

»Mladi za napredek Maribora 2019«

36. srečanje

**Vloga polimorfizmov v izbranih genih pri odzivu na anti-TNF  
terapijo pri bolnikih s Crohnovo boleznijo**

Raziskovalno področje: interdisciplinarno – zdravstvo, biologija

Raziskovalna naloga

Prostor za nalepko

Avtor: ALEKS BRUMEC

Mentor: KATJA RUPNIK, HELENA LONJAK, UROŠ POTOČNIK

Šola: PRVA GIMNAZIJA MARIBOR

Število točk: 157

Mesto: 2

Priznanje: srebrno

Maribor, Januar 2019

»Mladi za napredek Maribora 2019«  
36. srečanje

**Vloga polimorfizmov v izbranih genih pri odzivu na anti-TNF  
terapijo pri bolnikih s Crohново boleznijo**

Raziskovalno področje: interdisciplinarno – zdravstvo, biologija

Raziskovalna naloga

Prostor za nalepko

**Maribor, Januar 2019**

# KAZALO VSEBINE

|  |    |
|--|----|
| POVZETEK.....  | 1  |
| ZAHVALA .....  | 2  |
| 1. UVOD.....   | 3  |
| 1.1. Raziskovalno vprašanje .....                                      | 4  |
| 1.2. Hipoteze .....  | 4  |
| 2. TEORETIČNI DEL .....  | 4  |
| 2.1. Kronična vnetna črevesna bolezen.....                             | 4  |
| 2.1.1. Crohnova bolezen.....   | 5  |
| 2.2. Genetske bolezni .....  | 5  |
| 2.2.1. Polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP) .....                 | 7  |
| 2.2.1.1. SNP rs1800629 .....   | 8  |
| 2.2.1.2. SNP rs1061622 .....   | 8  |
| 2.2.1.3. SNP rs1801274.....  | 8  |
| 2.2.2. Genetski faktorji za Crohnovo bolezen.....                      | 9  |
| 2.3. Okoljski faktorji .....   | 10 |
| 2.3.1. Kajenje .....   | 11 |
| 2.4. Anti-TNF terapija in adalimumab (Humira®).....                    | 12 |
| 3. PRAKTIČNI DEL .....   | 13 |
| 3.1. Metode dela ter material .....                                    | 13 |
| 3.1.1. Pregled literature in izbor polimorfizmov .....                 | 13 |
| 3.1.2. Načrtovanje začetnih oligonukleotidov z orodjem Primer3.....    | 14 |
| 3.1.3. Načrtovanje restrikcijskih encimov s programom GeneRunner ..... | 14 |
| 3.1.4. Genotipizacija – PCR in RFLP .....                              | 15 |
| 3.2. Statistična obdelava podatkov.....                                | 19 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 4.     | REZULTATI.....   | 19 |
| 4.1.   | Genotipizacija .....                                       | 19 |
| 4.2.   | Genotipi SNP-jev, glede na odziv na anti-TNF terapijo..... | 20 |
| 4.2.1. | SNP rs1800629.....   | 20 |
| 4.2.2. | SNP rs1061622.....   | 21 |
| 4.2.3. | SNP rs1801274.....   | 21 |
| 4.3.   | Genotipi glede na IBDQ in delta IBDQ lestvico .....        | 24 |
| 4.3.1. | SNP rs1800629.....   | 24 |
| 4.3.2. | SNP rs1061622.....   | 24 |
| 4.3.3. | SNP rs1801274.....   | 24 |
| 5.     | RAZPRAVA.....  | 26 |
| 5.1.   | SNP rs1800629 .....  | 26 |
| 5.2.   | SNP rs1061622 .....  | 26 |
| 5.3.   | SNP rs1801274 .....  | 27 |
| 6.     | DRUŽBENA ODGOVORNOST .....                                 | 27 |
| 7.     | ZAKLJUČEK .....  | 28 |
| 8.     | VIRI IN LITERATURA.....                                    | 28 |

## KAZALO TABEL

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Vse možne kombinacije alelov potomcev [DH – dominanten homozigot, HT – heterozigot, RH – recesiven heterozigot] | 7  |
| Tabela 2: Beljakovine in vloge beljakovin, kodiranih v danih genih  | 14 |
| Tabela 3: Rezultati genotipizacije po SNP-jih in genotipih.   | 19 |
| Tabela 4: Število odzivnikov/neodzivnikov glede genotip SNP-ja rs1800629 po tednih ter statistična analiza.               | 22 |
| Tabela 5: Število odzivnikov/neodzivnikov glede genotip SNP-ja rs1061622 po tednih ter statistična analiza.               | 22 |
| Tabela 6: Število odzivnikov/neodzivnikov glede genotip SNP-ja rs1801274 po tednih ter statistična analiza.               | 23 |
| Tabela 7: Vrednosti IBDQ in delta IBDQ glede na genotip po tednih zdravljenja ter statistična analiza za SNP rs1800629.   | 25 |
| Tabela 8: Vrednosti IBDQ in delta IBDQ glede na genotip po tednih zdravljenja ter statistična analiza za SNP rs1061622.   | 25 |
| Tabela 9: Vrednosti IBDQ in delta IBDQ glede na genotip po tednih zdravljenja ter statistična analiza za SNP rs1801274.   | 25 |

