Uloga alelnih varijanata MDR1 gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva i odgovoru na liječenje glukokortikoidima

Brinar, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:064710

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI



Središnja medicinska knjižnica

Brinar, Marko (2011) ***Uloga alelnih varijanata MDR1 gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva i odgovoru na liječenje glukokortikoidima.*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/1386

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Marko Brinar

Uloga alelnih varijanata *MDR1* gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva i odgovoru na liječenje glukokortikoidima

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Marko Brinar

Uloga alelnih varijanata *MDR1* gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva i odgovoru na liječenje glukokortikoidima

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Disertacija je izrađena u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju i Kliničkom zavodu za molekularnu dijagnostiku

Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Voditelj istraživanja: prof. dr. sc. Boris Vucelić

Sadržaj

POPIS OZNAKA I SKRAĆENICA 3
1. Uvod 4
1.1. Upalne bolesti crijeva 6
1.1.1. Crohnova bolest 6
1.1.2. Ulcerozni kolitis 6
1.2. Epidemiologija 7
1.3. Etiologija i patofiziologija 8
1.3.1. Čimbenici okoliša 8
1.3.2. Genetika 10
1.3.3. MDR1 16
1.4. Liječenje upalnih bolesti crijeva 23
1.4.1. Glukokortikoidi u liječenju upalnih bolesti crijeva 23
1.5. *MDR1* i farmakogenetika 26
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA 30
3. MATERIJALI I METODE 35
3.1. Ispitanici 36
3.2. Genotipizacija *MDR1* polimorfizama 38
3.3. Statistička obrada podataka 41
4. REZULTATI 43
4.1. Osnovne kliničke karakteristike ispitanika 44
4.2. Povezanost *MDR1* C3435T i G2677T polimorfizma i upalnih bolesti crijeva 47
4.3. Povezanost haplotipova 2 lokusa (C3435T/G2677T) i upalnih bolesti crijeva 52
4.4. Analiza povezanosti genotipa i fenotipskih karakteristika 53
4.5. Utjecaj *MDR1* C3435T i G2677T/A polimorfizama na odgovor 57
5. RASPRAVA 62
6. ZAKLJUČAK 73
7. SAŽETAK 75
8. SUMMARY 78
9. LITERATURA 81
10. ŽIVOTOPIS 95

POPIS OZNAKA I SKRAĆENICA

95% CI – 95% interval pouzdanosti (*engl. 95% confidence interval)*

ATP – adenozin-trifosfat

CD – Crohnova bolest (*engl. Crohn's disease)*
FRET – prijenos energije fluorescentnom rezonancijom (*engl. fluorescence resonance energy transfer*)

GWAS – asocijacijske studije s obuhvaćanjem cijelog genoma (*engl. genome-wide association study)*

IBD – upalne bolesti crijeva (*engl. inflammatory bowel diseases*)
IBDU – neklasificirana upalna bolest crijeva (*engl. inflammatory bowel disease unclassified*)

IL-23 – interleukin 23

IL23R – IL-23 receptor

LRR – ponavljajući slijedovi leucina (*engl. leucine rich repeats*)

MDR1 – gen višestruke otpornosti na lijekove 1 (engl. *multidrug resistance 1 gene*)

NF-κB – nuklearni faktor κB

OR – omjer vjerodostojnosti (*engl. odds ratio*)

PAMP – molekularni uzorci povezani s patogenima (*engl. patogen-associated molecular patterns*)

Pgp – P-glikoprotein

RT-PCR – lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real time polymerase chain reaction*)

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (*engl. single nucleotide polymorphism)*

TNF-α – faktor nekroze tumora α

UC – ulcerozni kolitis (engl. ulcerative colitis)

1. Uvod

1.1. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva (IBD, engl. *inflammatory bowel disease)* kronične su upalne bolesti gastrointestinalnog trakta nepoznate etiologije i patogeneze. Dva glavna oblika upalnih bolesti crijeva su Crohnova bolest (CD, *engl. Crohn's disease*) i ulcerozni kolitis (UC, engl. *ulcerative colitis*) koji su definirani svojim kliničkim, endoskopskim, radiološkim i histološkim karakteristikama (1). Ponekad, u oko 10 % bolesnika, na temelju kliničkih, radioloških, endoskopskih i histoloških karakteristika, ne može se pouzdano utvrditi o kojem se obliku bolesti radi te se tada govori o neklasificiranoj upalnoj bolesti crijeva (IBDU, engl. *inflammatory bowel disease unclassified*).

1.1.1. Crohnova bolest

Crohnova bolest je kronična upalna bolest gastrointestinalnog trakta koja može zahvatiti bilo koji dio probavne cijevi od usne šupljine do anusa no najčešće zahvaća terminalni ileum. Crohnova bolest karakterizirana je diskontinuiranom upalom pri čemu se između segmenata probavne cijevi zahvaćene upalom nalaze područja zdrave sluznice stvarajući, na taj način, „skip“ lezije karakteristične za ovu bolest. Histološki, upala je transmuralna te zahvaća sve slojeve stijenke crijeva, a karakterizirana je nakupljanjem makrofaga uz često formiranje granuloma bez kazeozne nekroze koji predstavljaju tipičan histološki nalaz u bolesnika s Crohnovom bolešću (2).

1.1.2. Ulcerozni kolitis

Ulcerozni kolitis karakteriziran je upalnim procesom koji počinje u rektumu odakle se širi prema proksimalno te u kontinuitetu zahvaća pojedine dijelove debelog crijeva ili cijelo debelo crijevo. Za razliku od Crohnove bolesti, u ulceroznom kolitisu upala je ograničena na

sluznicu te u manjoj mjeri na submukozu uz infiltraciju sluznice neutrofilima i formiranje karakterističnih kriptalnih apscesa uz depleciju mucina.

1.2. Epidemiologija

Do sad je proveden niz epidemioloških istraživanja u svrhu definiranja incidencije i prevalencije upalnih bolesti crijeva. Rezultati tih istraživanja jasno pokazuju postojanje razlika u učestalosti upalnih bolesti crijeva u različim dijelovima svijeta. Na temelju rezultata postojećih istraživanja incidencija upalnih bolesti crijeva najviša je u visoko razvijenim zemljama zapadne Europe te Sjeverne Amerike dok se znatno niže stope bilježe u Aziji, Japanu i Južnoj Americi. Na temelju rezultata populacijskih studija provedenih u područjima visoke incidencije, incidencija Crohnove bolesti kreće se u rasponu od 2.3-9.8 slučajeva na 100 000 stanovnika dok se incidencija ulceroznog kolitisa kreće u rasponu od 1.5-15.1 na 100 000 stanovnika (3,4). Zanimljivo je da su geografske razlike u učestalosti ovih bolesti zamjećene i unutar područja visoke incidencije. Incidencija upalnih bolesti crijeva u Europi pada idući od sjevera prema jugu stvarajući gradijent sjever-jug pri čemu je incidencija Crohnove bolesti na sjeveru 80% viša u odnosu na incidenciju na jugu, a isti efekt postoji i u ulceroznom kolitisu sa 40% većom incidencijom bolesti na sjeveru Europe (5). Slične razlike opažene su i u SAD-u (6). Uzrok ove pojave nije razjašnjen no najvjerojatnije se radi o utjecaju više čimbenika poput klimatskih prilika, načina prehrane, ekonomskog stanja te genetske sklonosti.

Epidemiološka istraživanja učestalosti upalnih bolesti crijeva u različitim rasnim i etničkim skupinama ukazala su na značajno višu učestalosti upalnih bolesti crijeva u Askhenazi Židova u usporedbi s bijelačkom populacijom (7). Također, učestalost upalnih bolesti crijeva niža je u crnačkog i latinoameričkog stanovništva u usporedbi s bijelcima (6,8).

Upalne bolesti crijeva mogu se javiti u bilo kojoj dobi života no tipično pokazuju bimodalnu distribuciju s najvećom incidencijom između 15-30 godine života te još jednim, manjim vrškom, između 50-80 godine života. Obje bolesti podjednako zahvaćaju oba spola. U literaturi se mogu naći podaci o većoj učestalosti ulceroznog kolitisa u muškaraca te Crohnove bolesti u žena, no ti podaci nisu potvrđeni drugim istraživanjima te se ne može govoriti o većoj učestalosti neke od ovih bolesti u osoba određenog spola.

1.3. Etiologija i patofiziologija

Upalne bolesti crijeva bolesti su nepoznate etiologije. Patogeneza bolesti nije u potpunosti poznata, no smatra se da obje bolesti nastaju kao rezultat složenih interakcija između genetskih faktora, imunoloških poremećaja i čimbenika okoliša. Pri tome se glavno mjesto u patogenezi upalnih bolesti crijeva pripisuje abnormalnom imunološkom odgovoru na antigene uobičajene intestinalne flore u osoba sa specifičnim genetskim promjenama koje stvaraju predispoziciju za nastanak bolesti (1).

1.3.1. Čimbenici okoliša

Brojna istraživanja proučavala su utjecaj različitih čimbenika okoliša na pojavu i tijek upalnih bolesti crijeva. Usprkos činjenici da su istraživani brojni čimbenici okoliša, rezultati istraživanja potvrdili su povezanost svega njih nekoliko sa upalnim bolestima crijeva. Na temelju dosadašnjih istraživanja, najznačajniji čimbenik okoliša za razvoj upalnih bolesti crijeva jest pušenje. Zanimljivo, pušenje je faktor rizika za pojavu Crohnove bolesti gdje osobe koje puše imaju oko 1,7 puta veći rizik pojave bolesti, a istovremeno ima zaštitno djelovanje na pojavu ulceroznog kolitisa s 40% manjim rizikom pojave bolesti u pušača (9,10). Također osobe koje su prestale pušiti imaju povećani rizik pojave ulceroznog kolitisa u odnosu na nepušače, a taj je rizik posebno visok u periodu neposredno nakon prestanka

pušenja (9,10). Način na koji pušenje ostvaruje svoje učinke nije razjašnjen no pretpostavlja se da se radi o utjecaju na sastav sluzi u kolonu, utjecaju na vaskularne elemente sluznice uz moguće izravno proupalno djelovanje komponenata duhanskog dima. Izuzev utjecaja na pojavu bolesti, pušenje ima i modulirajući efekt na tijek bolesti. Tako bolesnici s Crohnovom bolesti koji puše imaju agresivniji tijek bolesti s učestalijim i težim relapsima, češćim hospitalizacijama i većom stopom postoperativnog recidiva bolesti u odnosu na nepušače (11-13). Rezultati brojnih istraživanja sugeriraju da je apendektomija zaštitni čimbenik za razvoj ulceroznog kolitisa (14,15). Rizik razvoja ulcerozog kolitisa manji je za 55% posto u osoba u koji je apendektomija učinjena prije 20-te godine života (15). Mehanizam protektivnog djelovanja apendektomije nije poznat. Nasuprot tomu, apendektomija nema nikakav utjecaj na incidenciju Crohnove bolesti (16).

Brojna su istraživanja proučavala povezanost upalnih bolesti crijeva i specifičnih uzročnika zaraznih bolest. Naime, prema danas prihvaćenom shvaćanju fiziološka crijevna flora pridonosi pojavi upalnih bolesti crijeva u osoba sa genetskom sklonošću uz utjecaj čimbenika okoliša. Neizravna potvrda ove hipoteze ogleda se u činjenici da se u eksperimetalnih životinja, u kojih je sklonost razvoju upale gastrointestinalnog trakta stvorena genetskim inžinjeringom, bolest ne razvija ukoliko se životinje nalaze u sterilom okolišu, ali se brzo javlja u prisutnosti luminalne flore (17,18). Nadalje, u nekoliko je istraživanja opažena veća učestalost pojave upalnih bolesti crijeva u osoba koje su preboljele akutni gastroenteritis (19). Brojne studije pokušale su uzročno povezati pojavu upalnih bolesti crijeva s infekcijom specifičnim uzročnikom. U literaturi se nalaze podaci o povezanosti pojave Crohnove bolesti s infekcijom različim uzročnicima poput virusa morbila, Mycobacterium paratuberculosis ili paramyxovirusima no navedene asocijacije nisu adekvatno potvrđene istraživanjem na nezavisim kohortama bolesnika te za sada nema znanstvenih dokaza o infektivnom agensu kao uzročniku upalne bolesti crijeva.

Povezanost s upalnim bolestima crijeva istraživana je i za brojne druge čimbenike okoliša poput upotrebe oralnih kontraceptiva, upotreba nesteroidnih antireumatika, dojenjem, intolerancije na bjelančevine kravljeg mlijeka u dojenačkoj dobi, potrošnje rafiniranih šećera te upotrebe izotretionina. Rezultati navedenih istraživanja su kontradiktorni te je stvarna uloga navedenih čimbenika okoliša u razvoju upalnih bolesti crijeva nejasna.

1.3.2. Genetika

Opažanje da se upalne bolesti crijeva javljaju s većom učestalosti u bijelaca i Askhenazi Židova otvorilo je pretpostavku o utjecaju genetskih čimbenika u patogenezi bolesti. Na ulogu genetskih faktora u patogenezi bolesti dodatno su upućivali i rezultati istraživanja u obiteljima oboljelih od upalnih bolesti crijeva koja su pokazala da se upalne bolesti crijeva često javljaju unutar više članova jedne familije. Tako 20-25% oboljelih ima srodnika u prvom koljenu koji boluje od Crohnove bolesti ili ulceroznog kolitisa (20,21). Sukladno tomu, srodnici u prvom koljenu oboljelih od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa imaju oko 10 puta veći rizik od razvoja bolesti u odnosu na opću populaciju (20). Zanimljivo je da se fenotip bolesti u pravilu ne mjenja unutar jedne familije tako da ukoliko jedan član oboli od Crohnove bolesti tada će najvjerojatnije i drugi oboljeli članovi iste obitelji imati Crohnovu bolest. Dodatno, unutar jedne obitelji postoji i konkordantnost u pogledu lokalizacije bolesti između pojedinih oboljelih članova (20). Međutim, glavnu potvrdu uloge genetskih faktora u patogenezi bolesti dala su istraživanja na parovima monozigotnih i dizigotnih blizanaca. U tim istraživanjima nađena je znatno viša konkordantnost bolesti u monozigotnih blizanaca nego u dizigotnih (22-25). Konkordatnost za Crohnovu bolest kreće se u rasponu od 20%-50% dok se konkordantnost za ulcerozni kolitis kreće od 6%-16%. Istovremeno, konkordantnost u dizigotnih blizanaca kreće se u rasponu od 0%-7% za Crohnovu bolest te od 0%-5% za ulcerozni kolitis.Zaključno, ova su istraživanja potvrdila pretpostavku da je sklonost pojavi

bolesti nasljedna te da je uloga genetskih faktora u patogenezi bolesti značajnija u Crohnovoj bolesti nego u ulceroznom kolitisu. Međutim, izostanak jednostavnog mendelovskog naslijeđivanja uputio je na činjenicu da u ovim bolestima utjecaj multiplih gena utječe na rizik pojave bolesti u određene osobe. Na temelju ovih spoznaja započela su istraživanja genetskih faktora u upalnim bolestima crijeva. U 90-tim godinama prošlog stoljeća u istraživanju povezanosti genetskih čimbenika s pojavom upalnih bolesti crijeva koristila se „linkage" metoda. Ova metoda se koristi za identifikaciju kromosomalnih regija čije naslijeđivanje koincidira sa prisutnošću ili odsutnošću određene karakteristike. U svrhu ovakvih istraživanja koriste se obitelji s više oboljelih članova te se u tih članova analizira naslijeđivanje određenih kromosomalnih regija te u koliko je stupanj naslijeđivanja veći od onog očekivanog na temelju slučajnosti tada se moguće u navedenom području nalazi genetski čimbenik koji igra ulogu u pojavi bolesti. Koristeći se ovim pristupom naposlijetku se iskristaliziralo 7 regija repliciranih u nezavisnim kohortama bolesnika. Neke od ovih regija bile su povezane isključivo se Crohnovom bolešću, neke isključivo s ulceroznim kolitisom no većina je pokazivala asocijaciju s oba fenotipa upalnih bolesti crijeva što je potvrdilo ranija očekivanja da će određeni geni nositi sklonost pojavi određenog fenotipa dok će drugi biti „zajednički" za obje bolesti (IBD geni). Nadalje, rezultati linkage studija odnose se na kromosomalne regije unutar kojih se nalaze brojni geni potencijalno povezani uz pojavu bolesti (Tablica 1). Sljedeći korak u istraživanju bila je identifikacija gena od kojih potječe signal dobiven linkage studijama. Godine 2001. dvije grupe istraživača, jedna koristeći se pozicijskim kloniranjem i druga koristeći "candidate gene" pristup, identificirale su *NOD2/CARD15* gen kao izvor signala iz IBD1 regije (27,28). Povezanost *NOD/CARD15* gena s Crohnovom bolesti vrlo je brzo potvrđena u brojnim replikacijskim studijama. Dosadašnje studije identificirale su tri glavne mutacije u *NOD2/CARD15* genu povezane s Crohnovom bolesti.U dvije se radi o nesinonimskim polimorfizmima jednog nukleotida (SNP; *engl. single nucleotide*

polymorphism) (R702W-SNP8; G908R-SNP12) dok se u posljednjem slučaju radi o frameshift mutaciji (3020insC, SNP13) u području regije NOD2/CARD15 proteina bogate ponavljajućim slijedovima leucina (LRR; *engl. leucin rich repeats*) (27,28). *NOD2/CARD15* do danas je najsnažniji genetski čimbenik otkriven u Crohnovoj bolesti te objašnjava oko 20% genetske podloge ove bolesti. Heterozigoti za mutacije *NOD2/CARD15* gena imaju 2-3x veći rizik obolijevanja od Crohnove bolesti dok homozigoti imaju oko 20x veći rizk u odnosu na nosioce divljeg tipa. Daljna istraživanja ukazala su da *NOD2/CARD15* ima utjecaja i na lokalizaciju i tijek boelsti te je tako povezan sa ilealnom lokalizacijom, strikturirajućim fenotipom te pojavom bolesti u ranijoj životnoj dobi (29,30). Značaj ovog otkrića nije samo u tome što je to prvi gen povezan s upalnim bolestima crijeva već je ovim otkrićem definitivno potvrđena uloga imunoloških poremećaja u patogenezi bolesti.

Tablica 1.

Lokusi	Kromosomske regije	Povezanost s fenotipom	Geni kandidati unutar lokusa
IBD1	16p11-q21	CD	NOD2/CARD15
IBD2	12p13.2-q24	UC	VDR, NRAMP, STAT6, MMP18, AVIL, Interferon γ, B_7-integrin
IBD3	6p21-p23	CD i UC	Glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC) klasa I i II, TNF
IBD4	14q11-q12	CD	TCR α i γ, Proteasomski cluster, Leukotrien B_4 receptor
IBD5	5q31-q35	CD	IL4, IL6, CD14, OCTN
IBD6	19p13-q13	CD	ICAM1, C3, TBXA2, LTB4H
IBD7	1p36.2-p32	CD i UC	TNF-R obitelj, HSPG2, UBE1L

Modificirano prema Brant et al. Inflamm Bowel Dis (26).

