC i CC, model recesivnog učinka C alela).....52

Slika 5.4. Koncentracija C-reaktivnoga proteina (CRP) u oboljelih od ulceroznoga kolitisa prema rs1800795 genotipu interleukina 6 (IL-6) (GG+GC i CC). 54

1. UVOD

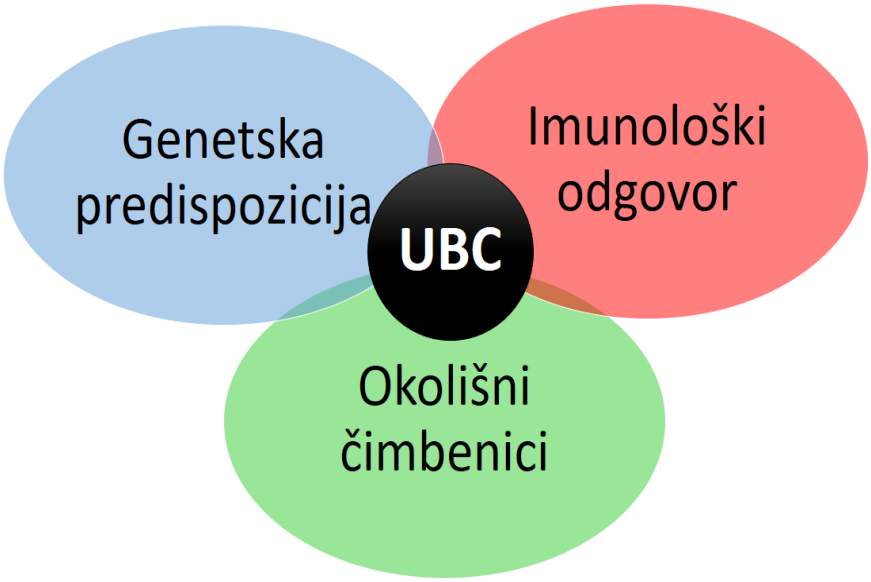
Funkcija gastrointestnalnoga sustava kompleksne je prirode s obzirom na to da je s jedne strane izložen alimentarnim antigenima, a s druge strane visokom stupnju bioraznolikosti komenzalne mikroflore, kao i potencijalno patogenim mikroorganizmima i njihovim produktima (1, 2). Crijevna kolonizacija povećava se od proksimalnih prema distalnim krajevima gdje dostiže $10^{11} – 10^{12}$ mikroorganizama po gramu luminalnoga sadržaja kolona (3). Aktivnost crijevnoga imunološkoga sustava odražava se kao tolerancija prema alimentarnim i komenzalnim antigenima, ali i kao učinkovita reakcija na patogene. Ovaj je proces reguliran mehanizmima ravnoteže između epitelne barijere i imunološkoga sustava. Poremećaj u takvoj ravnoteži može dovesti do agresivnoga imunološkoga odgovora i razvoja kronične upalne bolesti crijeva (UBC) (4, 5).

1.1. Crohnova bolest i ulcerozni kolitis: klinička i histopatološka prezentacija

Upalne su bolesti crijeva klinički i histopatološki kategorizirane u dvije osnovne podskupine: Crohnovu bolest (CB) i ulcerozni kolitis (UC) a predstavljaju idiopatske, upalne, kronične bolesti gastrointestinalnoga sustava nepredvidiva tijeka koje su imunološki posredovane (6-8). Obje bolesti obilježava kronična relapsirajuća upala crijeva koja reagira na protuupalne lijekove kao što su glukokortikoidi i imunosupresivi (9). Uz dva glavna entiteta, oko 10 % bolesnika s UBC-om ima indeterminirani kolitis koji se s obzirom na dijagnostičke kriterije ne može svrstati niti u jedan od dvaju dominantnih fenotipa UBC-a (10, 11).

UC je karakteriziran konstantnom upalom debeloga crijeva koja zahvaća crijevnu mukozu i submukozu, a upalne se promjene nalaze u kontinuitetu od rektuma prema proksimalnijim dijelovima crijeva s jasno definiranom granicom prema zdravoj sluznici (12, 13). Kod CB-a prisutna je transmuralnost upale koja se manifestira najčešće u distalnome ileumu i kolonu, ali može zahvatiti bilo koji dio probavne cijevi (14). Upalne su promjene uglavnom diskontinuirane i segmentalne, a lezije su promjera oko 5 mm s izraženim okolnim eritemom (15). Prosječna je godišnja pojavnost u svijetu oko 5,9 za CB i oko 11,2 za UC na 100 000 stanovnika, dok je u Hrvatskoj za UC 4,3 a za CB 7,0 na 100 000 stanovnika (16).

Iako etiologija još nije sasvim poznata, UBC vjerojatno predstavlja multifaktorski poremećaj čija klinička manifestacija ovisi o interakciji genetskih čimbenika, imunološkoga odgovora i okolišnih čimbenika (Slika 1.1.) (17-19).



Slika 1.1. Interakcija čimbenika u razvoju UBC-a (autorsko djelo)

Nekoliko deregulirajućih procesa, kao što su poremećaji u mukoznoj prirođenoj imunosti i propusnosti epitelne barijere te gubitak detoksikacije i/ili biotransformacije lijekova, prisutni su u oba UBC fenotipa (20). De Hertogh, Kucharzik, Campieri i drugi autori opisuju UBC kao rezultat pogreške u regulaciji nespecifične upale inducirane okolišnim čimbenicima kao što su ograničene, akutne infekcije ili izloženost nesteroidnim protuupalnim lijekovima koji izazivaju oštećenje mukoznoga sloja (21-23). Kim i Stidham izvještavaju kako je kompleksna priroda poremećaja doprinijela tomu da UBC postanu model za proučavanje gotovo svih imunološki posredovanih upalnih bolesti, naročito stoga što pacijenti s UBC-om imaju povećan rizik stvaranja prekancerogenih displastičnih lezija i karcinoma kolona povezanih s mjestima aktivne upale (24, 25) te razvoja psorijaze, ankiloznoga spondilitisa, primarnoga sklerozirajućega kolagenitisa, astme, multiple skleroze i autoimunih bolesti štitnjače (26-29).

U većini je studija UBC-a fokus na središnjoj ulozi stečenoga imunološkoga odgovora i gubitku imunološke tolerancije pa se paradigma signaliziranja u UBC-u vezala uz pomoćnički Th1 stanični odgovor kao dominantni kod CB-a i nekonvencionalni Th2 odgovor

kod UC-a (30, 31). Novija su istraživanja usmjerena na Th17 i prirođeni T-stanični odgovor zastupljen u oba dominantna fenotipa UBC-a, kao i na mukozni urođeni imunološki odgovor kao središnje događaje u patogenezi UBC-a (32). Također, u fokusu su istraživanja i mehanizmi koji narušavaju integritet epitelne barijere nakon indukcije okolišnim čimbenicima (33).

Kod zdravih osoba dolazi do brze restitucije i regeneracije crijevnoga epitelnoga monosloja, uklanjanja luminalnih stimulansa i regresije upale uslijed regulacije urođenoga imunološkoga i T staničnoga odgovora (34). Suprotno tome, kod genetski osjetljivih osoba ne dolazi do uklanjanja mikrobnih stimulansa i/ili usmjeravanja imunološkoga odgovora prema toleranciji na komenzalnu mikrofloru, što rezultira gubitkom cjelovitosti epitelne membrane, daljnjom translokacijom luminalnih antigena među imunokompetentne stanice lamine proprie i aktivacijom agresivnoga T staničnoga odgovora (35, 36).

1.2. Epidemiologija UBC-a

I UC i CB pokazuju bimodalnu dobnu distribuciju koja dostiže vrhunac između 20 i 30 godina starosti, s tim da se oko 10 % slučajeva događa u osoba mlađih od 18 godina (37). Sekundarni manji vrhunac zabilježen je u osoba između 50 i 70 godina starosti. (38). Spolna distribucija bolesti pokazuje da je CB nešto učestaliji kod žena, dok je za UC utvrđena minimalna predominacija kod muškaraca (39). Obje bolesti imaju tendenciju pojave u viših društveno-gospodarskih skupina (40) i češće su u visokorazvijenim i industrijaliziranim zemljama. Pojavnost UBC-a najviša je na području SAD-a, Kanade, sjeverne i zapadne Europe, dok je niža u zemljama Azije i Afrike, iako je i tamo uočen trend porasta. U Europi područja s najvišom pojavnošću su Farski otoci Danske i Velika Britanija (41) dok su u središnjoj i istočnoj Europi slučajevi UBC-a zastupljeni u značajno manjoj mjeri. Pojavnost UBC-a u svijetu još uvijek raste iako bi se porast mogao pripisati CB-u čiji je porast uočen i kod djece, dok se pojavnost UC-a relativno stabilizirala. U Hrvatskoj su epidemiološke studije UBC-a provođene u razdoblju od 1980. do 1989. Pojavnost UC-a bila je 1,5, a CB-a 0,7 na 100 000 stanovnika (42, 43). Druga epidemiološka studija provedena je u razdoblju od 2000. g. do 2004. g. Godišnja pojavnost UC-a bila je 4,6, a CB-a 6,5 na 100 000 stanovnika, što predstavlja značajan porast. Evidentna je i promjena u zastupljenosti pa je dominantni fenotip UBC-a u tom razdoblju CB (44). Prvu veliku multicentričnu studiju pojavnosti UBC-a u

Europi s jasno definiranim kriterijima pokrenuli su Burisch i suradnici. Studija je obuhvatila 31 centar iz 14 zapadnoeuropskih i 8 istočnoeuropskih zemalja, uključujući i Hrvatsku, s ukupnom populacijom od preko 10 milijuna stanovnika u vremenskom razdoblju od 2010. do 2015. godine (45). U zapadnoeuropskim centrima pojavnost CB-a i UC-a na 100 000 stanovnika bila je 6,3, odnosno 9,8, dok je u istočnoeuropskim centrima ona bila 3,3, odnosno 4,6, što upućuje na istočno-zapadni gradijent distribucije UBC-a (46). Takav trend odražava moguće razlike u okolišnim čimbenicima, ali upućuje i na genetski utjecaj. Naime, NOD2 (prema engl. *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*) mutacija u središnjem je dijelu Europe najviša, što bi moglo objasniti povećanu stopu CB-a u odnosu na UC (47). S druge strane, zanimljivo je da Japan kao zemlja s jednom od najviših stopa BDP-a i najrazvijenijim gospodarstvom kao i stabilnim društveno-gospodarskim uvjetima tijekom više desetljeća ima stopu UBC-a nižu od zemalja zapadne Europe i sjeverne Amerike (48, 49).

1.2.1. Genetička epidemiologija UBC-a

UBC vjerojatno nastaje interakcijom okolišnih čimbenika i crijevne mikroflore u genetski predisponiranih osoba (50). Na genetski utjecaj u etiologiji UBC-a prvo su ukazali epidemiološki podatci. Studije povezanosti identificirale su više uzročnih gena lociranih u različitim genomskim regijama označenih od UBC 1 do UBC 9 (51-54). Lokusi povezani s UBC-om kodiraju gene uključene u održavanje integriteta epitelne membrane, prepoznavanje uzorka antigena, autofagi, stečeni i urođeni imunološki odgovor (55). Najopsežnija su istraživanja provedena na NOD2 citoplazmatskim receptorima čija je mutacija povezana s CB-om (56, 57) te na genima humanoga leukocitnoga antigena (HLA) (58, 59) i proteina višestruke otpornosti na lijekove 1 (MDR1, prema engl. *multidrug resistance*) povezanih i s CB-om i UC-om (60, 61). Polimorfizmi gena čija je funkcija regulacija propusnosti crijevne epitelne barijere obično su povezani s razvojem UC-a (62).

Mnogobrojne genske studije definirale su lokuse koji reguliraju normalnu funkciju epitelne barijere te je takvim studijama i evoluiralo današnje shvaćanje da je CB više genetski reguliran od UC-a kao i to da su ovi poremećaji multigenični, što objašnjava heterogenost poremećaja te činjenicu da mutacija samo jednoga osjetljivoga gena vjerojatno neće izazvati bolest (63, 64). Ovo su potvrdile i studije u drugim zemljama. Primjerice, Njemačka

nacionalna studija na blizancima koju su vodili Spehlmann i suradnici pokazala je da je 35 % jednojajčanih parova i 3 % dvojajčanih parova konkordantno za CB dok je kod UC-a taj odnos 16 % za jednojajčane i samo 1 % za dvojajčane parove (65). Time je također potvrđena izraženija genetska komponenta kod CB-a u odnosu na UC, ali i važna uloga okolišnih mehanizama u indukciji UBC-a (66). Međutim, analiza DNA sekvence samo djelomično objašnjava visoku mogućnost nasljeđivanja CB-a i UC-a. Mogući utjecaji epigenetskih i drugih molekularnih mehanizama nasljeđivanja još uvijek nisu dovoljno istraženi. Epidemiološkim je studijama utvrđeno da UC i CB dijele određene, ali ne i sve gene. Cjelogenomske asocijacijske studije (GWAS, prema engl. *genome wide association studies*) kao i brojne meta-analize identificirale su mnogobrojne lokuse koji aktivirani čimbenicima okoliša dovode do poremećaja urođene imunosti. Tako su studije Jostinsa i suradnika utvrdile 163 UBC lokusa. Većina lokusa, 110/163, povezana je s oba fenotipa bolesti. Od preostalih 53 lokusa, njih je 30 klasificirano kao specifični za CB, a 23 kao specifični za UC (67). Mnogi od 163 UBC lokusa povezani su i s drugim imunološki povezanim poremećajima kao što su ankilozirajući spondilitis, psorijaza i dijabetes tipa 1 (68). Istraživanja Huanga i suradnika definiraju preko 200 aktivnih UBC lokusa (69). Također, nekoliko novijih nezavisnih istraživanja i meta analiza definirali su 215 osjetljivih lokusa statistički značajno povezanih s UBC-om (70). Ovi lokusi imaju temeljni utjecaj na shvaćanje molekularne biologije UBC-a (71-77).

1.2.2. UBC u evolucijski divergentnim populacijama

Osim po okolišnim čimbenicima, evolucijski divergentne populacije razlikuju se i po polimorfnom sadržajem genoma, što utječe na pojavnost nasljednih poremećaja. Frekvencija alela rezultat je akumulacije mutacija i selekcijskih procesa u populaciji, pa frekvencija može varirati između različitih populacija. Time se i raspodjela polimorfizama i njihov značaj mogu razlikovati među različitim etničkim skupinama. Genetska komponenta UBC-a vezana je uz obiteljsku agregaciju, razlike u prevalenciji između različitih etničkih skupina kao i raniju pojavu bolesti u potomaka osoba s UBC-om (78, 79). Analiza utjecaja SNP-a na nastanak i održavanje UBC-a u različitim populacijama i etničkim skupinama pokazuje da je gubitak imunološke tolerancije vezan i uz CB i UC, ali različita genetska konstitucija dovodi do razvoja jednoga od dvaju dominantnih fenotipova UBC-a. Različite polimorfne inačice, međutim, različito su zastupljene u evolucijski divergentnim populacijama i različito

pridonose riziku obolijevanja od UBC-a. Kategorizacija po rasnim i etničkim podskupinama indicira višu stopu UBC-a kod bijelaca nego drugih rasa kao što su afrički crnci, Indijci i Hispanci (80). Međutim, taj se odnos mijenja već u prvoj, a naročito u drugoj generaciji primjerice Azijata i Afroamerikanaca koji su migrirali u razvijenije zemlje, što osim na genetsku komponentu ukazuje i na životni stil i čimbenike okoliša u indukciji bolesti (81). Unutar europske populacije stopa UBC-a viša je u Židova nego u drugih etničkih skupina i viša je u Aškenazi Židova iz središnje i istočne Europe nego Sefardi Židova iz područja Španjolske (82).

1.3. Uloga polimorfizma jednoga nukleotida u UBC-u

Polimorfizmi gena definirani su kao varijacije deoksiribonukleinske kiseline (DNA, prema engl. *deoxyribonucleic acid*) koje su postigle genetsku stabilnost u populaciji i imaju frekvenciju alela 1 % ili više. Polimorfizam jednoga nukleotida (SNP, prema engl. *single nucleotide polymorphism*) najčešći je oblik genetske varijacije. Promjene jedne DNA baze odgovorne su za oko 90 % varijacija sekvenci u humanome genomu (83). Pojavnost je u prosjeku svakih 100 do 300 parova baza, što znači da je u humanome genomu oko 10 do 30 milijuna SNP-a. Chorley i Bell navode da, iako većina ovih polimorfizama nema ili ima vrlo ograničen učinak na regulaciju gena i aktivnost proteina, varijacije u slijedu nukleotida DNA mogu biti povezane s raznolikošću unutar populacije, osjetljivosti na bolest, individualnom odgovoru na terapijski tretman kao i odgovor na čimbenike okoliša (84, 85), a mogu utjecati i na fiziološke mehanizme i na patogenezu UBC-a (86). SNP u kodirajućoj regiji gena može rezultirati promjenama u biološkim osobinama kodiranoga proteina. Suprotno tome, SNP u nekodirajućoj regulacijskoj regiji gena ima utjecaj na izražaj gena.

Da bi se razumjela mehanička osnova kojom je polimorfizam povezan s određenim fenotipom potrebno je znati je li polimorfizam funkcionalan, odnosno mijenja li funkciju gena ili skupine gena. Najčešći polimorfizmi potencijalno su regulacijski polimorfizmi locirani u nekodirajućoj regiji uključujući promotorsku i intronsku regiju (87). Funkcionalni polimorfizmi gena različitih proupalnih i protuupalnih citokina povezanih s promijenjenom transkripcijom gena rezultiraju promijenjenom razinom citokina u tkivu i serumu (88). Za gene unutar kompleksa UBC, regulacijski i funkcijski značaj njihovih inačica nepotpuno je definiran.

1.4. Patogeneza UBC-a

Rezultati genetičkih i animalnih studija ukazuju na snažnu povezanost između Th1, Th2 i Th17 pomoćničkih stanica i rizika obolijevanja od UBC-a (89-91). Isto tako, studije genetske povezanosti ukazuju na preklapanje imunogeničnih puteva, a naročito središnju ulogu Th17 efektora kod UC-a (92). Najnovija GWAS ispitivanja na području CB-a posebno definiraju ulogu transkripcijskoga čimbenika aktivatora transkripcije 3 (STAT3, prema engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) u patogenezi bolesti koji je, uz citokine poput interleukina 6 (IL-6), uključen u Th2 i Th17 diferencijaciju (93). Također, GWAS studije impliciraju polarizacijske citokine i njegove distalne signalne komponente –tirozinska kinaza 2 (TYK2, prema engl. *non-receptor tyrosine-protein kinase 2*) i Janusova kinaza 2 (JAK2) – u patogenezi UBC-a (94-96), obuhvaćajući učinke na metaboličke funkcije imunoloških stanica, apoptozu, i popravak tkivnoga oštećenja.

Mehanistički, IL-6/STAT3 signal regulira Th2 diferencijaciju, kao i Th17/Treg (regulacijske T stanice) polarizaciju, ovisno o vrsti antigenskoga opterećenja u području narušenoga integriteta crijevne stijenke (97), i to inhibicijom razvoja perifernih FoxP3+Treg limfocita (prema engl. *forkhead box P3*), odnosno preusmjeravanjem razvoja naivnih prekursora u Th17 liniju indukcijom izražaja receptora za interleukin 23 (IL-23R), receptora za interleukin 1 (IL-1R), transkripcijskoga čimbenika RORγt (prema engl. *retinoid-related orphan receptor γt*) i STAT3 (98). STAT3 potom potiče izražaj drugih linijskih specifikatora Th17 stanica, poput transkripcijskoga čimbenika kappa Biz (NfκBiz, prema engl. *nuclear factor kappa Biz*), čimbenika indukcije hipotermije 1α (HIF1α, prema engl. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*) i receptora za aril ugljikohidrat (AHR, prema engl. *aryl hydrocarbon receptor*) (99). Nadalje, manjak STAT3 u STAT3-/- CD4+ Th stanicama izaziva zastoj Th17 diferencijacije, upućujući na njegovu ključnu ulogu u Th17 polarizaciji (100). Narušavanje polarizacijske ravnoteže između navedenih imunoloških sinapsi mnogi autori smatraju odgovornim za nastanak i održavanje upalnoga procesa u UBC-u (101-103). Th17 put stoga predstavlja zanimljiv terapijski cilj, a genske varijacije unutar Th17 osi potencijalni su biološki biljeg, s primjenom u individualnom krojenju terapije. Primjerice, inačice IL-23R gena koje imaju ulogu u Th17 polarizaciji naivnih CD4+ T limfocita povezane su s različitim izražajem proupalnoga citokina IL-17 u odgovoru na interleukin 23 (IL-23) stimulaciju, a neutralizacija i delecija p40 i p19 podjedinice IL-23 ublažava klinički tok bolesti, kako u humanoj patologiji, tako i u mišjim modelima induciranoga kolitisa. Sve ovo upućuje na

ulogu intaktnoga IL-23 signalnoga puta i IL-23R u aktivaciji i održavanju organ specifičnoga upalnoga odgovora, na tragu središnje uloge IL-23R u autoamplifikaciji Th17 polarizacije (104, 105).

1.4.1. Uloga IL- 6 i transkripcijskoga čimbenika STAT3 u UBC

Među brojnim citokinima, u patogenezi UBC-a jedna od središnjih uloga pripada IL-6 i transkripcijskome čimbeniku STAT3, kao dijelu postreceptorskoga signalnoga puta IL-6. Stoga se nove terapijske strategije, između ostaloga, temelje na inhibiciji IL-6/STAT3 signalosoma (106, 107). Ovaj signalni put ima ulogu u urođenoj i stečenoj imunosti, kako je ranije opisano, kao i u raznim biološkim procesima (108-110). Zbog širokoga spektra djelovanja Tanaka i suradnici smatraju IL-6 univerzalnim modelom citokina na temelju kojega je okarakterizirana molekularna osnova aktivnosti ostalih citokina (111). Humani IL-6 protein je od 20 kDa i 212 amino kiselina. S obzirom na dva potencijalna N-glikolizacijska mjesta te opseg glikolizacije veličina može varirati od 21 -26 kDa (112). Gen za IL-6 lociran je na kraćemu kraku kromosoma 7 (7p15.3), sadrži 6 exona i 4 introna (113).

Produkcija IL-6 općenito korelira sa staničnom aktivacijom i kontrolirana je glukokortikoidima, kateholaminima kao i spolnim steroidima (114). Poremećaj regulacije IL-6 povezan je s nekoliko imunološki posredovanih upalnih bolesti kao što su reumatoidni artritis, sistemski idiopatski juvenilni artritis, različiti tipovi karcinoma te UBC (115). IL-6 ima glavnu ulogu i u odgovoru akutne faze, što vodi ka promjeni koncentracija niza plazma proteina, kao što su C-reaktivni protein (CRP), haptoglobin, fibrinogen, albumin i transferin (116, 117). Nadalje, stimulira proliferaciju T stanica, diferencijaciju citotoksičnih T stanica, folikularnih pomoćničkih (Tfh) i B stanica. Baran, Scheller, Barbić i drugi autori navode da članovi IL-6 citokinske obitelji imaju proupalno i protuupalno djelovanje kojemu prethodi aktivacija ciljnih gena uključenih u diferencijaciju, preživljavanje, apoptozu i proliferaciju (118-120).

Biološka uloga IL-6 vezana je uz stanično signaliziranje i provođenje signala u jezgru (121). Pojednostavljeno, vezivanjem IL-6 za IL-6R i transdukcijski glikoprotein gp130 u stehiometrijskom omjeru 2:2:2, aktiviraju se i fosforiliraju JAK 1, 2 i TYK 2 konstitutivno vezane za citoplazmatsku domenu gp130 (glikoprotein 130) (122). Transfosforilacija

tirozinskih ostataka aktiviranim kinazama kulminira fosforilacijom STAT3 na tirozinu 759 i aktivacijom mitogenom-aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK) (123). Recipročna fosforilacija SH2 (prema engl. *src homology 2*) domena STAT3 molekula rezultira njihovom dimerizacijom i translokacijom posredstvom ulaznoga proteina NP1-α5 u staničnu jezgru gdje se aktivirani STAT3 veže uz *cis*-elemente unutar promotorskih regija IL-6 ciljnih gena, modulirajući njihovu transkripciju (124). Pri tome, STAT3 posreduje proupalne, ali i protuupalne učinke izražajem gena negativne povratne sprege, ovisno o vrsti stanice i transkripcijskim sučimbenicima koji određuju prepoznavanje specifičnih genomskih sekvencija.

U novijim je istraživanjima zastupljen stav da dihotomna uloga IL-6 i STAT3 predstavlja imunološku sinapsu između akutne i kronične faze upalne reakcije UBC-a kao i između upalne i protuupalne ili regenerativne aktivnosti (125). Rezultati prethodno objavljenoga istraživanja pokazali su da su vrijednosti IL-6 povišene i kod bolesnika s neaktivnim CB-om (CDAI < 150) (126). Sintetiziran u interepitelnim limfocitima, IL-6 također potiče parakrinu restituciju crijevnoga epitela indukcijom izražaja klaudina-2 te proliferaciju i regeneraciju uspostavljajući na taj način normalnu funkciju epitelne barijere za vrijeme akutne povrede tkiva (127).

U samim epitelnim stanicama, uključujući i epitel kolona, IL-6 amplificira vlastitu sekreciju međudjelovanjem gp130, STAT3 i receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR, prema engl. *epidermal growth factor receptor*) (128-130). Nadalje, IL-6 kod aktiviranih T limfocita razvija agresivni smjer imunološkoga odgovora aktivacijom transkripcije protuapoptotičkih gena Bcl-2 i Bcl-xl putem STAT3, što omogućuje preživljenje i klonsku ekspanziju aktiviranih T limfocita (131). Ovi procesi rezultiraju intenzivnom sintezom citokina, kao i matriks metaloproteinaza, čime se promovira kronična upala i narušavanje tkivne strukture, što je jedno od kliničkih obilježja UBC-a (132, 133).

Konačno, IL-6 poznat je i kao profibrotički citokin, koji potiče proliferaciju fibroblasta i diferencijaciju miofibroblasta. IL-6 pridonosi ožiljavanju, epitelnoj ozljedi i mezenhimskoj tranziciji narušavajući tako lokalnu tkivnu arhitekturu (134). Konačni ishod zbroj je različitih učinaka IL-6, čija lokalna prevaga ovisi o nedovoljno definiranim čimbenicima.

1.4.2. Povezanost C-reaktivnoga proteina i IL-6 u UBC-u

Sinteza CRP-a se aktivira signaliziranjem IL-6, ali i interleukina 1β (IL-1β) te čimbenika nekroze tumora α (TNFα, prema engl. *tumor necrosis factor α*) u hepatocitima (135), uz znatne interindividualne varijacije u bazalnoj serumskoj koncentraciji. CRP je obično smatran nespecifičnim, pasivnim biljegom upalne faze, ali CRP je također i aktivan čimbenik u kontekstu UBC-a jer predstavlja vezu između urođene i stečene imunosti aktivacijom C1q komponente komplementa i interakcijom s Fcγ receptorom (FcγR) makrofaga (136). Povratnom spregom, CRP pozitivno i negativno regulira sintezu IL-6 mehanizmom ovisnim o koncentraciji CRP-a i izoformi FcγR makrofaga (137). U niskim koncentracijama interakcija CRP-a i FcγRI rezultira izražajem proupalnih citokina IL-1, IL-6 i TNFα. Pri visokim koncentracijama, vezivanjem za FcγRIIb makrofaga, CRP aktivira protuupalne citokine transformirajući faktor rasta β (TGFβ, prema engl. *transforming growth factor β*) i posljedično IL-10+Treg stanice (interleukin 10 pozitivne T regulacijske stanice) (138). U UBC-u prisutne su znatne i nedovoljno razjašnjene interindividualne razlike u odgovoru CRP-a na aktivnost bolesti, uključujući i nerazjašnjenu ulogu IL-6 u varijabilnosti serumskih koncentracija CRP-a u UBC-u. Također, nije poznato utječu li i u kojoj mjeri genske varijacije u signalnom putu IL-6 na dinamiku CRP-a u UBC-u.