## KAZALO SLIK

|   |    |
|---|----|
| SLIKA 1: DOMAČA STRAN BRSKALNIKA PUBMED .....                                 | 13 |
| SLIKA 2: MEŠANICA KRVI IN PUFRA PBS NANEŠENEGA NA FICOL. ....                 | 15 |
| SLIKA 3: KRVNI VZOREC, KI JE PO CENTRIFUGIRANJE RAZDELJEN NA ŠTIRI FAZE. .... | 16 |
| SLIKA 4: PRIMER GELA PO PCR REAKCIJI, POSLIKANEGA POD UV SVETLOBO.....        | 18 |
| SLIKA 5: PRIMER REZULTATA RFLP, S KATERIM LAHKO GENOTIPIZIRAMO VZORCE. ....   | 18 |

## **POVZETEK**

V raziskovalni nalogi smo raziskovali farmakogenomiko Crohnove bolezni (CB), obliko kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB). Vzrok nastanka bolezni ni znan, znano je, da je bolezen posledica kombinacije okoljskih in genetskih dejavnikov. Namen te raziskave je ugotoviti nove gene/polimorfizme ter njihovo povezavo z vplivom na odziv na zdravljenje z anti-TNF biološko terapijo, ki zavira fiziološki odziv na pro-vnetni citokin TNF, ki vzpodbuja vnetje in je prisoten pri boleznih kot je KVČB. Terapija proti TNF se je izkazala kot zelo uspešna predvsem pri težjih oblikah bolezni, vendar je neodziv na terapijo prisoten pri okoli 30% bolnikov, zato je smiselno odkriti takšne genetske označevalce, s katerimi bi lahko že pred začetkom zdravljenja napovedali odziv na terapijo ter s tem zmanjšali obremenitev bolnika zaradi neučinkovite terapije kot tudi stroške zdravljenja. V naši raziskavi smo izbrali tri SNP-je, potencialno povezane z odzivom na anti-TNF terapijo, to so SNP-ji rs1061622 v genu *TNFRSF1B*, rs1800629 v genu *TNF* in rs1801274 v genu *FCGR2A*, ter jih analizirali pri slovenskih bolnikih s CB, zdravljenimi z anti-TNF terapijo. Ugotovili smo, da imajo bolniki z genotipom TT ali GG SNP-ja rs1801274 v genu *FCGR2A* boljši odziv po 4. in 12. tednu zdravljenja.

**Ključne besede:** Crohnova bolezen, farmakogenetika, anti-TNF

## **ZAHVALA**

Rad bi se iskreno zahvalil Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter Medicinski fakulteti Univerze v Mariboru za priložnost opravljanja raziskovalne naloge. Zahvalil bi se tudi svoji mentorici in sodelavcem na fakultetah za pomoč in vsa znanja, ki so mi jih dali.

## 1. UVOD

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je skupina vnetnih bolezni črevesja. Poznamo dve glavni obliki KVČB, to sta Crohnova bolezen (CD), ter ulcerozni kolitis (UC). CD je oblika KVČB, ki povzroča vnetje kateregakoli dela prebavnega trakta, ter lahko vodi do abdominalne bolečine, diareje, utrujenosti, izgube teže ter podhranjenosti. Vodi lahko tudi do resnih, življenje ogrožajočih komplikacij (Gajedran et al. 2017). Malignost je prav tako eden od problemov pri CD, saj zelo poveča tveganje za razvoj raka debelega črevesja (Soderlund et al. 2009).

Čeprav natančen vzrok bolezni ni znan, je znano, da obstaja kompleksna interakcija med genetsko predispozicijo, okoljskimi faktorji ter imunsko disregulacijo. Zato potekajo raziskave, s katerimi bi odkrili genetske lokuse, ki vplivajo na nastanek kot tudi potek te bolezni (Sartor in Muehlbauer, 2007). Eden od okoljskih faktorjev, ki povečajo možnost za CD za več kot dvakrat, je tudi kajenje (Calkins, 1989).