NOD2/CARD15 dio je Ced4-APAF1 superobitelji proteina i ima ekspresiju u različitim stanicama uključujući monocite, dendritičke stanice, Panethove stanice i stanice intestinalnog epitela. NOD2/CARD15 protein smješten je intracelularno i služi kao senzor za molekularne uzorke povezane s patogenima (PAMP; engl. *patogen- associated molecular pattterns*). Točnije, NOD2/CARD15 je senzor za muramil-dipeptid (MDP), najmanji strukturni dio peptidoglikana koji je građevna jedinica bakterijske stijenke Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Vezanje MDP-a na NOD2/CARD15 dovodi do aktivacije signalne kaskade koja rezultira aktivacijom nuklearnog faktora κB (NF-κB) što dovodi do produkcije proinflamatornih citokina (31). Interesantno je da je još uvijek nejasno je li ekspresija NF-κB povišena ili smanjena u bolesnika s Crohnovom bolesti. Primjerice, in vitro studije ukazuju na smanjenu aktivnost NOD/CARD15 proteina te time na efekt gubitka funkcije (32). S druge strane, aktivacija NF-κB regulirana je LRR regijom NOD2/CARD15 proteina i u teoriji delecija u ovom području mogla bi dovesti do nekontrolirane aktivacije NF-κB. Sukladno tomu, nađena je povećana aktivacija NF-κB u prisutnosti jedne od mutacija u NOD2/CARD15 genu povezanih s Crohnovom bolesti nakon stimulacije MDP-om što bi moglo objasniti povećanu razinu NF-κB u tkivima bolesnika s Crohnovom bolesti (33,34). Nadalje, nosioci mutacije u *NOD2/CARD15* genu imaju smanjeno oslobađanje α-defenzina iz Panethovih stanica nakon prepoznavanja komponenata staničnog zida bakterija (35). Defenzini su sastavni dio lokalnog imunološkog sustava crijeva te iz stanica intestinalnog epitela izlučuju u lumen gdje djeluju kao antimikrobni proteini. Smanjena aktivnost NOD/CARD15 u osoba s mutacijom dovela bi do smanjenog oslobađanja defenzina što bi posljedično dovelo do smanjenja mogućnosti obrane od bakterija i perzistentne upale (36). Otkriće *NOD2/CARD15* gena dovelo je do velikog interesa u području IBD genetike te je u sljedećim godinama publiciran veliki broj studija u kojima je mnoštvo gena povezano s Crohnovom bolesti no nađene asocijacije nisu uvjerljivo potvrđene u nezavisnim kohortama.

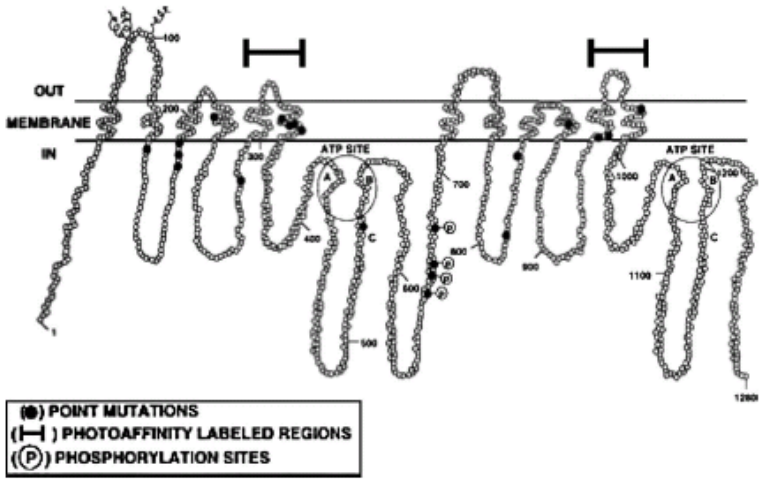
Veliki napredak u području IBD genetike započinje krajem 2006. godine provođenjem asocijacijskih studija koje obuhvaćaju čitav genom (GWAS; *engl. genome -wide association studies*). U ovim se studijama istovremeno testira veliki broj SNP-ova, od 300 000 – 500 000 tisuća, na velikom uzorku bolesnika pri čemu se SNP-ovi biraju tako da omogućuju pokrivanje cijelog genoma. Velika je prednost ovih studija što nisu vezane uz hipotezu dok im je glavni ograničavajući faktor činjenica da je potrebno uključiti veliki broj bolesnika zbog velikog broja testiranih markera. Do sada je provedeno više GWAS-ova u Crohnovoj bolesti te nekoliko u ulceroznom kolitisu. Rezultati navedenih istraživanja uz meta-analize učinjenih GWAS-ova dovele su do velikog broja gena povezanih s obje bolesti (IBD geni) ili pak gena ekskluzivno povezanih uz ulcerozni kolitis ili Crohnovu bolest. Međutim, usprkos velikog broja asocijacija koje se nalaze ovim studijama svega ih je nekoliko uvjerljivo replicirano u nezavisnim kohortama i od više autora. Više autora potvrdilo je povezanost mutacija u 2 gena za autofagiju, *ATG16L1* i *IRGM* s Crohnovom bolesti te mutacija u genu za receptor za interleukin-23 (*IL23R*; *engl. interleukin-23 receptor*) s Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom (37-39). Autofagija je fundamentalan homeostatski stanični proces koji se nalazi u svim eukariotskim stanicama koje su do danas proučavane. Osnovno obilježje autofagije je dopremanje sastojaka citoplazme do lizosoma u specifičnim vakuolama s dvostrukom membranom koje se nazivaju autofagosomima. Istraživanja su pokaza da osim dopremanja sastojaka citoplazme poput staničnih organela ili velikih proteina, autofagija sudjeluje u prirođenoj i stečenoj imunosti ograničavajući život intracelularnih patogena te sudjelujući u prezentaciji citosolnih antigena putem molekula MHC klase II (40-43). U više je istraživanja potvđena i asocijacija između Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa te mutacija unutar *IL23R* (38,39). Interleukin-23 (IL-23) smatra se danas ključnim citokinom koji dovodi do diferencijacije i održavanja Th-17 stanica koje se pak smatraju ključnima u podržavanju kronične intestinalne upale koja karakterizira ove bolesti (44). Skupno, potvrđene asocijacije

upućuju na centralno mjesto disregulacije imunološkog odgovora u patogenezi upalnih bolesti crijeva.

1.3.3. MDR1

Termin „višestruka otpornost na lijekove“ (MDR; engl. *multidrug resistance*) opisuje fenomen u kojem stanice tumora u staničnoj kulturi pri razvoju rezistencije na jedan citotoksični lijek kojem su izložene istovremeno razvijaju rezistenciju na veliki broj strukturno i funkcionalno različitih spojeva (45). Istraživanja su pokazala da MDR stanice imaju prekomjernu ekspresiju P-glikoproteina (Pgp), proteinskog produkta gena višestruke otpornosti na lijekove 1 (*MDR1*; *engl. mutidrug resistance 1 gene*) još nazvanog i *ABCB1* (engl. *ATP-binding cassete subfamily B member 1*) (46). U ljudi opisana su dva *MDR* gena, *MDR1* i *MDR3*. Međutim, čini se da je samo *MDR1* gen u ljudi uključen u transport i stvaranje otpornosti na lijekove (47). *MDR1/ABCB1*gen smješten je na dugom kraku kromosoma 7 i kodira integralni transmembranski protein Pgp. Pgp je 170 kDa protein, građen od 1280 aminokiselina i sadrži 2 homologne polovice, svaka od 610 aminokiselina spojenih fleksibilnom poveznicom od 60 aminokiselina (48). Svaka polovica ima N terminalnu hidrofobnu domenu koja sadrži 6 transmembranskih domena nakon koje slijedi hidrofilna domena unutar koje se nalazi vezno mjestoza adenozin-trifosfat (ATP) (slika 1). Pgp djeluje kao o ATP-u ovisan membranski transportni protein široke specifičnosti koji odstranjuje substrate iz stanice prije nego što dospiju u citoplazmu. Visoka ekspresija ovog proteina nađena je na epitelnim površinama crijeva, žučnih vodova, proksimalnih tubula bubrega i središnjeg živčanog sustava gdje tvori osnovu hematoencefalne barijere (46,49,50).

Slika 1. Hipotetska dvodimenzionalna struktura P-glikoproteina 170



Preuzeto iz Ho et al. Inflamm Bowel Dis 2005 (48)

Također, u stanicama imunološkog sustava, poput mononuklearnih stanica periferne krvi, makrofaga, NK stanica, dendritičkih stanica te T i B limfocita, postoje različiti stupnjevi ekspresije Pgp-a (51). Unutar probavne cijevi ekspresija Pgp-a najviša je u kolonu te distalnim dijelovima tankog crijeva (52). Također, u tankom crijevu, razina ekspresije Pgp-a najviša je u ileumu s postupnim padom prema proksimalno uz najniže razine u želucu (52,53). Iako do danas nije poznata fiziološka uloga Pgp-a u probavnom traktu, činjenica da se u probavnoj cijevi nalaze visoke razine ekspresije ovog proteina na apikalnoj površini epitelnih stanica kolona i distalnog tankog crijeva otvaraju pretpostavku da Pgp igra ulogu u zaštiti od ksenobiotika te spriječavanju prodora bakterijskih produkata u intestinalne epitelne stanice. Na taj način Pgp moguće igra ulogu u moduliranju kontakta između domaćina i bakterija u probavnom traktu čime pridonosi održavanju homeostaze. Na moguću ulogu *MDR1* gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva upućuje nekoliko znanstvenih otkrića. Prvo, knock-out miševi za *mdr1a* gen razvijaju kolitis histološki vrlo nalik ulceroznom kolitisu u specifičnom, od patogena slobodnom okolišu (54). Nastanak kolitisa uspješno je preveniran i liječen

primjenom antibiotika što posredno ukazuje na ulogu intestinalne flore u nastanku i podržavanju kolitisa u ovom modelu upalnih bolesti crijeva. U istom je istraživanju dokazano da do razvoja kolitisa dolazi zbog deficita *mdr-1* u epitelnim, a ne u limfoidnim stanicama što sugerira ulogu *mdr-1* gena u moduliranju interakcije između bakterijske flore i domaćina. Nadalje, *MDR1* gen nalazi se na dugom kraku kromosoma 7 u području 7q22. Ista regija povezana je s pojavom upalnih bolesti crijeva u linkage studiji koja je obuhvatila cijeli genom, a ta je povezanost potvrđena u kasnijoj meta-analizi svih linkage studija s obuhvaćanjem cijelog genoma (55,56). U istom području nađena je i asocijacija s ulceroznim kolitisom u nedavno objavljenom GWAS-u (57). Dodatan interes za ulogu *MDR1* gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva pobudilo je otkriće niskih razina ekspresije *MDR1* gena u bolesnika s upalnim bolestima crijeva s posebno niskom ekspresijom u kolonu u bolesnika s aktivnim ulceroznim kolitisom (58).

MDR1 gen dugačak je 209 kilobaza i sastoji se od 28 egzona. Unutar *MDR1* gena opisano je ukupno 29 SNP-ova (59-61). Za dva je polimorfizma, C3435T u egzonu 28 i G2677T/A u egzonu 21, utvrđena korelacija s aktivnošću odnosno ekspresijom Pgp-a i upravo su ta dva najekstenzivije istraživana u području upalnih bolesti crijeva.Prvo istraživanje koje je ukazalo na vezu C3435T polimorfizma u *MDR1* genu i upalnih bolesti crijeva je ono Schwaba i sur. u kojem je nađen značajno veći broj nosioca T alela i TT genotipa u osoba s ulceroznim kolitisom u usporedbi s kontrolama. U istom istraživanju nije nađena povezanost s Crohnovom bolesti (62). Iste godine objavljeno je istraživanje Branta i sur. u kojem se nalazi povezanosti između G2677T SNP-a i upalnih bolesti crijeva pri čemu nosioci G alela imaju povećani rizik razvoja upalnih bolesti crijeva (63). Nakon ovih studija koje su sugerirale povezanost SNP-ova u *MDR1* genu i upalnih bolesti crijeva uslijedio je veći broj replikacijskih studija (64-77) (Tablica 2). Navedene studije dale su kontradiktorne rezultate pri čemu su pojedini autori potvrdili povezanost ovih SNP-ova i upalnih bolesti crijeva (bilo

Crohnove bolesti ili ulceroznog kolitisa) dok drugi nisu našli povezanost upalnim bolestima crijeva. Zanimljivo je da su i one studije u kojima je nađena pozitivna asocijacija kao i one bez asocijacije dobro dizajnirane te su uključivale velik broj bolesnika. Uzimajući u obzir rezultate inicijalno objavljenih studija najuvjerljivijim se činila povezanost između T alela C3435T SNP-a i ulceroznog kolitisa. Ovu opservaciju potvdile su i dvije objavljene meta-analize koje su uključile prvih 6 odnosno 8 objavljenih istraživanja i u kojima je nađena asocijacija 3435T alela i 3435TT genotipa s ulceroznim kolitisom. S druge strane, povezanost s Crohnovom bolesti nije nađena niti za C3435T niti za G2677T SNP (70,78). Međutim, od publikacije navedenih meta-analiza objavljeno je nekoliko studija s oprečnim rezultatima te je stoga uloga polimorfizama *MDR1* gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva i dalje upitna. U prilog mogućoj ulozi *MDR1* gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva govori i činjenica da je izuzev povezanosti pojedinih alela u nekoliko je studija nađena i povezanost haplotipova navedena 2 lokusa s rizikom pojave upalnih bolesti crijeva. Tako su primjerice Ho i sur. objavili povezanost ulceroznog kolitisa sa 2677G/T3435 haplotipom, dok su Urcelay i sur. našli povezanost 2677T/C3436 haplotipa i Crohnove bolesti. Nadalje, Potočnik i sur. u istraživanju koje je uključivalo veliki broj SNP-ova *MDR1* gena pored C3435T i G2677T SNP-a, objavili su 3 haplotipa povezana s povećanim rizikom za razvoj ulceroznog kolitisa i jedan haplotip povezan s smanjenim rizikom pojave ulceroznog kolitisa. U sva se četiri haplotima nalazi G2677T SNP dok se u C3435T nalazi u dva haplotipa koji nose rizik pojave ulceroznog kolitisa.

Osim asocijacije s fenotipom upalnih bolesti crijeva, u navedenim je istraživanjima analizirana povezanost polimorfizama *MDR1* gena i brojnih subfenotipskih karakteristika koja su također ponudila zanimljive rezultate. Tako je primjerice C3435T SNP povezan s ekstenzivim kolitisom i ileokoloničkom lokalizacijom u Crohnovoj bolesti dok je G2677T SNP povezan s pojavom ekstraintestinalnih manifestacija, ekstenzivnim i teškim ulceroznim

kolitisom i pozitivnom obiteljskom anamnezom (68-71,76).Nadalje, Fiedler i sur. su analizirajući povezanost haplotipova i subfenotipskih karakteristika ovih bolesti objavili povezanost 2677GG/3435TT haplotipa i pojave ulceroznog kolitisa u ranoj životnoj dobi i s teškim kliničkim tijekom u ovoj podgrupi bolesnika. Zaključno, *MDR1* gen interesantan je kandidat za ulogu u patogenezi upalnih bolesti crijeva zbog visoke razine ekspresije ovog proteina u crijevu kao i činjenice da se njegova uloga kao čimbenika modulacije kontakta između crijevne mikroflore i domaćina može uklopiti u danas prihvaćeni model patogeneze ovih bolesti. Iako su dosadašnja istraživanja povezanosti *MDR1* gena i upalnih bolesti crijeva dala kontradiktorne rezultate, činjenica da su pojedina istraživanja dala pozitivne rezultate kako u pogledu povezanosti s pojavom bolesti tako i u pogledu povezanosti s pojedinim subfenotipskim karakteristikama, upućuje na nužnost daljnjih istraživanja u ovom području u svrhu definiranja uloge *MDR1* gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva.

Tablica 2. Sažetak genetskih istraživanja povezanosti polimorfizama *MDR1* gena i upalnih bolesti crijeva

Autor	Ispitanici	SNP	Populacija	Rezultati
Schwab et al	149 UC; 126 CD	C3435T	Njemačka	T alel i TT genotip povezani s UC (p=0.049)
Croucher et al	307 UC; 562 CD	C3435T	Njemačka i Velika Britanija	Bez povezanosti s CD i UC
Brant et al	119 UC, 409 CD	C3435T, G2677T	USA*	Povezanost IBD-a i G alela G2677T SNP-a (p=0.003)
Glas et al	123 UC, 135 CD	C3435T	Njemačka	Bez povezanosti s CD i UC
Potocnik et al	144 UC, 139 CD	C3435T, G2677T, C1236T	Slovenija	Povezanost T alela G2677T SNP-a s UC (p=0.02)
Gazzouli et al	85 UC; 120 CD	C3435T	Grčka	Bez povezanosti s CD i UC.
Ho et al	335 UC; 268 CD	C3435T, G2677T	Škotska	Povezanost 3435T alela (p=0.02) i TT genotipa (p=0.04) s UC. Povezanost s ekstenzivnim kolitisom (p=0.003).
Palmieri et al	468 UC; 478 CD	C3435T, G2677T	Italija	Bez povezanosti s CD i UC

Tablica 2. Sažetak genetskih istraživanja povezanosti polimorfizama *MDR1* gena i upalnih bolesti crijeva

Autor	Ispitanici	SNP	Populacija	Rezultati
Onnie et al	580 UC; 828 CD	C3435T, G2677T	Velika Britanija	Povezanost 2677T alela s UC (p=0.03)
Urcelay et al	330 UC, 321 CD	C3435T; G2677T	Španjolska	Povezanost CC genotipa C3435T SNP-a s CD-om (p=0.007).
Oostenbrug et al	224 UC; 533 CD	C3435T	Nizozemska	Bez povezanosti s UC i CD
Lal et al	112 UC; 247 CD	C3435T	Kanada*	Povezanost 3435T alela i CD (p=0.02)
Fiedler et al	144 UC; 244 CD	C3435T, G2677T	Njemačka	Bez povezanosti s CD i UC.
Fischer et al	149 UC, 265 CD	C3435T; G2677T	Mađarska	Bez povezanosti s CD i UC
Ardizzone et al	97 UC, 211 CD	C3435T; G2677T	Italija	Bez povezanosti s CD i UC
Huebner et al	401 UC; 483 CD	G2677T	Novi Zeland	Heterozigoti za G2677T SNP imaju manji rizik za UC (p=0.02)

* Studije uključuju i populaciju Aškenazi Židova

1.4. Liječenje upalnih bolesti crijeva

Temelj uspješnog liječenja upalnih bolesti crijeva je točna dijagnoza bolesti budući da postoje razlike u liječenje ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti. Prilikom stvaranja plana liječenja temeljne odrednice u odabiru načina liječenja su lokalizacija i aktivnost bolesti. U slučaju Crohnove bolesti način liječenja, osim o aktivnosti i lokalizaciji, ovisiti će i o ponašanju bolesti (2). Cilj liječenja je postizanje i održavanje remisije bolesti. Liječenje upalnih bolesti crijeva može biti medikamentozno i kirurško pri čemu se kirurško liječenje u pravilu odgađa do onog časa kad više ne postoji mogućnost kontrole aktivnosti bolesti lijekovima ili je nastupila jedna od komplikacija bolesti koja zahtjeva kirurški pristup. U medikamentoznom liječenju ovih bolesti na raspolaganju imamo različite formulacije aminosalicilata, glukokortikoide, imunomodulatore poput azatioprina i metotreksata, imunosupresiv poput ciklosporina i takrolimusa, te naposljetku biološku terapiju u vidu monoklonskih protutjela na faktor nekroze tumora α (TNF-α). Dvije su osnovne strategije liječenja: „step up“ pristup i „top-down“ pristup (2). U prvom se pristupu liječenje započinje manje potentnim lijekovima te se u slučaju njihove terapijske neučinkovitosti dodaju lijekovi druge odnosno treće linije. S druge strane, „top-down“ pristup zagovara ranu primjenu najpotentnijih lijekova s postupnim uvođenjem manje učinkovitih lijekova u fazi remisije bolesti. Trenutačno, u liječenju prevladava „step-up“ pristup uz modifikacije u vidu ranog uvođenja imunomodulatorne terapije u odabranih bolesnika.