1.4.3. Polimorfizmi gena za IL-6, STAT 3 i IL-23R

Unutar IL-6 lokusa, do sada je najviše proučavan funkcionalni polimorfizam -174 G/C, polazeći od pretpostavke da razlike u serumskoj koncentraciji IL-6 mogu nastati kao rezultat genskih varijacija, utječući tako i na upalni odgovor. Terry i suradnici navode da G > C tranzicija na poziciji 174 promotorske regije IL-6 gena utječe na transkripcijsku aktivnost gena za IL-6 što rezultira promjenama u izražaju IL-6 (139). Alel G povezuju s pojačanim izražajem IL-6 u serumu nositelja, a alel C sa sniženim izražajem IL-6. Gao izvještava kako je ova tranzicija povezana sa sepsom i brojnim drugim upalnim bolestima kao što je UBC (140). Istraživanja Guerreira u španjolskoj populaciji pokazuju da su GG homozigoti povezani sa šest puta većim rizikom obolijevanja od CB-a (141), dok Fishman, Kilpinen i suradnici izvještavaju da je izražaj IL-6 u funkciji polimorfizma promotorske regije G/C na poziciji 174 gena za IL-6 (142, 143).

Provedena genotipizacija IL-6 u populaciji Iraca (144), Danaca (145), Finaca (146) i Talijana (147, 148) povezuje GG genotip s povišenom koncentracijom serumskoga IL-6. U populaciji talijanskih žena ustanovljeno je da žene GG genotipa imaju dva puta manju mogućnost doživjeti duboku starost. Suprotno tome, u populaciji Francuza povišena serumska koncentracija IL-6 kod CC genotipova izmjerena je u osoba s upalnim bolestima i aterosklerozom (149). CC genotip u Nijemaca povezuje se s povišenim indeksom tjelesne mase kao i s visokim rizikom razvoja šećerne bolesti tipa 2 (150), dok se GG genotip IL-6 dovodi u vezu s metaboličkim sindromom i osjetljivošću na inzulin (151). Istraživanje koje je obuhvatilo populaciju britanskih obitelji pokazalo je da nositelji C-alela imaju povišenu koncentraciju plazmatskoga CRP-a (152), a CC genotip povezan je sa zaštitnom ulogom pri nastanku sistemskoga juvenilnoga artritisa (142). U danskoj se populaciji žena više koncentracije IL-6 kod CC genotipova povezuju s većim rizikom nastanka šećerne bolesti tipa 1 (153).

Ispitivanjem Th17 puta i IL-23R uočeno je da IL-23R inačica Arg381Gln ima frekvenciju od 1,9 % u CB bolesnika i 7,0 % ispitanika kontrolne skupine što upućuje na zaštitnu ulogu od UBC-a (154-156). Zaštitni mehanizam Arg381Gln nije poznat, a uloga IL-23R puta u UBC-u vjerojatno premašuje jednostavne učinke stjecanja ili gubitka funkcije IL-23R inačica. Slično, istraživanja Fishera i suradnika ukazuju da genetičke determinante CB-a i UC-a uključuju lokuse IL-23R gena (157). SNP rs1209026 dio je haplotipa s rs7530511, a povezan je do sada s psorijazom, psorijatičnim artritisom, ankiloznim spondilitisom i UBC-om (158-160). Duerr i suradnici izvještavaju da SNP inačica rs1209026 (c.1142G>A, p.Arg381Gln) ima zaštitni učinak za CB (161), dok je njemačka studija potvrdila povezanost rs 11209026 s CB-om kod djece, potvrđujući zaštitni učinak rs11209026 za CB, ali ne i za UC (162). Nizozemska je *case control* studija rs11209026 SNP gena za IL-23R pokazala da ima zaštini učinak za UBC te da su i CB i UC povezani s IL-23R (163). Jedan je od ciljeva istraživanja odrediti jesu li SNP rs7530511 i rs11209026 gena za IL-23R povezani s UC-om i/ili CB-om u hrvatskoj populaciji pacijenata.

Istraživanja McGoverna, Leppkessa, Sugimoto i suradnika identificirala su povezanost STAT3 lokusa s CB-om ili UBC-om (164-166). Transkripcijski čimbenik STAT3 ima ulogu u razvoju imunološkoga sustava i u hematopoezi i povezan je sa signalnim putem citokina IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 i IL-23. Nekoliko istraživanja na humanim i animalnim modelima povezuju STAT3 signalni put s UBC-om (167-170). U brojnim GWAS studijama

polimorfizam STAT3 gena povezan je i s CB-om i UC-om, iako rezultati u različitim populacijama ispitanika nisu dosljedni (171-174).

Među uzrocima nedosljednosti, istaknuto mjesto zauzimaju različite genetske pozadine u populacijama različitih povijesti, populacijska stratifikacija, fenotipska heterogenost bolesnika u različitim kohortama, razlike u okolišnim čimbenicima, i razlike u statističkoj snazi za detekciju skromnih alelnih učinaka. Tipično, složeni i umreženi signalni putovi podložni su epistatskim interakcijama koje moduliraju značaj pojedinih inačica u različitim populacijama i na različitim genetskim pozadinama, kako u smjeru tako i u veličini učinka. Zbog navedenoga razloga učinak kombinacija genskih promjena, primjerice dviju ili više mutacija unutar istoga signalnoga puta, znatno je slabije definiran i opisan od izoliranih učinaka pojedinačnih mutacija u agregiranim populacijama. Slično tome, doprinos pojedinih genskih inačica kliničkim manifestacijama, tijeku i prognozi UBC-a bitno je manje poznat od doprinosa samom riziku obolijevanja, otvarajući time nove smjerove istraživanja.

2. HIPOTEZA

Na temelju dosadašnjih spoznaja o UBC-u postavljaju se sljedeće hipoteze:

- IL-6 u serumu ispitanika s UBC-om povezan je s kliničkim, biokemijskim obilježjima i tijekom UBC-a.
- Razdioba alelnih i genotipskih frekvencija polimorfizma u genima za IL-6, STAT3 i IL-23R razlikuje se između kontrolnih ispitanika i podskupina bolesnika i utječe na omjer izgleda obolijevanja od UBC-a.
- Polimorfizam gena za IL-6 povezan je sa serumskom koncentracijom IL-6 i rizikom obolijevanja od UBC-a.
- Serumske koncentracije IL-6 i SNP u genima IL-6 i STAT3 povezane su sa serumskom koncentracijom CRP-a.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Specifični ciljevi istraživanja su:

- odrediti vrijednost i značaj IL-6 kao biljega CB-a i UC-a;
- odrediti alelne i genotipske frekvencije odabranih polimorfizama u genima za IL-6, STAT3 i IL-23R u populaciji kontrolnih ispitanika, ispitanika s CB-om i UC-om te testirati neravnotežu alelne povezanosti genskih polimorfizama IL-23R lokusa;
- ispitati učinak SNP IL-6 na serumsku koncentraciju IL-6 i rizik obolijevanja od UC-a i CB-a;
- ispitati povezanost SNP STAT3 gena s rizikom razvoja CB-a i UC-a;
- utvrditi je li rs11209026 i rs 7530511 SNP gena za IL-23R povezan s UBC-om;
- utvrditi međusobni utjecaj SNP STAT3 i IL-23R na indeks aktivnosti CB-a i aktivnosti UC-a;
- usporediti razdiobu SNP STAT3 i IL-23R kod pacijenata s aktivnom bolešću i kod pacijenata u remisiji;
- ispitati međudjelovanja odabranih genskih inačica na rizik obolijevanja od CB-a, UC-a i UBC-a u cijelosti;
- ispitati povezanost serumske koncentracije CRP-a s obilježjem bolesti i serumske koncentracije IL-6;
- ispitati utjecaj SNP IL-6 i STAT3 na serumsku koncentraciju CRP-a.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao istraživanje parova.

4.2. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 143 ispitanika obaju spolova (65 žena, 78 muškaraca), između 34 i 93 godine starosti kojima je upalna bolest crijeva dijagnosticirana u Klinici za unutarnje bolesti, Odjelu za urgentnu i intervencijsku gastroenterologiju Kliničkoga bolničkoga centra (KBC) Osijek. Od 143 ispitanika, 50 ima dijagnosticiranu CB, a 93 UC. Kontrolna je skupina obuhvaćala 100 zdravih punoljetnih ispitanika, bez kliničkih znakova ili obiteljske anamneze autoimunih i/ili malignih bolesti, odabranih prigodno među dobrovoljnim darivateljima krvi Kliničkoga zavoda za transfuzijsku medicinu KBC-a Osijek.

Dijagnoza upalnih crijevnih bolesti postavljena je na temelju endoskopskih nalaza te patohistoloških i radioloških kriterija. Podaci o dobi i spolu ispitanika te relevantnim kliničkim pokazateljima dobiveni su uvidom u zdravstvene kartone ispitanika.

Za procjenu težine CB-a korišten je standardni indeks aktivnosti Crohnove bolesti (CDAI, prema engl. *Crohn's Disease Activity Indeks*), a za procjenu težine UC-a indeks prema Trueloveu i Wittsu (MTWSI, od engl. *Modified Truelove Witts Severity Indeks*). Prema postavljenim kriterijima iz studije su isključeni ispitanici s infektivnim i nespecifičnim kolitisom te dokazanim drugim autoimunim i/ili malignim bolestima. Svi su ispitanici dobili Dokument obaviještenosti – obrazloženja studije, potpisali su Informativni pristanak za sudjelovanje u istraživanju, a ispitanici kontrolne skupine dobili su i Upitnik i obavijest za davatelje krvi. Za istraživanje je dobivena Suglasnost Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta Osijek Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku (klasa: 602-04/17-08/12, ur.br.: 2158-61-07-17-217 od 21. prosinca 2017.).

4.3. Metode

Koncentracija IL-6 u serumu određena je u Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja KBC-a Osijek. Analiza polimorfizma IL-6 (174 G-C, rs1800795), polimorfizma transkripcijskoga čimbenika STAT3 (rs744166) i polimorfizma receptora za IL-23 (rs11209026 i rs7530511) provedena je u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC-a Osijek. Biokemijska mjerenja provedena su u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek kojima su određene vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita (SE), broj leukocita (L) i eritrocita (E), koncentracije C-reaktivnoga proteina (CRP), albumina u serumu (ALB), alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST), hematokrita (Htc), hemoglobina (Hgb) i kreatinina u serumu (CRE/S).

4.4. Biokemijska i hematološka mjerenja

4.4.1. Određivanje serumske koncentracije IL-6

4.4.1.1. Uzorci ispitanika

Uzorci krvi dobiveni su venepunkcijom u jutarnjim satima kad su ispitanici bili natašte. Krv je svakome pacijentu vađena iz kubitalne vene u epruvetu s crvenim čepom bez aditiva za dobivanje seruma (BD Vacutainers Systems, Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK). Uzimalo se 10 mL krvi. Serumske se epruvete ostavljaju 30 minuta u uspravnom položaju na sobnoj temperaturi dok se ugrušak u potpunosti oblikuje. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3000 okr/min (Hettich Rotina 380 R, Tuttlingen, Njemačka). Dobiveni je serum odvojen od stanica, alikvotiran u šest uzoraka i pohranjen do analize na temperaturi -20 °C u vremenskom okviru od 45 minuta nakon venepunkcije. Uzorci su analizirani tijekom razdoblja od četiri tjedna.

4.4.1.2. Metoda određivanja koncentracije IL-6

Određivanje serumske koncentracije IL-6 zasnovano je na načelu kemiluminiscentne sekvencijalne imunometrične metode kod koje su monoklonska protutijela na humani IL-6 imobilizirana na čvrstu fazu.

Serumska koncentracija IL-6 određena je na analizatoru Siemens Immulite 1000 (Siemens Healthcare Diagnostics, Llanberis, Gwynedd, UK) u inkubacijskim ciklusima od 2 puta po 30 minuta prema protokolu proizvođača. Za određivanje koncentracije IL-6 korišten je komercijalni kit Immulite IL-6 (Siemens Healthcare Diagnostics, Llanberis, Gwynedd, UK, kataloški broj LK651, kit lot 0217). Immulite IL-6 kit sastoji se od IL-6 test jedinica od kojih svaka sadržava čvrstu fazu s adheriranim mišjim monoklonskim protu-IL-6 protutijelima, IL-6 reagensa L6PA koji sadrži 7,5 mL proteinskog pufera i L6PB sa 7,5 mL alkalne fosfataze konjugirane na ovčja poliklonalna protu-IL-6 protutijela u puferu, dva kalibratora definiranih koncentracija IL-6 s niskom i visokom vrijednosti citokina (L6PL i L6PH). Kalibratori su liofilizirani u proteinskom pufer matriksu. Rekonstituiraju se s po 3 mL redestilirane vode i miješaju dok se liofilizirani sadržaj u potpunosti ne otopi. Oba kalibratora mjerena su u tetraplikatima. Vrijednosti za kalibrator niske koncentracije varirale su između 117.662 impulsa po sekundi (cps, prema engl. *counts per second*) i 131.692 cps sa srednjom vrijednosti od 124.878 cps, cv 5,019 %, a za kalibrator visoke koncentracije između 7780.349 cps i 8258.338 cps sa srednjom vrijednosti od 8094.609 cps, cv 2,685 %.

Na temelju koncentracijskih vrijednosti kalibratora oblikuje se standardna kalibracijska krivulja. Svi su uzorci analizirani na analitičkom sustavu Siemens Immulite 1000 ekstrapolacijom izmjerenih vrijednosti na kalibracijsku krivulju. Za kontrolu kvalitete korišteni su komercijalni kontrolni uzorci u dvije koncentracijske razine IL-6 (Siemens Healthcare Diagnostics, Llanberis, Gwynedd, UK; kataloški broj ILCO10022 i ILCO2022, lot kontrolnih uzoraka 0022). Obje su kontrole liofilizirane humanom serumu i rekonstituirane s 5 mL redestilirane vode unutar 30 minuta prije uporabe i miješane dok se sadržaj u potpunosti ne otopi. Kontrole su analizirane na isti način kao i serumi ispitanika nepoznate koncentracije IL-6. Dobivene vrijednosti kontrole 1 su 97,3 pg/mL (očekivani raspon od 74 do 104 pg/mL). Vrijednosti za kontrolu 2 su 422 pg/mL (očekivani raspon od 365 do 543 pg/mL). Kalibracijski raspon je od 0 do 1,000 pg/mL. Utjecaj visokih koncentracija (engl. *High-dose*

hook effect) nije uočen do koncentracije uzoraka većih od 60,000 pg/ml. Siemens Immulite 1000 analizator automatski očitava koncentraciju IL-6 u uzorku.

4.4.2. Određivanje serumske koncentracije CRP-a

4.4.2.1. Uzorci ispitanika

Uzorci krvi dobiveni su venepunkcijom u jutarnjim satima kada su ispitanici bili natašte. Krv je svakome pacijentu vađena iz kubitalne vene u epruvetu s crvenim čepom bez aditiva za dobivanje seruma i u epruvetu s ljubičastim čepom s K_3-EDTA antikoagulansom (Becton Dickinson, New Jersey, SAD). Nakon 30 minuta stajanja serumske epruvete u uspravnom položaju, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3.000 okr/min (Hettich Rotina 380 R, Tuttlingen, Njemačka). Dobiveni je serum odvojen od stanica i pohranjen do analize na 2 – 8° C. Uzorci pune krvi analizirani su isti dan.

4.4.2.2. Metoda određivanja koncentracije CRP-a

Za određivanje serumske koncentracije CRP-a korišten je komercijalni reagens CRP Latex kat. br. OSR6299 (Beckman Coulter, Brea, California, SAD) na analitičkom sustavu Beckman Coulter AU680. Za kalibraciju reagensa korišten je Beckman Coulter CRP Latex Calibrator Normal Set (kat.br. ODC0026). Vrijednosti kalibratora CRP-a sljedive su prema standardu CRM 470 (175) Međunarodne udruge za kliničku kemiju (IFCC od engl. *International Federation of Clinical Chemistry*). Za kontrolu kvalitete korišteni su komercijalni kontrolni uzorci u dvije koncentracijske razine: Seronorm Immunoprotein Lyo-L1 kat. br. 202805 i Seronorm Immunoprotein Lyo-L2 kat.br. 202905 (Sero, Bilinstad, Norveška). Načelo testa temelji se na mjerenju povećanja turbidnosti reakcijske otopine (imunoturbidimetrija). Nakon miješanja ispitivanoga uzorka s reagensom CRP iz uzorka specifično reagira s protu-CRP protutijelima na lateks česticama iz reagensa pri čemu se stvaraju netopljivi agregati i raste zamućenje (turbidnost) reakcijske smjese. Porast zamućenja proporcionalan je koncentraciji CRP-a u uzorku.

4.4.3. Određivanje biokemijskih parametara

ALT, AST, ALB, CRE/S analizirani su laboratorijskim testovima na osnovi spektrofotometrijskoga određivanja enzimske aktivnosti (ALT, AST) i koncentracije (ALB, CRE/S). Svi su uzorci analizirani na analitičkom sustavu Beckman Coulter AU 680 (Beckman Coulter, Brea, California, SAD) ekstrapolacijom izmjerenih vrijednosti na kalibracijsku krivulju (System Calibrator, Beckman Coulter, kat. br. 66300). Za kontrolu kvalitete korišteni su komercijalni kontrolni uzorci u dvije koncentracijske razine: Seronorm Human, kat. br. 200805 i Seronorm Human High, kat. br. 203005 (Sero, Bilinstad, Norveška). Beckman Coulter analizatori automatski izračunavaju aktivnost ALT i AST uzorka te koncentraciju ALB i CRE/S uzorka.

4.4.4. Određivanje hematoloških parametara

Parametri krvne slike L, E. Hgb, Hct i brzina SE određeni su rutinskom analizom na hematološkome brojaču Siemens ADVIA 2120 (Siemens, München, Njemačka) (176). Analiza je temeljena na načelu protočne citometrije s mjerenjam rasapa svjetla (određivanje ukupne krvne slike), lizom stanica i bojanjem s mijeloperoksidazom (diferenciranje leukocita). Koncentracija hemoglobina određuje se spektrofotometrijski nakon miješanja uzorka s reagensom koji sadrži natrij lauril-sulfat.

4.5. Analiza polimorfizma gena IL-6, STAT3 i IL-23R

Polimorfizmi u genima za IL-6 (HGNC:6018), IL-23R (HGNC:19100) i STAT3 (HGNC:11364) analizirani su pomoću komercijalnoga seta LightCycler™ DNA Master HybProbe Kit (Roche, EU) i odgovarajućih početnica te fluorescentno obilježenih proba. Umnažanje i analiza rezultata provodila se na uređaju LightCycler™ PCR 1.2 (Roche, EU) u stvarnome vremenu. Analiza se temeljila na metodi prijenosa energije uslijed fluorescentne rezonancije (FRET, prema engl. *Fluorescent Resonance Energy Transfer*).

4.5.1. Izolacija DNA iz pune krvi

Genomska DNA izolirana je iz 200 µL heparinizirane, pune, periferne krvi korištenjem komercijalnoga seta Hight Pure PCR (prema engl. *polimerase chain reaction*) Template Preparation Kit (Roche, Njemačka).

Materijal: Uzorci krvi oboljelih i kontrolnih ispitanika, High Pure PCR Template Preparation Kit, dH_2O, izopropanol, apsolutni etanol.

Postupak izolacije: U sterilnu, nekorištenu kivetu od 1,5 mL odpipetirano je 200 µL pune krvi, 200 µL vezujućeg pufera (6 M gvanidin-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20 % Triton X-100 (v/v), pH 4,4 (25 °C)) i 40 µL proteinaze K. Reakcijska smjesa snažno je promiješana i inkubirana 10 minuta na 70 °C. Nakon inkubacije dodano joj je 100 µL izopropanola te je smjesa prenesena u tubicu s filterom. Uzorci su centrifugirani 1 minutu na 8.000 x g uslijed čega su se nukleinske kiseline vezale za staklena vlakna filter tubice. U svaki uzorak dodano je 500 µL pufera za uklanjanje inhibitora (5 M gvanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (pri 25 °C)) te je slijedilo novo centrifugiranje u jednakim uvjetima. Nakon toga dodano je 500 µL pufera za ispiranje (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25 ºC) uz novo centrifugiranje. Postupak ispiranja ponovljen je dva puta. U svrhu potpunoga uklanjanja pufera za ispiranje, uzorci su dodatno centrifugirani tijekom 10 sekundi pri punoj brzini centrifuge. Filter tubice prenesene su u nove, sterilne kivete od 1,5 mL te su uzorci isprani s 210 µL elucijskoga pufera (10 mM Tris-HCl, pH 8,5 (25 °C) prethodno zagrijanoga na 70 °C. Slijedilo je posljednje centrifugiranje nakon kojega su izolirani uzorci DNA pohranjeni na -80 °C do analize.

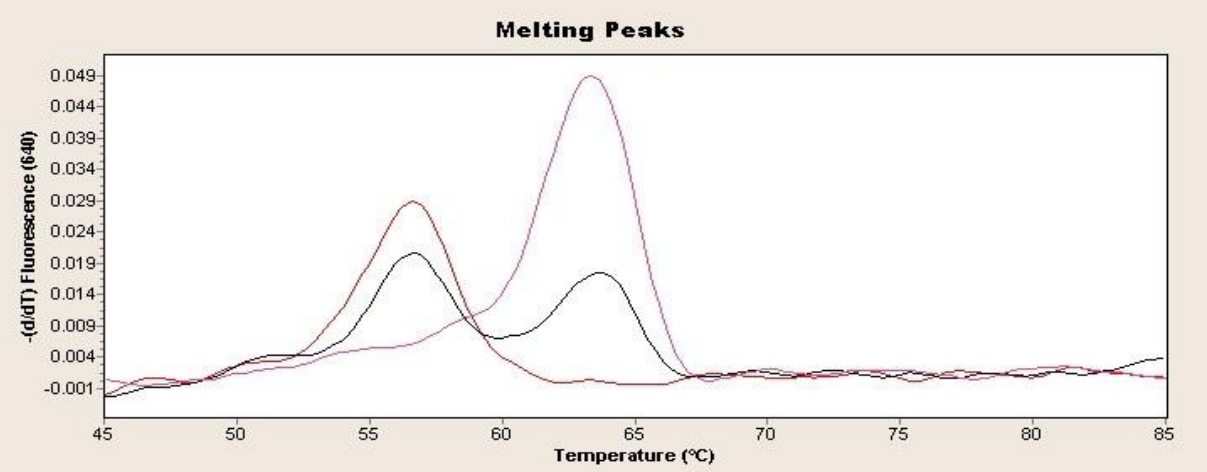
4.5.2. Genotipizacija polimorfizma u genu za IL-6

Analiza polimorfizma u genu za IL-6 (rs1800795, 7_22766645_C_G, GRCh37. p13) temeljena je na metodi prijenosa energije uslijed fluorescentne rezonancije ili FRET (prema engl. *Fluorescent Resonance Energy Transfer*) u stvarnome vremenu.

Materijal: Uzorci DNA, početnice i probe za navedeni polimorfizam, LightCycler DNA Master HybProbe Kit (Roche, Njemačka).

Postupak: Polimorfizam u genu za IL-6 analiziran je korištenjem komercijalnoga seta LightCycler DNA Master HybProbe Kit i odgovarajućih početnica te fluorescentno obilježenih proba.

Za analizu polimorfizma IL-6 (-174) korištene su početnice sa slijedom nukleotida: 5`-TTA CTC TTT GTC AAG ACA TGC CA-3` i 5`-ATG AGC CTC AGA CAT CTC CAG-3` te fluorescentno obilježene probe: *sensor* 5`-LC640-GTG TCT TGC GAT GCT AAA GGA-PH i *anchor* 5`-CTA AGC TGC ACT TTT CCC CCT AGT-FL. Reakcijska smjesa ukupnoga volumena 12 µL sadržavala je 2,5 mM $MgCl_2$, 0,5 µM početnica, 0,2 µM proba, te nukleotide i Taq polimerazu koji su bili dio korištenoga seta. Polimorfizam u genu za IL-6 genotipiziran je u umnoženim odsječcima DNA veličine 314 pb. Analiza genotipa temeljena je na bilježenju porasta fluorescencije na točno određenim temperaturama u koraku taljenja PCR produkata. Uočeni skokovi fluorescencije zabilježeni su na dvije temperature: 63 ºC ± 1 ºC za genotip GG; 55 C ± 1 ºC za CC; 63 ºC i 55 ºC ± 1 ºC za genotip GC (Slika 4.1.). U Tablici 4.1. navedeni su uvjeti PCR reakcije za analizu polimorfizma SNP rs1800795.



Slika 4.1. Genotipizacija temeljena na analizi temperature taljenja PCR produkta za SNP rs1800795

Tablica 4.1. Uvjeti PCR reakcije za analizu polimorfizma rs11209026 *IL-23R* gena

1. Denaturacija

Broj ciklusa	**1**
Način analize	"None"
Temperatura (°C)	95
Vrijeme inkubacije (min:s)	10:00
Brzina promjene temperature (°C/s)	20
Dodatna temperatura u ciklusu (°C)	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0
Ciklusi s dodatnom temperaturom	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"

2. Umnažanje DNA

Broj ciklusa	**55**		
Način analize	"Quantification"		
Dijelovi ciklusa	**1. dio**	**2. dio**	**3. dio**
Temperatura (°C)	95	53	72
Vrijeme inkubacije (min:s)	0:10	0:10	0:13
Brzina promjene temperature (°C/s)	20	20	50
Dodatna temperatura u ciklusu (ºC)	0	0	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0	0	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0	0	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"	"Single"	"None"

3. Analiza temperature taljenja PCR produkta

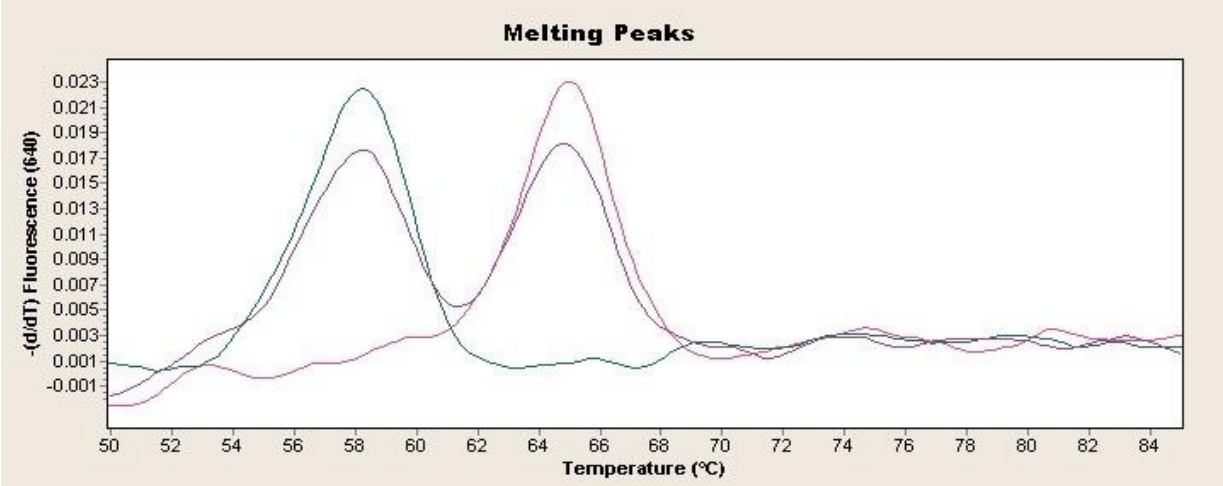
Broj ciklusa	**1**		
Način analize	"Melting Curves"		
Dijelovi ciklusa	**1. dio**	**2. dio**	**3. dio**
Temperatura (°C)	95	45	85
Vrijeme inkubacije (min:s)	0:0	0:90	0:0
Brzina promjene temperature (°C/s)	20	20	0,1
Dodatna temperatura u ciklusu (ºC)	0	0	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0	0	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0	0	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"	"None"	"Continuous"

4. Hlađenje

Broj ciklusa	**1**
Način analize	"None"
Temperatura (°C)	40
Vrijeme inkubacije (min:s)	0:30
Brzina promjene temperature (°C/s)	20
Dodatna temperatura u ciklusu (ºC)	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"

4.5.3. Genotipizacija polimorfizma u genu za STAT3

Reakcijska smjesa za analizu polimorfizma rs744166 (17_40514201_A_G) u genu za STAT3 sadržavala je 2,5 mM $MgCl_2$, 0,5 μM početnica i 0,2 μM hibridizacijskih proba i Taq polimerazu. Za umnažanje odsječka DNA dužine 248 pb korištene su početnice koje su imale nukleotidni slijed: 5′-GCC TGA TTT TTC TCT TGC CT-3′ i 5′-AAT GTC ATG GCA GGA GTG C-3′, dok je nukleotidni slijed fluorescentno obilježenih proba bio: 5′-GAG TTG CTG TGG CTG TAA TGT CTT GAG--FL i LC640-GAA TCG AGC CTG ACA GTA ATT TAT AG—PH. Analizom taljenja umnoženoga produkta zabilježen je porast fluorescencije pri temperaturama od: 65 ºC ± 1 ºC za genotip GG, 58 ºC ± 1 ºC i 65 ºC ± 1 ºC za genotip GA, te 58 ºC ± 1 ºC za genotip AA (Slika 4.2). U Tablici 4.2. prikazani su uvjeti PCR reakcije za analizu polimorfizma SNP rs744166 STAT3 gena.