Standardna terapija CD vključuje razne imunosupresante, med katerimi je najpogostejši metotreksat. Vključuje tudi kortikosteroide, antibiotike, aminosalicilate ter tiopurine. V primeru hujše oblike bolezni ali neodziva na standardno terapijo, pa zdravljenje vključuje tudi biološko anti-TNF terapijo. Velik problem anti-TNF terapije je, da se kljub njeni uspešnosti pri zdravljenju CD, pri 30 % ljudi vseeno pojavi neodziv (Sales – Campos et al., 2015).

Najpogostejša metoda diagnosticiranja CD so ileokolonoskopije z biopsijami (Baumgart in Sandborn, 2012). Te lahko pokažejo granulome, a ti so prisotni oziroma jih lahko odkrijejo le pri 60% vzetih vzorcih (Nikolaus in Schreiber, 2007). Napredek genetike in širitev genetskih podatkovnih baz pa je omogočilo iskanje biomarkerjev, ki bi lahko bili povezani z nastankom in potekom bolezni ter bi tako omogočili boljše diagnosticiranje kot tudi pomagali pri izbiri pravilne terapije za posameznika, saj je odziv ljudi na zdravila, poleg drugih dejavnikov, odvisen tudi od genotipa posameznika. To je koristno, saj bi lahko s takšnimi genetskimi biomarkerji omogočili bolnikom že v začetni fazi bolezni določiti terapijo, ki ne bi imela stranskih učinkov.

Namen te raziskovalne naloge je ugotoviti, če kateri izmed izbranih polimorfizmov posameznega nukleotida (v nadaljevanju SNP, ang. za single nucleotide polymorphism) (rs1061622 v genu



*TNFRSF1B*, rs1800629 v genu *TNF* in rs1801274 v genu *FCGR2A*) vpliva na odziv na anti-TNF terapijo<sup>1</sup> pri slovenskih<sup>2</sup> bolnikih s CD.

### 1.1. Raziskovalno vprašanje

S to nalogo smo želeli odgovoriti predvsem na eno glavno vprašanje, in to je: **Ali kateri od izbranih polimorfizmov vpliva na odziv bolnika s CD na anti-TNF terapijo?**

### 1.2. Hipoteze

Ker vsi izbrani SNP-ji sintetizirajo beljakovine, ki sodelujejo pri imunski odzivnosti, povezani ali z avtoimunskimi boleznimi ali pa s TNF, predvidevamo, da bodo izbrani polimorfizmi imeli vpliv na odzivnost pacientov na anti-TNF terapijo.

## 2. TEORETIČNI DEL

### 2.1. Kronična vnetna črevesna bolezen

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) obsega dve bolezni, in sicer Crohnovo bolezen (CD) ter ulcerozni kolitis (UC). Za obe obliki je značilno vnetje prebavnega trakta, vendar se razlikujeta po delu trakta, ki je prizadet ter po klinični prezentaciji bolezni. UC je omejen le na debelo črevo, CD pa se lahko pojavi v katerem koli delu trakta, torej od ust do anusa. Pri CD so med vnetimi deli trakta tudi zdrava tkiva, pri UC pa je debelo črevo v celoti vneto. Glavna razlika je, da UC prizadene le notranje celice črevesa, medtem ko CD lahko prizadene katerikoli sloj črevesne stene. V približno 10 % primerov KVČB imajo pacienti znake CD ter UC, v tem primeru je diagnoza običajno neopredeljen kolitis (ang. indeterminate colitis) (Fakhoury et al. 2014).

Zdravljenje KVČB poteka na več načinov, kljub temu pa bolezen ni povsem ozdravljiva. Glede na intenzivnost simptomov poteka zdravljenje z aminosalicilati, imunosupresanti (npr. kortikosteroidi), biološkimi zdravili oz. anti-TNF zdravili (npr. Humiro) ali pa z antibiotiki. Približno ena petina ljudi ima močne simptome, ki se pri zdravljenju z zdravili ne izboljšajo

---

<sup>1</sup> anti-TNF terapija je znanstveno ime za vsa biološka zdravila, ki zatirajo delovanje pro-vnetnega citokina TNF (ang. tumor necrosis factor).

<sup>2</sup> Poudarjeno je slovenskih bolnikih, saj študije kažejo, da se tveganje in prevalenca bolezni razlikuje po rasah ter verah, recimo židi imajo veliko prevalenco bolezni (Fireman et al. 1989, PubMed).

(Fakhoury et al. 2014). Slednje, vključno s stigmo, povezano z boleznijo, lahko izzove pri bolnikih različne oblike depresije. Študije so pokazale, da je približno 16 % pacientov imelo eno izmed oblik depresije (Wong et al. 2017).