1.4.1. Glukokortikoidi u liječenju upalnih bolesti crijeva

Glukokortikoidi su snažni inhibitori aktivacije T limfocita i sekrecije citokina, a svoje protuupalno djelovanje ostvaruju vežući se na specifične citoplazmatske glukokortikoidne receptore. Nakon vezivanja na receptor dolazi do njegove aktivacije i stvaranja homodimera dva aktivirana glukokortikoidna receptora koji potom ulazi u jezgru stanice i utječe na

transkripciju velikog broja gena. Rezultat je široki spektar djelovanja na imunološki sustav uključujući inhibiciju proliferacije i regrutiranja limfocita, monocita i makrofaga, migracije neutrofila na mjesta upale te smanjenje produkcije proinflamatornih citokina, prostanglandina i leukotriena (79).

Budući da većina stanica ima glukokortikoidne receptore, glukokortikoidi ostvaruju svoj učinak na velikom broju stanica uključujući i upalne stanice uključene u patogenezu upalnih bolesti crijeva. Sukladno tomu, istraživanja su potvrdila učinkovitost glukokortikoida u indukciji remisije u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu (80-82). Nasuprot tomu, glukokortikoidi se nisu pokazali učinkovitima u održavanju remisije u upalnim bolestima crijeva (83). U skladu s tim, europski konsenzus o dijagnozi i liječenju Crohnove bolesti preporuča primjenu glukokortikoida kao lijek prvog izbora za postizanje remisije bolesti izuzev vrlo blagih oblika bolesti (84). Isto tako, europski konsenzus o liječenju ulceroznog kolitisa preporuča primjenu glukokortikoida u indukciji remisije u umjereno aktivnoj i jako aktivnoj bolesti (85). Usprkos djelotvornosti glukokortikoida u postizanju remisije bolesti, upotreba ovih lijekova povezana je s brojnim nuspojavama uključujući osteoporozu i povećani rizik pojave bolesti kardiovaskularnog sustava (86,87). Iz tih razloga kao i činjenice da glukokortikoidi nisu učinkoviti u održavanju remisije nastoji se ograničiti njihova primjena na najkraće moguće vrijeme u bolesnika s upalnim bolestima crijeva. U tu svrhu, na temelju europskih konsenzusa o dijagnostici i liječenju Crohnove bolesti te europskog konsenzusa o liječenju ulceroznog kolitisa bolesnici liječeni glukokortikoidima klasificiraju se u one s dobrim odgovorom, ovisne o glukokortikoidima i refraktorne na glukokortikoide (84,85). Navedena klasifikacija pruža jasne kriterije na temelju kojih se primjena glukortikoida ograničava na bolesnike s jasnim pozitivnim učinkom terapije te omogućava pravovremeno prepoznavanje nedostatne djelotvornosti ili nedjelotvornosti terapije. Na taj način izbjegava se neprimjereno dugačka primjena terapije s visokim rizikom nastanka nuspojava, a malo koristi

za bolesnika. S obzirom na centralno mjesto glukokortioida u postizanju remisije upalnih bolesti crijeva jasno je da njihova nedostatna djelotvornost ili nedjelotvornost prestavlja veliki klinički problem. Uvid u veličinu problema pružaju rezultati dosadašnjih istraživanja. Na temelju tih rezultata između 16-25% odraslih bolesnika s Crohnovom bolesti biti će refraktorno na terapiju glukokortikoidima (88-90). Nakon godinu dana od započinjanja glukokortikoidne terapije 32-38 % bolesnika će i dalje imati dobar odgovor na terapiju glukokortikoidima dok će između 24-28% bolesnika razviti ovisnost o glukokortikoidima (89,90). U odraslih bolesnika s ulceroznim kolitisom 16-18% biti će refraktorno na terapiju glukokortikoidima (88-90). Nakon godinu dana od započinjanja terapije, dobar odgovor na terapiju biti će prisutan u oko 50% bolesnika dok će 17-22% razviti ovisnost o glukokortikoidima (89,90).

Razlozi zbog kojih pojedini bolesnici imaju dobar odgovor na terapiju dok drugi razvijaju ovisnost ili su refraktorni na terapiju su nepoznati. Međutim, nekoliko znanstvenih spoznaja upućuje na mogućnost da je odgovor pojedinca na glukokortikoide genetski determiniran. Prvo, Hearing i sur. dokazali su *in vitro* smanjenu osjetljivost na glukokortikoide T limfocita izoliranih iz periferne krvi bolesnika s ulceroznim kolitisom refraktornih na terapiju glukokortikoidima kao i u onih s parcijalnim odgovorom na terapiju (91). Slična korelacija između osjetljivosti limfocita na glukokortikoide *in vitro* i odgovora na terapiju glukokortikoidima *in vivo* nađeni su i u drugim upalnim bolestima poput astme, sistemskog lupusa i reumatoidnog artritisa. Konačno, u zdravih je dobrovoljaca nađena velika varijabilnost u osjetljivosti limfocita na glukokortikoide te bi oko 30% zdravih osoba neadekvatno odgovorilo na primjenu glukokortikoida u slučaju potrebe liječenja neke upalne bolesti (92). Ova opažanja upućuju na činjenicu da odgovor na glukokortikoide ne ovisi o samoj bolesti već se radi o intrizičnom svojstvu pojedinca te je stoga najvjerojatnije genetski determiniran (93).

1.5. *MDR1* i farmakogenetika

Proteinski produkt *MDR1* gena je Pgp koji funkcionira kao membranska transportna pumpa ovisna o ATP-u. Visoka ekspresija Pgp-a na epitelnim površinama crijeva, žučnih vodova, proksimalnih tubula bubrega i središnjeg živčanog sustava sugeriraju njegovi moguću zaštitnu ulogu gdje Pgp štiti organizam od djelovanja štetnih ksenobiotika izlučujući ih u žuč, mokraću ili lumen crijeva (46,49,50). Upravo lokalizacija ovog proteina upućuje na mogućnost njegove važne uloge u zaštiti od ksenobiotika, ali i u dispoziciji i učinku lijekova. Naime, iako fiziološki supstrat Pgp-a nije poznat, za brojne, strukturno različite lijekove, dokazano je da su supstrat ovog proteina (48). Budući da se Pgp nalazi na apikalnoj površini intestinalnih epitelnih stanica moguće je da će njegovo djelovanje u vidu transporta lijeka iz stanice natrag u lumen crijeva ograničiti apsorpciju pa samim time i učinkovitost lijeka. Nadalje, *MDR1* gen je visoko polimorfan, te je unutar njega do danas opisano 29 SNP-ova (59-61). Prvi dokaz povezanosti SNP-a unutar *MDR1* gena i ekspresije Pgp-a dolazi iz rada Hoffmeyera i suradnika u kojem je nađena povezanost između C3435T polimorfizma i razine ekspresije Pgp-a pri čemu su nosioci CC genotipa (divlji tip) imali gotovo dvostruko veću razinu ekspresije Pgp-a u odnosu na nosioce TT genotipa (mutant) (60). Istraživanje koje je uputilo na mogući utjecaj G2677T SNP-a na ekspresiju Pgp-a bilo je ono Tanabe i sur. u kojem je nađena korelacije između razine ekspresije Pgp-a i G2677T SNP-a (94). U tom su istraživanju nosioci divljeg tipa imali višu razinu ekspresije u odnosu na nosioce mutacije no razlika između grupa nije dosegla prag statističke značajnosti. Iako u ovom istraživanju nije nađena statistički značajna razlika u razini ekspresije Pgp-a u ovisnosti o C3435T genotipu, rezultati jasno ukazuju na trend u kojem nosioci CC genotipa imaju višu razinu ekspresije u odnosu na nosioce TT genotipa što je u skladu s rezultatima Hoffmeyera i sur. Daljnja istraživanja koja su se prvenstveno fokusirala na povezanost C3435T polimorfizma i ekspresije Pgp-a ponudila su kontradiktorne rezultate u pogledu utjecaja ovog SNP-a na

ekspresiju Pgp-a (95-97). Činjenica da polimorfizmi *MDR1* gena utječu na ekspresiju Pgp-a otvorila je mogućnost da različita razina ekspresije Pgp-a dovodi i do različite razine lijekova, supstrata Pgp-a, u serumu/plazmi. Ova je teorija potvrđena u inicijalnom istraživanju Hoffmeyera i suradnika u kojem su, izuzev dokaza povezanosti ekspresije Pgp-a s C3435T SNP-om, autori dokazali i povezanost između C3435T polimorfizma i serumskih razina digoksina, poznatog supstrata Pgp-a (60). Nosioci TT genotipa imali su značajno više serumske razine digoksina u usporedbi s nosiocima CC genotipa što je u kombinaciji s nalazom niže ekspresije Pgp-a u tih bolesnika upućuje na značajnu ulogu ovog proteina u ograničavanju apsorpcije lijekova iz probavnog trakta. Daljnja istraživanja potvrdila su moguću ulogu C3435T SNP-a u dispoziciji lijekova no jednako tako postoje znatne diskrepance između rezultata različitih studija kako u pogledu pronalaženja povezanosti između polimorfizama i razine lijekova tako i u pogledu utjecaja pojedinih genotipova na koncentracije lijeka (59,60,97-100). Primjerice, Hoffmeyer i suradnici našli su povezanost između TT genotipa C3435T SNP-a i visokih razina digoksina u serumu dok je u istraživanju Sakaede i suradnika najviša razina digoksina u serumu nađena u nosioca CC genotipa ovog SNP-a (60,98). U istraživanju u kojem je proučavana koncentracija fexofenadina, supstrata Pgp-a, u ovisnosti o polimorfizmima *MDR1* gena također je nađena značajno niža razina lijeka u nosioca TT genotipa C3435T SNP-a u usporedi s nosiocima CC genotipa (59). U istoj je studiji opisan trend u smislu niže razine fexofenadina u nosioca TT genotipa G2677T SNP-a u usporedbi s nosiocima CC genotipa te je opisan i haplotip povezan sa značajno nižim razinama fexofenadina (1236TT, 2677TT i 3435TT). Ulogu *MDR1* polimorfizama na dispoziciju lijekova dodatno je potvrdio nalaz značajno viših razina nelfinavira, inhibitora proteaza koji se koristi u liječenju HIV infekcije, u nosioca CC genotipa C3435T SNP-a u usporedbi s nosiocima CT i TT genotipa (97).

Ukupno gledajući, dosadašnja istraživanja potvrdila su učinak polimorfizama *MDR1* gena na ekspresiju Pgp-a. S druge strane, različite razine ekspresije PGP-a utječu na koncentraciju njegovih supstrata u serumu/plazmi. Interes za utjecaj polimorfizama *MDR1* gena na učinak terapije glukokortikoidima u upalnim bolestima crijeva pobudila je činjenica da su svi glukokortikoidi koji se standardno koriste u liječenju ovih bolesti (metil-prednisolon, prednison, hidrokortizon, budesonid) supstrati Pgp-a (48,101). Sukladno prethodnim istraživanjima, u bolesnika s visokim razinama Pgp-a očekuje se niska serumska koncentracija glukokortikoida i posljedični neuspjeh terapije. Ovu teoriju potvrdilo je istraživanje Farrella i suradnika u kojem su u bolesnika s aktivnom Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom refraktornih na terapiju nađene značajno više razine Pgp-a u limfocitima periferne krvi u usporedbi s bolesnicima u remisiji (102). Pri tomu je razina ekspresije Pgp-a bila stabilna u periodu od 3 mjeseca što sugerira da je razina ekspresije genetski determinirana. Nadalje, blokiranje funkcije Pgp-a humanih intestinalnih epitelnih stanica i T limfocita dovodi do značajno više intracelularne koncentracije kortizola što je još jedna potvrda važne uloge ovog proteina u dispoziciji lijekova (103). Daljnju potvrdu ulozi polimorfizama *MDR1* gena u razvoju refraktornosti na terapiju dalo je istraživanje Potočnika i sur. u kojem je identificiran haplotip povezan s refraktornom Crohnovom bolesti (67). Također, na temelju dosadašnjih istraživanja nosioci T alela značajno su češći među bolesnicima s ekstenzivnim ulceroznim kolitisom te u grupi bolesnika koji su zahtjevali terapiju kortikosteroidima (68,70-71). Također, istraživanje grupe iz Leuvena pokazalo je da je u nosioca T alela i TT genotipa C3435T lokusa značajno rijeđe bilo moguće prekinuti glukokortikoide ili značajno smanjiti dozu usporedbi s nosiocima C alela i CC genotipa (104). Nadalje, visoke razine ekspresije *MDR1* gena u biopsijama rektuma bolesnika s ulceroznim kolitisom povezane su s odgovorom na terapiju i dugotrajnom remisijom bolesti (105). S

druge strane druga istraživanja nisu potvrdila povezanost između polimorfizama *MDR1* gena i učinka terapije glukokortikoidima (69,106).

Na temelju dosadašnjih spoznaja razvidno je da je *MDR1* gen odličan kandidat za moguće predviđanje uspjeha terapije glukokortikoidima.Razvoj ovisnosti ili rezistencije na terapiju glukokortikoidima veliki je klinički problem, međutim rezultati dosadašnjih istraživanja su proturječni te su potrebna dodatna istraživanja u svrhu definiranja uloge polimorfizama *MDR1* gena u predikciji odgovora na glukokortikoide.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

HIPOTEZA

Pretpostavka ovog istraživanja je da polimorfizmi *MDR1* gena igraju ulogu u patogenezi upalnih bolesti crijeva. Očekujemo da će analiza povezanosti između pojedinih fenotipskih karakteristika bolesti i alelnih varijanta *MDR1* gena u skupini bolesnika oboljelih od upalnih bolesti crijeva omogućiti formiranje genotip – fenotip korelacija. Očekujemo da planiranim istraživanjem potvrdimo utjecaj polimorfizama *MDR1* gena na uspješnost terapije glukokortikoidima u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Obzirom na proturječne rezultate dosadašnjih istraživanja utjecaja polimorfizama *MDR1* gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva te odgovoru na terapiju glukokortikoidima primarni cilj ovog istraživanja biti će utvrditi učestalost polimorfizama *MDR1* gena u području egzona 21 (G2677T/A) i egzona 26 (C3435T) u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva uz usporedbu s rezultatima u kontrolnoj skupini. Cilj je dokazati ulogu *MDR1* gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva i identificirati polimorfizme *MDR1* gena koji nose predispoziciju za pojavu upalnih bolesti crijeva. Potom će se detaljno analizirati eventualna povezanost između genetskih promjena i fenotipskih karakteristika bolesti s ciljem formiranja genotip – fenotip korelacija. Analizom učinka terapije glukokortikoidima u ovisnosti o alelnim varijantama MDR 1 gena u populaciji bolesnika s upalnim bolestima crijeva utvrditi će se uloga MDR 1 gena u odgovoru na glukokortikoidnu terapiju s krajnjim ciljem identificiranja genotipa koji nosi visok rizik ovisnosti ili refraktornosti na terapiju glukokortikoidima. To će u budućnosti

omogućiti individualiziran terapijski pristup bolesniku s pravodobnim uvođenjem imunomodulatorne ili biološke terapije.

Dakle, ciljevi istraživanja su:

1. Određivanje učestalosti alelnih varijanata *MDR1* gena u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva te u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika odgovarajuće dobi i spola

   1.a. Analiza razlike učestalosti alelnih varijanata *MDR1* gena u skupini ispitanika s upalnim bolestima crijeva i u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika odgovarajuće dobi i spola

   1.b. Analiza povezanosti između alelnih varijanata *MDR1* gena i lokalizacije bolesti u ispitanika s upalnim bolestima crijeva

   1.c. Analiza povezanosti između alelnih varijanata *MDR1* gena i ponašanja bolesti u ispitanika s Crohnovom bolesti

   1.d. Analiza povezanosti između alelnih varijanata *MDR*1 gena i ekstraintestinalnih manifestacija bolesti u ispitanika s upalnim bolestima crijeva

   1.e. Analiza povezanosti između alelnih varijanata *MDR1* gena i potrebe za operativnim zahvatom u bolesnika s upalnim bolestima crijeva

2. Analiza učinka terapije glukokortikoidima u ovisnosti o prisutnosti alelnih varijanata *MDR1* gena u ispitanika s upalnim bolestima crijeva

2.a. Analiza povezanosti između prisutnosti alelnih varijanata *MDR1* gena u ispitanika s upalnim bolestima crijeva i razvoja ovisnosti na glukokortikoide.

2.b. Analiza povezanosti između alelnih varijanata *MDR1* gena u ispitanika s upalnim bolestima crijeva i refraktornosti na glukokortikoidnu terapiju.