Slika 4.2. Genotipizacija temeljena na analizi temperature taljenja PCR produkta za SNP rs744166

Tablica 4.2. Uvjeti PCR reakcije za analizu polimorfizma rs744166 u genu za STAT3

1. Denaturacija

Broj ciklusa	**1**
Način analize	"None"
Temperatura (°C)	95
Vrijeme inkubacije (min:s)	2:30
Brzina promjene temperature (°C/s)	20
Dodatna temperatura u ciklusu (°C)	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"

2. Umnažanje DNA

Broj ciklusa	**45**		
Način analize	"Quantification"		
Dijelovi ciklusa	**1. dio**	**2. dio**	**3. dio**
Temperatura (°C)	95	58	72
Vrijeme inkubacije (min:s)	0:45	0:15	0:10
Brzina promjene temperature (°C/s)	20	20	20
Dodatna temperatura u ciklusu (ºC)	0	0	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0	0	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0	0	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"	"Single"	"None"

3. Analiza temperature taljena PCR produkta

Broj ciklusa	**1**		
Način analize	"Melting Curves"		
Dijelovi ciklusa	**1. dio**	**2. dio**	**3. dio**
Temperatura (°C)	95	50	85
Vrijeme inkubacije (min:s)	0:60	0:60	0:0
Brzina promjene temperature (°C/s)	20	20	0,1
Dodatna temperatura u ciklusu (ºC)	0	0	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0	0	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0	0	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"	"None"	"Continuous"

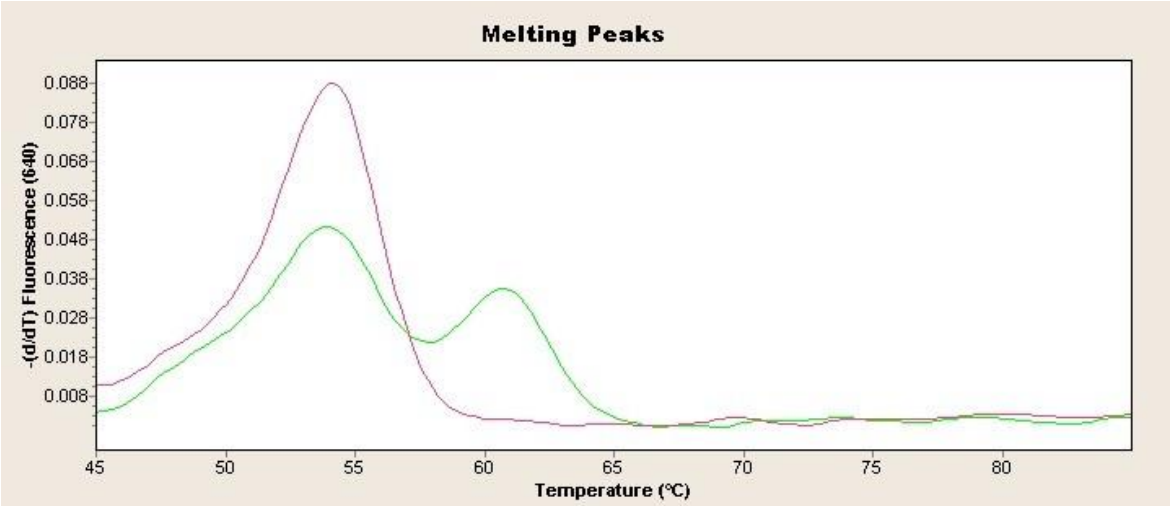
4. Hlađenje

Broj ciklusa	**1**
Način analize	None
Temperatura (°C)	40
Vrijeme inkubacije (min:s)	0:30
Brzina promjene temperature (°C/s)	20
Dodatna temperatura u ciklusu (°C)	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0
Način bilježenja fluorescencije	None

4.5.4. Analiza polimorfizama u genu za IL-23R

4.5.4.1. Polimorfizam rs11209026 (1_67705958_G_A)

Za umnažanje dijela DNA u svrhu analize polimorfizma rs11209026 u genu za IL-23R korištene su početnice sa slijedom nukleotida: 5′-CCT TCC TTT CAT TAG ACA ACA GAG G-3′ i 5′-AAC TGA AAT GAC TAA ATT TTG GTG A-3′ te fluorescentno obilježene probe: *sensor* 5′-ACA GAT CAT TCC AAA CTG GGT--FL i *anchor* LC640-GTT TTT GCA GAA TTT CTG TTT TCT GAT TT--PH. Reakcijska smjesa ukupnoga volumena 10 µL sadržavala je 2 mM $MgCl_2$, 0,5 µM početnica, 0,2 µM proba, te Taq polimerazu. U optimiziranim uvjetima PCR reakcije umnožen je odsječak DNA dužine 194 parova baza. Analiza navedenoga polimorfizma temeljila se na bilježenju porasta fluorescencije pri određenim temperaturama u koraku taljenja PCR produkata. Uočeni skok fluorescencije zabilježen je na dvije temperature na osnovi kojih je određen genotip svakoga uzorka: 54 ºC ±1 ºC za genotip GG; 54 ºC i 61 ºC ± 1 ºC za GA i 61 ºC ±1 ºC za genotip AA (Slika 4.3). U Tablici 4.3. prikazani su uvjeti PCR reakcije za analizu polimorfizma SNP rs11209026 u genu za IL-23R.



Slika 4.3. Genotipizacija temeljena na analizi temperature taljenja PCR produkta za SNP rs11209026 u genu za IL-23R

Tablica 4.3. Uvjeti PCR reakcije za analizu polimorfizma rs11209026 u *IL-23R* genu

1. Denaturacija

Broj ciklusa	**1**
Način analize	"None"
Temperatura (°C)	95
Vrijeme inkubacije (min:s)	2:30
Brzina promjene temperature (°C/s)	20
Dodatna temperatura u ciklusu (°C)	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0
Ciklusi s dodatnom temperaturom	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"

2. Umnažanje DNA

Broj ciklusa	**45**		
Način analize	"Quantification"		
Dijelovi ciklusa	**1. dio**	**2. dio**	**3. dio**
Temperatura (°C)	95	58	72
Vrijeme inkubacije (min:s)	0:60	40	40
Brzina promjene temperature (°C/s)	20	20	20
Dodatna temperatura u ciklusu (ºC)	0	0	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0	0	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0	0	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"	"Single"	"None"

3. Analiza temperature taljenja PCR produkta

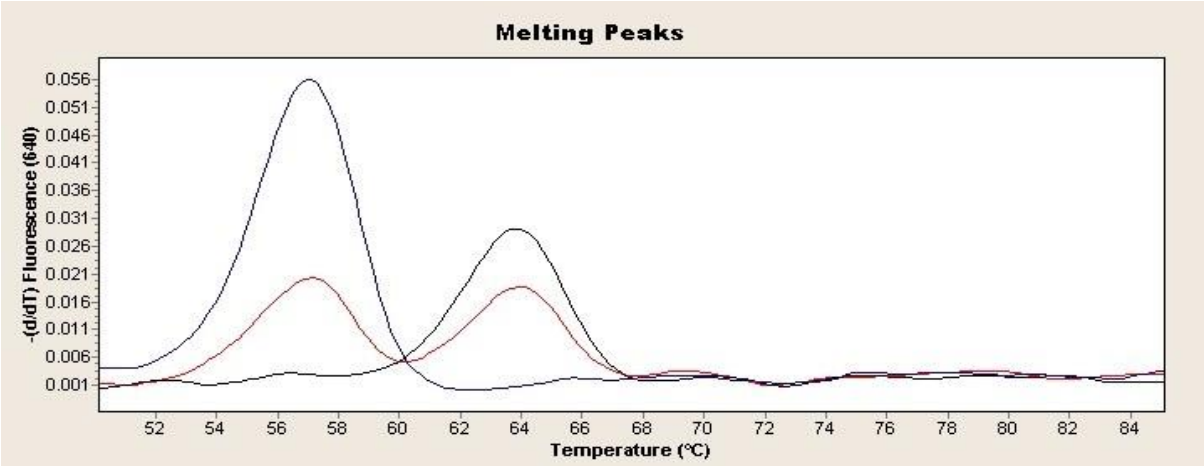
Broj ciklusa	**1**		
Način analize	"Melting Curves"		
Dijelovi ciklusa	**1. dio**	**2. dio**	**3. dio**
Temperatura (°C)	95	45	85
Vrijeme inkubacije (min:s)	0:0	0:60	0:0
Brzina promjene temperature (°C/s)	20	20	0,1
Dodatna temperatura u ciklusu (ºC)	0	0	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0	0	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0	0	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"	"None"	"Continuous"

4. Hlađenje

Broj ciklusa	1
Način analize	"None"
Temperatura (°C)	40
Vrijeme inkubacije (min:s)	0:30
Brzina promjene temperature (°C/s)	20
Dodatna temperatura u ciklusu (ºC)	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"

4.5.4.2. Polimorfizam rs7530511 (1_67685387_T_C)

Polimorfizam rs7530511 u genu za IL-23R analiziran je asimetričnim PCR-om u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 2,65 mM $MgCl_2$, 0.88 μM početnica F, 0,66 μM početnica Ri 0,18 μM hibridizacijskih proba, te Taq polimerazu. Slijed nukleotida u početnicama bio je 5´-GGA GCC AAA CAT TAA GTA CGT ATT T-3´ i 5´-CCT GCT TCA GGT GCT TTA TGA-3´, a u probama 5´-AGG CAA AAG GTA CTG GCA GCC--FL i LC640-TGG AGT TCA CCG TTT TTT CA--PH. Umnoženi PCR produkt imao je dužinu od 105 pb, a analizom taljenja PCR produkata zabilježen je porast fluorescencije pri temperaturama: 63 ºC ±1 ºC za genotip TT, 57 ºC i 63 ºC ± 1 ºC za genotip TC te 57 ºC ± 1 ºC za genotip CC (Slika 4.4.). U Tablici 4.4. prikazani su uvjeti PCR reakcije za analizu polimorfizma rs7530511 u genu za IL-23R.



Slika 4.4. Genotipizacija temeljena na analizi taljenja PCR produkta za SNP rs7530511

Tablica 4.4. Uvjeti PCR reakcije za analizu polimorfizma rs7530511 u genu za IL-23R

1. Denaturacija

Broj ciklusa	1
Način analize	"None"
Temperatura (°C)	95
Vrijeme inkubacije (min:s)	5:00
Brzina promjene temperature (°C/s)	20
Dodatna temperatura u ciklusu (°C)	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"

2. Umnažanje DNA

Broj ciklusa	**60**		
Način analize	"Quantification"		
Dijelovi ciklusa	**1. dio**	**2. dio**	**3. dio**
Temperatura (°C)	95	56	72
Vrijeme inkubacije (min:s)	0:30	0:15	0:8
Brzina promjene temperature (°C/s)	20	20	20
Dodatna temperatura u ciklusu (ºC)	0	0	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0	0	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0	0	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"	"Single"	"None"

3. Analiza temperature taljenja PCR produkata

Broj ciklusa	**1**				
Način analize	"Melting Curves"				
Dijelovi ciklusa	**1. dio**	**2. dio**	**3. dio**	**4. dio**	**5. dio**
Temperatura (°C)	95	50	48	40	85
Vrijeme inkubacije (min:s)	0:20	0:15	0:15	0:15	0:0
Brzina promjene temperature (°C/s)	20	1	1	1	0,1
Dodatna temperatura u ciklusu (ºC)	0	0	0	0	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0	0	0	0	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0	0	0	0	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"	"None"	"None"	"None"	"Cont"

4. Hlađenje

Broj ciklusa	1
Način analize	"None"
Temperatura (°C)	40
Vrijeme inkubacije (min:s)	0:30
Brzina promjene temperature (°C/s)	20
Dodatna temperatura u ciklusu (ºC)	0
Odstupanje od zadane temperature (°C)	0
Ciklus s dodatnom temperaturom	0
Način bilježenja fluorescencije	"None"

4.6. Statistička analiza

Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilk, a homogenost varijanci Levenovim testom. Numerički podaci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom ili medijanom s interkvartilnim rasponom, dok su kategoričke varijable opisane apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike među skupinama ispitane su Mann-Whitneyevim i Kruskal-Wallisovim testom s *post hoc* Bonferroni-Dunn procedurom, a za kategoričke varijable Fisherovim egzaktnim testom i $\chi 2$ testom. Snaga povezanosti prikazana je kao omjer izgleda ili kao srednja nepristrana procjena (mue, prema engl. *median unbiased estimate*) s 95 % intervalom pouzdanosti (LogXAct 10, Cytel Inc., Cambridge, MA, SAD). Povezanost omjernih varijabli testirana je Spearmanovim koeficijentom korelacije rangova (ρ). Za testiranje devijacija Hardy-Weinbergova ekvilibrija primijenjen je Guo-Thompsonov egzaktni test (177), a za opis neravnoteže alelne povezanosti D' koeficijent (178, 179) (PLINK 1.07 program) (180). Haplotipne frekvencije rekonstruirane su iterativnim EM (prema engl. *expectation maximisation*) algoritmom (181). Za pojedinačne polimorfizme statistička je značajnost simultano testirana Westfall-Youngovim permutacijama (10^4 randomizacija) (182), dajući empirijske P-vrijednosti korigirane za broj testova (maxT, PLINK 1.07). Epistatske interakcije za parove polimorfizama analizirane su W-testom (183) (400 *bootstrap* uzoraka, Bonferroni korigirani P za broj parova uz FWER (prema engl. *family-wise error rate*) 0,05), kao snažnom alternativom u niskofrekvencijskome okružju, koja se odlikuje

brzom i jednostavnom procjenom, bez pretpostavki na tip modela (R program, inačica 3.5.1, https://www.r-project.org, wtest paket).

Statistička snaga za alelne i genotipske asocijacije procijenjena je *Genetic Power Calculator* programom (184). Pod pretpostavkom multiplikativnoga modela alelnih učinaka, dvostranoga $\alpha = 0,05$, populacijske prevalencije bolesti od 0,5 %, D' = 1, i alelne frekvencije od 5, 10 i 35 %, veličina uzorka u ovom istraživanju postiže 80 % snage za omjere izgleda 2,6, 2,1 i 1,65.

Ukoliko nije drugačije naznačeno, statistička je analiza provedena pomoću programa SPSS 20,0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD. Dvostrane P-vrijednosti < 0,05 smatrane su značajnima. Za izradu grafova korišten je R paket *ggplot2*.

5. REZULTATI

5.1. Opća obilježja ispitanika

U istraživanje je uključeno 143 UBC ispitanika i 100 etnički i zemljopisno usporedivih zdravih ispitanika koji su činili kontrolnu skupinu. Skupinu oboljelih ispitanika s UBC-om činilo je 50 CB ispitanika (26 muških, medijan dobi 35, interkvartilni raspon 30 – 45 godina) i 93 UC ispitanika (52 muška) značajno većega medijana dobi (47 godina, $P < 10^{-6}$, Kruskall-Wallisov test, Bonferroni-Dunn *post hoc* test, Tablica 5.1.) u usporedbi s CB i kontrolnim ispitanicima (medijan dobi 36, interkvartilni raspon 26 – 47 godina). Medijan dobi ispitanika pri dijagnozi CB-a iznosio je 21 godinu (interkvartilni raspon 21 – 40), a pri dijagnozi UC-a 38 godina (interkvartilni raspon 28 – 47). Značajno je veći udio muškaraca ($P = 9{,}2 \times 10^{-6}$, $\chi 2$ test) zabilježen u kontrolnoj skupini (84 %) u usporedbi s CB (52 %) i UC ispitanicima (56 %, Tablica 5.1.).

Većina bolesnika (n = 79) tretirana je mesalaminom (medijan doza 2,500 mg, raspon 1,000 - 4,000 mg) u vrijeme uzorkovanja venske krvi. Kortikosteroide je primalo 29 ispitanika. Metilprednizolon je primalo 2 CB i 8 UC ispitanika (medijan doze 16 mg dnevno, raspon 8 – 40 mg). Prednison je primalo 9 CB i 10 UC ispitanika (medijan doze 17,5 mg dnevno, raspon 5 – 40 mg, n = 19). Kod 12 CB ispitanika učinjena je prethodno intestinalna resekcija, a u skupini UC ispitanika nije bilo ispitanika s prethodnom resekcijom.

Tablica 5.1. Demografska obilježja populacije oboljelih od Crohnove bolesti (CB) i oboljelih od ulceroznoga kolitisa (UC).

	spol (n)						
	m	ž	ukupno (n)	Dob (god)*	dob kod dijagnoze (god)*	trajanje bolesti (god)*	aktivnost bolesti*
CB	26	24	50	35 (30-45)	21 (21-40)	6 (3-9)	CDAI 136 (78-205)
UC	52	41	93	47 (36-59)	38 (28-47)	6 (3.5-12.5)	MTWSI 6 (3-12)
zdravi	84	26	100	36 (26-47)			
ukupno	162	91	243				

* medijan (interkvartilni raspon)

5.2. Deskriptivna analiza biokemijskih parametara

Medijan vrijednosti za masenu koncentraciju CRP-a viši je u CB i UC populaciji ispitanika od referentnoga intervala (< 5,0 mg/L). Medijan vrijednosti za broj leukocita u obje je skupine ispitanika unutar referentnoga intervala (3,4 – 9,7 x 10^9/L). Hipoalbuminemija, definirana kao serumska masena koncentracija albumina < 39,6 g/L, zapažena je u većine oboljelih, nešto izraženije u oboljelih od UC-a. Biokemijski parametri CB i UC populacije prikazani su u tablicama 5.2. i 5.3.

Tablica 5.2. Biokemijski parametri populacije oboljelih od Crohnove bolesti (n = 50).

	n*	medijan	interkvartilni raspon
SE (mm/3.6 ks)	47	18	10-33
L (x10^9/L)	47	8,3	7,2-10,2
E (x10^{12}/L)	39	4,44	4,19-4,9
Hgb (g/L)	39	125	111-135
Hct (L/L)	29	0,38	0,34-0,40
AST (U/L)	46	18	15-22,5
ALT (U/L)	46	16,50	13-31
ALB (g/L)	42	40,25	33,75-44,05
CRE/S (μmol/L)	45	73	65,5-78
CRP (mg/L)	48	9,35	2,2-39,03

SE sedimentacija eritrocita, L leukociti, E eritrociti, Hgb hemoglobin, Hct hematokrit, AST aspartat aminotransferaza, ALT alanin aminotransferaza, ALB serumski albumin, CRE/S kreatinin u serumu, CPR C-reaktivni protein

* broj raspoloživih opažanja

Tablica 5.3. Biokemijski parametri populacije oboljelih od ulceroznoga kolitisa (n = 93).

	n*	medijan	interkvartilni raspon
SE (mm/3.6 ks)	83	20	9-38
L ($x10^9$/L)	89	8,30	6,1-10,75
E ($x10^{12}$/L)	81	4,60	4,18-4,9
Hgb (g/L)	80	130	117-142
Hct (L/L)	54	0,39	0,33-0,43
AST (U/L)	84	20	15,25-26
ALT (U/L)	84	20	13-29,75
ALB (g/L)	73	39,50	30,95-45,35
CRE/S (μmol/L)	83	79	71-93
CRP (mg/L)	84	6,75	2,03-51,63

SE sedimentacija eritrocita, L leukociti, E eritrociti, Hgb hemoglobin, Hct hematokrit, AST aspartat aminotransferaza, ALT alanin aminotransferaza, ALB serumski albumin, CRE/S kreatinin u serumu, CPR C-reaktivni protein

* broj raspoloživih opažanja

5.3. Interleukin 6

Serumska koncentracija IL-6 ispitana je kod 32 CB i 68 UC ispitanika i kod 71 zdravog ispitanika. Ni kod oboljelih od CB-a niti kod oboljelih od UC-a nije bilo značajne razlike u koncentracijama IL-6 između ispitanika tretiranih kortikosteroidima i ispitanika koji nisu primali tu terapiju (P = 0,142, Kruskal-Wallisov test). Kruskal-Wallisovim testom ispitane su razlike u serumskoj koncentraciji IL-6 između triju skupina ispitanika (UC, CB i kontrolna skupina), a za potrebe analize, serumske koncentracije IL-6 niže od praga detekcije aproksimirane su donjim pragom detekcijskoga raspona (1,99 pg/mL). U ispitanika s CB-om, kao i ispitanika s UC-om, koncentracije IL-6 bile su statistički značajno više u usporedbi s kontrolnom skupinom (Tablica 5.4.). U kontrolnoj skupini, u 64/71 ispitanika zabilježene su koncentracije IL-6 < 2 pg/mL.

Tablica 5.4. Koncentracija interleukina 6 (IL-6) u oboljelih od Crohnove bolesti (CB) i oboljelih od ulceroznoga kolitisa (UC) i zdrave populacije (KS).

	Kruskall-Wallis P	CB ispitanici (n* = 32)		UC ispitanici (n* = 68)		KS (n* = 71)	
		medijan	inter-kvartilni raspon†	medijan	inter-kvartilni raspon	medijan	inter-kvartilni raspon
IL-6 (pg/mL)	<0,001†	3,25	1,99-5,96	2,67	1,99-11,20	1,99	1,99-1,99

* broj raspoloživih opažanja
† *post hoc* Dunn-Bonferronijev test: K < CB (P < 0,001); K < UC (P < 0,001)

Rezultati *post hoc* testova ukazuju na značajnu razliku između skupine oboljelih od UC-a i kontrolne skupine i između CB ispitanika i ispitanika kontrolne skupine. Nije bilo statistički značajne razlike između skupina CB i UC ispitanika.

Također, uspoređena je serumska koncentracija IL-6 kod CB ispitanika koji su prethodno imali intestinalnu resekciju s CB ispitanicima kod kojih intestinalna resekcija nije provedena. Nije utvrđena statistički značajna razlika između tih dviju podskupina ispitanika (Tablica 5.5.).

Tablica 5.5. Mann-Whitneyev test koncentracija interleukina 6 (IL-6) u oboljelih od Crohnove bolesti s prethodnom intestinalnom resekcijom i oboljelih od Crohnove bolesti bez intestinalne resekcije.

	intestinalna resekcija	n*	medijan	interkvartilni raspon	P
IL-6 (pg/mL)	da	8	2,61	2,02-3,75	0,313
	ne	24	3,55	1,99-7,23	

* broj raspoloživih opažanja

Uspoređena je i serumska koncentracija IL-6 kod ispitanika s neaktivnom CB (CDAI < 150) i kontrolne skupine. Utvrđena je statistički značajna razlika između ovih dviju skupina (Tablica 5.6.).

Tablica 5.6. Mann-Whitneyev test koncentracija interleukina 6 (IL-6) u ispitanika s neaktivnom Crohnovom bolesti (CB) i kontrolne skupine (zdravi).

	status	n*	medijan	interkvartilni raspon	P
IL-6 (pg/mL)	neaktivni CB	17	1,99	1,99-3,77	< 0,001
	zdravi	71	1,99	1,99-1,99	

* broj raspoloživih opažanja

Nisu utvrđene statistički značajne varijacije serumske koncentracije IL-6 s dobi (ρ = -0,08, P = 0,411) ili spolom ispitanika (Tablica 5.7.).

Tablica 5.7. Mann-Whitneyev test koncentracija interleukina 6 (IL-6) u muških i ženskih ispitanika.

	spol	n*	medijan	interkvartilni raspon	P
IL-6 (pg/mL)	muški	52	3,77	1,99-7,96	0,363
	ženski	48	2,33	1,99-6,11	

* broj raspoloživih opažanja

Odnos između IL-6, kliničkih i biokemijskih podataka ispitan je korištenjem Spearmanovoga koeficijenta korelacije ranga zasebno kod CB i UC skupine. Kod obje skupine ispitanika postoji jaka pozitivna korelacija između serumske koncentracije IL-6 i SE (ρ_{CB} = 0,54, P < 0,01 i ρ_{UC} = 0,67, P < 0,01, zasebno), kao i između serumske koncentracije CRP-a i koncentracije IL-6 (ρ_{CB} = 0,68 P < 0,01 i ρ_{UC} = 0,799, P < 0,01, zasebno). Također, kod obje skupine ispitanika utvrđena je umjerena pozitivna korelacija između broja leukocita i koncentracije IL-6 (ρ_{CB} = 0,45, P < 0,05; ρ_{UC} = 0,53, P < 0,01). U objema je skupinama ispitanika utvrđena negativna korelacija između koncentracije serumskoga albumina i koncentracije IL-6: kod CB ispitanika negativna korelacija je umjerena (ρ_{CB} = -0,42, P < 0,05) dok je kod UC skupine ispitanika ova korelacija snažnija (ρ_{UC} = -0,59, P < 0,001). U skupini ispitanika s CB-om CDAI pozitivno korelira s koncentracijom IL-6 (ρ_{CB}= 0,48, P < 0,01). Kod UC skupine negativna je korelacija između koncentracije Hgb i koncentracije IL-6 (ρ_{UC} = -0,43, P < 0,01), a također je očekivano negativna i korelacija između Hct i koncentracije IL-6 (ρ_{UC} = -0,33, P < 0,05). Značajna pozitivna korelacija utvrđena je između indeksa

aktivnosti bolesti, MTWSI, u skupini ispitanika s UC i serumske koncentracije IL-6 (ρ_{UC} = 0,66, P < 0,001) (Tablica 5.8.).

Tablica 5.8. Spearmanov koeficijent korelacije ranga (ρ) za interleukin 6 (IL-6).

	IL-6					
	oboljeli od Crohnove bolesti (CB)			oboljeli od ulceroznoga kolitisa (UC)		
	n*	ρ	P	n*	ρ	P
CDAI	28	0,481	0,009		-	-
Dob pri dijagnozi (god.)	31	0,188	0,311	68	0,027	0,824
Dob (god.)	32	-0,115	0,532	68	-0,024	0,849
SE (mm/3,6 ks)	30	0,544	0,001	60	0,671	< 0,001
L ($x10^9$/L)	30	0,451	0,012	65	0,536	< 0,001
E ($x10^{12}$/L)	30	-0,211	0,261	62	-0,202	0,114
Hgb (g/L)	30	-0,324	0,081	61	-0,436	< 0,001
Hct (L/L)	23	-0,139	0,525	46	-0,335	0,023
AST (U/L)	29	-0,037	0,848	60	-0,221	0,089
ALT (U/L)	29	-0,117	0,546	60	-0,083	0,526
ALB (g/L)	27	-0,420	0,028	53	-0,591	< 0,001
CRP (mg/L)	30	0,682	< 0,001	64	0,787	< 0,001
MTWSI		-	-	67	0,669	< 0,001

CDAI indeks aktivnosti Crohnove bolesti, SE sedimentacija eritrocita, L leukociti, E eritrociti, Hgb hemoglobin, Hct hematokrit, AST aspartat aminotransferaza, ALT alanin aminotransferaza, ALB serumski albumin, CPR C-reaktivni protein, MTWSI indeks aktivnosti ulceroznoga kolitisa

* broj raspoloživih opažanja

Razlike u brzini SE, broju L, koncentraciji ALB i CRP-a između muškaraca i žena CB i UC grupe ispitanika nisu bile značajne (podatci nisu prikazani). Međutim utvrđena je statistički značajna razlika između muškaraca i žena u koncentraciji Hgb (P = 0,014), i vrijednosti Hct (P = 0,021) (muškarci su imali više vrijednosti), i to u skupini UC ispitanika.

5.4. C-reaktivni protein

Serumska koncentracija CRP-a izmjerena je kod 132 ispitanika oboljelih od UBC-a (84 ispitanika s UC-om). Koncentracije CRP-a nisu mjerene kod ispitanika kontrolne skupine. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama CRP-a među oboljelima od UBC-a koji su primali kortikosteroidnu terapiju i onih koji nisu primali terapiju (P = 0,777). U tablici 5.8. prikazani su rezultati korelacijske analize između koncentracije CRP-a i IL-6 za CB i UC ispitanike zasebno. Tablica 5.9. prikazuje rezultate korelacijske analize između koncentracije CRP-a te indeksa aktivnosti bolesti, CDAI i MTWSI za obje skupine ispitanika. Utvrđene su jake pozitivne korelacije između CRP-a i MTWSI, dok korelacija između CRP-a i CDAI-a nije bila značajna.

Tablica 5.9. Spearmanov koeficijent korelacije ranga (ρ) za C-reaktivni protein (CRP).

	CRP (mg/L)		
	n*	ρ	P
CDAI	46	0,208	0,166
MTWSI	83	0,586	< 0,001

CDAI indeks aktivnosti Crohnove bolesti, MTWSI indeks aktivnosti ulceroznoga kolitisa

* broj raspoloživih opažanja

Uspoređena je koncentracija CRP-a kod muških i ženskih ispitanika, pri čemu je razlika između ovih dviju skupina bila nominalno marginalno značajna (P = 0,049) (Tablica 5.10.)

Tablica 5.10. Mann-Whitneyev test koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) u muških i ženskih ispitanika.

	spol	n*	medijan	interkvartilni raspon	P
CRP (mg/L)	muški	73	9,4	2,7-72,5	0,049
	ženski	59	5,8	1,6-16,9	

* broj raspoloživih opažanja

Spearmanov koeficijent korelacije ranga nije pokazao statistički značajnu korelaciju između koncentracije CRP-a i dobi ($\rho = 0,08$, $P = 0,383$).

Mann-Whitneyev test proveden je kako bi se usporedila koncentracija CRP-a između CB i UC ispitanika. Nije bilo statistički značajne razlike između ovih dviju skupina (Tablica 5.11.).

Tablica 5.11. Mann-Whitneyev test koncentracija C-reaktivnoga proteina (CRP) u oboljelih od Crohnove bolesti i oboljelih od ulceroznoga kolitisa.

	zdravstveni status	n*	medijan	interkvartilni raspon	P
CRP (mg/L)	CB	48	9,35	2,2-39,02	0,882
	UC	84	6,75	2,03-51,63	

* broj raspoloživih opažanja

Mann-Whitneyevim testom utvrđena je statistički značajna razlika koncentracije CRP-a između CB ispitanika sa i bez intestinalne resekcije (Tablica 5.12.), u smislu više koncentracije u bolesnika koji nisu prethodno operativno liječeni. Nije bilo statistički značajne razlike u indeksu aktivnosti Crohnove bolesti između operiranih i neoperiranih ispitanika (Tabica 5.13).

Tablica 5.12. Mann-Whitneyev test koncentracije C-reaktivnoga proteina (CRP) u oboljelih od Crohnove bolesti s prethodnom intestinalnom resekcijom i bez intestinalne resekcije.

	zdravstveni status	n*	medijan	interkvartilni raspon	P
CRP (mg/L)	ispitanici s intestinalnom resekcijom	11	2,2	0,9-4,5	0,005
	ispitanici bez intestinalne resekcije	37	10,3	6,05-46,75	

* broj raspoloživih opažanja

Tablica 5.13. Mann-Whitneyev test indeksa aktivnosti Crohnove bolesti (CDAI) u oboljelih od Crohnove bolesti s prethodnom intestinalnom resekcijom i bez intestinalne resekcije.

	zdravstveni status	n*	medijan	interkvartilni raspon	P
CDAI	ispitanici s intestinalnom resekcijom	10	152	90,5-222	0,356
	ispitanici bez intestinalne resekcije	37	113	57-196,5	

* broj raspoloživih opažanja

5.5. Genski polimorfizmi i sklonost obolijevanju

5.5.1. Hardy-Weinbergov ekvilibrij

Genotipske frekvencije svih analiziranih polimorfizama bile su u Hardy-Weinbergovom ekvilibriju, kako u kontrolnoj skupini, tako i u ukupnom uzorku ispitanika (Tablice 5.14. do 5.16.).

Tablica 5.14. Usporedba alelnih frekvencija IL-6 rs1800795 inačice (SNP) između ispitanika oboljelih od upalnih bolesti crijeva (UBC) i kontrolne skupine.

SNP	alel	Frekvencija (UBC)	Frekvencija (kontrole)	OI* (95 % IP)	P*	HWE† (kontrole) P	HWE† P (svi)
rs1800795	C	0,419	0,391	1,12-1,75	0,973	0,613	0,425

IP interval pouzdanosti, HWE Hardy-Weinbergov ekvilibrij, OI omjer izgleda

* empirijska P-vrijednost, 10^4 permutacija, Westfall-Youngova korekcija

† Guo-Thompsonov egzaktni test

Tablica 5.15. Usporedbe alela genskih polimorfizama (SNP) IL-23R između UBC ispitanika i kontrolne skupine.

SNP	alel	Frekvencija (UBC)	Frekvencija (kontrole)	OI* (95 % IP)	P*	HWE† kontrole P	HWE† P (svi)
rs11209026	A	0,021	0,071	0,28 (0,11-0,75)	0,014	1	1
rs7530511	T	0,105	0,101	1,04 (0,57-1,9)	1	0,054	0,727

IP interval pouzdanosti, HWE Hardy-Weinbergov ekvilibrij, OI omjer izgleda

* empirijska P-vrijednost, 10^4 permutacija, Westfall-Youngova korekcija

† Guo-Thompsonov egzaktni test

Tablica 5.16. Razdioba alela genskih STAT3 polimorfizama (SNP) između UBC ispitanika i kontrolne skupine

SNP	alel	Frekvencija (UBC)	Frekvencija (kontrole)	OI* (95 % IP)	P*	HWE† kontrole P	HWE† P (svi)
rs744166	G	0,368	0,368	1 (0,68-1,46)	1	0,51	0,327

IP interval pouzdanosti, HWE Hardy-Weinbergov ekvilibrij, OI omjer izgleda

* empirijska P-vrijednost, 10^4 permutacija, Westfall-Youngova korekcija

† Guo-Thompsonov egzaktni test

5.5.2. IL-6 rs1800795

Razdioba genotipskih i alelnih frekvencija u oboljelih i kontrolnih ispitanika prikazana je tablicom 5.17. U genotipskoj analizi, homozigotni nositelji češćega alela predstavljaju referentnu skupinu. Nisu zapažene značajne razlike u zastupljenosti alelnih i genotipskih inačica između ispitanika i oboljelih, bilo skupno, bilo prema UC-u ili CB-u.

Tablica 5.17. Usporedba učestalosti genotipova i alela interleukin 6 (IL-6) rs1800795 između ispitanika oboljelih od upalnih bolesti crijeva (UBC) i kontrolne skupine.

Genotipske asocijacije					
Fenotip	Genotip	UBC n (%)	Kontrole n (%)	P*	OI (95 % IP)
UBC	CC	16 (16,2)	9 (13)		1,33 (0,5-3,65) §
	GC	51 (51,5)	36 (52,2)	0,976	1,06 (0,53-2,1)
	GG	32 (32,3)	24 (34,8)		Ref
CB	CC	8 (25)	9 (13)		2,37 (0,67-8,24)
	GC	15 (46,9)	36 (52,2)	0,145	1,11 (0,42-3,05)
	GG	9 (28,1)	24 (34,8)		Ref
UC	CC	8 (11,9)	9 (13)		0,93 (0,3-2,89)
	GC	36 (53,7)	36 (52,2)	0,846	1,04 (0,5-2,19)
	GG	23 (34,4)	24 (34,8)		Ref

Alelne asocijacije					
Fenotip	Alel	Frekvencija (UBC)	Frekvencija (kontrole)	P*	OI (95 % IP)
CB	C	0,484	0,391	0,651	1.46 (0,8-2,65)
UC	C	0,388	0,391	1	0,99 (0,59-1,66)

CB oboljeli od Crohnove bolest, IP interval pouzdanost, OI omjer izgleda, Ref referentni genotip, UC oboljeli od ulceroznoga kolitisa,

* empirijska P-vrijednost, 10^4 permutacija, Westfall-Youngova korekcija

5.5.3. IL-23R rs11209026 i rs7530511

Genotipizacija je provedena na 50 CB ispitanika (26 muških) i na 93 UC ispitanika (52 muška) te na 93 ispitanika kontrolne skupine.

Frekvencije alela u populaciji zdravih kontrola bile su slične onima koje navode prethodna istraživanja u kojima su ispitanici bili pripadnici bjelačke rase (18). Kao što se vidi iz tablice 5.15., u ispitanika s UBC-om (dakle, kada se objedine CB i UC), alel rs11209026A bio je različito distribuiran u skupini oboljelih i zdravih kontrola (2,1 % i 7,1 %, P = 0,014),

što ukazuje na značajno smanjenje omjera izgleda za UBC za nositelje A alela (alelski OI 0,28; 95 % IP 0,11–0,75).

Tablica 5.18. Usporedbe alela polimorfizma jednoga nukleotida (SNP) receptora za interleukin 23 (IL-23R) između oboljelih od upalnih bolesti crijeva (UBC) i kontrolne skupine prema fenotipu bolesti.

Fenotip	SNP	alel	Frekvencija (UBC)	Frekvencija (kontrole)	OI (95 % IP)	P*
CB	IL-23R rs11209026	A	0	0,071	0,09 (0-0,57)†	0,013
	IL-23R rs7530511	T	0,12	0,101	1.21 (0,57-2.6)	0,871
UC	IL-23R rs11209026	A	0,032	0,071	0,44 (0,16-1,17)	0,185
	IL-23R rs7530511	T	0,097	0,101	0,95 (0,49-1,87)	1

CB oboljeli od Crohnove bolesti, IP interval pouzdanosti, OI omjer izgleda, SNP polimorfizam jednoga nukleotida, UBC oboljeli od upalnih bolesti crijeva, UC oboljeli od ulceroznoga kolitisa

* empirijska P-vrijednost, 10^4 permutacija, Westfall-Youngova korekcija

† *median unbiased estimate*

Ako se bolesti promatraju pojedinačno, učestalost alelne inačice rs11209026A (p.381Gln) bila je niža kod oboljelih od CB-a, ali ne i kod oboljelih od UC-a u usporedbi s ispitanicima kontrolne skupine (Tablica 5.18.). To upućuje na zaštitni učinak prvenstveno za CB (Tablica 5.18.). Suprotno tome, genska inačica rs7530511 nije bila povezana ni s CB-om ni s UC-om.

Tablica 5.19. Usporedba polimorfizma jednoga nukleotida (SNP) receptora za interleukin 23 (IL-23R) prema genotipu i fenotipu bolesti.

Bolest	SNP	genotip	UBC n* (%)	Kontrole n* (%)	P†	OI (95 % IP)
CB	IL-23R rs11209026	AA	0	0		-
		GA	0	14 (14.1)	0,012	0,09 (0-0-54) ‡
		GG	50 (100)	85 (85.9)		Ref
	IL-23R rs7530511	TT	0	3 (3,1)		0,57 (0-5.43)
		CT	12 (24)	14 (14.1)	0,38	1,85 (0,78-4,38)
		CC	38 (76)	82 (82.8)		Ref
UC	IL-23R rs11209026	AA	0	0		-
		GA	6 (6.5)	14 (14.1)	0,288	0,42 (0,15-1,14)
		GG	87 (93.5)	85 (85.9)		Ref
	IL-23R rs7530511	TT	0	3 (3,1)		0,29 (0-2,73)
		CT	18 (19.4)	14 (14.1)	0,381	1.41 (0,65-3,02)
		CC	75 (80,6)	82 (82.8)		Ref

IP interval pouzdanost, CB oboljeli od Crohnove bolesti, OI omjer izgleda, Ref referentni genotip, UBC oboljeli od upalnih bolesti crijeva, UC oboljeli od ulceroznoga kolitisa,

* broj raspoloživih opažanja

† empirijska P-vrijednost, 10^4 permutacija, Westfall-Youngova korekcija

‡ *median unbiased estimate*

Distribucije genotipa inačica rs11209026 i rs7530511 u genu IL-23R prikazane su u tablicama 5.19. i 5.20. Kod rs11209026 polimorfizma uočen je značajno smanjeni omjer izgleda za razvoj UBC-a (OI 0,27, 95 % IP 0,1–0,72, Tablica 5.20.), koji je vjerojatno ograničen samo na fenotip CB (mue 0,09, 95 % IP 0–0,54), za heterozignote nositelje A/G u usporedbi s homozigotnim genotipom G/G (Tablica 5.19.). Nisu uočeni homozigoti i heterozigoti alela u slučajevima CB, a niti u jednoj skupini nisu uočeni rijetki homozigoti AA. Što se tiče SNP-a rs753051, nije uočen statistički značajan učinak.

Tablica 5.20. Genotipske asocijacije, IL-23R gen, inačice rs11209026 i rs7530511

SNP	Genotip	UBC n* (%)	kontrole n* (%)	P†	OI (95 % IP)
IL-23R rs11209026	AA	0	0		-
	GA	6 (4.2)	14 (14.1)	0,015	0,27 (0,1-0,72) ‡
	GG	137 (95.8)	85 (85.9)		Ref
IL-23R rs7530511	TT	0	3 (3,1)		0,19 (0-1,8) ‡
	CT	30 (21)	14 (14.1)	0,128	1,56 (0,78-3,12)
	CC	113 (79)	82 (82.8)		Ref

IP interval pouzdanost, OI omjer izgleda, Ref referentni genotip, SNP polimorfizam jednoga nukleotida, UBC oboljeli od upalnih bolesti crijeva

* broj raspoloživih opažanja

† empirijska P-vrijednost, 10^4 permutacija, Westfall-Youngova korekcija

‡ *median unbiased estimate*

Za dva analizirana IL-23R polimorfizma, međusobno udaljena 20,571 kb, kreirani su haplotipni blokovi (D'=1, Tablica 5.21.). U komparaciji s ancestralnim haplotipom, rs11209026-rs7530511 AC haplotip udružen je sa smanjenim izgledom obolijevanja od UBC-a, uz učinak gotovo u cijelosti posredovan rs11209026A alelom.

Tablica 5.21. Analiza IL-23R rs11209026-rs7530511 haplotipa

Haplotip	Frekvencija (UBC)	Frekvencija (kontrole)	P*	OI (95 % IP)
GA	0,874	0,828	0,327	Ref
GT	0,105	0,101	1	1,02 (0,56-1,85)
AC	0,021	0,071	0,02	0,28 (0,11-0,75)

OI omjer izgleda, IP interval pouzdanost, Ref referentni haplotip, UBC upalna bolest crijeva

* empirijska P-vrijednost, 10^4 permutacija, Westfall-Youngova korekcija

5.5.4. STAT3 rs744166

Distribucija genotipa inačice rs744166 u genu STAT3 prikazana je u Tablici 5.22. Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti alela između dvaju fenotipova UBC-a i kontrolne skupine ispitanika, kao ni razlika između kontrolne skupine ispitanika i UBC skupine općenito.

Tablica 5.22. Usporedba učestalosti genotipova i alela između oboljelih od upalnih bolesti crijeva UBC i kontrolne skupine (STAT3 gen, inačica rs744166).

Fenotip	Genotip	UBC n* (%)	Kontrola n* (%)	P†	OI (95 % IPP)
UBC	GG	17 (12,1)	11 (11,6)	0,998	1,03 (0,43-2,46)
	GA	69 (49,3)	48 (50,5)		0,96 (0,55-1,68)
	AA	54 (38,6)	36 (37,9)		Ref
CB	GG	9	11 (11,6)	0,659	1,03 (0,43-2,46)
	GA	24	48 (50,5)		0,96 (0,55-1,68)
	AA	16	36 (37,9)		Ref
UC	GG	8	11 (11,6)	0,872	1,03 (0,43-2,46)
	GA	45	48 (50,5)		0,96 (0,55-1,68)
	AA	38	36 (37,9)		Ref
Fenotip	Mutirani alel	Frekvencija (%, UBC)	Frekvencija (%, kontrole)	P	OI (95 % IP)
CB	G	42,9	36,8	0,662	1.29 (0,78-2,11)
UC	G	33,5	36,8	0,874	0,86 (0,56-1,32)

CB oboljeli od Crohnove bolesti, IP interval pouzdanost, OI omjer izgleda, Ref referentni genotip, UBC oboljeli od upalnih bolesti crijeva, UC oboljeli od ulceroznoga kolitisa

* broj raspoloživih opažanja

† empirijska P-vrijednost, 10^4 permutacija, Westfall-Youngova korekcija

5.6. Epistatske interakcije polimorfizama i izgledi obolijevanja

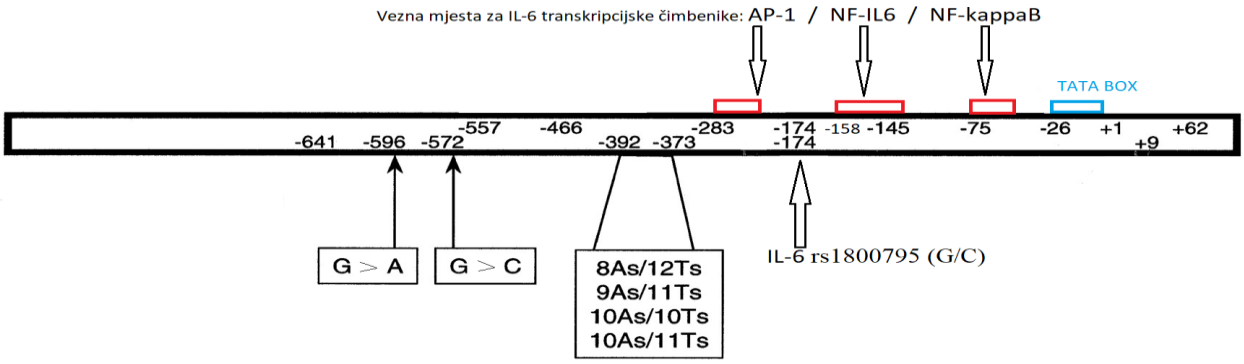
W-testom, nema znakova statistički značajnih epistatskih interakcija između parova analiziranih lokusa (Tablica 5.23).

Tablica 5.23. Epistatske interakcije između parova lokusa, W-test

Lokus1	Lokus2	P
IL-23R rs7530511	IL-6 rs1800795	0,108
IL-23R rs11209026	STAT3 rs744166	0,206
IL-23R rs11209026	IL-6 rs1800795	0,299
IL-23R rs7530511	STAT3 rs744166	0,319
STAT3 rs744166	IL-6 rs1800795	0,985

5.7. Povezanost rs1800795 sa serumskom koncentracijom IL-6

Kako bi se ispitala uloga genotipa IL-6 na serumsku koncentraciju IL-6 i serumsku koncentraciju proteina akutne faze CRP-a provedena je analiza polimorfizma u genu za IL-6 (-174, rs1800795). Slika 5.1. shematski prikazuje četiri polimorfizma regije IL-6 gena s veznim mjestom transkripcijskoga faktora NF-IL-6.



Slika 5.1. Polimorfizmi IL-6 regije gena (autorsko djelo)

Kruskal-Wallisov test pokazao je statistički značajnu razlika u koncentraciji IL-6 kod UC ispitanika s obzirom na genotip IL-6 (P = 0,045) (Tablica 5.24.). *Post hoc* Bonferroni-Dunn test pokazao je da je koncentracija IL-6 statistički značajno viša u nositelja CC genotipa u odnosu na GC genotip (Slika 5.2.). Kod CB ispitanika i UBC ispitanika u cjelini nisu uočene statistički značajne razlike koncentracije IL-6 između genotipova.

Tablica 5.24. Usporedba koncentracije interleukina 6 (IL-6) između rs1800795 genotipova (GG, GC i CC) s obzirom na fenotip bolesti (podatci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom, Kruskal-Wallisov test).

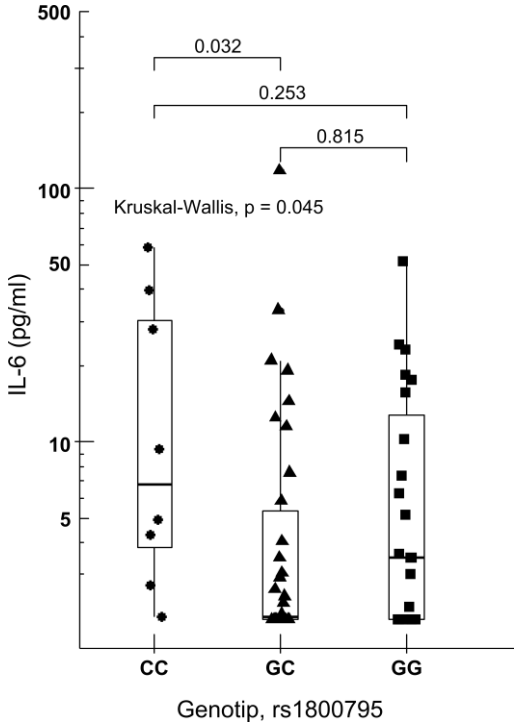
Genotip Fenotip, IL-6 (pg/mL)	GG	n*	GC	n*	CC	n*	P†
UBC	3,16 (1,99-7,91)	32	2,35 (1,99-5,27)	49	4,62 (2,79-9,36)	16	0,092
UC	3,49 (1,99-15,80)	23	2,05 (1,99-6,28)	34	7,17 (3,12-36,85)	8	0,045‡
CB	2,11 (1,99-5,16)	9	3,19 (1,99-4,69)	15	3,77 (2,24-8,03)	8	0,701

CB oboljeli od Crohnove bolesti, UC oboljeli od ulceroznoga kolitisa, UBC oboljeli od upalnih bolesti crijeva

* broj raspoloživih opažanja

† Kruskal-Wallisov test

‡ *post hoc* Dunn-Bonferronijev test (z): GC < CC (P = 0,032)



Slika 5.2. Serumska masena koncentracija interleukina 6 (IL-6) u oboljelih od ulceroznoga kolitisa prema rs1800795 genotipu. Ordinata je logaritmska os. Gornje i donje vertikalne linije *box-plot* dijagrama predstavljaju granice 1,5 x interkvartilnoga raspona. Prema Tukeyu, ekstremne vrijednosti označene su točkom, a prag značajnosti definiran je kao $P < 0,05$ (Kruskall-Wallisov test s *post hoc* Bonferroni-Dunn poredbom).

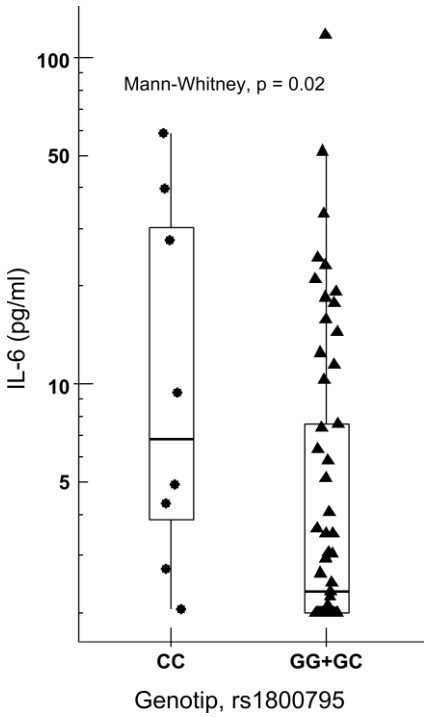
U sljedećem koraku testiran je model recesivnoga učinka C alela (CC vs. GC+GG, Tablica 5.25.). Rezultati Mann-Whitneyeva U testa pokazuju da je koncentracija IL-6 u nositelja GG ili GC genotipa statistički značajno niža od koncentracije u nositelja CC genotipa kod UC ispitanika ($P = 0,02$, Slika 5.3.). Razlika između GG+GC i CC nositelja nije značajna kod UBC-a ($P = 0,052$). Kod CB ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika serumske koncentracije IL-6 između GG + GC i CC genotipa (Tablica 5.25.).

Tablica 5.25. Usporedba koncentracije interleukina 6 (IL-6) između nositelja rs1800795 GG+GC genotipa i CC genotipa (podatci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom, Mann-Whitneyev U test).

Genotip Fenotip, IL-6 (pg/mL)	GG+GC	n*	CC	n	P
UBC	2,46 (1,99-6,44)	81	4,62 (2,79-9,36)	16	0,052
UC	2,31 (1,99-8,94)	57	7,17 (3,12-36,85)	8	0,02
CB	3,16 (1,99-4,68)	24	3,77 (2,24-8,03)	8	0,683

CB oboljeli od Crohnove bolesti, SNP polimorfizam jednoga nukleotida UBC oboljeli od upalnih bolesti crijeva, UC oboljeli od ulceroznoga kolitisa

* broj raspoloživih opažanja



Slika 5.3. Koncentracija interleukina 6 (IL-6) u oboljelih od ulceroznoga kolitisa prema rs1800795 genotipu IL-6 (GG+GC i CC, model recesivnog učinka C alela). Ordinata je logaritmska os. Gornje i donje vertikalne linije box-plot dijagrama predstavljaju granice 1,5 x interkvartilnoga raspona. Prema Tukeyu, ekstremne vrijednosti označene su točkom, a prag značajnosti definiran je kao $P < 0,05$.

5.8. Povezanost rs1800795 sa serumskom koncentracijom CRP-a

Isti postupak analize s obzirom na rs1800795 genotipove IL-6 (GG, GC, CC) proveden je i za koncentracije CRP-a. Kruskal-Wallisov test nije prikazao statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina (Tablica 5.26.).

Tablica 5.26. Usporedba koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) između rs1800795 genotipova (GG, GC i CC) s obzirom na fenotip bolesti (podatci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom, Kruskal-Wallisov test).

Genotip Fenotip, CRP (mg/L)	GG	n*	GC	n*	CC	n*	P
UBC	8,20 (2,00-21,60)	31	6,70 (1,85-37,30)	45	8,70 (4,30-167,40)	15	0,469
UC	6 (1,60-29,10)	23	6,20 (2,15-19,23)	30	90,20 (6,03-293,23)	8	0,068
CB	9,25 (3,30-18,30)	8	6,70 (1,10-70,10)	15	5,90 (1,70-16,30)	7	0,701

CB oboljeli od Crohnove bolesti, SNP polimorfizam jednoga nukleotida

UBC oboljeli od upalnih bolesti crijeva, UC oboljeli od ulceroznoga kolitisa

* broj raspoloživih opažanja

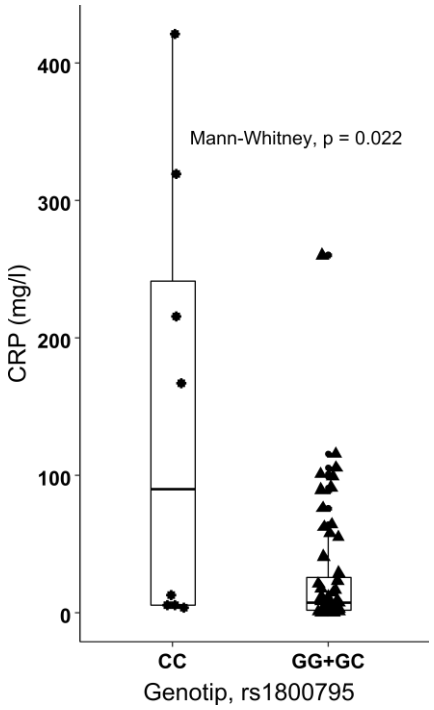
Mann-Whitneyevim testom utvrđeno je da je koncentracija CRP-a kod rs1800795 GG+GC genotipa statistički značajno niža (P = 0,022) od CC genotipa kod UC ispitanika (Tablica 5.27., Slika 5.4.). Kod UBC-a i CB-a nije utvrđena statistički značajna razlika koncentracije CRP-a za ispitivane genotipove (Tablica 5.27.).