ZNANSTVENI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

Upalne bolesti crijeva su bolesti nepoznate etiologije i nerazjašnjene patogeneze. Na temelju dosadašnjih istraživanja smatra se da je za nastanak bolesti odgovoran neadekvatan imunološki odgovor na antigene uobičajene crijevne flore u genetski predisponiranih osoba. Također, u osoba oboljelih od upalnih bolesti crijeva glukokortikoidi su standardna terapija za postizanje remisije bolesti. Međutim, iz nedovoljno poznatih razloga, pojedini bolesnici razviti će ovisnost o terapiji glukokortikoidima dok će neki biti u potpunosti rezistentni na glukokortikoide. Rana identifikacija ovih bolesnika te pravovremeno uvođenje imunomodulatorne terapije za sada nije moguće. Dosadašnja istraživanja o ulozi *MDR1* gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva pokazala su proturječne rezultate pri čemu pojedine studije potvrđuju, a druge opovrgavaju ulogu pojedinih polimorfizama u patogenezi upalnih bolesti crijeva. Obzirom da do danas slično istraživanje nije učinjeno u Republici Hrvatskoj predloženo istraživanje biti će prvo koje će nam pružiti uvid u prevalenciju pojedinih polimorfizama *MDR1* gena u populaciji bolesnika s upalnim bolestima crijeva i u populaciji zdravih osoba. Također, predloženim istraživanjem pridonijeti će se definiranju uloge *MDR1* gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva. Upalne bolesti crijeva karakterizirane su varijabilnim i nepredvidljivim kliničkim tijekom što dodatno otežava liječenje ovih bolesnika. Dodatne analize povezanosti pojedinih polimorfizama i određenih fenotipskih karakteristika

bolesti unaprijediti će se znanje o genotip – fenotip korelacijama s ciljem da se u budućnosti omogući individualizirani terapijski pristup u ovih bolesnika. Analiza ovisnosti polimorfizama *MDR1* gena i odgovora na terapiju glukokortikoidima u bolesnika s upalnim bolestima crijeva također do sada nije učinjena u Republici Hrvatskoj. Istraživanje će definirati utjecaj polimorfizama *MDR1* gena na uspjeh terapije glukokortikoidima. Identifikacija *MDR1* genotipa koji nosi povećani rizik od razvoja ovisnosti ili neuspjeha kortikosteroidne terapije omogućio bi rano prepoznavanje tih bolesnika s razvojem individualiziranog pristupa liječenju s krajnjim ciljem izbjegavanja komplikacija bolesti i liječenja te poboljšanja kvalitete života ovih bolesnika.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno ukupno 308 bolesnika, 199 s Crohnovom bolesti i 109 s ulceroznim kolitisom, u kojih je dijagnoza upalne bolesti crijeva postavljena na temelju kliničkih, endoskopskih, radioloških i histoloških karakteristika. Bolesnici s neklasificiranom upalnom bolesti crijeva (IBDU) su isključeni iz istraživanja. Pri uključivanu u studiju u svih bolesnika učinjena je detaljna evaluacija dotadašnjeg tijeka i ekstenzije bolesti te su prikupljeni podaci o: dobi, spolu, dobi pri postavljanju dijagnoze bolesti, lokalizaciji i ponašanju bolesti, prisutnosti ekstraintestinalnih manifestacija, broju operativnih zahvata, dobi pri operativnom zahvatu te terapiji glukokortikoidima. Na temelju prikupljenih podataka o lokalizaciji i ponašanju bolesti bolesnici su prilikom uključivanja klasificirani prema Montrealskoj klasifikaciji upalnih bolesti crijeva (107). Prema Montrealskoj klasifikaciji bolesnici s Crohnovom bolesti klasificiraju se prema lokalizaciji i ponašanju bolesti. Na temelju lokalizacije bolesti svrstavaju se u jednu od četiri skupine: L1 skupinu ukoliko bolest zahvaća terminalni ileum, L2 skupinu ukoliko bolest zahvaća kolon, L3 skupinu ukoliko postoji zahvaćenost i terminalnog ileuma i kolona te L4 skupinu ukoliko postoji izolirana zahvaćenost gornjeg probavnog trakta. Na temelju ponašanja bolesti svrstavaju se u jednu od 3 skupine: B1 skupinu ukoliko je bolest inflamatornog fenotipa, B2 skupinu ukoliko je bolest strikturirajućeg fenotipa i B3 bolest u slučaju penetrantnog fenotipa bolesti pri čemu je u sve tri skupine moguća prisutnost perianalne bolesti. Za razliku od Crohnove bolesti, bolesnici s ulceroznim kolitisom klasificiraju se samo na temelju lokalizacije bolesti u tri skupine: L1 skupinu ukoliko je bolest ograničena na rektum, L2 skupinu ukoliko je bolest ograničena na lijevi kolon odnosno ukoliko se upalne promjene ne nalaze prokismalno od lijenalne fleksure kolona i L3 skupinu ukoliko se bolest proteže proksimalno od lijenalne fleksure.

U svih bolesnika je pri uključenju u studiju prikupljen podatak o terapiji glukokortikoidima za vrijeme trajanja bolesti. Odgovor bolesnika na terapiju glukokortikoidima klasificiran je na temelju Europskog konsenzusa o dijagnozi i liječenju Crohnove bolesti te Europskog konsenzusa o liječenju ulceroznog kolitisa (83,84). Na temelju spomenutih konsenzusa bolesnici klasificirani u one s dobrim odgovorom na glukokortikoide, ovisne o glukokortikoidima i one refraktorne na terapiju glukokortikoidima. Ovisnost na terapiju glukokortikoidima postoji ukoliko nije moguće smanjiti dnevnu dozu prednizolona ispod 10 mg zbog aktivacije bolesti ili ukoliko unutar tri mjeseca od prekida terapije glukokortikoidima dolazi do relapsa bolesti. Na glukokortikoide su refraktorni oni bolesnici u kojih ne dolazi do adekvatnog smanjenja aktivnosti bolesti nakon četiri tjedna terapije glukokortikoidima u dozi od 0.75 mg/kg.

U kontrolnu skupinu uključeno je 120 zdravih ispitanika bez simptoma ili pozitivne obiteljske anamneze za upalnu bolest crijeva. Ispitanici u kontrolnoj skupini izabrani su tako da prema dobi i spolu odgovaraju ispitanicima s upalnom bolesti crijeva.

Po uključivanju u studiju u svih je ispitanika jednokratno izvađeno 10 ml krvi iz koje je učinjena ekstrakcija DNA te potom analiza polimorfizama *MDR1* gena.

Svi ispitanici upoznati su sa protokolom i svrhom istraživanja, a prije uključivanja potpisali su informirani pristanak. Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim načelima i Deklaracijom iz Helsinkija iz 2000 godine. Istraživanje je provedeno u Zavodu za gastroenterologiju i Kliničkom zavodu za molekularnu dijagnostiku KBC Zagreb. Istraživanje je odobreno od etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Genotipizacija *MDR1* polimorfizama

Izdvajanje DNA iz 5 ml pune krvi sa Na-EDTA antikoagulansom provedeno je na aparatu KingFisher (Njemačka), s kitom za izdvajanje DNA (Qiagen, Njemačka). Umnažanje ulomaka gena *MDR1*/*ABCB1* provodilo se metodom temeljenom na lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR; engl. *real time polymerase chain reaction*), na aparatu LightCycler®- Roche Diagnostics, Njemačka. LightCycler®(LC) tehnologija kombinira brze temperaturne cikluse s mjerenjem fluorescencije dobivenih produkata na principu FRET-a (eng. *fluorescence resonance energy transfer*, prijenos energije fluorescentnom rezonancijom). Željeni odsječak DNA se umnaža i kvantificira u stvarnom vremenu, što znači da se umnažanje procjenjuje nakon svakog ciklusa. Uporabom hibridizacijskih proba otkrivaju se mutacije gena u samo jednoj bazi i to na temelju temperature taljenja (T_m; eng. *melting temperature*).

Za analizu polimorfizama *MDR1* 2677G>T/A u egzonu 21 primijenjena je metoda opisana u literaturi (108,109). Za analizu polimorfizma *MDR1* 3435C>T u egzonu 26, primijenjena je metoda PCR u stvarnom vremenu prema opisu von Ahsen i suradnika (110).

Reakcijska smjesa za PCR u stvarnom vremenu, u volumenu od 10μL sadržava:

Fast Start DNA Master HybProbe master mix 1x; 2,5 mM $MgCl_2$; 0,5 μM svake početnice; 0,1 μM anchor probe; 3 nM *sensor* probe; 0,5μL bovin serum; 0,5μL DMSO; 75 ng DNA.

Početnice i hibridizacijske probe:

G2367T/A f 5'-GCAGGAGTTGTTGAAATGAAAATG-3'

r 5'-CGCCTGCTTTAGTTTGACTCA-3'

G2367T/A:anchor 5'- LCRed640-CTTTCTTATCTTTCAGTGCTTGTCC-ph

sensor5'- TTCCCAGTACCTTCT-fluorescein

C3435T f 5'-TGT TTTCAGCTGCTTGATGG-3'

r 5’-AAGGCATGTATGTTGGCC TC-3’

C3435T sensor5’- LCRed640-GGAAGAGATCGTGAGGGCAG-ph

anchor5’- GACAACAGCCGGGTGGTGTCA –fluorescein

Oprema

Aparat za brzo izdvajanje DNA (KingFisher, Njemačka)

Instrument za umnažanje DNA, LightCycler 1.2 (Roche Diagnostics, Njemačka)

Centrifuge (Eppendorf, Njemačka)

Tresilice (Koetterman, Njemačka)

Hladnjak (Gorenje, Slovenija)

Kupelj (Koetterman, Njemačka)

Pribor

Kapilare za PCR u stvarnom vremenu, Roche Diagnostics, Njemačka

Epruvetezamalekoličineuzorka, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL (Eppendorf, Njemačka)

Automatske pipete 1-100 μL (Eppendorf, Njemačka)

Nastavci za automatske pipete 1-100 μL (Eppendorf, Njemačka)

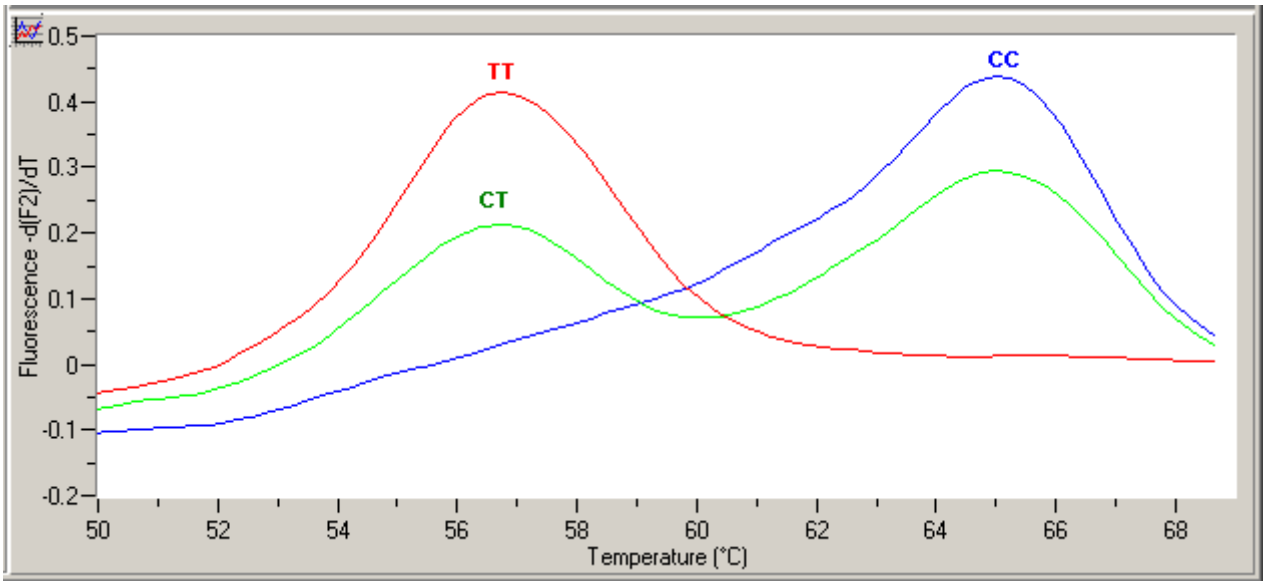
Reagensi

Kit za brzo izdvajanje DNA (*BioSprint 15 DNA Blood Kit*: proteaza, puferiAL, AW1, AW2, AE, suspenzijaMagAttract) Qiagen, Njemačka

Izopropanol (Sigma, Njemačka)

Smjesa za umnažanje ulomaka DNA,*LightCycler® Fast Start DNA Master plus HybProbe master mix* (Roche, Njemačka)

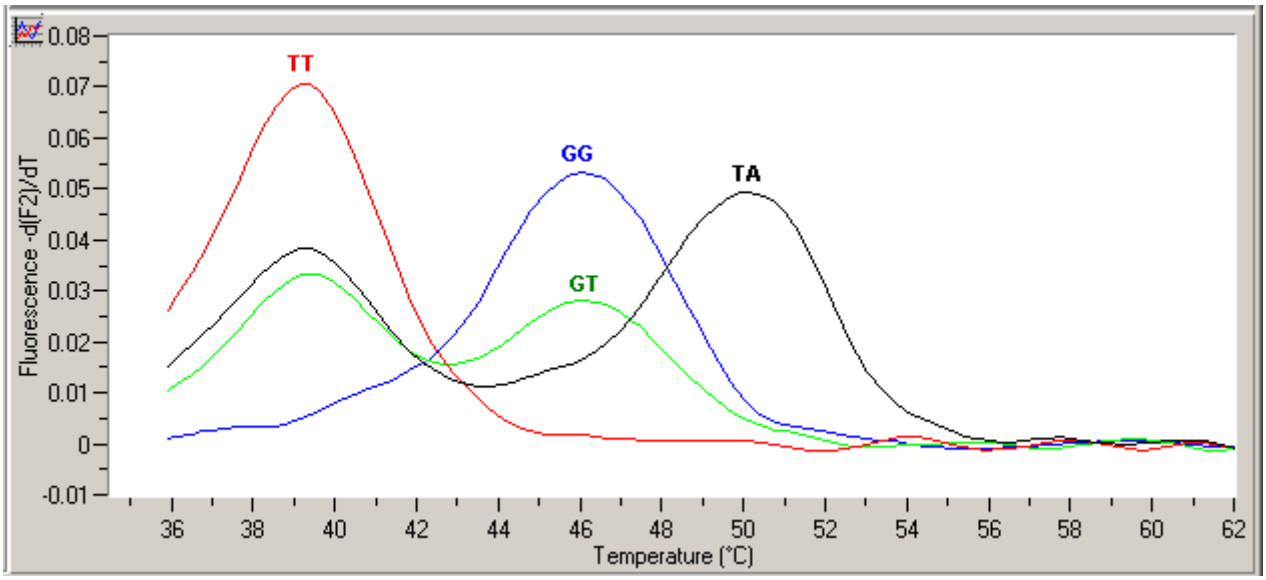
Početnice i hibridizacijske probe (TIB MOLBIOL, Njemačka)



Slika 1. Analiza *MDR1* C3435T: CC 65° C

CT 55° C, 65° C

TT 55° C



Slika 2. Analiza *MDR1* G2677T/A : TT 39° C

GT 39° C, 46 ° C

GG 46° C

TA 39° C, 51° C

3.3. Statistička obrada podataka

U svim obradama podataka korišteni su dvosmjerni (eng. two-tailed) testovi statističke značajnosti. Učestalosti svakog od genotipova između skupina uspoređena je putem Fisherovog egzaktnog testa, a za statističku obradu korišten je program SPSS 17.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Ovaj test koristi se u slučaju 2x2 klasifikacijskih tablica u kojima je broj slučajeva u jednoj ili više ćelija manji od 5 budući da korištenje hi-kvadrat testa podrazumijeva zadovoljenje tog preduvjeta. Učestalost alela svakog SNP-a je određena i

uspoređena putem statističkog programa Haploview 4.1, pri čemu u obradu nisu uključeni rijetki 2677A aleli. Haplotipovi u različitim skupinama sudionika procijenjeni su putem EM algoritma (expectation-maximization) implementiranog u Haploview. Ovaj algoritam stvara populacijske procjene na osnovi maksimalne vjerojatnosti za dani haplotip koju određuje na temelju podataka iz uzorka. Učestalost pojedinog haplotipa određena je zbrajanjem vjerojatnosti (određene putem EM algoritma) za taj haplotip u slučaju svakog pojedinca te su učestalosti u različitim skupinama uspoređene putem hi-kvadrat testa. U slučajevima statistički značajnih razlika određen je omjer vjerodostojnosti (OR; eng. *odds ratio*) te njegov 95% interval pouzdanosti (95% CI).

Osim navedenih usporedbi, ispitane su i razlike između bolesnika s različitim genotipovima s obzirom na dob pri prvoj operaciji i broj operacija te vrijeme od dijagnoze do prvog operativnog zahvata. Ova serija analiza napravljena je u SPSS-u. Budući da su postojale skupine sudionika kod kojih je raspodjela rezultata statistički značajno odstupala od normalne, kao mjere centralnih tendencija i raspršenja korišteni su medijan i interkvartilni raspon. Genotipovi 2677AA, 2677GA i 2677TA su zbog malih učestalosti izbačeni iz ovih analiza. Skupine s različitim genotipovima su međusobno uspoređene putem Mann-Whitneyevog U testa, pri čemu je razina značajnosti korigirana putem Bonferronijeve korekcije. Budući da su u svim slučajevima postojale ukupno 3 usporedbe, odnosni genotipa, korigirana razina značajnosti iznosila je p=0,017. Zbog mogućnosti vezanih rangova koji mogu utjecati na rezultate provedenih testova, u svim slučajevima izračunat je z-statistik koji sadrži korekciju za vezane rangove te je određena njegova razina statističke značajnosti.

4. REZULTATI

4.1. Osnovne kliničke karakteristike ispitanika

U istraživanje je uključeno 199 bolesnika s Crohnovom bolesti i 109 bolesnika s ulceroznim kolitisom. Osnovne kliničke karakteristike bolesnika prikazane su u tablici 3 i tablici 4. U istraživanje je uključeno i 120 zdravih kontrola . Kontrolna skupina sastoji se od 60 muškaraca i 60 žena te kontrolna skupina prema spolu odgovara skupinama bolesnika s ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolesti. Kao što je vidljivo u tablici 3, u skupini bolesnka s Crohnovom bolesti bilo je 53.3 % muškaraca, a medijan dobi prilikom postavljanja dijagnoze iznosio je 25 godina s interkvartilnim rasponom od 18.5-31.1 godinu. Najčešća lokalizacija bolesti u ovoj skupini bio je ileokolitis (50%), dok oko trećina bolesnika ima zahvaćen samo terminalni ileum (32.7%), a 17.2% ima izoliranu zahvaćenost kolona. Također, s obzirom na ponašanje bolesti, najveći broj bolesnika ima inflamatorni fenotip (45.4%) nakon čega slijede bolesnici s strikturirajućim (33.2%) i penetrantnim fenotipom (21.4%). Od ukupnog broja bolesnika 71.3% liječeno je glukokortikoidima, a 56.3% podvrgnuto je kirurškom liječenju do trenutka uključivanja u studiju.

Kao što je vidljivo u tablici 4, u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom nalazi se 47.7% muškaraca, a medijan dobi pri postavljanju dijagnoze iznosi 29.9 godina s interkvartilnim rasponom od 26-35,7 godina. Najveći broj bolesnika ima zahvaćenost cijelog debelog crijeva (pankolitis, 69.4%), a slijede ih bolesnici sa zahvaćenim lijevim kolonom (20.4%) i oni sa izoliranom zahvaćenošću rektuma (10.2%). U ovoj skupini bolesnika glukortikoidima je liječeno 79.8% bolesnika, a u 19.8% bolesnika učinjena je proktokolektomija sa formiranjem poucha ili terminalnom ileostomom.

Ukupno gledajući, kliničke karakteristike naših bolesnika odraz su činjenice da su regrutirani u tercijarnom centru zbog čega se u obje skupine nalazi znatan broj bolesnika s ekstenzivnom bolešću kao i visok postotak operiranih bolesnika s Crohnovom bolesti.