Tablica 5.27. Usporedba koncentracije C-reaktivnoga proteina (CRP) između rs1800795 GG+GC genotipa i CC genotipa (podatci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom, Mann-Whitneyev U test).

Genotip Fenotip, CRP (mg/l)	GG+GC	n*	CC	n*	P
UBC	7,40 (2,00-23,25)	76	8,70 (4,30-167,40)	15	0,963
UC	6,00 (2,00-22,70)	53	90,20 (6,03-293,23)	8	0,022
CB	8,20 (1,10-40,70)	23	5,90 (1,70-16,30)	7	0,624

CB oboljeli od Crohnove bolesti, SNP polimorfizam jednoga nukleotida, UBC oboljeli od upalnih bolesti crijeva, UC oboljeli od ulceroznoga kolitisa

* broj raspoloživih opažanja



Slika 5.4. Koncentracija C-reaktivnoga proteina (CRP) u oboljelih od ulceroznoga kolitisa prema rs1800795 genotipu interleukina 6 (IL-6) (GG+GC i CC). Gornje i donje vertikalne linije box-plot dijagrama predstavljaju granice 1,5 x interkvartilnoga raspona. Prema Tukeyu, ekstremne vrijednosti označene su točkom, a prag značajnosti definiran je kao $P < 0,05$.

6. RASPRAVA

UBC predstavljaju kronične upalne bolesti nepredvidiva tijeka praćene spontanim remitencijama i relapsima (185, 186). Patofiziologija UBC-a još uvijek nije u potpunosti jasna, stoga su terapijski modaliteti daleko od idealnih (187). U patogenezu bolesti uključeni su imunološki, genski, okolišni i mikrobiološki čimbenici koji su predmet intenzivnoga proučavanja koje se provodi s ciljem doprinosa novim spoznajama i unapređenja pristupa dijagnostici i liječenju (188).

Pleiotropnost, signaliziranje u akutnoj i kroničnoj fazi upalne reakcije, kao i u regenerativnim mehanizmima bio je razlog uključivanja IL-6 u istraživanje. CRP, kao reaktant akutne upalne faze induciran IL-6 signaliziranjem, odabran je zbog mehanizama povratne sprege kojima pozitivno ili negativno regulira IL-6 sintezu i ujedno predstavlja imunološku sinapsu između akutne i kronične upale. Mutacije u genima za IL-23R, transkripcijski čimbenik STAT3 i IL-6 odabrani su na temelju funkcionalnih podataka, ekspresijskih i cjelogenomskih asocijacijskih studija. R381Q inačica IL-23R (rs11209026) negativno se odražava na IL-23/STAT3 ovisnu ekspanziju Th17 stanica, fosforilaciju STAT3 i prijepis interleukina 17A (IL-17A). Suprotno tome, rs744166A inačica STAT3 povezana je s povećanjem membranske frakcije JAK2/IL-6R (receptor za interleukin 6) i povećanom STAT3 fosforilacijom u odgovoru na IL-6 u transformiranim limfocitima, što može imati utjecaj na razvoj i održavanje UBC-a (189-191). Rs1800795 u genu za IL-6 povezan je s tkivnim izražajenm gena u tankome crijevu, terminalnome ileumu i sigmiodnome kolonu, kao globalno značajan eQTL (prema engl. *expression quantitative trait loci*) (192), što potencijalno može utjecati na smjer i ishod UBC-a (193, 194).

6.1. IL-6

U studiji je istražena ulogu IL-6 i ispitana serumska koncentracija IL-6 kao parametra aktivnosti CB-a i UC-a. Utvrđeno je da koncentracija serumskoga IL-6, određenoga na načelu kemiluminiscentne, sekvencijalne imunometrične metode, značajno korelira s kliničkom aktivnosti UBC-a mjerenoj prema CDAI i MTSWI. Rezultati ove studije pokazuju da postoji statistički značajna razlika između serumske koncentracije IL-6 skupine ispitanika oboljelih od UBC-a i kontrolne skupine zdravih ispitanika. Među ostalim nalazima, zapažena je i

povezanost više koncentracije IL-6 s hipoalbuminemijom, anemijom i leukocitozom u oboljelih. Korolkova i suradnici navode da su IL-6 i interferon γ (IFN-γ) povišeni u CB-u, međutim, u njihovoj studiji, za razliku od ove, nisu utvrđene povišene vrijednosti IL-6 kod oboljelih od UC-a, nego povišene vrijednosti za eotaksin i TNFα (195). Prevladava stav da je CB pretežno Th1/Th17 reguliran, dok u UC-u prevladava nekonvecionalni pomoćnički Th2/Th17 stanični odgovor. U takvim okolnostima, IL-6 je, kao multifunkcionalni citokin, potrebno sagledati i kao citokin koji balansira Th1, Treg, Th2 i Th17 ravnotežu. Feng i suradnici, slično ovome istraživanju, tako navode povišene vrijednosti IL-6 u UC-u, uz povišene vrijednosti IL-10, IL-13, IL-17 (prototipski Th17 citokin) i TNFα (196). Beck i suradnici u svom radu izvještavaju o povišenim vrijednostima IL-6 u oba tipa UBC-a, dok Rogler definira UBC kao disbalans između upalnih i protuupalnih citokina, gdje su povišene vrijednosti upravo IL-6 uz TNF, IL-8 i IL-12 (197, 198). Seegert i suradnici također izvještavaju o povišenim vrijednostima IL-6 i drugih upalnih citokina u oboljelih od CB-a kao i od UC-a (199). S druge strane, Mahida i suradnici izvještavaju o povišenim vrijednostima IL-6 u pacijenata s aktivnim CB-om, ali ne i u pacijenata s UC-om (200). Yoshimoto i suradnici u obrazloženju navode da povišena serumska koncentracija IL-6 upućuje na moguća oštećenja sluznice i crijevnoga epitela, kao i izlaganje upalnim stimulansima te da obično korelira s intenzitetom aktivnosti bolesti (201). Konačno, Reinisch i surdnici utvrdili su da je koncentracija IL-6 kod bolesnika s primarnom upalnom bolesti Crohnovoga tipa viša nego u istovrsnih bolesnika s crijevnom stenozom (202).

Ako uzmemo u obzir fenotip bolesti, IL-6 je u ovoj studiji povišen i kod oboljelih od CB-a i kod oboljelih od UC-a u odnosu na kontrolnu skupinu. Nije bilo statistički značajne razlike u serumskoj koncentraciji IL-6 između oboljelih od CB-a i UC-a. Ispitivanjem odnosa između koncentracije cirkulirajućega IL-6 i indeksa aktivnosti bolesti utvrđeno je da postoji tendencija pozitivne korelacije s kliničkom aktivnosti bolesti na MTWSI/CDAI skali u oba ispitivana fenotipa UBC-a (203). Slično ovim rezultatima, Hyams, Reinisch i drugi autori također navode da je serumski IL-6 značajno povišen u oboljelih od UBC-a, te da pozitivno korelira s upalnom aktivnosti bolesti (204, 202). Povrh navedenoga, u ovoj je studiji utvrđeno i da su serumske koncentracije IL-6 kod ispitanika s aktivnim CB-om (CDAI > 150) statistički značajno više u usporedbi s ispitanicima s neaktivnim CB-om (CDAI < 150), dok je Brown u svom istraživanju utvrdio da serumska koncentracija IL-6 korelira značajnije s indeksom aktivnosti UC-a nego CB-a (205). Slično indeksu aktivnosti CB-a, serumske koncentracije IL-6 ukazuju na snažnu pozitivnu korelaciju s indeksom aktivnosti UC-a

(MTWSI), s tim da su vrijednosti IL-6 više u skupini ispitanika s teškim UC-om (MTWSI > 6) od skupine s blagim UC-om (MTWSI < 4) (206). Suprotno rezultatima ovoga istraživanja, neke prethodne studije nisu nedvojbeno potvrdile povezanost između koncentracije serumskoga IL-6 i nalaza kliničke aktivnosti bolesti, što se dijelom pripisivalo učinku terapijski primijenjenih kortikosteroida u tim studijama koji farmakološki inaktiviraju upalne transkripcijske čimbenike na mnogim razinama, uključujući i smanjenje dostupnosti, te poluživota glasničke ribonukleinske kiseline (mRNA, prema engl. *messenger ribonucleic acid*) brojnih citokina poput IL-6 (207). Nadalje, spominje se i gubitak statističke snage u manjem uzorku ispitivanih pacijenata. Tako Gross i suradnici u svom istraživanju navode višu, iako ne i statistički značajnu, koncentraciju IL-6 u oboljelih od CB-a nego u oboljelih od UC-a. Isto tako ne nalaze pozitivnu korelaciju između serumske koncentracije IL-6 i indeksa kliničke aktivnosti bolesti (208). *In vivo*, animalne studije, međutim, podupiru ulogu IL-6 u težini bolesti: adoptivni transfer $CD4^{+}CD45RB^{high}$ T stanica $IL\text{-}6^{-/-}$ donora u SCID (prema engl. *severe combined immunodeficiency*) modelu rezultira blažom upalnom bolesti kolona (209).

Nadalje, u ovoj je studiji uočen gradijent serumskih koncentracija IL-6 u oboljelih od CB-a, u smislu aktivne bolesti koja pokazuje višu razinu u usporedbi s inaktivnom bolesti, i inaktivne bolesti koja pokazuje značajno višu koncentraciju cirkulirajućega IL-6 u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. Slično tome, Mitsuyama, Scheller, Kishimoto pokazali su da je, uz IL-6, popratno povišena i serumska koncentracija α podjedinice solubilnoga IL-6R (sIL-6Rα), što upućuje na aktivno IL-6 *trans*-signaliziranje koje se temelji na interakciji IL-6 s sIL-6Rα (210-212). Kako sintezu mnogih citokina ko-aktiviraju isti transkripcijski čimbenici, primjerice vezivanjem NFκB i aktivacijski protein 1 (AP-1) u *cis* regulacijske elemente unutar promotorske regije gena, slični stimulansi često vode združenoj koaktivaciji izražaja primordijalnih citokina poput IL-6, TNFα i IL-1β (213-215). U tom smislu, zanimljive rezultate dobili su Stevens i suradnici koji su ispitivali prisutnost IL-6, TNFα i IL-1β mRNA u crijevnim uzorcima UBC-a, upalnim poremećajima koji nisu UBC te uzorcima zdravoga crijevnoga tkiva. Razina mRNA TNFα nije se razlikovala između upalnih bolesti i kontrolnih uzoraka, dok je razina IL-1β mRNA bila najviša u aktivnom UC-u, a IL-6 transkripti bili su povišeni samo u uvjetima aktivnoga UC-a i CB-a (216). Takvim tkivnim studijama povezane su serumske koncentracije citokina s njihovom tkivnom, *in situ* izražajem u oboljeloj sluznici crijeva, zbog čega cirkulirajući IL-6, između ostaloga, vjerojatno barem dijelom zrcali i tkivna zbivanja u oboljelome organu. U ovome posljednjem segmentu potrebne su dodatne studije za

puno rasvjetljivanje doprinosa različitih staničnih i tkivnih izvora IL-6 njegovoj serumskoj razini i dinamici. U takvome je kontekstu posebno zanimljiva povišena koncentracija IL-6 u serumu bolesnika s klinički inaktivnom bolesti, što otvara prostor mnogobrojnim hipotezama o njegovom podrijetlu: od rezidualne, subkliničke upale, preko uloge crijevne flore, do procesa cijeljenja tkivne ozljede.

U pogledu potonjega, osim upalnoga signaliziranja, opisana je i uloga IL-6 u procesima regeneracije crijevnoga epitela i time smanjenju upalnih stimulansa. U prilog tomu su i slučajevi paradoksnoga pogoršanja bolesti nakon primjene tocilizumaba, monoklonalnih protutijela koja blokiraju sIL-6R reducirajući na taj način IL-6 signaliziranje. Među takvim ishodima, Atreya, Shetty i suradnici opisali su prvi puta egzacerbaciju UC-a nakon terapije tocilizumabom (217, 218).

Ovi rezultati ukazuju da IL-6 treba promatrati u širemu kontekstu, odnosno, da pored njegovoga proupalnoga signaliziranja, IL-6 ima i protuupalno i regeneracijsko djelovanje, te je kao takav potencijalno aktivno uključen u mehanizme cijeljenja crijevnoga epitela i sluznice (219, 220). U prilog otvorenoga biološkoga značaja, razina > 4000 genskih prijepisa pune krvi korelira sa serumskim IL-6, od čega > 1500 u inverznoj asocijaciji, a > 2300 u pozitivnoj sprezi (221). Među njima, značajno mjesto čine komponente glukokortikoidnoga receptorskoga signalnoga puta, što upućuje na moguću ulogu IL-6 u razvoju kortikosteroidne rezistencije (222) i posljedični neuspjeh steroidne terapije. Steroidna rezistencija važna je komponenta kliničkoga i farmakološkoga zbrinjavanja bolesnika, a uloga IL-6 kao biljega i/ili aktivnoga čimbenika u prevladavanju steroidne rezistencije mogući je smjer budućih istraživanja. Nadalje, izražaj brojnih gena povezanih s eritrocitnom funkcijom izravno i snažno korelira sa serumskim IL-6 (223), dajući mehanistički doprinos zapaženoj vezi između anemije i serumskoga IL-6 u oboljelih. Anemija u oboljelih od UBC-a posljedica je malapsorpcije i kronične bolesti, u čemu slojevitost uloge IL-6 zahtijeva pojašnjenje budućim istraživanjima.

Mjerenje serumske koncentracije IL-6 može stoga biti korisno za stratificiranje pacijenata s visokim rizikom relapsa ili stratificiranje težine bolesti. Rezultati ove studije pokazuju da serumska koncentracija IL-6 barem dijelom odražava upalnu aktivnost kod ispitanika oboljelih od CB-a i UC-a. S obzirom na značaj signaliziranja u UBC-u, IL-6 bi se mogao smatrati potencijalno značajnim ciljem za citokin specifičnu terapiju, pri čemu treba

uzeti u obzir prostorni i vremenski okvir upalne reakcije i moguću interferenciju s protuupalnim odnosno regenerativnim mehanizmima. Time je otvorena i moguća uloga IL-6 u individualiziranom probiru bolesnika za biološku ili drugu terapiju.

6.2. C-reaktivni protein

CRP nije samo biokemijski biljeg, već je i aktivni čimbenik u kontekstu UBC-a, jer predstavlja imunološku sinapsu između upalne i protuupalne aktivnosti te urođene i stečene imunosti. Izmjerene povišene vrijednosti CRP-a kod skupine ispitanika oboljelih od UBC-a pozitivno koreliraju sa serumskom razinom IL-6. Povišene vrijednosti CRP-a u studiji izmjerene su i kod skupina ispitanika oboljelih od CB-a i oboljelih od UC-a s tim da nema statistički značajne razlike između tih dviju skupina. Slično tome, Yang i suradnici u svome radu definiraju CRP kao marker aktivnosti CB-a koji pozitivno korelira s CDAI, ali i sa serumskom koncentracijom IL-6 (224). Istraživanja Solema i suradnika također navode povišene serumske koncentracije CRP-a kod oboljelih od UC-a i CB-a, uz pozitivnu korelaciju s indeksom aktivnosti bolesti (225), dok rezultati Fagana i suradnika indiciraju da su koncentracije CRP-a povišene u oba fenotipa, s tim da su značajnije više u oboljelih od CB-a od onih u oboljelih od UC-a (226). Vrijednosti CRP-a u studiji pozitivno koreliraju s indeksom aktivnosti UC-a mjerenom skalom MTWSI, ali ne i indeksom aktivnosti CB-a mjerenom skalom CDAI.

IL-6, oslobođen iz neutrofila, monocita i makrofaga TLR/NOD2 kaskadom, glavni je citokin koji inducira sintezu reaktanata akutne faze u jetri, kao što su CRP, serumski amiloid A, haptoglobin i fibrinogen (227-229). CRP proteolitički odcjepljuje (solubilizira) ektodomenu membranski vezanoga IL-6Rα pospješujući učinak IL-6 *trans*-signaliziranjem (230). Interakcija IL-6 s novonastalim sIL-6Rα potom stabilizira kompleks i na taj način povećava biodostupnost i poluživot IL-6 za 50% (231). To je ključni mehanizam aktivnosti IL-6, budući da samo ograničeni broj stanica, uglavnom polimorfonuklearne stanice, monociti, hepatociti, makrofagi, epitelne stanice te Th1 i Th2 limfociti, izražavaju membranski vezan IL-6Rα (232, 233). Posljedično, IL-6 u aktiviranim T limfocitima povećava izražaj protuapoptotskih gena, poput Bcl-2 i Bcl-xl, poglavito posredstvom STAT3, što omogućuje preživljenje, akumulaciju i klonsku ekspanziju antigen-specifičnih T stanica (234, 235).

U ovome radu, serumski CRP kao i SE očekivano odražavaju razine cirkulirajućega IL-6, direktnim i indirektnim mehanizmima (236). Slične rezultate dalo je istraživanje Browna koji navodi da IL-6 predstavlja osjetljiviji marker mikrointestinalne upale od SE s osjetljivošću od oko 82 % i specifičnošću od čak 100 % (205, 237). Suprotno navedenim istraživanjima, Jones i suradnici utvrdili su da su vrijednosti CRP-a i IL-6 povišene u oboljelih od CB-a, ali da postoji pozitivna korelacija s endoskopskom, a ne kliničkom aktivnosti bolesti (238), dok Poullis i suradnici navode kako su koncentracije CRP-a povišene i u oboljelih od CB-a i oboljelih od UC-a uz povišenu SE, s tim da su vrijednosti CRP-a bile više u skupini oboljelih od CB-a (239). Florin i suradnici izvještavaju o povišenim vrijednostima CRP-a u oboljelih od CB-a, ali isto tako opisuju pacijente s aktivnim CB-om uz perzistirajuće niske vrijednosti CRP-a (240). Ovaj bi fenomen mogao upućivati na nizak indeks tjelesne mase (podatak nedostupan u ovom radu), te stenozirajući nasuprot penetrativni CB.

Povišene bi koncentracije IL-6 i CRP-a u ispitanika s inaktivnim CB-om u studiji mogle upućivati na aktivaciju mukoznoga imunološkoga sustava ili povećanje crijevne propusnosti. Svi navedeni stimulansi mogu aktivirati sintezu IL-6 i CRP-a u osoba s inaktivnim CB-om, ali se isto tako povećana IL-6 produkcija može pripisati mogućem postojanju subkliničke, ali ipak relevantne rezidualne upalne aktivnosti bolesti. Van Kemseke, Schreiber, Wyatt i drugi autori navode da ove biološke abnormalnosti, utvrđene u ranijim studijama, mogu biti povezane s povećanim rizikom relapsa, obično unutar godine dana (241-243). Gross i suradnici izvještavaju o pozitivnoj korelaciji između serumske koncentracije CRP-a i drugih proteina akutne faze koji pozitivno koreliraju s indeksom kliničke aktivnosti UBC-a za razliku od IL-6 (208). Moguće objašnjenje ovakvih rezultata leži u relativno brzome raspadu IL-6, tehničkim poteškoćama u mjerenju IL-6 komercijalno dostupnim kitovima, načinu čuvanja i obrade seruma, diurnalnim varijacijama, različitim obilježjima populacije, te brzom klirensu putem jetre, za razliku od proteina akutne faze koji imaju duži poluživot (244).

S druge strane, na poluživot CRP-a ne utječu fiziološki ili patofiziološki mehanizmi, što rezultira smanjivanjem njegove koncentracije u razdoblju smanjene upalne aktivnosti, obično 19 sati nakon sinteze, čime se omogućuje primjena CRP-a kao biomarkera terapijske učinkovitosti (245, 246). Pri tome, potencijalna patobiološka uloga samoga CRP-a varijabilna je i nejasna, i vjerojatno nadmašuje ulogu pukoga biokemijskoga i terapijskoga biljega.

Naime, Zouki i suradnici ističu da CRP i peptidi proizašli iz CRP-a inhibiraju L-selektinom posredovanu interakciju neutrofila s endotelnim stanicama, vjerojatno vežući se za CD32, što je prvi korak ekstravazacije neutrofila (247). Također, CRP proteolitički odcjepljuje ekstracelularnu domenu L-selektina mehanizmom sličnim odcjepljivanju ekstracelularne domene membranskoga IL-6R. Niže koncentracije CRP-a također favoriziraju asocijaciju CRP-a za FcγRI, FcγRIIa i FcγRIIIa receptore makrofaga, što za posljedicu ima dodatnu sintezu i otpuštanje upalnih citokina poput IL-1, IL-6 TNFα (248, 249). Viša koncentracija CRP-a, naprotiv, favorizira vezivanje s FcγRIIb makrofaga, što rezultira supresijom sinteze proupalnih citokina u negativnoj povratnoj sprezi, dijelom posredstvom IL-10^{+}Treg stanica. Nadalje, Reinisch i suradnici navode da serumske koncentracije različitih proteina akutne faze mogu predvidjeti klinički relaps, iako samo kombinacija više laboratorijskih testova može pružiti pouzdaniji prediktivni indeks (202). Iako usporedba ispitanika oboljelih od CB-a s intestinalnom resekcijom s ispitanicima oboljelim od CB-a koji nisu imali prethodnu resekciju u ovoj studiji nije dala statistički značajnu razliku u serumskim koncentracijama IL-6 i CRP-a, odsustvo razlike nije moguće definitivno isključiti, prvenstveno zbog male veličine uzorka. Nadalje, određene razlike mogu biti posljedica i različitih medikamentnih terapijskih modaliteta, terapije održavanja (dijelom kortikosteroidne, premda nije uočena formalno značajna razlika u koncentraciji IL-6 ili CRP-a u ispitanika liječenih i neliječenih steroidima), ali i dvojnih učinaka samoga IL-6 i CRP-a. Konačno, spol, pušenje, udjel masnoga tkiva i komorbiditeti također mogu doprinijeti razlikama (250, 251).

6.3. Utjecaj polimorfizama gena u UBC-u

Genetske varijacije, kao što su polimorfizmi jednoga nukleotida, odnosno mutacije, mogu imati utjecaj na transkripcijsku efikasnost gena, poluživot mRNA, i strukturu proteinskoga produkta, a samim time i na njegovu funkciju (252). Stoga, kada su varijacije gena vezane za upalne citokine, a upalni proces je jedan od faktora rizika, određene varijacije mogu rezultirati većim intenzitetom upalnoga procesa i time povećanim rizikom za nastanak i razvoj upalnih ozljeda tkiva. (253). Međutim, istraživanja utjecaja genskih mutacija na tkivni izražaj i serumsku razinu citokina u UBC-u još su uvijek proturječna, iako novije studije upućuju na moguću ulogu genskih polimorfizama u razvoju i progresiji bolesti (254). Mutacije su stoga potencijalni terapijski i dijagnostički markeri mnogih bolesti (255), a kako je frekvencija alela rezultat akumulacije mutacija i selekcijskih procesa u populaciji,

frekvencija može varirati između različitih populacija, pa bi se raspodjela polimorfizama i njihov značaj mogli razlikovati među različitim etničkim skupinama (256). Cilj je ove studije bio utvrditi imaju li genske inačice upalnih medijatora utjecaj na povećani rizik razvoja upalnih bolesti crijeva, ispitati postoji li razlika u frekvenciji izabranih genskih polimorfizama između pacijenata s UBC-om i zdrave kontrolne skupine ispitanika, te ima li razlika u frekvenciji polimorfnih inačica između UC-a i CB-a. Nadalje, testirano je postoji li povezanost između serumske koncentracije IL-6, CRP-a i polimorfizama IL-6 gena kod obaju fenotipova UBC-a.

6.4. Polimorfizam IL-6 gena

Najviše je proučavan funkcionalni polimorfizam, transverzija -174 G/C promotorske regije gena za IL-6 (rs1800795, 7_22766645_C_G, GRCh37.p13), koji je bio i predmet ovoga istraživanja. Gen za IL-6 smješten je na kraćem kraku kromosoma 7 (7p15.3), i sadrži 6 eksona (257), dok je ispitivani polimorfizam lociran 174 parova paza uzvodno od TATA slijeda IL-6 gena. Uočeno je da G/C izmjena na poziciji 174 promotorske regije utječe na transkripciju aktivnost gena što rezultira promjenama u produkciji IL-6 (258, 259). Uz alel G koji pojedini autori smatraju visokoproducirajućim (genotip GG i GC), opisan je pojačani izražaj IL-6 u serumima nositelja (260), dok se alel C (CC) povremeno opisuje kao niskoproducirajuća inačica u nekim manjim studijama, upućujući na moguću zaštitnu funkciju (261). Ograničeni, *in vitro* rezultati transfekcijskih studija podupiru ovu podjelu (262). Drugi rezultati, međutim, nalažu oprez u ovako pojednostavljenom shvaćanju njihove uloge. Primjerice, vrlo robustan genotipski gradijent izražaja zabilježen je za transkripte IL-6 lokusa (AC073072.5) u tkivnim uzorcima (n = 203) sigmoidnoga i transverzalnoga kolona GTEx projekta, a sličan učinak zapažen je i u nizu drugih tkiva (192).

Skupina ispitanika oboljelih od UBC-a iz ove studije i kontrolna skupina zdravih ispitanika ne razlikuju se značajno razdiobom alelnih i genotipskih frekvencija rs1800795. Pri tom, zabilježena frekvencija mutiranoga alela u kontrolnoj populaciji slijedi očekivane vrijednosti za europske populacije i populacije europskoga podrijetla (263). Također nije bilo statistički značajne razlike u razdiobi alelnih frekvencija između dvaju fenotipova UBC-a, što navodi na zaključak da predispozicijska uloga ovoga polimorfizma u UBC-u nije snažna, niti diferencijalna, ili je očekivana veličina učinka manja od dosega statističke snage ovoga

uzorka. Iako se drugi funkcionalni ili regulacijski polimorfizam u neravnoteži alelne povezanosti s analiziranom inačicom ne može isključiti, trenutno nema takvih očiglednih kandidata u području IL-6 lokusa.

Istraživanja koja su u Dublinu proveli Balding i Livingstone pokazuju da je rs1800795 uključen u upalni odgovor i da doprinosi osjetljivosti na bolest i fenotipu kod pacijenata s UBC-om (264). Istraživanja Guerreira u španjolskoj populaciji pokazuju da GG homozigoti imaju šest puta veći rizik obolijevanja od CB-a (141). Međutim, Pawlik i suradnici navode kako distribucija IL-6 genotipa ne pokazuje značajnu razliku između pacijenata i kontrolne skupine (265), dok su Banday i suradnici utvrdili kako je CC inačica rs1800795 nije značajno povezana s izgledima pobola, nego s izgledima za dugoročne komplikacije, poput razvoja kolorektalnoga karcinoma kao jedne od posljedica dugotrajnoga UBC-a (266). Kod tumačenja takvih rezultate potrebno je ipak uzeti u obzir i statističke teškoće u pravilnoj analizi sekundarnih podobilježja bolesti koje obično zahtijevaju primjenu novijih postupaka za pravilnu kontrolu greške tipa I (267, 268). Među drugim uzrocima nehomogenih i nedosljednih rezultata dominira skromna veličina uzoraka, čemu vjerojatno doprinosi klinička heterogenost bolesti, kao i brojni tehnički i eksperimentalni detalji.

Na razini regulacije prijepisa gena, Sawczenko i suradnici izvještavaju o višim serumskim razinama IL-6 vezanima za GG genotip u djece oboljele od CB-a, kao i o višim razinama CRP-a. Visoke razine IL-6 povezuju se tako sa zaostajanjem u rastu kod djece oboljele od CB-a (269). Također, nakon mjerenja razine IL-6 u plazmi kod 102 zdrava ispitanika s područja Londona, alel C bio je povezan sa značajno nižom razinom IL-6 plazmi od alela G (270). Ostaje nejasno, međutim, je li ovakav rezultat samostalan i neovisan učinak rs1800795, ili rezultat sinergije više kolokaliziranih, netipiziranih inačica unutar istoga haplotipnoga bloka. Osim ovakvih *cis*-učinaka, opisani su i *trans*-učinci na izražaj IL-6 (271), što ne isključuje niti učinak udaljenih alelnih inačica (260). Ispitivanjem odnosa rs1800795 i serumskih razina CRP-a i IL-6 u ovom radu pronađene su statistički značajne više koncentracije IL-6 i CRP proteina u oboljelih nositelja genotipa CC u usporedbi s nositeljima GG i GC genotipa, poglavito u modelu recesivnoga učinka C alela. Uzroci proturječnih asocijacija ostaju nejasni, stoga ne bi trebalo izvoditi snažne zaključke iz ovih studija. Između ostaloga, maleni ukupni broj opažanja i marginalna razlika nalažu oprez, a drugi uzroci obuhvaćaju različitost populacija bolesnika po dobi, spolu, aktivnosti i trajanju bolesti, terapijskim modalitetima, epigenetici, naslijeđu i rasi. U *in vitro* studijama izražaja gena treba

primijetiti i moguću razliku rezultata prema staničnim linijama i izboru referentnih prijepisa, uz poseban oprez pri tumačenju rezultata izražaja IL-6 u HeLa kulturama (272-274). Rezultate ove studije treba stoga prije svega shvatiti kao doprinos raspravi o utjecaju genskih mutacija na izražaj serumskoga IL-6 u UBC-u. Iz svega navedenoga jasno je da regulacija izražaja IL-6 daleko nadmašuje jednostavne podjele, poput one na univerzalne, nisko- i visokoproducirajuće alelne inačice IL-6 gena.

6.5. IL-23R i STAT3 transkripcijski čimbenik

Efektorske $CD4^+$ T stanice imaju visok stupanj heterogenosti povezan s različitim profilom sinteze citokina (275). Među njima, primjerice, IL-6 ima ključnu ulogu u regulaciji ravnoteže između Th17 i tolerogenih T stanica tako što inhibira razvoj perifernih $FoxP3^+$Treg limfocita i preusmjerava razvoj zajedničkih naivnih prekursora u Th17 liniju indukcijom izražaja IL-23R, transkripcijskoga faktora RORγt i STAT3 (276-278). Jedan od mogućih uzročnika narušene Th17/Treg ravnoteže uključuje stoga i varijacije u strukturi gena za IL-6, STAT3, i IL-23R (279). STAT3 izravno regulira izražaj IL-23R, a funkcijski ili regulacijski polimorfizmi IL-23R, poput rs11209026 ili rs7530511, moduliraju djelovanje IL-23 na Th17 diferencijaciju (280-282). Ove bi se promjene mogle primijeniti u kliničkoj dijagnostici pacijenata s UBC-om i drugih multifaktorijalnih genetičkih poremećaja koji rezultiraju upalnim procesom, budući da bi se polimorfizmi mogli primjenjivati kao biološki markeri rizika pobola.

6.6. Utjecaj polimorfizma IL-23R i STAT3 transkripcijskoga čimbenika

Gen za IL-23R lociran je na kromosomu 1 (1p31.3) i sadrži 13 eksona (283). Sastoji se od IL-12β1 i IL-23R lanca i visoko je eksprimiran na staničnim membranama memorijskih T stanica, NK stanica (prema engl. *natural killer cells*), monocita i dendritičnih stanica (284). STAT3 gen kodira transkripcijski faktor koji ima ključnu ulogu u moduliranju izražaja gena posredovane signaliziranjem citokina, a lociran je na dužem kraku kromosoma 17 (17q21.2) (285, 286).

Rezultati ispitivanja rs11209026 (1_67705958_G_A) u genu za IL-23R u ovoj studiji ukazuju na značajno češću pojavnost rs11209026A u zdravih ispitanika u odnosu na oboljele, što sugerira da ovaj polimorfizam ima zaštitni učinak. U studiji je uočena i odsutnost A alela u UC-u za razliku od CB-a, vjerojatno uslijed očekivano niske populacijske frekvencije ove mutacije u europskih bijelaca (287). GA genotip pokazao se kao zaštitni, poglavito za CB. Ispitivanje rs7530511 (1_67685387_T_C) inačice za IL-23R nije ukazalo na povezanost s CB-om ili UC-om, niti s UBC-om općenito. Promatrajući rs7530511, nedostatak povezanosti upućuje na to da ovaj polimorfizam nema utjecaj na razvoj i smjer UBC-a, iako je povezan s drugim autoimunim poremećajima, kao što je ankilozantni spondilitis i psorijaza. Mala veličina uzorka, međutim, ne isključuje efekte umjerenih učinaka, ispod dosega statističke snage uzorka. S obzirom na to da je rs7530511 dio haplotipa zajedno s rs112090026, u ispitivanju osjetljivosti prema bolestima može biti potrebno ispitati haplotip umjesto samostalnoga polimorfizma (288).

Zaštitni učinak SNP rs11209026 gena za IL-23R u ovoj populaciji ispitanika sukladan je s objavljenim podatcima drugih ispitivanja, kao i meta-analiza u kojima je također uočena statistički značajno manja zastupljenost ovoga polimorfizma u ispitanika oboljelih od CB-a. Istraživanja u njemačkoj, češkoj, španjolskoj, novozelandsko-belgijskoj, mađarskoj i britanskoj populaciji bijelaca potvrđuju ove rezultate (289-294). Duerr, Lacher, Weersma, i drugi autori, slično ovim rezultatima, utvrdili su kako nema povezanosti između ovoga polimorfizma s UC-om (161, 162, 295), premda niska populacijska frekvencija A alela znači potrebu za iznimno velikim brojem ispitanika za isključenje malih učinaka (< 5 %). Ovakvi rezultati stoga upućuju kako na potencijalne razlike u patofiziološkome mehanizmu između CB-a i UC-a, tako još više na razlike uvjetovane različitom zastupljenošću ovih mutacija u različitim populacijama. Tako, suprotno ovome istraživanju, Büning i suradnici navode rs11209026 inačicu kao zaštitnu i za UC (296). Cilj je ovakvih istraživanja genetičke podložnosti za kronične bolesti prilagođavanje dijagnostičkih modaliteta točno određenome genetskome profilu bolesnika u svrhu optimiziranja terapije, primjerice ustekinumabom - IgG1κ monoklonskim protutijelima protiv p40 podjedinice humanoga IL-12 i IL-23 (297). Budući da su rezultati ovakvih i sličnih studija još uvijek uvelike heterogeni, klinička vrijednost genotipizacije za sada nije jasna. Jedan od razloga često oprečnih rezultata može se povezati s velikim brojem polimorfizama i varijacijama blok strukture u humanome genomu, ali i genetičkim studijama suboptimalne snage. Tako, suprotno navedenim studijama, rezultati u litvanskoj i čileanskoj populaciji ne ukazuju na povezanost rs11209026 ni s CB-om ni s

UC-om (298, 299). Kontradiktorni rezultati mogli bi ukazivati na utjecaj etničkoga čimbenika u genetskoj pozadini UBC-a, s obzirom na razlike u polimorfnom sadržaju genoma evolucijski divergentnih populacija, što nameće potrebu opsežnih ispitivanja u različitim etničkim skupinama kako bi se dobila jasnija slika. Između navedenih kohortnih studija provedeno je i nekoliko velikih meta-analiza koje su određivale povezanost IL-23R inačica s UBC-om. Meta-analiza koju su proveli Li i suradnici potvrđuje polimorfizam rs11209026 i rs7517847 IL-23R gena kao zaštitni za razvoj CB-a (300). Povezanost nadalje potvrđuje i veza s drugim imunološkim poremećajima. Tako je uz rs7530511 vezana psorijaza, psorijatični artritis i ankilozantni spondilitis (160, 301, 302) dok je uz rs11209026 vezana psorijaza, reumatoidni artritis, kronični sarkoiditis, ankilozantni spondilitis (303-306).

U istraživanju je ispitan utjecaj i intronskoga polimorfizma rs744166 (17_40514201_A_G) unutar STAT3 gena na omjere izgleda za pobol od UBC-a. STAT3 je unutarstanična efektorska molekula signaliziranja citokina i faktora rasta i glavni je regulator Th17 i FoxP3^{+}Treg polarizacije (307, 308). U bolesnika s CB-om zabilježena je aktivacija STAT3 u crijevnim i perifernim CD4^{+} T stanicama dok je kod bolesnika s UC-om uočeno prekomjerno nakupljanje aktiviranoga STAT3 u mononuklearnim stanicama *laminae propriae* i epitelnim stanicama kolona (309).

U humanim i animalnim modelima kolitisa ograničena aktivacija STAT3 posreduje zaštitnim mehanizmima, kao što je akutno cijeljenje povrede crijevnoga epitela i protuupalni učinak IL-10 (310). Također je u studijama potvrđeno da je STAT3 potreban za održavanje cjelovitosti crijevnoga epitelnoga monosloja. Suprotno, perzistirajuća aktivacija STAT3 doprinosi progresiji bolesti i malignoj transformaciji (311).

Cilj je studije bio ispitati ima li funkcionalni SNP rs744166 u STAT3 genu utjecaj na rizik obolijevanja od CB-a i UC-a i bi li njegova fenotipska povezanost bila korisna u kliničkim prognozama. STAT3 rs744166 lociran je u intronskoj regiji između eksona 1 i 2 STAT3 gena i regulira izražaj gena (312). Uočena frekvencija alela kontrolne skupine ispitanika u studiji podudara se sa sličnim ispitivanjima bjelačke populacije (36,8 %, alel G). Nije uočena statistički značajna razlika u frekvenciji gena i alela između kontrolne i skupine ispitanika oboljelih od UBC-a, što upućuje na to da STAT3 rs 744166 inačica nije povezana s osjetljivošću na CB i UC kao ni s intenzitetom bolesti u hrvatskoj populaciji. Za rs744166 inačicu Ferguson i suradnici ustanovili su da alel G i GG genotip imaju zaštitni učinak protiv

CB-a (313), a slični rezultati dobiveni su studijom u kineskoj Han populaciji (191), dok su Waterman i suradnici u kanadskoj studiji utvrdili povezanost rs744166 i s CB-om i UC-om (314). Suprotno, studija u njemačkoj populaciji Franke i suradnika nije pokazala povezanost s CB-om (315). U turskoj je populaciji ispitanika rs744166 povezan s rizikom obolijevanja od CB-a, ali ne i UC-a. Također je u istoj studiji utvrđena povezanost rs744166 sa stenozirajućim CB-om (316). Slično, Kanadska studija provedena na djeci oboljeloj od CB-a upućuje na povezanost rs744166 s CB-om (317).

Iako neke studije upućuju na to da bi različite inačice gena mogle imati utjecaj na izražaj ili aktivnost STAT3 povezujući s tim osjetljivost prema UBC-u ili povećanom riziku razvoja karcinoma, rezultati su tih studija nedosljedni, a mehanizmi kojim djeluju na patogenezu bolesti nejasni. Isto tako UBC u različitim populacijama može imati različite imunogenetičke mehanizme, Nadalje, STAT3 lokus može imati drugačiju strukturu neravnoteže alelne povezanosti u različitim populacijama. Studije s većim uzorkom kao i između različitih etničkih skupina omogućile bi pouzdaniju interpretaciju rezultata.

6.7. Ograničenja studije

Ova je studija djelomično ograničena nedostatkom longitudinalnoga mjerenja serumskoga IL-6 u pacijenata s remisijom induciranom steroidima, kao i terapijom održavanja, što bi, vjerujemo, dalo bolji uvid u dinamiku i vrijednost IL-6 kao prediktora relapsa. U trenutku uzimanja uzorka UBC ispitanici imali su različite terapijske modalitete kao i različito trajanje bolesti. Broj analiziranih citokina bio je ograničen, stoga nije bilo moguće procijeniti eventualni doprinos drugih kemokina, budući da je izražaj citokina obično koordinirani događaj i uključuje istovremeni suizražaj više članova obitelji. Također, s obzirom na to da većinu dobrovoljnih davatelja krvi čine muškarci, kontrolna populacija ispitanika nije potpuno uravnotežena. Svakako treba uočiti i ograničenu veličinu uzorka, kao i nepotpunu dostupnost podataka o nekim kliničko-laboratorijskojm varijablama u pojedinih ispitanika. Nedostatak podatka o endoskopskoj aktivnosti bolesti, kao i histopatološkim obilježjima crijeve sluznice otvara vrata budućim studijama, u koje treba uključiti i analizu tkivnoga izražaja kemokina, te fenotipizaciju tkivnih populacija imunosnih stanica. Konačno, sociodemografske varijable, životne navike, sastav tijela, i razlike u crijevnom mikorobiomu također mogu utjecati na rezultate.

7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenoga istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Serumske koncentracije IL-6 povišene su u oba fenotipa UBC-a s obzirom na kontrolnu skupinu ispitanika i pozitivno koreliraju s kliničkom aktivnosti bolesti mjerenom prema skalama CDAI i MTWSI. Uočene su i povišene vrijednosti IL-6 kod ispitanika s aktivnim CB-om (CDAI > 150) u odnosu na ispitanike s neaktivnim CB-om (CDAI ≤ 150). Koncentracije IL-6 kod ispitanika s neaktivnim CB-om bile su više nego kod ispitanika u kontrolnoj skupini.
- Analizom polimorfizma promotorske regije IL-6 rs1800795 nisu uočene razlike u učestalosti alela između CB, UC i kontrolne skupine ispitanika, ni razlike između kontrolne skupine ispitanika i UBC skupine općenito. Utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji IL-6 kod UC ispitanika s obzirom na genotip IL-6. Koncentracija IL-6 viša je kod CC genotipa u odnosu na GC i GG genotip, u prilog recesivnog modela alelnih učinaka rs1800795C inačice.
- Distribucije genotipa inačica rs744166 u genu STAT3 ne razlikuju se značajno u CB, UC, kao ni UBC općenito.
- Analiza polimorfizma IL-23R rs11209026 ukazuje na značajno smanjenje omjera izgleda za razvoj UBC-a među nositeljima mutiranoga alela, poglavito za CB fenotip. Inačica rs7530511 nije povezana s CB-om, UC-om niti s UBC-om općenito.
- Nisu uočene statistički značajne epistatske interakcije između parova analiziranih lokusa.
- Serumske koncentracije CRP-a povišene su i u CB i UC skupini ispitanika u odnosu na referentne vrijednosti. Pozitivno su korelirale s indeksom kliničke aktivnosti UC-a, mjerenom prema skali MTWSI. Koncentracije CRP-a bile su niže u grupi ispitanika s prethodnom intestinalnom resekcijom u usporedbi s ispitanicima bez intestinalne resekcije.
- Koncentracija serunmskog CRP-a u nositelja IL-6 rs1800795 GG + GC genotipa niža je od CC genotipa kod UC ispitanika.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Crohnova bolest i ulcerozni kolitis obilježeni su kroničnom upalom crijeva nepredvidiva tijeka koja je imunološki posredovana. U uvjetima dugotrajne upale moguć je razvoj prekancerogenih displastičnih lezija i karcinoma crijeva povezanih s mjestima aktivne upale. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati učinke citokina, biokemijskih biljega i polimorfizama gena na razvoj CB-a, UC-a i UBC-a općenito te utvrditi razlike između UBC i kontrolne skupine ispitanika.

Nacrt studije: U 143 ispitanika, podijeljenih s obzirom na dijagnostičke kriterije u CB i UC skupinu ispitanika, te 100 ispitanika kontrolne skupine izmjerene su serumske koncentracije IL-6 i CRP-a te su određene genske inačice gena čiji se genski produkti smatraju posrednicima upale (IL-6) ili su povezani s proupalnim signaliziranjem (STAT3 i IL-23R). Studija je ustrojena kao istraživanje parova.

Materijal i metode: Serumska koncentracija IL-6 određena je kemiluminiscentnom sekvencijalnom imunometričnom, a koncentracija CRP-a imunoturbidimetrijskom metodom. Analiza polimorfizama gena IL-6 rs1800795, IL-23R rs11209026 i rs7530511 i STAT3 rs744166 provodila se na uređaju LightCyclerTM PCR 1.2 u stvarnome vremenu temeljem prijenosa energije uslijed fluorescentne rezonancije.

Rezultati: Serumske koncentracije IL-6 bile su statistički značajno više u UBC skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom, uz pozitivnu korelaciju s kliničkom aktivnosti bolesti. Koncentracija IL-6 nije se razlikovala između dobnih skupina UBC ispitanika kao ni između žena i muškaraca. Serumske koncentracije CRP-a više su u CB i UC populaciji ispitanika od referentnog intervala. Utvrđena je pozitivna korelaciju CRP-a s indeksom aktivnosti UC-a mjerenoj prema skali MTWSI i serumskom koncentracijom IL-6. Koncentracija CRP-a viša je kod CB ispitanika bez intestinalne resekcije obzirom na CB ispitanike koji su prethodno operativno liječeni. Kod IL-6 nisu uočene razlike između ovih dvaju skupina ispitanika. Serumske koncentracije IL-6 i CRP-a kod CC genotipa IL-6 značajno su više kod UC ispitanika s obzirom na GG + GC genotip. Polimorfizam IL-23R rs11209026 povezan je s UBC-om za razliku od rs7530511 kod kojega nije utvrđena statistički značajna razlika. STAT3 rs744166 ne pokazuje statistički značajnu razliku distribucije genotipa između UBC i

kontrolne skupine ispitanika. Nisu utvrđene statistički značajne interakcije između odabranih genskih inačica u UBC-u.

Zaključak: Serumske koncentracije IL-6, CRP-a te polimorfizam IL-23R rs11209026 imaju utjecaj na sklonost pobolu i obilježju UBC-a. CC genotip IL-6 povezan je s višom koncentracijom IL-6 i CRP-a kod UC-a obzirom na GG + GC genotip. IL-23R rs11209026 ima zaštitni učinak za CB dok polimorfizmi IL-23R rs7530511 i STAT3 rs744166 ne pokazuju povezanost s CB-om i UC-om kao ni s UBC-om općenito.

Ključne riječi: Crohnova bolest, ulcerozni kolitis, upalne bolesti crijeva interleukin 6, C-reaktivni protein, STAT3, receptor za interleukin 23, polimorfizam jednog nukleotida

9. SUMMARY

The Role of Interleukin 6, Polymorphisms of Interleukin 6, Transcription Factor STAT3 and Interleukin 23 Receptor and their Relationship with C-Reactive Protein in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis

Objectives: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are marked by chronic immunologically mediated intestinal inflammation with an unpredictable disease course. Prolonged inflammation can lead to precancerous lesions and colon cancer associated with active inflammation sites. The present study aims at exploring the effects of cytokines, biochemical markers and gene polymorphisms on CD, UC and inflammatory bowel diseases (IBDs) overall and determine the differences between IBD patients and healthy controls.

Study Design: IL-6 and CRP levels were measured and genetic variants whose genetic products are considered inflammatory mediators (IL-6) or are associated with proinflammatory signalling (STAT3 and IL-23R) in 143 patients diagnosed with CD or UC and 100 healthy controls. A paired research design was applied in the study.

Material and Methods: Quantitative assessment of IL-6 and CRP sera was performed with solid-phase, enzyme-labeled, chemiluminescent sequential immunometric and immunoturbidimetric assay, respectively. A real-time fluorescence resonance energy transfer-based method in LightCyclerTM PCR 1.2 was used for genotyping of polymorphisms IL-6 rs1800795, IL-23R rs11209026 and rs7530511 and STAT3 rs744166 genes.

Results: IL-6 serum levels were statistically significantly higher in IBD than in healthy controls and were positively correlated with clinical disease activity. IL-6 levels were not significantly different between age groups or male and female IBD patients. In CD and UC patients, CRP serum levels were higher than the reference intervals. Positive correlations between CRP and IL-6 serum levels and CRP serum levels and UC activity index as measured by MTWSI were observed. CRP serum level was higher in CD patients without intestinal resection than in CD patients with prior intestinal resection. No differences were observed in IL-6 serum levels in the two patient groups. In UC patients, IL-6 and CRP serum levels are statistically significantly higher in CC IL-6 genotype in comparison to GG+GC genotype. Polymorphism IL-23R rs11209026 is associated with IBD, unlike rs7530511 for

which no statistically significant difference was observed. For STAT3 rs744166 no statistically significant difference in genotype distribution was observed between IBD and healthy controls. No statistically significant interactions between selected gene variants were found in IBD.

Conclusion: IL-6, CRP serum levels and IL-23R rs11209026 polymorphism affect the tendency to morbidity and characteristics of IBD. The CC IL-6 genotype is associated with higher IL-6 and CRP serum levels than GC+CC genotype in UC patients. IL-23R rs11209026 has a protective effect in CD, while no association was observed between IL-23R rs7530511 and STAT3 rs744166 polymorphisms and CD, UC or IBD overall.

Keywords: Crohn's Disease, Ulcerative Colitis, Inflammatory Bowel Disease, Interleukin 6, C-reactive Protein, STAT3, Interleukin 23 Receptor, Single Nucleotide Polymorphism

10. LITERATURA

1. Litman DR, Pamer EG. Role of commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. Cell Host Microbe. 2011;10(4):311-23.
2. Saffrey MJ. Aging of the mammalian gastrointestinal tract: a complex organ system. Age. 2014;36(3):9603.
3. Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF. Intestinal barier in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2014;20(5):1165-79.
4. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. World J Gastroeneterol. 2014;7:20(1):6-21.
5. Ribaldone DG, Pellicano R, Actic GC. Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: Basic Science in the Light of Real-World Epidemiology. Gastrointest Disord. 2019;1(1):129-46.
6. Korolkova OY, Myers JN, Pellom ST, Wang L, M'Koma AE. Characerisation of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delienate Ulcerative and Chron's Colitides. Clin Med Insights Gastroenterol. 2015;8:29-44.
7. Lemberg DA, Day AS. Crohn disease and ulcerative colitis in children: an update for 2014. J Pediatr Child Health. 2015;51(3):266-70.
8. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative Colitis. N Engl J Med. 2011;365:1713-25.
9. Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate Immunity in Inflammatory Bowel Disease. World J Gastroenterol. 2007;13(42):5577-80.
10. William J. Tremaine. Diagnosis and Treatment of Indeterminate Colitis. Gastroenetrol Hepatol. 2011;7(12):826-8.
11. Guindi M, Riddell RH. Indeterminate colitis. J Clin Pathol. 2004;57:1233–44.
12. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. Nature Rev Immunol. 2014;14(5):329-42.
13. Roberts-Thomson IC, Fon J, Uvlaki W, Cummins AG, Barry S. Cell, cytokines and inflammatory bowel disease: a clinical perspective. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2011;5(6):703-16.
14. James SD, Wise PE, Zuluaga-Toro T, Schwartz DA, Washington MK, Shi Chanjuan. Identification of pathologic features associated with “ulcerative colitis-like” Crohn’s disease. World J Gastroenterol. 2014;20(36):13139-45.

15. Rameshshanker R, Arebi N. Endoscopy in inflammatory bowel disease when and why. World J Gastrointest Endosc. 2012;4(6):201-11.
16. Vucelić B, Čučković-Čavka S. Upalne bolesti crijeva. Novosti u gastroenterologiji. 2006;15(1):53-62.
17. Rodriges-Bores L, Fonseca GC, Villeda MA, Yamamoto-Furusho JK. Novel genetics markers in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2007;13(42):5560-70.
18. Bianco AM, Girardelli M, Tommasini A. Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms. World J Gastroenterol. 2015;21(43):12296-310.
19. Loddo I, Romanc C. Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis. Front Immunol. 2015;6:551.
20. Bilsborough J, Targan SR, Snapper SB. Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease: Current and Future. The Amer Journ of Gastroenterol Suppl. 2016;3:27-37.
21. De Hertogh G, Geboes G. Crohn's Disease and Infections: A Complex Relationship. MedGenMed. 2004;6(3):14.
22. Kucharzik T, Maaser C. Infections and Chronic Inflammatory Bowel Disease. Viszaralmedizin. 2014;30(5):326-32.
23. Campieri M, Gionchetti P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. Gut. 2001;48:132–5.
24. Kim ER, Chang DK. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. World J Gastroenterol. 2014;20(29):9872-81.
25. Stidham RW, Higgins PDR. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. Clin Colon Rectal Surg. 2018;31(8):168-78.
26. Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. Thromb Haemost. 2009;102(2):215-22.
27. Elewaut D. Linking Crohn's Disease and Ankylosing Spondylitis: It's All about Genes!. PloS Genet. 2010;6(12)e1001223.
28. Shizuma T. Concomitant Thyroid Disorders and Inflammatory Bowel Disease: A Literature Review. Biomed Res Int. 2016;2016:5187061.

29. Kosmidou M, Katsanos AH, Katsanos KH, Kyritis AP, Tsivgoulis G, Christodoulou D, Giannopoulos S. Multiple sclerosis and inflammatory bowel diseases: a systemic review and meta-analysis. J Neurol. 2017;262(2):254-9.
30. Nemeth ZH, Bogdanovski DA, Stopper PB, Paglinco SR, Antonioli L, Rolandelli RH. Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Show Unique Cytokine Profiles. Cureus. 2017;9(4):e1177.
31. Strober W, Fuss IJ. Pro-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of IBD. Gastroenterology. 2011;140(6):1756-67.
32. Seiderer J, Elben I, Digelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, i sur. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. Inflamm Bowel Dis. 2007;14:437–45.
33. Holmberg FEO, Pedersen J, Jørgensen P, Soendergaard C, Jensen KB, Nielsen OH. Intestinal barrier integrity and inflammatory bowel disease: Stem cell-based approaches to regenerate the barrier. J Tissue Eng Regen Med. 2018;12(4):923-35.
34. Sturm A, Dignass AU. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2008;14(3):348-53.
35. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. New Engl J Med. 2011;365:1713-25.
36. Baumgart DC, Sandborn WJ. Chron's disease. Lancet. 2012;380:1590-605.
37. Sonnenberg A. Age distribution of IBD hospitalization. Inflamm Bowel Dis. 2010;16(3):452-7.
38. Nimmos D, Limdi JK. Elderly patients and inflammatory bowel disease. World J Gastrointest Pharmacol Ther. 2016;7(1):51-65.
39. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. Lancet. 2018;390(10114):2769-78.
40. Loftus EV, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin North Am. 2002;31(1):1-20.
41. Edward J, Loftus EV. Clinical Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: Incidence, Prevalence, and Environmental Influences. Gastroenterol. 2004;126:1504-17.