Tablica 3. Kliničke karakteristike bolesnika s Crohnovom bolesti

Broj pacijenata	199
Spol – broj pacijenata (%)	
Ženski	93 (46,7)
Muški	106 (53,3)
Operacija – broj pacijenata (%)	111 (56,3)
Dob pri dijagnozi (godine), medijan [interkvartilni raspon]	25,0 [18,50-31,10]
Dob pri operaciji (godine), medijan [interkvartilni raspon]	28,6 [22,80-36,80]
Trajanje bolesti prije operacije (godine), medijan [interkvartilni raspon]	3,0 [0,40-6,67]
Lokalizacija – broj pacijenata (%)	
Ileum ± UGI	64 ± 10 (32,7)
Kolon ± UGI	34 ± 0 (17,3)
Ileokolon ± UGI	98 ± 17 (50,0)
UGI	29 (14,6)
Ponašanje – broj pacijenata (%)	
Luminalni ± perianal	89 ± 28 (45,4)
Stenozirajući ± perianal	65 ± 25 (33,2)
Penetrantni ± perianal	42 ± 16 (21,4)
Perianal (bilo koji)	70 (35,4)
Ekstraintestinalne manifestacije (%)	92 (46,2)
Primljeni steroidi – broj pacijenata (%)	
Dobar odgovor	42 (29,6)
Ovisni	91 (64,1)
Refraktorni	9 (6,3)

Tablica 4. Kliničke karakteristike bolesnika s ulceroznim kolitisom

Broj pacijenata	109
Spol – broj pacijenata (%)	
Ženski	57 (52,3)
Muški	52 (47,7)
Operacija – broj pacijenata (%)	21 (19,8)
Dob pri dijagnozi (godine), medijan [interkvartilni raspon]	29,9 [26,0-35,70]
Dob pri operaciji (godine), medijan [interkvartilni raspon]	37,3 [31,80-43,10]
Trajanje bolesti prije operacije (godine), medijan [interkvartilni raspon]	4,4 [1,0-7,75]
Lokalizacija – broj pacijenata (%)	
Proktitis	11 (10,2)
Lijevi kolon	22 (20,4)
Pankolitis	75 (69,4)
Ekstraintestinalne manifestacije (%)	22 (20,2)
Primljeni steroidi – broj pacijenata (%)	
Dobar odgovor	27 (31,0)
Ovisni	46 (52,9)
Refraktorni	14 (16,1)

4.2. Povezanost *MDR1* C3435T i G2677T polimorfizma i upalnih bolesti crijeva

Nije nađeno statistički značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini niti za G2677T/A SNP (p=0.93) niti za C3435T SNP (p=0.138). G2677T/A SNP u egzonu 21 je trialelni polimorfizam i u ispitivanoj populaciji nađena su sva tri moguća alela. Međutim, alel A je vrlo rijedak s učestalosti od oko 3% u kontrolnoj skupini te u skupini bolesnika s Crohnovom bolesti dok se u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom nalazi u oko 1% ispitanika. Budući da se A alel nalazi u vrlo malog broja ispitanika te da ne postoji značajna razlika u učestalosti ovog alela između ispitivanih skupinama, 2677A varijanta je isključena iz daljnje statističke analize alelnih asocijacija.

U tablici 5. prikazana je distribucija alela i genotipova u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva i kontrolnoj skupini. Kao što je vidljivo, nema statistički značajne razlike u distribuciji pojedinih alela između bolesnika s upalnim bolestima crijeva i kontrolne skupine. Međutim, analiza distribucije genotipova otkriva statistički značajnu razliku u zastupljenosti TT i CT genotipa C3435T polimorfizma pri čemu postoji značajno veća učestalost nosioca TT genotipa u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva (p=0.02; OR 1.93, 95% CI (1.11-3.35)) dok su nosioci CT genotipa značajno rijeđe nalaze u skupini ispitanika s upalnim bolestima crijeva (p=0.04; OR 0.63, 95% CI (0.41-0.97)).

Distribucija alela i genotipova C3435T i G2677T polimorfizama u skupini bolesnika s Crohnovom bolesti i kontrolama prikazana je u tablici 6. Ne nalazi se statistički značajna razlika u distribuciji alela između skupine bolesnika s Crohnovom bolesti i kontrolne skupine u oba ispitivana SNP-a. Analizom distribucije genotipova, nalazi se zaštitno djelovanje CT genotipa C3435T polimorfizma, gdje je učestalost nosioca navedenog genotipa značajno viša u kontrolnoj skupini u usporedbi sa skupinom bolesnika s Crohnovom bolesti (p=0.02; OR

0.58, 95% CI(0.36-0.91). Nema razlike u distribuciji genotipova G2677T SNP-a između skupine bolesnika s Crohonovom bolesti i kontrolne skupine.

Tablica 5. Učestalost alela i genotipa *MDR1* 2677G<T/A i 3435C<T polimorfizama u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva i kontrolnoj skupini

	Kontrole N (%)	IBD n (%)	p vrijednost
MDR 1 **2677G<T/A**			
T alel	83 (35.8)	246 (40.7)	0.189
G alel	149 (64.2)	358 (59.3)	
AA	0 (0.0)	1 (0.3)	1.0
GA	3 (2.5)	3 (1.0)	0.356
GG	47 (39.2)	115 (37.3)	0.740
GT	55 (45.8)	128 (41.6)	0.447
TA	1 (0.8)	2 (0.6)	1.0
TT	14 (11.7)	59 (19.2)	0.085
MDR 1 **3435C<T**			
T alel	106 (44.5)	304 (49.7)	0.179
C alel	132 (55.5)	308 (50.3)	
TT	19 (16.0)	82 (26.8)	**0.022**
CT	68 (57.1)	140 (45.8)	**0.040**
CC	32 (26.9)	84 (27.5)	1.0

Tablica 1. Distribucija alela i genotipova *MDR1* 2677G<T/A i 3435C<T SNP-a u skupini bolesnika s Crohnovom bolešću i kontrolnoj skupini

	Kontrole	CD	p vrijednost
	n (%)	n (%)	
MDR 1 **2677G<T/A**			
T alel	83 (35.8)	149 (38.4)	0.513
G alel	149 (64.2)	239 (61.6)	
AA	0 (0.0)	1 (.5)	1.0
GA	3 (2.5)	2 (1.0)	0.369
GG	47 (39.2)	82 (41.2)	0.726
GT	55 (45.8)	75 (37.7)	0.160
TA	1 (.8)	2 (1.0)	1.0
TT	14 (11.7)	37 (18.6)	0.116
MDR 1 **3435C<T**			
T alel	106 (44.5)	188 (47.5)	0.473
C alel	132 (55.5)	208 (52.5)	
TT	19 (16.0)	51 (25.8)	0.050
CT	68 (57.1)	86 (43.4)	**0.020**
CC	32 (26.9)	61 (30.8)	0.525

Zanimljivo, analizom podskupine bolesnika s Crohnovom bolesti s izoliranim zahvaćanjem kolona nađena je značajno veća učestalost TT genotipa na C3435T lokusu u bolesnika s Crohnovom bolesti u usporedbi s kontrolnom skupinom (p=0.015; OR 3.01, 95% CI (1.27-7.12)). Nasuprot tomu, heterozigotnost za ovaj lokus pokazala je zaštitni učinak pri čemu su heterozigoti bili znatno češći u kontrolnoj skupini u usporedbi sa skupinom bolesnika s Crohn kolitisom (p=0.01; OR 0.33, 95% CI (0.14-0.75)). Distribucija alela i genotipa u bolesnika s Crohnovom bolesti ograničenoj na kolon i kontrola prikazana je u tablici 7.

Tablica 7. Distribucija alela i genotipova *MDR1* 2677G<T/A i 3435C<T SNP-a u skupini bolesnika s Crohn kolitisom i kontrolnoj skupini

	Kontrole	Crohn kolitis	p vrijednost
	n (%)	N (%)	
MDR 1 **2677G<T/A**			
T alel	83 (35.8)	28 (42.4)	0.324
G alel	149 (64.2)	38 (57.6)	
GA	3 (2.5)	0 (0.0)	1.0
GG	47 (39.2)	14 (41.2)	0.845
GT	55 (45.8)	10 (29.4)	0.115
TA	1 (0.8)	1 (2.9)	0.394
TT	14 (11.7)	9 (26.5)	0.053
MDR 1 **3435C<T**			
T alel	106 (44.5)	34 (51.5)	0.314
C alel	132 (55.5)	32 (48.5)	
TT	19 (16.0)	12 (36.4)	**0.015**
CT	68 (57.1)	10 (30.3)	**0.010**
CC	32 (26.9)	11 (33.3)	0.515

Distribucija alela i genotipova C3435T i G2677T/A *MDR1* polimorfizma u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom i kontrolnoj skupini prikazana je u tablici 8. Analizom distribucije alela nađena je granično značajna razlika u učestalosti nosioca T alela G2677T polimorfizma pri čemu je postotak nosioca T alela bio znatno viši u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom u usporedbi s kontrolnom skupinom (p=0.048; OR 1.46, 95% CI (1.0-2.14)). Također, zamjećena je i veća učestalost nosioca T alela C3435T polimorfizma u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom u usporedbi s kontrolama no razlika nije dosegla prag statističke značajnosti (p=0.051). Međutim, analizirajući distribuciju genotipova između

skupina, nađena je značajno veća učestalost nosioca TT genotipa C3435T polimorfizma u usporedbi s kontrolnom skupinom (p=0.015; OR 2.12, 95% CI (1.11-4.03)) što potvrđuje trend uočen prilikom analize distribucije alela (tablica 8). Sukladno rezultatima u Crohnovoj bolesti, nema razlike u distribuciji alela i genotipova G2677T/A SNP-a između skupine bolesnika s ulceroznim kolitisom i kontrolne skupine.

Tablica 8. Učestalost MDR 1 2677G<T/A i 3435C<T genotipa u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom i kontrolnoj skupini

	Kontrole	UC	p vrijednost
	n (%)	n (%)	
MDR 1 **2677G<T/A**			
T alel	83 (35.8)	97 (44.9)	**0.048**
G alel	149 (64.2)	119 (55.1)	
GA	3 (2.5)	1 (0.9)	0.623
GG	47 (39.2)	33 (30.3)	0.168
GT	55 (45.8)	53 (48.6)	0.693
TA	1 (0.8)	0 (0.0)	1.0
TT	14 (11.7)	22 (20.2)	0.101
MDR 1 **3435C<T**			
T alel	106 (44.5)	116 (53.7)	0.051
C alel	132 (55.5)	100 (46.3)	
TT	19 (16.0)	31 (28.7)	**0.025**
CT	68 (57.1)	54 (50.0)	0.290
CC	32 (26.9)	23 (21.3)	0.355

4.3. Povezanost haplotipova 2 lokusa (C3435T/G2677T) i upalnih bolesti crijeva

Budući da je A alel G2677T/A polimorfizma vrlo rijedak u ispitivanoj populaciji te da nije opažena značajna razlika u distribuciji ovaj alel je izostavljen iz analize asocijacije haplotipova. S obzirom na to analizirali razlike u distribuciji četiri moguća haplotipa dva ispitivana lokusa u skupini bolesnika s Crohovnom bolesti, ulceroznim kolitisom i u kontrolnoj skupini. Distribucija haplotipova u bolesnika s Crohnovom bolesti i u kontrolnoj skupini prikazana je u tablici 9. Kao što je vidljivo, nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji pojedinih haplotipova između ove dvije skupine ispitanika.

Tablica 9. Učestalost *MDR1* C3435T/G2677T haplotipova u skupini bolesnika s Crohnovom bolesti i kontrolnoj skupini.

		Kontrole	CD	p vrijednost
		n (%)	n (%)	
2677G<T	**3435C<T**			
G	C	126.3 (53.1)	202.2 (51.1)	0.621
T	T	78.3 (32.9)	144.9 (36.6)	0.344
G	T	27.7 (11.7)	43.1 (10.9)	0.765
T	C	5.7 (2.4)	5.8 (1.5)	0.405
T	C	5.7 (2.4)	5.8 (1.5)	0.405

Za razliku od analize u bolesnika s Crohnovom bolesti, analizirajući distribuciju hapolotipova u bolesnika s ulceroznim kolitisom identificiran je haplotip koji nosi povećani rizik za razvoj ulceroznog kolitisa. Kao što se može vidjeti u tablici 10, nosioci 3435T/2677T haplotipa nađeni su značajno češće u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom te nosioci ovog haplotipa

imaju 1.5 puta veći rizik pojave ulceroznog kolitisa u odnosu na one koji isti haplotip ne nose (p=0.02; OR 1.55, 95% CI (1.06-2.28)).

Tablica 10. Učestalost *MDR1* C3435T/G2677T haplotipova u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom i kontrolnoj skupini.

		kontrole n (%)	UC n (%)	p vrijednost
2677G<T	**3435C<T**			
G	C	126.2 (53.0)	97.3 (44.6)	0.072
T	T	78.2 (32.9)	94.2 (43.2)	**0.023**
G	T	27.8 (11.7)	22.9 (10.5)	0.695
T	C	5.8 (2.4)	3.6 (1.7)	0.567

4.4. Analiza povezanosti genotipa i fenotipskih karakteristika

U bolesnika s Crohnovom bolesti analizirana je distribucija alela i genotipova *MDR1* G2677T/A i C3435T polimorfizma u ovisnosti o glavnim karakteristikama Crohnove bolesti odnosno ovisno o lokalizaciji i ponašanju bolesti. Na temelju učinjene analize, ne nalazi se značajne povezanosti ispitivanih polimorfizama i četiri glavne lokalizacije bolesti. Treba napomenuti da je opažena značajno manja učestalost nosioca TT genotipa C3435T polimorfizma u bolesnika u kojih je bolest ograničena na terminalni ileum gdje je zamjećeno da svega 17% bolesnika u toj skupini nosi taj genotip u usporedbi s 30.1% bolesnika koji nemaju isključivo zahvaćen terminalni ileum. Međutim, razlika između grupa nije dosegla prag statističke značajnosti (p=0.058). Analizirajući skupine bolesnika sa i bez perianalne bolesti ponovno je nađeno zaštitno djelovanje heterozigota C3435T polimorfizma. Heterozigoti za ovaj lokus imaju značajno manji rizik od pojave perianalne bolesti u

usporedbi s homozigotima za divlji tip ili homozigotima za mutaciju (p=0.036; OR 0.51, 95% CI (0.28-0.94)) (tablica 11). Također postoji i trend prema većoj učestalosti TT genotipa na istom lokusu u bolesnika s perianalnom bolesti, ali razlika između grupa nije dosegla statistički značajnost (p=0.06).

Tablica 11. Učestalost MDR 1 2677G<T/A i 3435C<T genotipa u skupini bolesnika s Crohnovom bolesti s obzirom na perianalne komplikacije

	Ne n (%)	Da n (%)	p vrijednost
MDR 1 **2677G<T/A**			
T alel	90 (36.3)	57 (41.3)	0.331
G alel	158 (63.7)	81 (58.7)	
AA	0 (0.0)	1 (1.4)	0.354
GA	2 (1.6)	0 (0.0)	0.541
GG	53 (41.4)	29 (41.4)	1.0
GT	52 (40.6)	23 (32.9)	0.358
TA	2 (1.6)	0 (0.0)	0.541
TT	19 (14.8)	17 (24.3)	0.123
MDR 1 **3435C<T**			
T alel	116 (45.7)	71 (50.7)	0.337
C alel	138 (54.3)	69 (49.3)	
TT	27 (21.3)	24 (34.3)	0.061
CT	62 (48.8)	23 (32.9)	**0.036**
CC	38 (29.9)	23 (32.9)	0.748

Analizirajući distribuciju alela i genotipova u bolesnika s Crohnovom bolesti sa i bez ekstraintestinalnih manifestacija uočena je povezanost G2677T i C3435T polimorfizma i pojave ekstraintestinalnih manifestacija (tablica 12). Nosioci G2677 alela imaju značajno veći rizik od pojave ekstraintestinalnih manifestacija (p=0.025; OR 1.79, 95% CI (1.07-2.99)). Isti trend uočen je i analizom genotipova gdje su nosioci GG genotipa na ovom lokusu bili znatno češće zastupljeni u skupini bolesnika s ekstraintestinalnim manifestacijama (54.3% vs 37.5%) no razlika nije dosegla prag značajnosti (0.058). Nasuprot tomu, opaženo je zaštitno djelovanje T alela na C3435T lokusu pri čemu su nosioci T alela imali znatno manji rizik od pojave ekstraintestinalnih manifestacija (p=0.03; OR 0.59, 95% CI (0.36-0.95)) (tablica 12). I ovdje je opažen trend s znatno manjim brojem nosioca TT genotipa na C3435T lokusu u skupini bolesnika s ekstraintestinalnim manifestacijama u odnosu na one bez no razlika između grupa nije bila statistički značajna (15.2% vs 29.4%; p=0.08).

Učinjenom analizom nije nađena značajna povezanost alela i genotipova ispitivanih polimorfizama i potrebe za kirurškim liječenjem kao i broja operativnih zahvata u skupini skupini bolesnika s Crohnovom bolesti.

Tablica12. Učestalost MDR 1 2677G<T/A i 3435C<T genotipa u skupini bolesnika s Crohnovom bolesti s obzirom na prisutnost ekstraintestinalnih manifestacija

	ne	Da	p vrijednost
	n (%)	n (%)	
MDR 1 **2677G<T/A**			
T alel	115 (41.4)	26 (28.3)	**0.025**
G alel	163 (58.6)	66 (71.7)	
AA	1 (0.7)	0 (0.0)	1.0
GA	2 (1.4)	0 (0.0)	1.0
GG	54 (37.5)	25 (54.3)	0.058
GT	55 (38.2)	16 (34.8)	0.729
TA	2 (1.4)	0 (0.0)	1.0
TT	30 (20.8)	5 (10.9)	0.189
MDR 1 **3435C<T**			
T alel	146 (51.0)	35 (38.0)	**0.030**
C alel	140 (49.0)	57 (62.0)	
TT	42 (29.4)	7 (15.2)	0.081
CT	62 (43.4)	21 (45.7)	0.865
CC	39 (27.3)	18 (39.1)	0.142

U bolesnika s ulceroznim kolitisom nije opažena povezanost alela i genotipova ispitivanih polimorfizama s određenom lokalizacijom bolesti. Također, nije nađena povezanost između ispitivanih polimorfizama i pojave ekstraintestinalnih manifestacija, potrebe za kirurškim liječenje kao ni vremenu proteklom od dijagnoze do operativnog zahvata u ovoj skupini bolesnika.