42. Vucelić B, Korač B, Sentić M, Miličić D, Hadžić N, Juresa V, i sur. Epidemiology of Crohn's disease in Zagreb, Yugoslavia: a ten-year prospective study. Int J Epidemiol. 1991;20:216-20.
43. Vucelić B, Korač B, Sentić M, Miličić D, Hadžić N, Juresa V, i sur. Ulcerative colitis in Zagreb, Yugoslavia: incidence and prevalence 1980-1990. Int J Epidemiol. 1991;20:1043-47.
44. Sincić BM, Vucelić B, Persić M, Brncić N, Erzen DJ, Radaković B, i sur. Incidence of inflammatory bowel disease in Primorsko-goranska County, Croatia, 2000-2004: A prospective population-based study. Scand J Gastroenterol. 2006;41:437-44.
45. Burisch J, Kiudelis G, Kupcinskas L, Kievit HAL, Andersen KW, Andersen V, i sur. Natural disease course of Crohn's disease during the first 5 years after diagnosis in a European population-based inception cohort: an Epi-IBD study. Gut. 2018; doi: 10.1136/gutjnl-2017-315568.
46. Burisch J, Pedersen N, Čuković-Čavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, i sur. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. Gut. 2014;63(4):588-97.
47. Sidiq T, Yoshihama S, Downs I, Kobayashi KS. Nod2: A Critical Regulator of Ileal Microbiota and Crohn's Disease. Front Immunol. 2016;7:367.
48. Khoon W, Wong SH, Siew C. Changing epidemiological trends of inflammatory bowel disease in Asia. Intest Res. 2016;14(2):111-19.
49. Yamabe K. Health-related outcomes and economic burden in Japan: focus on inflammatory bowel disease, multiple sclerosis, and depression. Clinicoecon Outcomes Res. 2018;10:653-54.
50. Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. Semin Immunopathol. 2015;37:47-55.
51. Van Limbergen J, Radford G, Satsangi J. Advances in IBD genetics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11(6):372-85.
52. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. Gastroenterol. 2011;140:1704-12.
53. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, i sur. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. Nat Genet. 2015;47(9):979-86.

54. Sarlos P, Kovesdi E, Magyari L, Banfai Z, Szabo A, Javorhazy A, Melegh B. Genetic update on inflammatory factors in ulcerative colitis: Review of the current literature. World J Gastrointest Pathophysiol. 2014;15:304-21.
55. Chahuan S, Mandell MA, Deretic V. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. Mol Cell. 2015;58(3):507-21.
56. Igor VM, Dmitry NA. Role of Mutations in NOD2/CARD15, ATG16L1, and IRGM in the Pathogenesis of Crohn's Disease. International Journal of Biomedicine. 2014;4(1):7-10.
57. Hugot JP. CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease. Ann N Y Acad Sci. 2006;1072:9-18.
58. Ahmad T, Marshall S, Jewell D. Genetics of inflamatory bowel disease: The role of the HLA complex. World J Gastroenterol. 2006;12(23):3628-35.
59. Rodíguez-Bores L, Fonseca GC, Villeda MA, Yammamoto-Furusho JK. Novel genetic markers in inflammatory bowel disease. World J. Gastroenterol. 2007;14:5560-70.
60. Senhaji N, Kassogue Y, Fahimi M, Serbati N, Badre W, Nadifi S. Genetic Polymorphisms of Multidrug Resistance Gene-1 (MDR1/ABCB1) and Glutathione S-Transferase Gene and the Risk of Inflammatory Bowel Disease among Moroccan Patients. Mediators Inflamm. 2015;2015:248060.
61. Brinar M, Cukovic-Cavka S, Bozina N, Ravic KG, Markos P, Ladic A, i sur. MDR1 polymorphisms are associated with inflammatory bowel disease in a cohort of Croatian IBD patients. BMC Gastroenterol. 2013;13:57.
62. Prager M, Buettner J, Buening C. Genes involved in the regulation of intestinal permeability and their role in ulcerative colitis. J Dig Dis. 2015;16(12):713-22.
63. Hugot JP. CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease. Ann N Y Acad Sci. 2006;1072:9-18.
64. Esters N, Pierik M, van Steen K, Vermeire S, Claessens G, Joossens S, i sur. Transmission of CARD15 (NOD2) variants within families of patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2004;99:299-305.
65. Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwidw study. Inflamm Bowel Dis. 2008;14(7):968-76.

66. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, i sur. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet. 2002;99:321-6.
67. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duer RH. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. Nature. 2012;1;491(7422):119-24.
68. Vlachos C, Gaitanis G, Katsanos KH, Christodoulou DK, Tsianos E, Bassukas ID. Psoriasis and inflammatory bowel disease: links and risks. Psoriasis (Auckl). 2016;6:73-92.
69. Huang H, Fang M, Jostins L, Umićević MM, Boucher G, Anderson CA, i sur. Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single variant resolution. Nature. 2017;13;547(7662):173-8.
70. De Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, Lamb C, Luo Y, Kennedy NA. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in imflammatory bowel disease. Nat Genet. 2017;49(2): 256-61.
71. Liu JZ, van Sommersen S, Huang H, NgSC, Alberts R, Takahashi A. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. Nat Genet. 2015;47:979–89.
72. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. Nat Genet. 2007;39:830–2.
73. Yamazaki K, Umeno J, Takahashi A, Hirano A, Johnson TA, Kumasaka N. A Genome-Wide Association Study Identifies 2 Susceptibility Loci for Crohn's Disease in a Japanese Population. Gastroenterology. 2013;144:781–8.
74. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. Nat Genet. 2011;43:246–52.
75. Ellinghaus D, Jostins L, Spain SL, Cortes A, Bethune J, Han B. Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. Nat Genet. 2016;48:510–18.
76. Julià A, Domènech E, Chaparro M, García-Sánchez, Gomollón F, Panés J. A genome-wide association study identifies a novel locus at 6q22.1 associated with ulcerative colitis. Hum Mol Genet. 2014;23:6927–34.

77. Yang S-K, Hong M, Zhao W, Jung Y, Beak J, Tayebi N. Genome-wide association study of Crohn's disease in Koreans revealed three new susceptibility loci and common attributes of genetic susceptibility across ethnic populations. Gut. 2014;63:80–7.
78. Binder V. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. Dig Dis. 1998;16(6):351-5.
79. Halfvarson J. Genetic Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease, Early Twin and Family Studies. U: D'Amato M, D Rioux JD urednici. Molecular Genetics of Inflammatory Bowel Disease. Springer; 2013. str. 23 – 43.
80. Joossens M, Simoens M, Vermeire S, Bossuyt X, Geboes K, Rutgeerts P. Contribution of genetic and environmental factors in the pathogenesis of Crohn's disease in a large family with multiple cases. Inflamm Bowel Dis. 2007;13:580-4.
81. Hanauer SB. Inflamatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. Inflamm Bowel Dis. 2006;12(1):3-9.
82. Kenny EE, Pe'er I, Karban A, Ozelius L, Mitchell AA, Ng SM. A genome-wide scan of Ashkenazi Jewish Crohn's disease suggests novel susceptibility loci. PLoS Genet. 2012;8(3):e1002559.
83. Wang X, Tomso DJ, Liu X, Bell DA. Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. Toxicol Appl Pharmacol. 2005;207(2):84-90.
84. Chorley BN, Wang X, Campbell MR, Pittman GS, Noureddine MA, Bell DA. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. Mutat Res. 2008;659(1-2):147-57.
85. Bell JI. Single nucleotide polymorphisms and disease gene mapping. Arthritis Res. 2002;4(3):273-8.
86. Loktionov A. Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. Cancer Lett. 2004;208:1-33.
87. Albert PR. What is functional genetic polymorpism? Defining classes of Functionality. J. Psychiatry Neurosci. 2011;36(6):363-5.
88. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. Genes Immun. 1999;1:3-19.

89. Imam T, Park S, Kaplan MH, Olson MR. Effector T Helper Cell Subsets in Inflammatory Bowel Diseases. Front Immunol. 2018;9:1212.
90. Steinbach EC, Plevy SE. The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. Inflamm Bowel Dis. 2014;20:166-75.
91. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. Front Immunol. 2015;6:39.
92. Caprioli F, Pallone F, Monteleone G. Th17 immune response in IBD: A new pathogenic mechanism. Journal of Crohn's and Colitis. 2008;2(4):291-5.
93. Kortylewski M, Xini H, Kujawski M, Lee H, Liu Y, Harris T, Drake C, i sur. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by STAT3 signaling in the tumor microenvironment. Cancer Cell. 2009;15(2):114-23.
94. Zundler S, Neurath M. Integrating Immunologic Signaling Networks: The JAK/STAT Pathway in Colitis and Colitis-Associated Cancer. Vaccines (Basel). 2016;4(1):5.
95. Silva FAR, Rodrigues BL, Ayrizono MLS, Leal RF. The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterol Res Pract. 2016;2016:20297274.
96. Olivera P, Danese S, Peyrin-Biroulet. JAK inhibition in inflammatory bowel disease. Expert Rev Clin Immunol. 2017;13(7):693-703.
97. De Simone V, Franzè E, Ronchetti G, Colantoni A, Fantini MC, Di Fusco D, i sur. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF-α synergistically activate STAT3 and NF-kB to promote colorectal cancer cell growth. Oncogene. 2015;34:3493–503.
98. Igaki K, Nakamura Y, Komoike Y, Uga K, Shibata A, Ishimura Y, i sur. Pharmacological Evaluation of TAK-828GF, a Novel Orally Available RORγt Inverse Agonist, on Murine Colitis Model. Inflammation. 2019;42(1):91-102.
99. Ikeda S, Saijo S, Murayama MA, Shimizu K, Akitsu A, Iwakura Y. Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF-β-induced Foxp3 expression. J Immunol. 2014;192(4):1449-58.
100. Feng T, Qin , Wang L, Benveniste EN, Elson CO, Cong Y. Th17 Cells Induce Colitis and Promote Th1 Cell Responses through IL-17 Induction of Innate IL-12 and IL-23 Production. J Immunol. 2011;186(11):6313-18.
101. Cătană CS, Neagoe IB, Cozma V, Magdaş C, Tăbăran F, Dumitraşcu. Contribution ot the IL-177IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2015;21(19):5823-30.

102. Harbour SN, Maynard CL, Zindl CL, Schoeb TR. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. PNAS. 2015;112(22):7061-6.
103. Toussirot E. The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. Inflamm Allergy Drug Targets. 2012;11(2):159-68.
104. Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, Hue S, Gorelick PL, McKenzie BS, i sur. IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis. J Exp Med. 2006;203:2485-94.
105. Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, Thompson C, Joyce-Shaikh B, Stepankova R, i sur. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. Immunity. 2006;25:309-18.
106. Nguyen PM, Putoczki TL, Ernst M. STAT3-Activating Cytokines: A Therapeutic Opportunity for Inflammatory Bowel Disease? J Interferon Cytokine Res. 2015;35(5):340–50.
107. Rose-John S, Wintrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. Nat Rev Rhematol. 2017;13(7):399-409.
108. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity and Disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(10):a016295.
109. Griesinger AM, Josephson RJ, Donson AM, Mulcahy Levy JM, Amani V, Birks DK. Interleukin-6/STAT3 Pathway Signaling Drives an Inflammatory Phenotype in Group A Ependymoma. Cancer Immunol Res. 2015;3(10):1165-74.
110. Weidinger C, Ziegler JF, Letizia M, Schmidt F, Siegmund B. Adipolines and Their Role in Intestinal Inflammation. Front Immunol. 2018;9:1974.
111. Tanaka T, Kishimoto T. The biology and Medical Implication of Interleukin-6. Cancer Immunol Res. 2014;2(4):288-94.
112. Rincon M, Irvin C. Role of IL-6 in Asthma and Other Inflammatory and Pulmonary Diseases. Int J Biol Sci. 2012;8(9):1281-90.
113. Schett G. Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. Rheumatology. 2018;57:43-50.
114. Nishimoto N, Kishimoto T. IL6: from bench to bedside. Nat Clin Prac Rheumatol. 2006;2:619-26.
115. Macaubas C, Wong E, Zhang Y, Nguyen KD, Lee J, Milojevic D, i sur. Altered signaling in systematic juvenile idiophatic arthritis monocytes. Clin Immunol. 2016;163:66-74.

116. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. Arthritis Res Ther. 2006;8(2):S3.
117. Biljan D, Šitum M, Kostović K, Batinac T, Matišić D. Acute phase proteins in psoriasis. Coll Antropol. 2009;33(1):83-6.
118. Baran P, Hansen S, Waetzig GH, Arkbarzadeh M, Lamertz L, Huber JH, i sur. The balance of interleukin (IL)-6, IL-6-soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6-sIL-6-sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. J Biol Chem. 2018;293(18):6762-75.
119. 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(5):878-88.
120. Barbić J, Ivić D, Alkhamis T, Drenjančević D, Ivić J, Haršanji-Drenjančević I, Turina I, Včev A. Kinetics of changes in serum concentrations of procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein after elective abdominal surgery. Can it be used to detect postoperative complications? Coll Antropol. 2013;37(1):195-201.
121. Verboogen DRJ, Revelo NH, Ter Beest M, van den Bogaart G. Interleukin-6 secretion is limited by self-signaling in endosomes. J Mol Cell Biol. 2019;11(2):144-57.
122. Danziger O, Pupko T, Bacharach E, Ehrlich M. Interleukin-6 and Interferon-α Signaling via JAK1-STAT Differentially Regulate Oncolytic versus Cytoprotective Antiviral States. Front Immunol. 2018;9:94.
123. Rincon M, Pereira FV. A New Perspective: Mitochondrial Stat3 as a Regulator for Lymphocyte Function. Int J Mol Sci. 2018;19(6):1656.
124. Whitley SK, Balasubramani A, Zindl CL, Sen R, Shibata Y, Crawford GE. IL-1R signaling promotes STAT3 and NF-κB factor recruitment to distal cis-regulatory elements that regulate Il17a/f transcription. J Biol Chem. 2018;293(41):15790-800.
125. Kasembeli MM, Bharadwaj U, Robinson P, Tweardy DJ. Contribution of STAT3 to Inflammatory and Fibrotic Diseases and Prospects for its Targeting for Treatment. Int J Mol Sci. 2018;19(8):2299.
126. Takač B, Mihaljević S, Štefanić M, Glavaš-Obrovac Lj, Kibel A, Samardžija M. Importance of Interleukin 6 in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. Coll. Antropol. 2014;38(2):659-64.

127. Kuhn KA, Manieri NA, Liu TC, Stappenbeck TS. IL-6 Stimulates Intestinal Epithelial Proliferation and Repair after Injuri. PloS ONE. 2014;9(12):e114195.
128. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor signaling. Mol Sy Biol. 2005;1:2005.0010.
129. Block KM, Hanke NT, Maine EA, Baker AF. IL-6 stimulates STAT3 and Pim-1 kinase in pancreatic cancer cell lines. Pancreas. 2012;41(5):773-881.
130. Liu H, Ren G, Wandg T, Chen Y, Gong C, Bai Y, i sur. Aberrantly expressed Fra-1 by IL-6/STAT3 transactivation promotes colorectal cancer aggressiveness through epithelial-mesenchymal transition. Carcinogenesis. 2015;36(4):459-68.
131. Mudter J, Neurath MF. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. Gut. 2007;56(2):293-303.
132. Vanderbroucke RE, Vanlaere I, Van Hauwermeiren F, Van Wonterghem E, Wilson C, Libert C. Pro-inflammatory effects of matrix metalloproteinase 7 in acute inflammation. Mucosal Immunol. 2014;7(3):579-88.
133. Petrey AC, de la Motte CA. The extracellular matrix in IBD: a dynamic mediator of inflammation. 2017;33(4):234-8.
134. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. Front Pharmacol. 2014;5:123.
135. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. Arthritis Research & Therapy. 2006;8(2):1-6.
136. Sllats J, Oever JT, Van de Veerdonk FL, Netea MG. IL-1β/IL-6/CRP and IL-18/ferritin: Distinct Inflammatory Programs in Infections. Plos Pathog. 2016;12(12):e1005973.
137. Peisajovich A, Marnell L, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein at the interface between innate immunity and inflammation. Expert Rev Clin Immunol. 2008;4(3):379-90.
138. Haapakoski R, Ebmeier KP, Alenius H, Kivimäki M. Innate and adaptive immunity in the development of depression: An update on current knowledge and technological advances. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2016;(66):63-72.
139. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. J Biol Chem 2000;275:18138-44.

140. Gao JW, Zhang AG, Pan W, Yue CL, Zeng L, Gu W, Jiang J. Association between IL-6-174G/C Polymorphism and the Risk of Sepsis and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. Plos One. 2015;10(3):e0118843.
141. Guerreiro CS, Ferreira P, Tavares L, Santos PM, Neves M, Brito M, Cravo M. Fatty acids, IL6, and TNFalpha polymorphisms: an example of nutrigenetics in Crohn's disease. Am J Gastroenterol. 2009;104(9):2241-9.
142. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, i sur. 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;102:1369–76.
143. Kilpinen S, Hulkkonen J, Wang XY, Hurme M. The promoter polymorphism of the interleukin-6 gene regulates interleukin-6 production in neonates but not in adults. Eur Cytokine Netw. 2001;12:62–8.
144. Ross OA, Curran MD, Meenagh A, Williams F, Barnett YA, Middleton D, Rea IM. Study of age-association with cytokine gene polymorphisms in an aged Irish population. Mech. Ageing. Dev. 2003;124(2):199–206.
145. Christiansen L, Bathun L, Anders-Ranberg K. Jeune B, Christiansen K. Modest implicationof interleukin-6 promoter polymorphisms in longevity. Mech Ageing Dev 2004;125:391–5.
146. Hurmea M, Lehtimäkib T, Jylhäc M, Karhunend BJ, Hervonenc A. Interleukin-6174G/C polymorphism and longevity. Mech. Ageing Dev. 2005;126:417–18.
147. Di Bona D, Vasto S, Capurso C, Christiansen L, Deiana L, Franceschi C, i sur. Effect of Interleukin-6 polymorphism on human longevity: a systematic review and meta-analysis. Ageing. Res. Rev. 2009;8:36–42.
148. Olivieri F, Bonafè M, Cavallone L, Giovagnetti S, Marchegiani F, Cardelli M, i sur. The -174 locus affects in vitro/in vivo IL-6 production during aging. Exp. Gerontol. 2002;37:309–14.
149. Haddy N, Sass C, Maumus S, Marie B, Droesch S, Siest G, Lambert D, Visvikis S. Biological variations, genetic polymorphisms and familial resemblance of TNF-alpha and IL-6 concentrations: STANISLAS cohort. Eur J Hum Genet. 2005;13:109–17.
150. Jerrard-Dune P, Sitzer M, Risley P, Steckel DA, Buehler A, Von Kegler A, Markus HS. Interleukin-6 Promoter Polymorphism Modulates the Effects of

Heavy Alcohol Consumption on Early Carotid Artery Atherosclerosis. Stroke. 2003;34:402–7.

151. Illig T, Bongardt F, Schopfer A, Muller-Scholze S, Rathmann W, Koenig W, i sur. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes. Clin Endocr Metab. 2004;89:5053–8.

152. Vickers MA, Green FR, Terry C, Mayosi BM, Julier C, Lathrop M, i sur. Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein. Cardiovasc Res. 2002;53:1029–34.

153. Kristiansen OP, Nolsoe RL, Larsen L, Gjesing AMP, Johannesen J, Larsen ZM, i sur. Association of a functional 17β-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. Hum Molec Genet. 2003;12:1101–10.

154. Sivanesan D, Beauchamp C, Quinou C, Lee J, Lesage S, Chemtob S, i sur. IL23R (Interleukin 23 Receptor) Variants Protective against Inflammatory Bowel Diseases (IBD) Display Loss of Function due to Impaired Protein Stability and Intracellular Trafficking. The Journal of Biological Chemistry. 2016;291(16):8673-85.

155. Roberts RL, Gearry RB, Hollis-Moffatt JE, Miller AL, Reid J, Abkevich V, i sur. IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2007;102(12):2754-61.

156. Toussirot E. The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. Inflamm Allergy Drug Targets. 2012;11(2):159-68.

157. Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, Gwilliam R, Bumpstead S, Prescott NJ. Genetics determinants of ulceraative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. Nat Genet. 2008;40(6):710-12.

158. Nair RP, Ruether A, Stuart PE, Jenisch S, Tejasvi T, Hiremaqalore R, i sur. Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. J Invest Dermatol. 2008;128(7):1653-61.

159. Rahman P, Inman RD, Maksymowych WP, Reeve JP, Peddle L, Gladman DD. Association of interleukin 23 receptor variants with psoriatic arthritis. J Rheumatol. 2009;36(1):137-40.

160. Sáfrány E, Pazár B, Csöngei V, Járomi L, Polgár N, Sipeky C, i sur. Variants of the IL23R gene are associated with ankylosing spondylitis but not with Sjögren syndrome in Hungarian population samples. Scand J Immunol. 2009;70(1):68-74.
161. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science. 2006;314(5804):1461-3.
162. Lacher M, Schroepf S, Helmbrecht J, Von Schweinitz D, Ballauff A, Koch I, i sur. Association of the interleukin-23 receptor gene variant rs11209026 with Crohn's disease in German children. Acta Paediatr. 2010;99(5):727-33.
163. Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM, Lefebvre C, Rioux JD, Mulder F, i sur. ATG16L and IL23R are associated with inflammatory bowel disease but not with celiac disease in the Netherlands. Am J Gastroenterol. 2008;103(3):621-7.
164. Mc Govern DPB, Gardet A, Törkvist L, Goyette P, Essers J, , Taylor KD. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. Nat Genet. 2010;42(4):332-7.
165. Leppkes M, Neurath MF, Herrmann M, Becker C. Immune deficiency vs. Immune excess in inflammatory bowel disease-STAT3 as rheo-STAT3 of intestinal homeostasis. J Leukoc Biol. 2016;99(1):57-66.
166. Sugimoto K. Role of STAT3 ininflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2008;14(33):5110-14.
167. Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, i sur. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. J Exp Med. 2001;193(4):471–81.
168. Musso A, Dentelli P, Carlino A, Chiusa L, Repici A, Sturm A, i sur. 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(2):91–8.
169. Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, i sur. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. J Biol Chem. 2003;278(19):16777–81.
170. Li Y, de Haar C, Peppelenbosch MP, van der Woude CJ. New insights into the role of STAT3 in IBD. Inflamm Bowel Dis. 2012;18(6):1177–83.
171. Sato K, Shiota M, Fukuda S, Iwamoto E, Machida H, Inamine T, i sur. Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the

signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population. J Clin Immunol. 2009;29(6):815–25.

172. Cénit MC, Alcina A, Márquez A, Mendoza JL, Díaz-Rubio M, de las Heras V, i sur. STAT3 locus in inflammatory bowel disease and multiple sclerosis susceptibility. Genes Immun. 2010;11(3):264–8.

173. Polgar N, Csongei V, Szabo M, Zambo V, Melegh BI, Sumegi K, i sur. Investigation of JAK2, STAT3 and CCR6 polymorphisms and their gene-gene interactions in inflammatory bowel disease. Int J Immunogenet. 2012;39(3):247–52.

174. Peter I, Mitchell AA, Ozelius L, Erazo M, Hu J, Doheny D, i sur. Evaluation of 22 genetic variants with Crohn's disease risk in the Ashkenazi Jewish population: a case–control study. BMC Med Genet. 2011;12:63.

175. Merlini G, Bilirup-Jensen S, Johnson AM, Sheldon J, Zegers I. Standardizing plasma protein measurements worldwide: a challenging enterprise. Clin Chem Lab Med. 2010;48(11):1567-75.

176. Harris N, Kratz A, Kunicka J. The ADVIA 2120 Hematology System: Flow Cytometry-Based Anlysis of Blood and Body Fluids in the Routine Hematology Laboratory. Laboratory Hematology. 2005;1(11):47-61.

177. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics. 1992;48(2):361-72.

178. Lewontin RC. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. Genetics. 1964;49(1):49-67.

179. Hedrick PW. Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. Genetics. 1987;117(2):331-41.

180. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, i sur. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. Am J Hum Genet. 2007;81(3):559–75.

181. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. Mol Biol Evol. 1995;12(5):921-7.

182. Westfall PH, Young SS. Resampling-based multiple testing: examples and methods for p-value adjustment. New York: John Wiley & Sons Inc; 1993.

183. Wang MH, Sun R, Guo J, Weng H, Lee J, Hu I, Sham P, Zee BCY. A fast and powerful W-test for pairwise epistasis testing. Nucleic Acids Research. 2016;44(12):e115.
184. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. (2003) Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. Bioinformatics, 19(1):149-150.
185. Gaiendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashas JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. Dis Mon. 2018;64(2):201-57.
186. Kim DH, Cheon JH. Pathoenesis of Inflammatory bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. Immune Net. 2017;17(1):25-40.
187. Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, Ohman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. Scand J Gastroenterol. 2018;53(4):379-89.
188. Lee SH, Kwon JE, Cho ML. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. Intest Res. 2018;16(1):26-42.
189. Di Meglio P, Di Cesare A, Laggner U, Chu CC, Napolitano L, Villanova F, i sur. The IL23R R381Q gene variant protects againts immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans. Plos One. 2011;6(2):e17160.
190. Sarin R, Wu X, Abraham C. Inflammatory disease protective R381Q IL23 receptor polymorphism results in decreased primary CD4+ and CD8+ human T-cell functional responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(23):9560-5.
191. Wang Z, Xu B, Zhang H, Fan R, Zhou J, Zhong J. Association between STAT3 gene Polymorphisms and Crohn's disease susceptibility: a case-control study in a Chinese Han population. Diagn Pathol. 2014;9:104.
192. NCBI. Common Fund (CF) Genotype-Tissue Expression Project (GTEx). Dostupno na adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/id=phs000424.v7.p2. Datum pristupa: 25.02.2019.
193. Gok I, Ucar F, Ozgur O, Efe H. Analysis of Cytokine Gene Polymorphism Allelic Variation in the Turkish Population with Inflammatory Bowel Disease. Biomedical Research. 2014;25(4):551-9.
194. Prieto-Pérez R, Almoguera B, Cabaleiro T, Hakonarson H, Abad-Santos F. Association Between Genetic Polymorphisms and Response to Anti-TNFs in Patients with Inflammatory Bowel Disease. Int J Mol Sci. 2016;17:225.

195. Korolkova OY, Myers JN, Pellom ST, Wang L, M'Koma AE. Characterisation of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitides. Clin Med Insights Gastroenterol. 2015;6(8):29-44.
196. Feng JS, Yang T, Zhu YZ, Liu Z, Guo CC, Zheng XB. Serum IL-17 and IL-6 increased acompany with TGF-β and IL-13 respectively in ulcerative colitis patients. Int J Clin Med. 2014;7(12):5498-504.
197. Beck PL, Wallace JL. Cytokines in inflammatory bowel disease. Mediators Inflamm. 1997;6(2):95-103.
198. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. World J Surg. 1998;22(4):382-9.
199. Seegert D, Rosenstiel P, Pfahler H, Verkorn PP, Nikolaus S, Schreiber S. Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease. Gut. 2001;48(3):326-32.
200. Mahida YR, Kurlac L, Gallagher A, Hawkey CJ. High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. Gut. 1991;32(12):153-4.
201. Yoshimoto T, Nakanishi K, Hirose S, Hiroishi K, Okamura H, Takemoto Y, i sur. High IL-6 level reflects ,Susceptible status of the host endotoxin and IL-1/tumor necrosis factor. J immunol. 1992;148(11):3596-603.
202. Reinisch W, Gasche C, Tillinger W, Wyatt J, Lichtenberg C, Willheim M, i sur. Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn’s disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse. Am J Gastroentrol. 1999;94(8):2156–64.
203. Besr WR, Becktel JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity indeks. National Cooperative Crohn's Disease Study. Gastroenterology. 1976;70(3):439-44.
204. Hyams JS, Fitzgerald JE, Treem WR, Wyzga N, Kreutzer DL. Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease. Gastroenterol. 1993;104(5):1285-92.
205. Brown KA, Back SJ, Ruchelli ED, Markowitz J, Mascarenhas M, Verma R, i sur. Lamina propria and circulating interleukin-6 in newly diagnosed pediatric inflammatory bowel disease patients. Am J Gastroenterol. 2002;97(10):2603-8.
206. Katičić M. Indeksi aktivnosti upalnih bolesti crijeva. Acta Med Croatica. 2013;67:93-110.

207. Malzlam MZ, Montazeri G, Hodgson HJF. The effects of some antiinflammatory agents on cytokines released from human. Eur J Gastroenterology Hepatology. 1993;5:515-32.
208. Gross V, Andus T, Caesar I, Roth M, Schölmerich J. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. Gastroenterology. 1992;102(2):514-9.
209. Kuhn KA, Manieri NA, Liu TC, Stappenbeck TS. IL-6 stimulates epithelial proliferation and repair after injuri. PLoS One. 2014;5(9):e114195.
210. Mitsuyama K, Tomiyasu N, Suzuki A, Takaki K, Takedatsu H, Masudas J, i sur. A form of circulating interleukin-6 receptor component soluble gp130 as a potential interleukin-6 inhibitor in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol. 2006;143(1):125-31.
211. Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signaling in chronic inflammation and cancer. Scand J Immunol. 2006;63(5):321-9.
212. Kishimoto T. Interleuki-6: from basic science to medicine-40 years in immunology. Annu Rev Immunol. 2005;23:1-21.
213. Cahill CM, Rogers JT. Interleukin (IL) 1ß Induction of IL-6 is Mediated by a Novel Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent AKT/IκB Kinase α Pathway Targeting Activator Protein-1. J Biol Chem. 2008;2836(38):25900-12.
214. Confalone E, D'Alesio G, Furia A. IL-6 Induction by TNFα and IL-1ß in an Osteoblast-Like Cell Line. Int J Biomed Sci. 2010;6(2):135-40.
215. Lawrence T. The Nuclear Factor NF-κB Pathway in Inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009;1(6):a001651.
216. Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, i sur. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 1992;37(6):818-26.
217. Atreya R, Billmeier U, Rath T, Mudter T, Vieth M, Neumann H, Neurath MN. First case of exacerbatet ulcerative colitis after anti-interleukin-6R salvage therapy. World J Gastroenterol. 2015;21(45):12963-9.
218. Shetty A, Hanson R, Korsten P, Shawagfeh M, Arami S, Volkov S, i sur. Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis and beyond. Drug Des Devel Ther. 2014;8:349-64.
219. Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, Jenkins B, Waring P, Clay FJ, i sur. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-

mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. Nat Med. 2002;8(10):1089-97.

220. Jin X, Zimmers TA, Zhang Z, Pierce RH, Koniaris LG. Interleukin-6 is an important in vivo inhibitor of intestinal epithelial cell death in mice. Gut. 2010;59(2):186-96.

221. Lin H, Joehanes R, Pilling LC, Dupuis J, Lunetta KL, Ying SX. Whole Blood Gene Expression and Interleukin-6 Levels. Genomics. 2014;104(600):490-5.

222. Wine E, Mack DR, Hyams J, Otley AR, Markowitz J, Crandall WV. Interleukin-6 is associated with steroid resistance and reflects disease activity in severe pediatric ulcerative colitis. J Crohns Colitis. 2013;7(11):916-22.

223. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Diagnosis anemia in inflammatory bowel disease: beyond the establish markers. J Crohns Colitis. 2011;5(5):381-91.

224. Yang DH, Yang SK, Park SH, Lee HS, Boo SJ, Park JH, i sur. Usefulnes of C-Reactive Protein as a Disease Activity Marker in Crohn's disease according to the Location of Disease. Gut Liver. 2015;9(1):80-6.

225. Solem CA, Loftus EVJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical andoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2005;11(8):707-12.

226. Fagan EA, Dyck RF, Maton PN, Hodgson HJ, Chadwick VS, Pepys MB. Serum levels of C-reactive protein in Crohn's disease and ulcerative colitis. Eur J Clin Invest. 1982;12(4):351-9.

227. Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. Journal of Hepatology. 2016;64:1403-15.

228. Zhou Z, Xu MJ, Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. Cellular & Molecular Immunology. 2016;13:301-15.

229. Song SNJ, Yoshizaki K. Mechanism and Clinical Significance of IL-6 Combined with TNF-α or IL-1 for the Induction of Acute Phase Proteins SAA and CRP in Chronic Inflammatory Diseases. J Alcohol Drug Depend. 2016;4(3):1-4.

230. Vollmer P, Walev I, Rose-John S, Bhakdi S. Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the fuman interleukin-6 receptor. Infect Immun. 1996;64(9):3646-51.

231. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Terapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. J Clin Invest. 2011;121(9):3375-83.
232. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones AS. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. J Leukoc Biol. 2006;80(2):227-36.
233. Scheller J, Garbers C, Rose-John S. Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflamatory activities. Semin Immunol. 2014;26(1):2-12.
234. Itoh J, de la Motte C, Strong SA, Levine AD, Fioch C. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. Gut. 2001;49:35–41.
235. Ponemone V, Keshavarzian A, Brand MI, Saclarides T, Abcarian H, Cabay RJ. Apoptosis and Inflamation: Role of Adipokines in Inflammatory Bowel Disease. Clin Transl Gastroenterol. 2010;1(10):e1.
236. Navarra P, Tsagarakis S, Faria MS, Rees LH, Besser GM, Grossman AB. Interleukins-1 and -6 stimulate and release of corticotropin-releasing hormone-41 from rat hypotalamus in vitro via the eicosanoid cyclooxygenase pathway. Endocrinology. 1991;128:37-44.
237. Norouzina M, Chaleshi V, Alizedeh AHM, Zali MR. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: insight into diagnosis, prognosis and treatment. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2017;10(3):155-67.
238. Jones J, Loftus EVJ, Panaccione R, Chen LS, Peterson S, McConell J. Relationship between disease activity and serum and fecal biomarkers in patients with Crohn's disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2008;6(11):1218-24.
239. Poullis AP, Zar S, Sundaram KK, Moodie SJ, Risley P, Theodossi A, Mendall MA. A new, highly sensitive assay for C-reactive protein can aid the differentiation of inflammatory bowel disorders from functional bowel disorders. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2002;14(4):409-12.
240. Florin TH, Paterson EW, Fowler EV, Radford-Smith GL. Clinically active Crohn's disease in the presence of a low C-reactive protein. Scand J Gastroenterol. 2006;41(3):306-11.
241. 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(4):206-10.

242. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J, Hämling J, Koop I, Groessner B, Lochs H, Raedler A. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in relapse of Crohn's disease. Lancet. 1999;353(9151):459-61.

243. Wyatt J, Vogelsgang H, Hübl W, Waldohöer T. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. Lancet. 1993;341(8858):1437-9.

244. Nilsonne G, Lekander M, Akerstedt T, Axelsson J, Ingre M. Diurnal Variation of Circulating Interleukin-6 in Humans: A Meta-Analysis. PloS One. 2016;11(11):e0165799.

245. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive Protein as a Marker for Inflammatory Bowel Disease. Inflamm Bowel Dis. 2004;10(5):661-5.

246. Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM, Seidelin JB, Heegard NH. Established and Emerging Biological Activity Markers of Inflammatory Bowel Disease. Am J Gastroenterol. 2000;95(2):359-67.

247. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, Fliep JG. Prevention of in Vitro Neutrophil Adhesion to Endothelial Cells through Shedding of L-Selectin by C-reactive protein and Peptides Derived from c-reactive protein. J Clin Invest. 1997;100(3):522-9.

248. Bodman-Smith KB, Melendez AJ, Campbell I, Harrison PT, Allen JM, Raynes JG. C-reactive protein mediated phagocytosis and phospholipase D signalling through the high-affinity receptor for immunoglobulin G (FcgammaRI). Immunol. 2002;107:252-60.

249. Manolov DE, Rocker C, Hombach V, Nienhaus GU, Torzewski J. Ultrasensitive confocal flourescence microscopy of C-reactive protein interacting with FcyRIIa. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24(12):2372-7.

250. Khera A, McGuire DK, Murphy SA, Stanek HG, Das SR, Vongpatanasin W, i sur. Race and gender differences in C-reactive protein levels. J Am Col Cardiol. 2005;46(3):464-9.

251. Yamada S, Gotoh T, Nakashima Y, Kayaba K, Ishikawa S, Nago N, i sur. Distribution of Serum C-Reactive Protein and Its Association with Atherosclerotic Risk Factors in a Japanese Population: Jichi Medical School Cohort Study. Am J Epimiol. 2001;153(12):1183-90.

252. Heubner C, Petermann I, Lam WJ, Shelling AN, Ferguson LR. Characterization of single-nucleotide polymorphism relevant to inflammatory bowel disease in commonly used gastrointestinal cell line. Inflamm Bowel Dis. 2010;16(2):285-95.

253. Chen J, Ying XM, Huang XM, Huang P, Yan SC. Association between polymorphisms in selected inflammatory response genes and the risk of prostate cancer. Onco Targets Ther. 2016;9:223-9.
254. Senhaji N, Serrano A, Serbati N, Karkouri M, Zaid Y, Nadifi S, Martin J. Association of inflammatory cytokine gene polymorphisms with inflammatory bowel disease in a Moroccan cohort. Genes Immun. 2016;7(1):60-5.
255. Deng N, Zhou H, Fan H, Yan Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. Oncotarget. 2017;8(66):110635-49.
256. Ilhami Gok, Fahri Ucar, Orhan Ozgur, Hasan Efe. Analysis of Cytokine Gene Polymorphism Allelic Variation in the Turkish Population with Inflammatory Bowel Disease. Biomed. Res. 2014;25(4):551-9.
257. Genetic Testing Registry. IL 6 Interleukin 6. Dostupno na adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569. Datum pristupa: 14. 01. 2019.
258. Wujcicka W, Gaj Z, Wilczyński J, Nowakowska D. Contribution of IL-6174 G>C and IL1B +3954 C>T polymorphisms to congenital infection with Toxoplasma gondii. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34(11):2287-94.
259. Belluco C, Olivieri F, Bonafè M, Giovagnetti S, Mammano E, Scalerta R, i sur. -174 G>C polymorphism of interleukin 6 gene promoter affects interleukin 6 serum level in patients with colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2003;9(6):2173-6.
260. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. J Biol Chem. 2000;275(24):18138-44.
261. Mandić S, Sudarević B, Marczi S, Horvat V, Cosić I, Mihaljević S, i sur. Interleukin-6 Polymorphism and Prostate Cancer Risk in Population of Eastern Croatia. Coll. Antropol. 2013;37(3):907-11.
262. Kim Y, Hooten NN, Dluzen DF, Martindale JL, Gorospe M, Evans MK. Posttransriptional Regulation of the Inflammatory Marker C-Reactive Protein by the RNA-Binding Protein HuR and MicroRNA 637. Mol Cell Biol. 2015;35(24):4212-21.
263. Cross DS, Ivacic LC, Stefanski EL, McCarty CA. Population Based allele frequencies od disease associated polymorphisms in the Personalized Medicine Research Project. BMC Genet. 2010;11:51.
264. Balding J, Livingstone WJ, Conroy J, Mynett-Johnson, Weir DG. Inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms. Mediators Inflamm. 2004;13(3):181-7.

265. Pawlik A, Wrzesniewska J, Florezak M, Gawronska SB, Herezyiska M. IL-6 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 2005;34(2):109-13.

266. Banday MZ, Balkhi HM, Sameer AS, Chowdri NA, Hag E. Strong association of interleukin-g-174 G/C promoter nucleotide polymorphism with decreased risk of colorectal cancer in ethnic Kashmiri population: A case sontrol study. Tumour Biol. 2017;39(3):1010428317695940.396-403.

267. Lin DY, Zeng D. Proper Analysis of Secondary Phenotype Data in Case-Control Association Studies. Genet Epidemiol. 2009;33(3):256-65.

268. Xing C, McCarthy JM, Dupuis J, Cupples LA, Meigs JB, Lin X, Allen AS. Robust analysis of secondary phenotypes in case-control genetic association studies. Stat Med. 2016;35(23):4226-37.

269. Sawczenko A, Azooz O, Paraszczuk, Idestrom M, Croft NM, Savage MO, i sur. Intestinal inflammation-induced growth retardation acts through IL-6 in rats and depnds on the -174 IL-6 G/C polymorphism in children. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(37):13260-5.

270. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphism in the IL-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(7):1369-76.

271. Reich D, Patterson N, Ramesh V, De Jager PL, McDonals GJ, Tandon A, i sur. Admixture Mapping of an Allele Affecting Interleukin 6 Soluble Receptor and Interleukin 6 Levels. Am J Hum Genet. 2007;80(4):716-26.

272. Kniss DA, Summerfield TL. Discovery of HeLa Cell Contamination in HES Cell: Call for Cell Line Authentication in Reproductive Biology Research. Reprod Sci. 2014;21(8):1015-19.

273. Horbach SPJM, Halffman W. The ghosts of HeLa: How cell line misidentification contaminates the scientific literature. PloS One. 2017; 12(10): e0186281.

274. Rottem S, Barile MF. Beware of mycoplasmas. Trends Biotechnol. 1993;11(4):143-51.

275. Brodie T, Brenna E, Sallust F. OMIP-018: chemokine receptor expression on human T helper cells. Cytometry A. 2013;83(6):530-2.

276. Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. Mol Immunol. 2002;39(9):531-6.

277. Sofi MH, Li W, Kaplan MH, Chang CH. Elevated IL-6 expression in CD4 T cells via PKCtheta and NF-kappaB induces Th2 cytokine production. Mol Immunol. 2009;46(7):1443-50.
278. Gálvez J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. ISRN Inflamm. 2014;928461.
279. Mihaljević S, Kibel A, Štefanić M, Glavaš-Obrovac Lj, Takač B, Krznarić Ž, i sur. Polymorphism of Interleukin-23 Receptor in Patient with Inflammatory Bowel Disease in Croatian Tertiary Center. Coll Antropol. 2013;37(4):1171-7.
280. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. IL-23-IL-17 immune axis: Discovery, Mechanistic Understanding, and Clinical Testing. Nat Rev Immunol. 2014;14(9):585-600.
281. Yago T, Nanke Y, Kawamoto M, Kobashigawa T, Yamanaka H, Kotake S. IL-23 and Th17 Disease in Inflammatory Arthritis. J Clin Med. 2017;6(9):81.
282. Morrison PJ, Ballantyne SJ, Kullberg MC. Interleukin-23 and T helper 17-type responses in intestinal inflammation: from cytokines to T-cell plasticity. Immunology. 2011;133(4):397-408.
283. Gene. IL23R interleukin 23 receptor [*Homo sapiens* (human)]. Dostupno na adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/149233. Datum pristupa: 25.02.2019.
284. Naser SA, Arce M, Khaja A, Fernandez M, Naser N, Elwasila S, Thanigachalam S. Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. World J Gastroenterol. 2012;18(5):412-24.
285. Milner JD, Vogel TP, Forbes L, Ma CA, Stray-Pedersen A, Niemela JE. Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. Blood. 2015;125(4):591-9.
286. Gene. STAT3 signal transducer and activator of transcription 3 [*Homo sapiens* (human)]. Dostupno na adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6774. Datum pristupa: 25.02.2019.
287. NCBI U.S. National Library of Medicine. Reference SNP (rs) Report (rs11209026). Dostupno na adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs11209026. Datum pristupa: 25.02.2019.
288. Szabo M, Safrany E, Pazar B, Melegh BI, Kisfalu P, Poor G. Marked diversity of IL23R gene haplotype variants in rheumatoid arthritis comparing with Crohn's disease and ankylosing spondylitis. Mol Biol Rep. 2013;40(1):359-63.

289. Lacher M, Schroepf S, Helmbrecht J, Von Schweinitz D, Ballauff A, Koch I, i sur. Association of the interleukin-23 receptor gene variant rs11209026 with Crohn's disease in German children. Acta Paediatr. 2010;99(5):727-33.
290. Dusatkova P, Hradsky O, Lenicek M, Bronsky J, Nevoral J, Kotalova R, i sur. Association of IL23R p.381Gln and ATG16L1 p.197Ala with Crohn disease in the Czech population. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009;49(4):405-10.
291. Oliver J, Rueda B, López-Nevot MA, Gómez-Garcia M, Martin J. Replication of an Association Between IL23R Gene Polymorphism With Inflammatory Bowel Disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2007;5(8):977-81.
292. Márquez A, Mendoza JL, Taxonera C, Diaz-Rubio M, De La Concha EG, Urcelay E, Martinez A. IL23R and IL12B polymorphisms in Spanish IBD patients: no evidence of interaction. Inflamm Bowel Dis. 2008;14(9):1192-6.
293. Lakatos PL, Szamosi T, Szilvasi A, Molnar E, Lakatos L, Kovacs A, i sur. ATG16L1 and IL23 receptor (IL23R) genes are associated with disease susceptibility in Hungarian CD patients. Dig Liver Dis. 2008;40(11):867-73.
294. Cotterill L, Payne D, Levinson S, McLaughlin J, Wesley E, Feeney M, i sur. Replication and meta-analysis of 13 000 cases defines the risk for interleukin-23 receptor and autophagy-related 16-like 1 variants in Crohn's disease. Can J Gastroenterol. 2010;24(5):297-302.
295. Weersma RK, Zhemakova A, Nolte IM, Lefebvre C, Rioux JD, Mulder F, i sur. ATG16L1 and IL23R Are Associated With Inflmmatory Bowel Disease but Not With Celiac Disease in The Netherlands. Am J Gastroenterol. 2008;103(3):621-7.
296. Büning C, Schmidt HH, Molnar T, De Jong DJ, Fiedler T, Bühner S, i sur. Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers protective effect not only aagainst Crohn's disease but also ulcerative colitis. Aliment Pharmacol Ther. 2007;26(7):1025-33.
297. Simon EG, Ghosh S, Iacucci M, Moran GW. Ustekinumab for the treatment of Crohn's disease: can it find its niche? Therap Adv Gastroenterol. 2016;9(1):26-36.
298. Sventoraityte J, Zvirbliene A, Franke A, Kwiatkowski R, Kiudelis G, Kupcinskas L, Schreiber S. NOD2, IL23R and ATG16L1 polymorphisms in Lithuanian patients with inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2010;16(3):359-64.

299. Venegas M, Beltrán CJ, Alvarez L, Castro A, Torres T, Leal AD, i sur. IL-23R Arg381Gln polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease. Eur Cytokine Netw. 2008;19(4):190-5.
300. Li Y, Mao Q, Shen L, Tian Y, Yu C, Zhu Wm, Li JS. Interleukin-23 receptor genetic polymorphisms and Crohn's disease susceptibility: a meta-analysis. Inflamm Res. 2010;59(8):607-14.
301. Nair RP, Ruether A, Stuart PE, Jenisch S, Tejasvi T, Hiremagalore R, i sur. Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. J Invest Dermatol. 2008;128(7):1653-61.
302. Rahman P, Inman RD, Maksymowych WP, Reeve JP, Peddle L, Gladman DD. Association of interleukin 23 receptor variants with psoriatic arthritis. J Rheumatol. 2009;36(1):137-40.
303. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association between interleukin-23R polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: a meta-analysis. Inflamm Res. 2012;61(2):143-9.
304. Fischer A, Nothnagel M, Franke A, Jacobs G, Saadati HR, Gaede KI, i sur. Association of inflammatory bowel disease risk loci with sarcoidosis, and its acute and chronic subphenotypes. Eur Respir. 2011;37(3):610-6.
305. Hazlett J, Stamp LK, Merriman T, Highton J, Hessian PA. IL-23R rs11209026 polymorphism modulates IL-17A expression in patients with rheumatoid arthritis. Genes Immun. 2012;13(3):287-7.
306. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, i sur. A Large-Scale Genetic Association Study Confirms IL12B and Leads to tje identification of IL-23R as Psoriasis-Risk Genes. Am J Hum Genet. 2007;80(2):273-390.
307. Seki R, Nishizawa K. Factors regulating Th17 cells: a review. Biomed Res Clin Prac. 2016;1(4):126-47.
308. Mohr A, Malhotra R, Mayer G, Gorochov G, Miyara M. Human FOXP3+ T regulatory cell heterogeneity. Clin Transl Immunol. 2018;7(1):e1005.
309. Willson TA, Kuhn BR, Jurickova I, Gerad S, Moon D, Bronkowski E, i sur. STAT3 Genotypic Variation and Cellular STAT3 Activation and Colon Leukocyte Recruitment in Pediatric Crohn Disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012;55(1):32-43.

310. Ip WKE, Hoshi N, Shouval DS, Snapper S, Medzhitov R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. Science. 2017;356(6337):513-9.
311. Nivarthi H, Gordziel C, Themanns M, Kramer N, Eberl M, Rabe B, i sur. The ratio of STAT1 to STAT3 expression is a determinant of colorectal cancer growth. Oncotarget. 2016;7(32):51096-106.
312. Gene. Stat3 signal transducer and activator of transcription 3. Dostupno na adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=20848. Datum pristupa: 05.01.2019.
313. Ferguson LR, Han DY, Fraser AG, Huebner C, Lam WJ, Morgan AR, i sur. Genetic factors in chronic inflammation: single nucleotide polymorphisms in the STAT-JAK pathway, susceptibility to DNA danage and Crohn's disease in a New Zeland population. Mutat Res. 2010;690(1-2):108-15.
314. Waterman M, Xu W, Stempak JM, Milgrom R, Bernstein CN, Griffiths AM. Distinct and overlaping genetic loci in Crohn's disease and ulcerative colitis: correlations with pathogenesis. Inflamm Bowel Dis. 2011;17(9):1936-42.
315. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Hedderich J, May S, Lu T, i sur. Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. Nat Genet. 2008;40(6):713-5.
316. Can G, Tezel A, Gürkan H, Tozkir H, Ünsal G, Soylu AR, i sur. Investigation of IL23R, JAK2, and STAT3 gene polymorpisms and gene-gene interactions in Crohn's diseas and ulcerative colitis in Turkish population. Turk J Gastroenterol. 2016;27(6):525.36.
317. Amre DK, Mack DR, Morgan K, Israel D, Deslandres C, Seidman EG, i sur. Susceptibility loci reported in genome-wide association studies are associated with Crohn's disease in Canadian children. Aliment Pharmacol Ther. 2010;31(11):1186-91.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime:	Boris Takač
Datum rođenja:	26. 05. 1968.
Adresa:	Šet. P. Preradovića 9, Osijek
Mobitel:	091 224 7730
Elektronička pošta:	btakac@gmx.net

ŠKOLOVANJE

1975. – 1983.	Osnovna škola Braća Ribar, Osijek
1983. – 1987.	Srednja medicinska škola Ruđer Bošković, Osijek
1987. – 1994.	Pedagoški fakultet, biologija i kemija, Osijek
1995. – 1999.	Poslijediplomski studij Biomedicina, Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb
2009. – danas	Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek

STRUČNO I ZNANSTVENO USAVRŠAVANJE

1995. - 1996. Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

1997.	Ortho-Clinical Diagnostics Center: „Automation in Immunology“. Strassbourg, Francuska
1997.	1. poslijediplomski seminar Medicinske ljetne škole Dubrovnik, „Uvod u molekularnu medicinu“, Zagreb
1998.	2. poslijediplomski seminar Medicinske ljetne škole Dubrovnik, „Oncology/ Solid Tumors“, Dubrovnik
2000.	4. poslijediplomski seminar Medicinske ljetne škole Dubrovnik, „Molecular Medicine-Signal Transduction“, Dubrovnik
2003.	Ortho-Clinical Diagnostics Centar: „Vitros ECI Field Engineer Training“. Strassbourg, Francuska
2004.	LKB Corporate Education Centre: „Automation in specific IgE testing/ Automation in Autoimmunity parameter testing/Celiac Disease Management“. Beč, Austrija

2010. - 2011. Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

ZAPOSLENJE

1995. – 1995.	Medicinski fakultet Osijek, znanstveni novak
1995. – danas	Klinički zavod za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja, Klinički bolnički centar Osijek

ZNANSTVENA DJELATNOST

Izvorni znanstveni radovi

1. Takač B, Mihaljević S, Glavaš-Obrovac Lj, Kibel A, Suver-Stević M, Canecki-Varžić S, i sur. Interactions between Interleukin-6, C-reactive Protein and Interleukin-6 (-174) G/C Polymorphism in Pathogenesis of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Acta Clin Croat. 58/2019.

2. Simundic T, Jelakovic B, Dzumhur A, Turk T, Sahinovic I, Dobrosevic B, i sur. Interleukin 17A and Toll-like Receptor 4 in Patients with Arterial Hypertension. Kidney Blood Press Res 2017;42:99-108.

3. Vrselja Z, Šram M, Andrijevac D, Takač B, Lekšan I, Radić R, i sur. Transcardial gradient of adiponectin, interleukin-6 and tumor necrosis factor-α in oveweight coronary artery disease patients. Cytokine. 2015;76(2):321-7.

4. Takač B, Mihaljević S, Štefanić M, Glavaš-Obrovac Lj, Kibel A, Samardžija M. Importance of Interleukin 6 in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. Coll. Antropol. 2014;38(2):659-64.

5. Mihaljević S, Kibel A, Štefanić M, Glavaš-Obrovac Lj, Takač B, Krznarić Ž, i sur. Polymorphisms of Interleukin-23 Receptor in Patients with Inflammatory Bowel Disease in a Croatian Tertiary Center. // Collegium antropologicum. 2013;(37)4; 1171-7.

6. Takač B, Kosović P, Steiner-Brezničar R, Mihaljević I. Significance of the “Recovery” Test During Thyroglobulin Concetration Measurement. Acta Clin Croatica 2007;46(3):71.

7. Vcev A, Vceva A, Kurbel S, Takac B, Stimac D, Ivandić A, i sur. Amoxycillin, clarithromycin and either sucralfate or pantoprazole for eradication of Helicobacter pylori in duodenal ulcer (a randomized controlled trial). Wien Klin Wochenschr. 2001;113(23-24):939-41.

8. Vcev A, Stimac D, Ivandić A, Vceva A, Takac B, Pezerović D. Pantoprazole, amoxycillin and either azithromycin or clarithromycin for eradication of Helicobacter pylori in duodenal ulcer. Aliment Pharmacol Ther. 2000;14(1):69-72.

9. Vcev A, Stimac D, Vceva A, Takac B, Ivandić A, Pezerović D, i sur. Pantoprazole versus omeprazole in the treatment of reflux esophagitis. Acta med. Croatica. 1999;53(2):79-82.

10. Vcev A, Stimac D, Vceva A, Takac B, Pezerović D, Ivandić A. High Dose Omeprazole Plus Amoxycillin and Azithromycin in Eradication of Helicobacter Pylori in Duodenal Ulcers. Helicobacter. 1999;4(1):54-7.

11. Vcev A, Vceva A, Takac B, Dmitrović B, Stimac D, Stimac T, i sur. Omeprazole, azithromycin and amoxycillin or amoxycillin plus clavulanic acid in eradication of Helicobacter pylori in duodenal ulcer disease. Acta med. Croatica. 1998;52(4-5):209-14.

12. Vcev A, Ivandić A, Vceva A, Stimac D, Takac B, Mikolasević I, i sur. Infection with Helicobacter pylori and long-term use of non-steroidalantiinflamatory drugs. Acta med. Croatica. 1998;52(1):27-31.

13. Vcev A, Vceva A, Stimac D, Takac B, Dmitrović B, Kovac D. Omeprazole, azithromycin and either amoxycillin or metronidazole in eradication of Helicobacter pylori in duodenal ulcer. Aliment Pharmacol Ther. 1998;12(5):453-6.

Znanstveni rad u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom

Takač S, Delagić A, Takač B. The Influence of Living Condition on Human Mental Health. Internatoinal Conference Sustainable Building, Maastricht. 2000:368-70.

Sažeci u zbornicima skupova

1. Kibel A, Mihaljević S, Štefanić M, Glavaš - Obrovac L, Krznarić Ž, Takač B, Šegec I.

Polymorphisms of Interleukin-23 Receptor in Patients with Inflammatory Bowel Disease in a Croatian Tertiary Center // Falk Symposium 192; IBD 2014: Thinking out of the box; P65 Pariz. 2014;147.

2. Pinotić Lj, Marjanac I, Pušeljić S, Pinotić K, Žuro-Tijardović I, Štajner-Brezničar R, Takač B, Dokonal Z. Učestalost pozitivnog serološkog nalaza Helycobacter pylori u djece s recidivnim bolovima u trbuhu. Knjiga sažetaka - Simpozij pedijatara – Osijek, 2003.

Kongresno priopćenje u CC časopisu

Mihaljević S, Smolić R, Štefanić M, Krznarić Ž, Glavaš-Obrovac Lj, Takač B, Kibel A. Single nucleotide polymorphism in the STAT3 gene may influence susceptibility to UC and CD in a Croatian population. Asian Pacific Digestive Week 2013 and World Congress of Gastroenterology (Gastro 2013 APDW/WCOG): abstracts; u: Journal of Gastroenterology and Hepatology 28 (2013)(S3);Poster presentation 23-693;P1479.