4.5. Utjecaj *MDR1* C3435T i G2677T/A polimorfizama na odgovor na terapiju glukokortikoidima

U skupini bolesnika s Crohnovom bolesti 71.3% (n=142) bolesnika liječeno je glukokortikoidima u tijeku bolesti. Od bolesnika koji su liječeni glukokortikoidima, njih 26.6% imalo je dobar odgovor na glukokortikoide, ovisnost o glukokortikoidima javila se u 64.1%, a 6.3% bolesnika bilo je refraktorno na terapiju (tablica 3). Distribucija alela i genotipova u bolesnika s dobrim odgovorom, bolesnika s razvojem ovisnosti na glukokortikoide te bolesnike refraktorne na terapiju prikazana je u tablici 13 i tablici 14. Na razini alela nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji alela između bolesnika s dobrim odgovorom i bolesnika s ovisnosti o glukokortikoidima. Analizom distribucije genotipova nađena je značajno veća učestalost nosioca GT genotipa G2677T polimorfizma u skupini bolesnika s dobrim odgovorom na terapiju u usporedbi s bolesnicima ovisnima o glukokortikoidima te nosioci ovog genotipa imaju značajno veću šansu da dobro odgovore na terapiju glukokortikoidima (p=0.034; OR 2.32, 95% CI(1.11-5.0)). U skupini bolesnika refraktornih na terapiju nije nađena razlika u distribuciji alela i genotipova u usporedbi sa skupinom bolesnika s dobrim odgovorom na terapiju.

Tablica 13. Odnos alela i genotipa MDR 1 2677G<T/A i MDR1 3435C<T i odgovora na terapiju glukokortikoidima u bolesnika s Crohnovom bolesti

	ovisan n (%)	dobar odgovor n (%)	p vrijednost
MDR 1 **2677G<T/A**			
T alel	65 (36.9)	38 (45.2)	0.200
G alel	111 (63.1)	46 (54.8)	
AA	1 (1.1)	0 (0.0)	1.0
GA	1 (1.1)	0 (0.0)	1.0
GG	41 (45.1)	12 (28.6)	0.087
GT	29 (31.9)	22 (52.4)	**0.034**
TA	1 (1.1)	0 (0.0)	1.0
TT	18 (19.8)	8 (19.0)	1.0
MDR 1 **3435C<T**			
T alel	81 (45.0)	45 (53.6)	0.194
C alel	99 (55.0)	39 (46.4)	
TT	25 (27.8)	12 (28.6)	1.0
CT	31 (34.4)	21 (50.0)	0.126
CC	34 (37.8)	9 (21.4)	0.074

Tablica 142. Odnos alela i genotipova MDR 1 2677G<T/A i MDR1 3435C<T SNP-a i refraktornosti na terapiju glukokortikoidima u bolesnika s Crohnovom bolesti

	Refraktoran n (%)	dobar odgovor n (%)	P vrijednost
MDR 1 **2677G<T/A**			
T alel	6 (33.3)	38 (45.2)	0.355
G alel	12 (66.7)	46 (54.8)	
GG	5 (55.6)	12 (28.6)	0.140
GT	2 (22.2)	22 (52.4)	0.147
TT	2 (22.2)	8 (19.0)	1.0
MDR 1 **3435C<T**			
T alel	9 (50.0)	45 (53.6)	0.783
C alel	9 (50.0)	39 (46.4)	
TT	3 (33.3)	12 (28.6)	1.0
CT	3 (33.3)	21 (50.0)	0.473
CC	3 (33.3)	9 (21.4)	0.424

U skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom glukokortikoidima je liječeno 78.8% bolesnika (n=87) od čega je 31% imalo dobar odgovor, 52.9% bilo je ovisno, a 16.1% bilo je refraktorno na terapiju glukokortikoidima (tablica 4). Distribucija alela i genotipova C3435T i G2677T/A polimorfizma u ovim skupinama bolesnika prikazana je u tablicama 15 i 16. Kao što je vidljivo iz tablice 15 postoji značajno veća učestalost nosioca T alela G2677T polimorfizma u skupini bolesnika s razvojem ovisnosti na terapiju glukokortikoidima gdje taj alel nosi 55.6% ispitanika u usporedbi sa bolesnicima s dobrim odgovorom na glukokortikoidnu terapiju gdje isti alel nosi svega 35.2% ispitanika te nosioci T alela imaju značajno veću šansu za razvoj ovisnosti na glukokortikoide (p=0.018; OR 2.30, 95% CI (1.15-4.62)). Analizirajući distribuciju genotipova između skupina bolesnika s dobrim odgovorom na terapiju glukokortikoidima i onih s razvojem ovisnosti na glukokortikoide nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između skupina. Međutim, rezultati ukazuju na prisutnost dva trenda. Naime, nađena je veća učestalost nosioca GG genotipa G2677T/A SNP-a u skupini bolesnika s dobrim odgovorom na terapiju no razlika je na pragu statističke značajnosti (p=0.051). Nadalje, opažena je i veča učestalost nosioca CC genotipa C3435T SNP-a u skupini bolesnika s dobrim odgovorom na terapiju no razlika između skupina nije dosegla prag statističke značajnosti (p=0.08). U skupini bolesnika refraktornih na terapiju nije nađena razlika u distribuciji alela i genotipova u usporedbi sa skupinom bolesnika s dobrim odgovorom na terapiju što je u skladu s rezultatima u ispitanika s Crohnovom bolesti.

Tablica 15. Odnos alela i genotipova MDR1 2677G<T/A i MDR1 3435C<T i odgovora na terapiju glukokortikoidima u bolesnika s ulceroznim kolitisom

	ovisan N (%)	dobar odgovor n (%)	p vrijednost
MDR 1 **2677G<T/A**			
T alel	50 (55.6)	19 (35.2)	**0.018;**
G alel	40 (44.4)	35 (64.8)	
GA	1 (2.2)	0 (0.0)	1.0
GG	8 (17.4)	11 (40.7)	0.051
GT	24 (52.2)	13 (48.1)	0.811
TT	13 (28.3)	3 (11.1)	0.142
MDR 1 **3435C<T**			
T alel	53 (57.6)	25 (46.3)	0.186
C alel	39 (42.4)	29 (53.7)	
TT	14 (30.4)	7 (25.9)	0.792
CT	25 (54.3)	11 (40.7)	0.334
CC	7 (15.2)	9 (33.3)	0.085

Tablica16. Odnos MDR1 2677G<T/A i MDR1 3435C<T genotipa i refraktornosti na steroide u bolesnika s ulceroznim kolitisom

	refraktoran n (%)	dobar odgovor n (%)	p vrijednost
MDR 1 **2677G<T/A**			
T alel	10 (35.7)	19 (35.2)	0.962
G alel	18 (64.3)	35 (64.8)	
GG	6 (42.9)	11 (40.7)	1.0
GT	6 (42.9)	13 (48.1)	1.0
TT	2 (14.3)	3 (11.1)	1.0
MDR 1 **3435C<T**			
T alel	14 (53.8)	25 (46.3)	0.527
C alel	12 (46.2)	29 (53.7)	
TT	4 (30.8)	7 (25.9)	1.0
CT	6 (46.2)	11 (40.7)	1.0
CC	3 (23.1)	9 (33.3)	0.716

Konačno, analizirali smo povezanost haplotipova dva ispitivana lokusa i odgovora na terapiju glukokortikoidima. U bolesnika s Crohnovom bolesti nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji haplotipova u ovisnosti o odgovoru na terapiju glukokortikoidima. Međutim, u bolesnika s ulceroznim kolitisom identificirali smo haplotip koji nosi povećani rizik za razvoj ovisnosti o glukokortikoidima (tablica 16). Nosioci 3435T/2677T haplotipa imaju značajno veću šansu za razvoj ovisnosti na glukokortikoide u usporedbi s nosiocima drugih haplotipova (p=0.02; OR 2.27, 95% CI (1.13-4.56)). Nije nađena značajna razlika u distribuciji haplotipova u bolesnika s ulceroznim kolitisom refraktornih na glukokortikoide.

Tablica16. Odnos *MDR1* C3435T/G2677T haplotipova u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom i ovisnosti o steroidima

		ovisan n (%)	dobar odgovor n (%)	p vrijednost
2677G<T	**3435C<T**			
T	T	48.7 (52.9)	17.9 (33.2)	**0.021**
G	C	36.8 (40.0)	27.9 (51.7)	0.167
G	T	4.3 (4.7)	7.1 (13.1)	0.069
T	C	2.2 (2.4)	1.1 (2.0)	0.859

5. RASPRAVA

Upalne bolesti crijeva kronične su bolesti koje nastaju kao rezultat neadekvatne aktivacije imunološkog sustava u genetski predisponiranih osoba. Prema danas prihvaćenoj teoriji, centralno mjesto u patogenezi ovih bolesti pripada fiziološkoj crijevnoj mikroflori. Iz tog razloga, zajednički model za gene koji stvaraju predispoziciju za pojavu upalnih bolesti crijeva je da mijenjaju interakciju između domaćina i njegovog okoliša i time pridonose pojavi bolesti. S tog aspekta, *MDR1* je odličan kandidat gen za upalne bolesti crijeva budući da se nalazi u regiji povezanoj s upalnim bolestima crijeva na 7 kromosomu, da *mdr1* knock-out miševi razvijaju kolitis u prisustvu fiziološke intestinalne flore, da njegov proteinski produkt ima ekspresiju na apikalnoj površini intestinalnih epitelnih stanica te da polimorfizmi *MDR1* gena mjenjaju aktivnost njegovog proteinskog produkta koji funkcionira kao transportna pumpa. Međutim, nakon inicijalnih istraživanja u kojima je opisana povezanost C3435T i G2677T polimorfizma i ulceroznog kolitisa odnosno upalnih bolesti crijeva kasnija istraživanja nisu uvjerljivo potvrdila ove rezultate te je uloga *MDR1* gena u patogenezi upalnih bolesti crijeva nejasna (62-78). U ovoj studiji istražili smo povezanost polimorfizama *MDR1* gena i upalnih bolesti crijeva u kohorti dobro klinički karakteriziranihbolesnika s Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom. Rezultati našeg istraživanja potvrđuju povezanost G2677T i C3435T polimorfizma s ulceroznim kolitisom. Na temelju naših rezultata, nosioci 2677T alela imaju znatno veći rizik pojave ulceroznog kolitisa. Brant i suradnici prvi su objavili povezanost G2677T SNP-a s upalnim bolestima crijeva (64). Međutim, u tom istraživanju nije definirano s kojim je fenotipom upalnih bolesti crijeva nađena povezanost. Nadalje, rezultat spomenutog istraživanja upućuju na povezanost upalnih bolesti crijeva i G alela. U kasnijim istraživanjima još su Onnie i suradnici te Potocnik i suradnici dokazali povezanost G2677T polimorfizma s ulceroznim kolitisom (67,70). U potonja dva istraživanja povezanost je dokazana za nosioce T alela ovog polimorfizma što je u skladu i s rezultatima našeg istraživanja. Dodatno težinu našim rezultatima daje i činjenica da je istraživanje Onnie i

suradnika imalo do danas najveću statističku snagu za detekciju povezanosti polimorfizama *MDR1* gena i upalnih bolesti crijeva. U skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom nije nađena statistički značajna razlika u distrubuciji alela C3435T polimorfizma u usporedbi s kontrolama. Međutim, opazili smo veću učestalost 3435T alela u odnosu na kontrole (53.7% vs 44,5%) no opažena razlika je na pragu statističke značajnosti (p=0.051) te je izostanak povezanosti T alela i ulceroznog kolitisa, opisana od strane drugih istraživača, moguće posljedica nedovoljnog broja bolesnika u našoj kohorti (62,68). Na ulogu C3435T polimorfizma u ulceroznom kolitisu dodatno upućuje činjenica da na temelju naših rezultata, nosioci TT genotipa ovog lokusa imaju značajno veći rizik pojave ulceroznog kolitisa. Time naši rezultati potvrđuju rezultate drugih istraživača koji su našli povezanost T alela i TT genotipa ovog polimorfizma i ulceroznog kolitisa (62,68). Dosadašnja istraživanja haplotipova ova dva lokusa ponudila su zanimljive rezultate budući da su u istim kohortama identifcirani i haplotipovi koji nose rizik kao i oni koji štite od pojave ulceroznog kolitisa što upućuje na kompleksno djelovanje *MDR1* gena na predispoziciju za pojavu bolesti (67,68). Sukladno ovim rezultatima, opazili smo značajno češću pojavu 3435T/2677T haplotipa u bolesnika s ulceroznim kolitisom što je dodatna potvrda uloge ovih polimorfizama u stvaranju predipozicije za pojavu ulceroznog kolitisa. Važno je napomenuti da je ovaj haplotip uključen u dva od ukupno tri haplotipa, opisanih u istraživanju Potočnika i suradnika, koji nose povećani rizik pojave ulceroznog kolitisa (67). Međutim, značajan broj istraživanja nije dokazao značajnu povezanost G2677T i/ili C3435T polimorfizma i ulceroznog kolitisa (63,65,66,69,71,72,74-76). Razlog tolikih razlika između rezultata pojedinih istraživanja nije u potpunosti jasan. Upalne bolesti crijeva su kompleksne genetske bolesti gdje u nastanku bolesti ulogu ima veliki broj različitih gena pri čemu je uloga svakog pojednog gena relativno mala, a do nastanka bolesti dolazi kombinacijom malih učinaka velikog broja gena. Sukladno tomu, doprinos polimorfizama *MDR1* gena predispoziciji za razvoj ulceroznog kolitisa je

očekivano skroman (p vrijednosti od 0.02-0.04.; OR 1.23-1.4) (tablica 2), a u ove okvire se uklapaju i naši rezultati. S obzirom na skroman doprinos *MDR1* gena predispoziciji za ulcerozni kolitis, moguće je da su pojedine studije imale nedovoljnu snagu za detekciju učinka ove veličine. Međutim, ovo je objašnjenje malo vjerojatno budući da naše istraživanje, u kojem smo dokazali povezanost ovih polimorfizama i ulceroznog kolitisa, uključuje 109 bolesnika što je jedna od manjih kohorta objavljenih u literaturi. Nasuprot tomu, od šest istraživanja koja su uključila više od 300 bolesnika s ulceroznim kolitisom svega u tri je nađena pozitivna asocijacija (63,68-71,77) te se razlog opaženih inkonzistentnosti rezultata ne može objasniti isključivo razlikama u broju ispitanika. U pojedinim istraživanjima nađena je povezanost polimorfizama *MDR1* gena s ekstenzivnim kolitisom, te su autori sugerirali da je razlika između rezultata pojedinih istraživanja posljedica razlika u subfenotipskim karakteristikama bolesnika s ulceroznim kolitisom odnosno da će uključivanje većeg broja bolesnika s ekstenzivnim kolitisom dovesti do pozitivnog rezultata (68). Međutim, u našoj populaciji bolesnika s ulceroznim kolitisom 69.4% imalo je pankolitis no nismo dokazali povezanost niti s C3435T niti s G2677T polimorfizmom u ove subpopulacije bolesnika. Protiv ovog objašnjenja govore i rezultati drugih istraživanja koji također nisu replicirali povezanost s ekstenzivnim kolitisom, a i u samom istraživanja Onnie i suradnika u kojem je nađena povezanost 2677TT genotipa s ekstenzivnim kolitisom isti trend opažen je i u grupi bolesnika s lijevostranim kolitisom što upućuje na činjenicu da TT genotip nije ekskluzivno vezan uz ekstenzivni kolitis (70). U objavljenim istraživanjima prisutna je značajna heterogenost ispitanika s ulceroznim kolitisom te posebno heterogenost kontrolne skupine s obzirom na učestalost alela ispitivanih polimorfizama. U dosadašnjim istraživanjima, učestalost pojave T alela C3435T polimorfizma varira od 41%-65.3%, a T alela G2677T polimorfizma od 40%-53% u bolesnika s ulceroznim kolitisom (62-77). Međutim, znatno veći utjecaj na različitost rezultata pojedinih istraživača ima heterogenost kontrolnih skupina pa

tako učestalost pojave T alela C3435T polimorfizma varira od 37%-63%, a T alela G2677T polimorfizma od 39%-48% (64,67-72,75-78). Veliki utjecaj frekvencije alela u kontrolnoj skupini na rezultate najbolje ilustrira istraživanje Glas i suradnika (65). U tom su istraživanju uspoređivane frekvencije alela C3435T polimorfizma između skupine bolesnika s ulceroznim kolitisom i dvije različite kontrolne skupine. Usporedbom s kontrolnom skupinom 1 u kojoj je učestalost T alela ispitivanog polimorfizma bila 52.8% nije nađena statistički značajna razlika u odnosu na skupinu bolesnika s ulcerzonim koltitisom. Međutim, usporedbom s kontrolnom skupinom 2, u kojoj je frekvencija T alela bila 43.7%, nađena je statistički značajna razlika. Budući da se u slučaju MDR1 gena radi o malim razlikama u učestalosti ispitivanih alela između dviju skupina, razumljivo je da su relativno velike razlike u zastupljenosti *minor* alela u kontrolnoj skupini najvjerojatniji uzrok velikih razlika u rezultatima dosadašnjih istraživanja. Za napomenuti je da je učestalost T alela G2677T polimorfizma u našoj kontrolnih skupini 35.8% što je najniža do sada objavljena frekvencija u Europljana. Ova činjenica dodatno potkrepljuje postojanje razlika između različitih populacija unutar Europe te upućuje na važnost replikacije rezultata genetskih istraživanja u različitih etničkih skupina. Budući da naši rezultati upućuju na ulogu C3435T i G2677T polimorfizma u patogenezi ulceroznog kolitisa postavlja se pitanje na koji način ovi polimorfizmi dovode do pojave bolesti. Uzimajući u obzir da *mdr1a* knock out miševi razvijaju kolitis u prisutnosti fiziološke crijevne flore očekivali bismo da su aleli i genotipovi koji nose povećani rizik od pojave bolesti povezani s nižom razinom ekspresije Pgp-a u odnosu na nosioce divljeg tipa (54). Ovo dodatno potvrđuje nalaz niskih razina ekspresije Pgp-a u sluznici kolona u bolesnika oboljelih od ulceroznog kolitisa pri čemu je razina ekspresije obrnuto proporcionalna aktivnosti bolesti (111-113). Rezultat G2677T polimorfizma je zamjene alanina serinom u slijedu aminokiselina Pgp-a. Suprotno očekivanom, objavljeno je da nosioci ove mutacije imaju višu razinu ekspresije Pgp-a (59). Nasuprot tomu, istraživanje Kimchi-Sarfaty i suradnika nije dokazalo

utjecaj ove mutacije niti na ekspresiju niti na lokalizaciju Pgp-a u stanici (114). Budući da G2677T polimorfizam nije povezan sa smanjenim razinama ekspresije Pgp-a, moguće ja ovaj SNP mjenja afinitet molekule Pgp-a za određeni produkt ili skupinu produkata ili pak utječe na stabilnost samog Pgp-a te time ostvaruje svoj utjecaj na sklonost pojavi bolesti. S druge strane, TT genotip C3435T polimorfizma povezan je s niskim razinama ekspresije Pgp-a u bijelaca dok je upravo obrnuto nađeno istraživanjima u Japanu čime se još jednom naglašavaju interetničke razlike u djelovanju *MDR1* (60,94-97). Budući da je u bijelaca TT genotip povezan s niskom razinom ekspresije Pgp-a on se mehanicistički uklapa u model dobiven na temelju rezultata na miševima gdje niska razina Pgp-a dovodi do pojave bolesti. Interesantno je da je C3435T sinonimski SNP, što znači da ne dovodi do zamjene aminokiselina (*nijema* mutacija). Budući da mutacija ne dovodi do promjene aminokiselinskog slijeda postavlja se pitanje na koji način dovodi do smanjenja ekspresije Pgp-a. Prethodna istraživanja su pokazala da unutar MDR1 gena postoji značajan linkage disequilibirum, uključujući i snažan linkage između G2677T i C3435T polimorfizma (59,68,115). Linkage disequilibrium označava pojavu zajedničkog prenošenja dva različita lokusa češće nego što bi se moglo očekivati na temelju slučajnosti. S obzirom na navedeno, učinili smo analizu povezanosti haplotipova dva lokusa i ulceroznog kolitisa i našli smo povezanost jednog haplotipa i ulceroznog kolitisa. Međutim, razina značajnosti i rizik nisu bili superiorni u odnosu na analizu pojedinačnih polimorfizama. Iako je moguće je da je u našoj populaciji za učinak C3435T polimorfizma u stvari odgovoran G2677T polimorfizam, najuvjerljivije objašnjenje je da se C3435T polimorfizam nalazi u linkage disequilibriumu s nekim drugim, za sada nepoznatim, SNP-om koji je u biti mutacija koja uzrokuje povezanost s ulceroznim kolitisom.

Za razliku od ulceroznog kolitisa dokazi za povezanost polimorfizama *MDR1* gena i Crohnove bolesti znatno su manje uvjerljivi. Od dosadašnjih istraživanja samo je u dva

uočena asocijacija C3435T polimorfizma i Crohnove bolesti (tablica 2). Prvo istraživanje u kojem je nađena povezanost s Crohnovom bolesti bilo je ono Urcelay i suradnika u kojem je nađena povezanost CC genotipa C3435T polimorfizma i Crohnove bolesti (71). Međutim, u tom istraživanju podaci nisu bili u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži što kompromitira rezultate tog istraživanja. Drugo istraživanje u kojem je nađena povezanost s Crohnovom bolesti bilo je ono Lal i suradnika u kojem je nađena povezanost T alela i Crohnove bolesti (73). Međutim, u ovom istraživanju oko 30% bolesnika s Crohnovom bolesti bili su Askhenazi Židovi te rezultate treba uzeti s rezervom s obzirom na poznatu činjenicu da su upalne bolesti crijeva znatno češće javljaju u ovoj populaciji u odnosu na ostatak bijelaca (7). U našoj kohorti bolesnika s Crohnovom bolesti nismo opazili značajnu razliku u distribuciji alela C3435T i G2677T polimorfizma. Međutim, na razini genotipova opazili smo zaštitni učinak heterozigotnosti na C3435T lokusu. Na koji način heterozigotnost na ovom lokusu štiti od pojave Crohnove bolesti je trenutno teško objasniti. Zaštitno djelovanje heterozigota ovog lokusa nađeno je i u istraživanju Huebner i suradnika, ali u ulceroznom kolitisu (77). U literaturi je opisano povoljno djelovanje heterozogotnosti za CFTR gen pri čemu heterozigoti imaju veću otpornost na infekciju Salmonellom typhi (116). Također u anemiji srpastih stanica heterozigotnost pruža zaštitu od pojave malarije (117). Analogno ovim spoznajama, Huebner i suradnici su postavili atraktivnu hipotezu da heterozigoti za C3435T lokus imaju veću otpornost na mikroorganizme te da je upravo taj učinak odgovoran za zaštitno djelovanje od ulceroznog kolitisa (77). Ukoliko je navedena hipoteza točna, to bi objasnilo naš nalaz zaštitnog djelovanje heterozigotnosti na pojavu Crohnove bolesti posebice imajući u vidu centralno mjesto crijevne mikroflore u patogenezi bolesti. Interesantno, uspoređujući kontrolnu skupinu s bolesnicima s Crohn kolitisom opazili smo značajno veću učestalost nosioca TT genotipa C3435T polimorfizma u skupini bolesnika s Crohnovom bolesti što je vrlo slično rezultatima u ulceroznom kolitisu. Slično našim rezultatima, Ardizzone i suradnici

našli su povezanost T alela 3435T polimorfizma i ileokolitisa (76). Ova činjenica u kombinaciji sa spoznajom da je TT genotip povezan s niskom razinom ekspresije Pgp-a upućuje na činjenicu da niske razine Pgp-a predisponiraju za nastanak upale u kolonu. Na koji način niske razine Pgp-a specifično predisponiraju za pojavu upale kolona je ovaj čas nejasan. Činjenica da su razine ekspresije Pgp-a najviše u kolonu u odnosu na druge dijelove probavnog trakta sugerira važnost ovog proteina u ovom dijelu probavne cijevi što je moguće u vezi s visokom koncentracijom bakterija u kolonu (52,53). Ukoliko Pgp ima ključnu ulogu u održavanju homeostaze u kolonu, razumljivo je da će i učinci polimorfizama koji dovode do smanjenja ekspresije Pgp-a biti najizraženiji upravo u ovom dijelu probavne cijevi. Međutim, iako se povezanost TT genotipa i pojave kolitisa čini logičnom, treba imati na umu da je naša skupina bolesnika s Crohn kolitisom sadržavala svega 34 bolesnika te ove rezultate definitivno treba potvrditi u većoj skupini ispitanika ovog fenotipa.

Kako bismo utvrdili postoji li povezanost između ispitivanih polimorfizama i pojedinih subfenotipskih karakteristika upalnih bolesti crijeva svi su bolesnici klasificirani prema danas široko upotrebljavanoj Montrealskoj klasifikaciji bolesti (107). U bolesnika sa ulceroznim kolitisom nije nađena povezanost niti sa jednom subfenotipskom karakteristikom niti je nađena povezanost sa ekstenzivnim kolitisom koju su ranije objavili Ho i suradnici (68). U bolesnika s Crohnovom bolesti opazili smo kompleksno djelovanje ova dva polimorfizma na pojavu ekstraintestinalnih manifestacija. Dosadašnjim istraživanjima opažena je smanjena učestalost ekstraintestinalnih manifestacija u nosioca GT genotipa G2677T polimorfizma i veća učestalost nosioca C alela C3435T polimorfizma u bolesnika s ekstraintestinalnim manifestacijama na zglobovima (69,76). Paradoksalno, mi smo opazili veću učestalost ekstraintestinalnih manifestacija u nosioca divljeg tipa G2677T lokusa te zaštitno djelovanje T alela C3435T lokusa na pojavu ekstraintestinalnih manifestacija. Zbog čega divlji tip nosi rizik od pojave ekstraintestinalnih manifestacija dok pojava mutacije smanjuje rizik u ovom

trenutku nije jasno. Po prvi puta dosada opazili smo povezanost C3435T polimorfizma i pojave perianalne bolesti. Ova povezanost nije uočena u dosadašnjim istraživanjima, a mogući razlog tomu je činjenica da su prethodnim istraživanjima bolesnici mahom klasificirani po Bečkoj klasifikaciji. U toj je klasifikaciji perianalna bolest klasificirana kao penetrantni fenotip te su ti bolesnici analizirani zajedno s bolesnicima s pravim penetrantnim fenotipom čime je moguće „prekrivena" stvarna povezanost s perianalnom bolesti.

Pgp je membranska transportna pumpa čiji fiziološki susptrat još nije otkriven, a pretpostavlja se da igra ulogu u ograničavanju apsorpcije toksina iz gastrointestinalnog trakta te moguće modulira interakcije između mikroorganizama i domaćina (46,49,50). S obzirom da postoji visoka razina ekspresije ovog proteina na apikalnim površinama intestinalnih epitelnih stanica, činjenica da postoje polimorfizmi *MDR1* gena koji mjenjaju aktivnost proteina te saznanje da su brojni, strukturno različiti lijekovi susptrat Pgp-a otvorila je mogućnost da polimorfizmi *MDR1* gena mjenjajući razinu ekspresije utječu na uspjeh liječenja bolesti (48). Potvrdu ovog koncepta dalo je istraživanje provedeno u HIV pozitivnih bolesnika (97). Saznanje da su glukokortikoidi supstrati Pgp-a pobudilo je posebno zanimanje o mogućem utjecaju polimorfizama MDR1 gena na uspjeh terapije s obzirom na centralnom mjesto glukokortikoida u terapiji upalnih bolesti crijeva (48,84,85,101). Pretpostavku da će visoke razine ekspresije Pgp-a dovesti do neuspjeha terapije zbog posljedično manje intracelularne koncentracije lijeka potvrdilo je istraživanje Farrella i suradnika u kojem je nađena značajno viša ekspresija Pgp-a u limfocitima periferne krvi bolesnika s Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom refraktornih na terapiju u usporedbi s bolesnicima s inaktivnom bolešću (102). Dodatno, blokiranjem Pgp-a postignute su značajno više intracelularne koncentracije glukokortikoida i ciklosporina (103). Potrebno je napomenuti da u ovim istraživanjima razina ekspresije Pgp-a nije korelirana s polimorfizmima *MDR1* gena. Prvi dokaz o postojanju veze između polimorfizama MDR1 gena i odgovora na terapiju pružilo je istraživanje Potočnika i

suradnika u kojem su istraživači definirali haplotip povezan s refraktornom Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom (67). Također, istraživanje Onnie i suradnika pokazalo je povezanost prisutnosti T alela G2677T polimorfizma i potrebe za terapijom glukokortikoidima (70). Nažalost, u istom istraživanju nije evaluiran i odgovor na terapiju glukokortikoidima. Međutim, naredna istraživanja u kojim je proučavan učinak polimorfizama MDR1 gena na uspjeh terapije glukokortikoidima bila su mahom negativna (69,75,76,106). Naši su rezultati u koliziji sa rezultatima potonjih istraživanja. U kohorti bolesnika s ulceroznim kolitisom dokazali smo da nosioci T alela G2677T polimorfizma imaju značajno veću šansu za razvoj ovisnosti na glukokortikoide. U skladu s tim, veća je i učestalost nosioca GG genotipa istog lokusa u skupini bolesnika s dobrim odgovorom no razlika između grupa nije dosegla značajnost. S obzirom da je T alel G2677T polimorfizma povezan sa pojačanom ekspresijom Pgp-a nalaz povezanosti T alela i neuspjeha terapije glukokortikoidima uklopio bi se u inicijalnu hipotezu Farrella i suradnika (59,101). Također, u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom identificirali smo i haplotip koji nosi povećani rizik od razvoja ovisnosti na glukokortikoidnu terapiju. Značajno je i da je haplotip povezan s povećanim rizikom razvoja ovisnosti na glukokortikoide u našoj kohorti dio haplotipa povezanog s refraktornom Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom u istraživanju Potočnika i suradnika (67). Razloge neuspjeha drugih istraživača u identificiranju povezanosti polimorfizama MDR1 gena i uspjeha glukokortikoidne terapije dijelom se može naći i u različitim definicijama odgovora na glukokortikoide korištene u pojedinim istraživanjima. Neki od kriterija odgovora u tim istraživanjima su proizvoljno odabrani dok se drugi razlikuju od istraživanja do istraživanja čime se stvara heterogenost populacije bolesnika između pojedinih studija te onemogućuje usporedba rezultata različitih istraživanja. U skladu s tim, potrebno je koristiti usuglašene definicije odgovora na terapiju kako bi se postigla uniformnost proučavanih skupina ispitanika i omogućila usporedba ili kombiniranje rezultata

dva različita istraživanja u svrhu detekcije skromin učinaka. U bolesnika s Crohnovom bolesti opazili smo zaštitno djelovanje GT heterozigota G2677T lokusa na razvoj ovisnosti o glukokortikoidima. Kako heterozigotnost štiti od razvoja ovisnosti na glukokortikoide nije ovaj čas moguće objasniti.

Iako smo provedenim istraživanjem potvrdili inicijalnu hipotezu o utjecaju polimorfizama MDR1 gena na pojavu upalnih bolesti crijeva te odgovoru na terapiju glukokortikoidima rezultate našeg istraživanja potrebno je pažljivo interpretirati. Najuvjerljiviji rezultati o povezanosti polimorfizama MDR1 gena i utjecaju tih polimorfizama na uspjeh terapije glukortikoidima opisani su u populaciji bolesnika s ulceroznim kolitisom. Međutim, uključeni broj bolesnika (n=109) relativno je malen u usporedbi s drugim objavljenim istraživanjima, a opisane razine značajnosti i pridruženi rizici su skromni. Nadalje, treba imati na umu da gotovo 70% te populacije čine bolesnici s pankolitisom, te je moguće da je velika zastupljenost ovih bolesnika imala znatan utjecaj na rezultate. U pogledu rezultata u skupini bolesnika s Crohnovom bolesti, na temelju današnjih spoznaja vrlo je teško objasniti opaženi zaštitni učinak heterozigotnosti. Također, kao i u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom razine značajnosti kao i pridruženi rizici su skromni. Jednako tako, iako smo dokazali utjecaj ispitivanih polimorfizama na uspjeh glukokortikoidne terapije opisani doprinos ovih polimorfizama je također skroman što upućuje na činjenicu da je u odgovoru na terapiju glukokortikoidima sudjeluju brojni čimbenici od koji svaki pridonosi krajnjem ishodu liječenja.

6. ZAKLJUČAK

- Ovim istraživanjem potvrdili smo ulogu C3435T i G2677T polimorfizama *MDR1* gena u patogenezi Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa u kohorti dobro klinički karakteriziranih bolesnika
- Ispitivani polimorfizmi *MDR1* gena imaju skroman doprinos ukupnom riziku pojave Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa u pojedinca pri čemu je taj učinak izraženiji u pogledu pojave ulceroznog kolitisa
- Nosioci 2677T alela i 3435TT genotipa imaju povećani rizik za pojavu ulceroznog kolitisa
- Nosioci 3435T/2677T haplotipa imaju povećani rizik pojave ulceroznog kolitisa
- Nosioci 3435CT genotipa imaju manju vjerojatnost pojave Crohnove bolesti
- Polimorfizmi MDR1 gena izuzev utjecaja na stvaranje predispozicije za pojavu upalnih bolesti crijeva utječu i na sam tijek Crohnove bolesti što se ogleda u činjenici da postoji povezanost C3435T i G2677T polimorfizma i pojave ekstraintestinalnih manifestacija bolesti te C3435T polimorfizma i pojave perianalne bolesti
- Polimorfizmi MDR1 gena utječu na uspjeh terapije glukokortikoidima u bolesnika s Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom
- Bolesnici s ulceroznim kolitisom koji su nosioci 2677T alela imaju znatno veći rizik razvoja ovisnosti na terapiju glukokortikoidima
- Nosioci 3435T/2677T haplotipa u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom imaju veći rizik razvoja ovisnosti na terapiju glukokortikoidima
- U skupini bolesnika s Crohnovom bolesti G2677T heterozigoti imaju značajno manju vjerojatnost razvoja ovisnosti na glukokortikoide

7. SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva kronične su bolesti nepoznate etiologije i patogeneze u kojih postoji doprinos genetskih čimbenika pojavi bolesti. *MDR1/ABCB1* gen zanimljiv je kandidat gen za upalne bolesti crijeva iz nekoliko razloga. Prvo, knock out miševi za mdr1a gen razvijaju kolitis nalik ulceroznom kolitisu. Nadalje, smješten je na 7 kromosomu u regiji povezanoj s pojavom upalnih bolesti crijeva. Konačno, postoje visoke razine ekspresije Pgp-a, proteinskog produkta *MDR1* gena koji funkcionira kao o ATP-u ovisna membranska transportna pumpa, na apikalnim površinama crijevnih epitelnih stanica. Nakon inicijalnih istraživanja koja su uputila na povezanost polimorfizama MDR1 gena i upalnih bolesti crijeva, kasnija istraživanja ponudila su oprečne rezultate te je uloga *MDR1* u patogenezi upalnih bolesti crijeva nejasna. Dodatno zanimanje za *MDR1* pobudila je i činjenica da su glukokortikoidi supstrat Pgp-a, proteinskog produkta *MDR1*. Spoznaja da pojedini polimorfizmi *MDR1* gena utječu na ekspresiju proteina otvorila je mogućnost da različite razine ekspresije mogu utjecati na uspjeh terapije glukokortikoidima. Međutim, rezultati dosadašnjih istraživanja također su proturječni. Stoga su ciljevi ovog istraživanja bili dokazati povezanost između polimorfizama *MDR1* gena i upalnih bolesti crijeva te pronaći povezanost između prisutnosti određenog genotipa i pojedinih kliničkih karakteristika bolesti. Nadalje, cilj istraživanja bilo je dokazati povezanost polimorfizama MDR1 gena i učinka terapije glukokortikoidima s krajnjim ciljem identificiranja rizičnih faktora na razini alela odnosno genotipova za terapijski neuspjeh. U istraživanje smo uključili ukupno 308 bolesnika s upalnim bolestima crijeva, 199 s Crohnovom bolesti i 109 s ulceroznim kolitisom, te 120 zdravih kontrola. U svih bolesnika učinjena je genotipizacija za G2677T/A i C3435T polimorfizma metodom RT-PCR. U bolesnika s upalnim bolestima crijeva učinjen je studiozan pregled dosadašnje medicinske dokumentacije te su bolesnici fenotipizirani prema Montrealskoj klasifikaciji. Također, učinjen je i pregled dosadašnjeg načina liječenja posebno u pogledu uzimanja glukokortikoida

u tijeku bolesti te su bolesnici grupirani u skupinu s dobrim odgovorom, ovisne ili refraktorne na glukokortikoide.

Dokazali smo povezanost polimorfizama *MDR1* gena i upalnih bolesti crijeva na razini alela, genotipova i haplotipova dva lokusa. Na temelju naših rezultata povezanost polimorfizama MDR1 gena i upalnih bolesti crijeva je skromna. Također smo dokazali povezanost ispitivanih polimorfizama i fenotipskih karakteristika u bolesnika s Crohnovom bolesti. Nadalje, dokazali smo utjecaj ovih polimorfizama na uspjeh terapije glukokortikoidima. Opaženi utjecaj na ishod terapije je skroman te je nešto izraženiji u bolesnika s ulceroznim kolitisom.

Zaključno, polimorfizmi *MDR1* gena igraju ulogu u patogenezi upalnih bolesti crijeva. Izuzev učinka na predispoziciju na pojavu bolesti modificiraju i tijek Crohnove bolesti. Također, *MDR1* gen ima skroman utjecaj na uspjeh liječenja glukokortikoidima posebno u bolesnika s ulceroznim kolitisom.

8. SUMMARY

Inflammatory bowel diseases are chronic diseases of unknown etiology and pathogenesis in which genetic factors contribute to development of disease. *MDR1/ABCB1* is an interesting candidate gene in inflammatory bowel disease for several reasons. First, *mdr1a* knock out mice develop colitis that resembles ulcerative colitis. Second, it is located in the region of chromosome 7 associated with inflammatory bowel disease. Finally, high levels of its protein product Pgp, functioning as an ATP-dependant membrane efflux pump, are found on apical surfaces of intestinal epithelial cells. Initial reports confirmed association of polymorphisms of *MDR1* and IBD. However, results of subsequent studies were contradictory making the role of *MDR1* gene in IBD pathogenesis and susceptibility unclear. Additional interest in these gene arose from the fact that glucocorticoids are know substrates of Pgp. The fact that certain polymorphisms influence expression levels of Pgp leads to the possibility that different expression levels might influence outcome of glucocorticoid therapy. However, results of current studies are contradictory. Thus, the aims of this research were to investigate the association of *MDR1*polymorphisms and inflammatory bowel disease and to investigate the association of these polymorphisms with certain clinical characteristics. We also aimed to investigate the association of *MDR1* polymorphisms with outcome of glucocorticoid therapy with an attempt to identify aleles or genotypes risk conffering for therapy failure.

A total of 310 inflammatory bowel disease patients, 199 Crohn's disease and 109 ulcerative colitis patients, and 120 healthy controls were included in the study. All subjects were genotyped for G2677T/A i C3435T polymorphism using RT-PCR. In IBD patients review of medical records was performed and patients were meticulously phenotyped according to the Montreal classification. Additionaly, data regarding exposure to glucocorticoids and therapy outcome were recorded and patients were categorised as having good response, dependant or refractory to glucocorticoids.

We report association of *MDR1* gene polymorphisms and inflammatory bowel disease on the level of alleles, genotypes and two locus haplotypes. Based on our findings, the observed association of *MDR1* polymorphisms and IBD is modest. We also report an association of investigated polymorphisms and phenotypic characteristics of Crohn's disease patients. Furthermore, we found an association with outcome of glucocorticoid therapy. The observed effect is also modest but is somewhat more prononced in ulcerative colitis patients.

In conclusion, *MDR1* gene polymorphisms are associated with inflammatory bowel disease. Apart from their effect on disease susceptibility they also exhibit a disease-modifying effect in Crohn's disease. Furthermore, *MDR1* gene has a modest impact glucocorticoid therapy outcome that is more pronounced in ulcerative colitis.

9. LITERATURA

1. Podolsky DK. Inflammatory Bowel Disease. N Engl J Med 2002; 347:417-429.
2. Vucelić B. Upalne bolesti crijeva. U: Vucelić B. i sur. (ur.) Gastroenterologija i hepatologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2002, str 723-760.
3. Gower-Rousseau, Salomez JL, Dupas JL et al. Incidence of inflammatory bowel disease in northern France (1988-1990). Gut 1994; 35: 1433-1438.
4. Devlin HB, Datta D, Dellipiani AW. The incidnece and prevalence of inflammatory bowel disease in North Tees Health District. World J Surg 1980; 4:183-193.
5. Shivananda S, Lennard-Jonnes J, Logan R et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south ? Results of the European collaborativce study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). Gut 1996; 39:690-697.
6. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. Gastroenterology 1991;100:143-149.
7. Acheson ED. The distribution of ulcerative colitis and regiuonal enteritis in United States veterans with particular reference to the Jewish religion. Gut 1960; 1:291-293.
8. Calkins BM, Lilienfeld AM, Garland CF, Mendeloff AI. Trends in incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease. Dig Dis Sci 1984; 29:913-920.
9. Calkins BM. A meta-analysisof the role of smoking in inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 1989;34:1841-1854.
10. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. Mayo Clin Proc 2006; 81:1462-1467.
11. Silverstein MD, Lashner BA, Hanauer SB, Evans AA, Kirsner JB. Cigarette smoking in Crohn's disease. Am J Gastroenterol 1989;84:31-33.
12. Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. Gastroenterology 2001;120:1093-1099.

13. Sutherland LR, Ramcharan S, Bryant H, Fick G. Effect of cigarette smoking on recurrence of Crohn's disease. Gastroenterology 1990;98:1123-1128.
14. Rutgeerts P, D'Haens G, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G. Appendectomy protects against ulcerative coltiits. Gastroenterology 1994;106:1251-1253.
15. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. N Engl J Med 2001;344:808-814.
16. Kaplan GG, Jackson T, Sands BE, Frisch M, Andersson RE, Korzenik J. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. Am J Gastroenterol 2008; 103:2925-2931.
17. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT et al. The germfree state prevents gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. J Exp Med 1994;180:2359-2364.
18. Rath HC, Schultz M, Freitag R et al. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. Infect Immun 2001;69:2277-2285.
19. García Rodríguez LA, Ruigómez A, Panés J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2006;130:1588-1594.
20. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V. Familial occurence of inflammatory bowel disease. N Engl J Med 1991; 324:84-88.
21. Peeters M, Nevens H, Baert F et al. Familial aggregation of Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. Gastroenterology 1996; 111:597-603.
22. Orholm M, Binder V,Sørensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. Scand J Gastroenterol 2000; 35:1075-1081.

23. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in a unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. Gut 1988; 29:990-996.
24. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus enviroment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. BMJ 1996;312:1075-1096.
25. 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 nationwide study. Inflamm Bowel Dis; 2008:968-976.
26. Brant SR, Shugart YY. Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis rationale, methodology, and present status of the field. Inflamm Bowel Dis 2004; 10:300-311.
27. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411:437-439.
28. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al. A frame shift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001; 411:603-606.
29. Vavassori P, Borgiani P, D'Apice MR et al. 3020insC mutation within the NOD2 gene in Crohn's disease: frequency amnd association with clinical pattern in Italian population. Dig Liver Dis 2002; 34:153-
30. Lesage S, Zouali H, Cezard JP et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet 2002; 70:845-57.
31. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. J Biol Chem 2001; 276:4812-4818.

32. Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidogylcan. Gastroenterology 2003;124:140-146.
33. Maeda S, Hsu LC, Liu H et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. Science 2005; 307:734-738.
34. Neurath MF, Fuss I, Schurmann G et al. Cytokine gene transcription by NF-kappaB family members in patients with inflammatory bowel disease. Ann N Y Acad Sci 1998; 859:149-159.
35. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. Gut 2004; 53:1658-1664.
36. Schmid M, Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger K, Stange EF. The role of defensins in pathogenesis of chronic inflammatory bowel disease. Z Gastroenterol 2004; 42:333-338.
37. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNP's identifies a susceptibility variant for Crohn's disease in ATG16L1. Nat Genet 2007;39;207-211.
38. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls. Nature 2007;447:661-678.
39. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science 2006; 314:1461-1463.
40. Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T Brumell JH. Autophagy controls Salmonella infection in response to damage to the Salmonella containing vacuole. J BiolChem 2006;281:11374-11383.
41. Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular Mycobacteria. Science 206;313:1438-1441.

42. Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels MJ, Striepen B, Subauste CS. CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. J Clin Invest 2006;116:2366-2377.
43. Dengjel J, Schoor O, Fischer R et al. Autophagy promotes MHC clas II presentation of peptides from intracellular source proteins. ProcNatlAcadSci USA 2005;102:7922-7927.
44. Abraham C, Cho J. Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2009;1090-1100.
45. Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. Cancer Res 1970; 30:1174-1184.
46. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta 1976; 455:152-162.
47. Fardel O, Payen L, Courtois A, Vernhet L, Lecureur V. Regulation of biliary drug efflux pump expression by hormones and xenobiotics. Toxicology 2001; 167:37-46.
48. Ho GT, Moodie FM, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant of gastrointestinal disease? Gut 2003; 52:759-766.
49. Thiebaut F, Tsuoro T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localisation of the mutidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:7735-7738.
50. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at the blood-brain barrier sites. Procl Natl Acad Sci USA 1989; 86:695-698
51. Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. Blood 1994;83:2451-8.
52. Fricker G, Drewe J, Huwyler J, Gutmann H, Beglinger C. Relevance of p-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A; in vitro-in vivo correlation. Br J Pharmacol 1996; 118:1841-1847.

53. Chianale J, Vollrath V, Wielandt AM et al. Differences between nuclear run-off and mRNA levels for multidrug resistance gene expression in the cephalocaudal axis of the mouse intestine. Biochim Biophys Acta 1995; 1264: 369-376.

54. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the mutiple drug resistance gene, mdr1a, spontaneously develop colitis. J Immunol 1998; 161: 5733-5744.

55. Satsangi J, Parkes M, Louis E et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7, i 12. Nat Genet 1996; 14:199-202.

56. van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. Hum Mol Genet 2004; 13:763-770.

57. Franke A, Balschun T, Sina C et al. Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL). Nat Genet 2010; 42:292-295.

58. Langmann T, Moehle C, Mauerer R et al. Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. Gastroenterology 2004; 127: 26-40.

59. Kim RB, Leake BF, Choo EF et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. Clin Pharamcol Ther 2001; 70:189-199.

60. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O et al. Functional polymorphisms of the human mutidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein activity in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:3473-3478.

61. Casorbi I, Gerloff T, Johne A et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. Clin Pharmacol Ther 2001; 69:169-174.

62. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C et al. Association between the C3434T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. Gastroenterology 2003; 124;26-33.
63. Croucher PJ, Mascheretti S, Foelsch UR, Hampe J, Schreiber S. Lack of association between the C3435T MDR 1 gene polymorphisms and inflammatroy bowel disease in two independent Northern European populations. Gastroenterology 2003;125:1919-1920.
64. Brant SR, Panhuysen CI, Nicolae D et al. MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet2003; 73:1282-1292.
65. Glas J, Török HP, Schiemann U, Folwaczny C. MDR1 gene polymorphism in ulcerative colitis. Gastroenterology 2004; 126:367.
66. Gazouli M, Zacharatos P, Gorgoulis V, Mantzaris G, Papalambros E, Ikonomopoulos J. The C3435T MDR1 gene polymorphism is not associated with susceptibility for ulcerative colitis in Greek population. Gastroenterology 2004; 126:367-369.
67. Potocnik U, Ferkolj I, Glavač D, Dean M. Polymorphisms in mutidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis. Genes Immun 2004; 5:530-539.
68. Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A et al. Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. Gastroenterology 2005; 128:288-296.
69. Palmieri O, Latiano A, Valvano R, et al. Multidrug resistance gene polymorphisms are not associated with inflammatory bowel disease and response to therapy in Italian patients. Aliment Pharmacol Ther 2005;22(11-12):1129-38.
70. Onnie CM, Fisher SA, Pattni R et al. Associations of allelic variants of the multidrug resistance gene (ABCB1 or MDR1) and inflammatory bowel disease and their effects on disease behaviour: A case control study and meta-analyis study. Inflamm Bowel Dis 2006; 12:263-271.

71. Urcelay E, Mendoza JL, Martín MC et al. MDR1 gene: Susceptibility in Spanish Crohn's disease and ulcerative colitis patients. Inflamm Bowel Dis 2006; 12: 33-37.

72. Oostenbrug LE, Dijkstra G, Nolte IM et al. Absence of association between the mutidrug resistance (MDR1) gene and inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 2006; 41:1174-1182.

73. Lal S, Stempak JM, Law C, Elkadri AA, Steinhart AH, Silverberg MS. Association between the C3435T polymorphism of the MDR1 gene and Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2006; 12:1006.

74. Fischer S, Lakatos LP, Lakatos L et al. ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) variants are not associated with disease susceptibility, disease phenotype, response to medical therapy or need for surgery in Hungarian patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 2007; 42:726-733.

75. Fiedler T, Büning C, Reuter W et al. Possible role of MDR1 two-locus genotypes for young-age onset ulcerative colitis but not Crohn's disease. Eur J Clin Pharmacol 2007; 63:917-925.

76. Ardizzone S, Maconi G, Bianchi V et al. Multidrug resistance gene 1 polymorphism and susceptibility to inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2007; 13:516-523.

77. Huebner C, Browning BL, Petermann I et al. Genetic analysis of MDR1 and inflammatory bowel disease reveals protective effect of heterozygous variants for ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2009; 15:1784-1793.

78. Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. World J Gastroenterol 2006; 12:3636-3644.

79. Katz JA. Treatment of inflammatory bowel disease with corticosteroids. Gastroenterol Clin North Am 2004; 33:171-189.

80. Benchimol EI, Seow CH, Steinhart AH, Griffiths AM. Traditional corticosteroids for induction of remission in Crohn's disease. Cochrane Database Syst Rev 2008; 16:CD006792.

81. Turner D, Walsh CM, Steinhart AH, Griffiths AM. Response to corticosteroids in severe ulcerative colitis: a systematic review of the literature and a meta-regresion. Clin Gastroenterol Hepatol 2007; 5:103-110.

82. Bebb JR, Scott BB. How effective are the usual treatments for ulcerative colitis? Aliment Pharmacol Ther 2004; 20:143-149.

83. Steinhart AH, Ewe K, Griffiths AM, Modigliani R, Thomsen OO. Corticosteroids for maintaining remission of Crohn's disease: a systematic review. Cochrane Database Syst Rev 2003; 4:CD000301.

84. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO et al. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. J Crohns Colitis 2010; 4:28-62.

85. Travis SPL, Stange EF, Lémann M et al. European evidence-based consensus on the management of ulcerative colitis: current management. JCrohns Colitis 2008; 2:24-62.

86. De Vries F, Pouwels S, Lammers JW et al. Use of inhaled and oral glucocorticoids, severity of inflammatory disease and risk of hip/femur fracture: a population-based case-control study. J Intern Med 2007; 261:170-177.

87. Souverein PC, Berard A, Van Staa TP et al. Use of oral glucocorticoids and risk of cardiovascular and cerebrovascular disease in a population based case-control study. Heart 2004; 90:859-865.

88. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. Gut 1994; 35:360-362.

89. Faubion WA Jr, Loftus EV Jr, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. Gastroenterology 2001; 121:255-260.

90. Ho GT, Chiam P, Drummond, Loane J, Arnott ID, Satsangi J. The efficacy of corticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: analysis of a 5-year UK inception cohort. Aliment Pharmacol Ther 2006; 24:319-330.

91. Hearing SD, Norman M, Probert CS, Haslam N, Dayan CM. Predicting therapeutic outcome in severe ulcerative colitis by measuring in vitro steroid sensitivity of proliferating peripheral blood lymphocytes. Gut 1999; 45:382-388.

92. Hearing SD, Norman M, Smyth C, Foy C, Dayan CM. Wide variation in lymphocyte steroid sensitivity among healthy human volunteers. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:4149-4154.

93. De Iudicibus S, Franca R, Martelossi S, Ventura A, Decorti G. Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2011; 17:1095-1108.

94. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphisms of the mutidrug resistance (MDR)-1 gene. J Pharmacol Exp Ther 2001; 297:1137-1143.

95. Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M et al. Effect of mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. Clin Pharmacol Ther 2002; 71: 297-303.

96. Hitzl M, Drescher M, van der Kuip H et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein supstrate rhodamine 123 from $CD56^{+}$ natural killer cells. Pharmacogenetics 2001; 11:1-6.

97. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER et al. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. Lancet 2002; 359:30-36.
98. Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M et al. MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. Pharm Res 2001; 18:1400-1404.
99. Drescher S, Schaeffeler E, Hitzl M et al. MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadin. Br J Clin Pharmacol 2002; 53:526-534.
100. von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporine A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. Clin Chem 2001; 47: 1048-1052.
101. Dilger K, Schwab M, Fromm MF. Identification of budesonide and prednisone as substrates of intestinal drug efflux pump P-glycoprotein. Inflamm Bowel Dis 2004; 10:578-583.
102. Farrell RJ, Murphy A, Long A et al. High mutidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. Gastroenterology 2000; 118:279-288.
103. Farrell RJ, Menconi MJ, Keates AC, Kelly CP. P-glycoprotein -170 inhibitoon significantly reduces cortisol and ciclosporin efflux from human intestinal epithelial cells and T lymphocytes. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16:1021-1031.
104. Katsanos KH, Ferrante M, Henckaerts L et al. The single nucleotide polymorphism C3435T in the MDR1 gene predicts steroid sparing in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2006; 130 Suppl 2: A-589.

105. Yamamoto-Furusho J, Villeda-Ramírez MA, Fonseca-Camarillo G et al. High gene expression of MDR1 (ABCB1) is associated with medical treatment response and long-term remission in patients with ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2010; 16:541-542.

106. Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-α but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007; 44:171-179.

107. SilverbergMS, SatsangiJ, AhmadTetal.Towardanintegratedclinical, molecularandserologicalclassificationofinflammatory bowel disease: report of a Working Party of 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. Can J Gastroenterol 2005; 19(Suppl A):5-36.

108. Oselin K, Gerloff T, Mrozikiewicz PM, Pähkla R, Roots I. MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes. Fundam Clin Pharmacol 2003; 17:463-469.

109. Arjomand-Nahad F, Diefenbach K, Landt O, Gaikovitch E, Roots I. Genotyping of the triallelic variantG2677T/A in MDR1 using LightCycler with locked-nucleic-acid-modified hybridization probes. Anal Biochem 2004; 334;201-203.

110. von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. Clin Chem 2001;47:1048-1052.

111. Gutmann H, Hruz P, Zimmermann C et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein expression in patients with newly diagnosed and therapy-refractory ulcerative colitis compared to healthy controls. Digestion 2008; 78:154-162.

112. Ufer M, Häsler R, Jacobs G et al. Decreased sigmoidal ABCB1 (P-glycoprotein) expression in ulcerative colitis is associated with disease activity. Pharmacogenomics 2009; 10:1941-1953.

113. Englund G, Jacobson A, Rorsman F, Artursson P, Kindmark A, Rönnblom A. Efflux transporters in ulcerative colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). Inflamm Bowel Dis 2007; 13:291-297.

114. Kimchi-Sarfaty C, Gribar JJ, Gottesman MM. Functional characterization of coding polymorphisms in the human MDR1 gene using a vaccinia virus expression system. Mol Pharmacol 2002; 62:1-6.

115. Horinuchi M, Sakaeda T, Nakamura T et al. Significant genetic linkage of MDR1 polymorphisms at positions 3435 and 2677: functional relevance to pharmacokinetics of digoxin. Pharm Res 2002; 19:1581-1585.

116. Pier GB, Grout M, Zaidi T et al. Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. Nature 1998; 393:79-82.

117. Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS et al. Protective effects of the sicke cell gene against malaria morbidity and mortality. Lancet 2002; 359:1311-1312.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 1979. godine u Zagrebu gdje sam završio osnovnu i srednju školu. Nakon mature u zagrebačkoj VII. Gimnaziji 1998. godine upisao sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 1998. godine i diplomirao sam 2004. godine. 2001. godine dobio sam Dekanovu nagradu kao najbolji student treće godine studija. Obavezni pripravnički staž obavio sam u KBC Zagreb nakon čega sam 2005. godine položio državni ispit. Od rujna 2005. godine radim kao znanstveni novak – asistent Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na istraživačkom projetku prof. dr. Borisa Vucelića. 2006. godine upisao sam znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvno“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U prosincu 2006. godine započeo sam specijalizaciju iz interne medicine. Tijekom 2008. godine proveo sam 11 mjeseci u Sveučilišnoj bolnici Gasthuisberg, Leuven, Belgija, gdje sam se bavio istraživačkim radom u području genetike upalnih bolesti crijeva pod vodstvom profesorice Severine Vermeire. Rezultati tog istraživanja odabrani su za oralnu prezentaciju na Europskom gastroenterološkom kongresu održanom iste godine u Beču. Autor sam ukupno 9 znanstvenih radova od kojih je 7 publicirano u časopisima koji se citiraju u Current Contents. Oženjen sam i otac sam kćeri.