### **2.1.1. Crohnova bolezen**

Angleška organizacija CrohnsandColitis UK to bolezen opisuje kot vnetje črevesnega trakta, kjer je lahko prizadet katerikoli del, vendar je najpogosteje prizadet ali ileum<sup>3</sup> ali debelo črevo. Vnetje se po navadi izrazi v posameznih manjših odsekih črevesa, med njimi pa je zdravo tkivo. Prizadene lahko črevesno steno ali pa tudi ostale sloje. Je kronična bolezen, kar pomeni, da traja celo življenje in ni ozdravljiva, vendar imajo pacienti lahko vmesne remisije (obdobja brez simptomov) ter tudi relapse (obdobja, ko so simptomi še močnejši). Simptomi bolezni se pri bolnikih razlikujejo po intenziteti, lahko so mili ali pa hudi. Najpogostejši so abdominalna bolečina in driska, utrujenost, vročina, ulcerji<sup>4</sup>, izguba apetita in teže ter anemija (CrohnsandColitis, 2013).

Pogostost pojavnosti CD se razlikuje glede na starost, raso, veroizpoved in geografsko lokacijo ljudi. Najpogosteje se pojavi med 20. in 30. letom starosti, za razliko od UC, ki se pojavi najpogosteje med 30. in 40. letom starosti. V Evropi je pogostost bolezni med 8 in 214 / 100.000 prebivalcev, za razliko od Severne Amerike, kjer je med 44 in 201 / 100.000 prebivalcev, vendar najnovejša študija kaže, da bi naj bila prevalenca v Severni Ameriki 201 / 100.000 prebivalcev. CD se za 20 % do 30 % pogosteje pojavlja pri ženskah kot pri moških, čeprav se v območjih visoke pogostosti CD ta razlika znatno zmanjša. Raziskava iz Ameriške zvezne države Georgia kaže, da je najvišja incidenca CD med afro-ameriškimi otroci. Odrasli Hispanci imajo tudi manjšo prevalenco kot belci, najmanjšo incidenco pa imajo Azijci, še posebej Korejci, s prevalenco 5,3 / 100.000 prebivalcev. Visoko prevalenco imajo tudi Židovske populacije (Cosnes et al, 2011).

### **2.2. Genetske bolezni**

Genetske bolezni so vse bolezni, na katere vplivajo spremembe v sekvenci DNK. To so lahko mutacije v enem samem genu (monogenske bolezni), mutacije v več genih (poligenske ali multifaktorske bolezni), kombinacija genskih mutacij in okoljskih faktorjev (npr. KVČB), ter

---

<sup>3</sup> ileum – zadnji del tankega črevesja.

<sup>4</sup> ulcer – razjeda oz. defekt v steni prebavne cevi.

napake v samih kromosomih, (npr. sprememba števila kromosomov kot je trisomija 21. kromosoma<sup>5</sup> ali sprememba strukture kromosoma) (Crespi, 2010).

Raziskave kažejo, da ima veliko bolezni vzrok v genetski komponenti. Nekatere bolezni povzročajo mutacije, ki jih podedujemo od staršev in so prisotne ob rojstvu (npr. anemija srpastih celic<sup>6</sup>), druge pa povzročajo pridobljene mutacije v genih ali skupini genov, ki jih pridobimo tekom življenja. Te pa niso podedovane ampak jih dobimo ali po naključju ali pa zaradi okoljskih faktorjev, kot je npr. kajenje. V to skupino genetskih bolezni spadajo tudi nekatera rakava obolenja, na primer pljučni rak. Dedne bolezni po navadi vključujejo podedovanje enega samega mutiranega gena, ki se prenaša iz roda v rod in lahko tako pri vseh generacijah povzroči ekspresijo bolezni. Princip dedovanja teh bolezni lahko prikažemo s Punnettovim kvadratom (glejte Tabelo 1). Te bolezni se lahko dedujejo recesivno ali dominantno. Pri recesivnih boleznih sta potrebna oba mutirana alela (genotip je recesivni homozigot), pri dominantnih pa je potreben le en mutiran alel (genotipa sta lahko ali dominanten homozigot ali heterozigot) (Genetic Alliance, 2009).

---

<sup>5</sup> Trisomija 21. Kromosoma – bolezen, kjer imajo ljudje tri kopije 21. Kromosoma namesto dveh. Bolezen se imenuje Downov sindrom.

<sup>6</sup> Anemija srpastih celic - Bolezen, kjer imajo rdeče krvničke obliko srpov.

*Tabela 1: Vse možne kombinacije alelov potomcev [DH – dominanten homozigot, HT – heterozigot, RH – recesiven heterozigot]*

| <b>Genotip staršev</b> | <b>DH (% možnosti)</b> | <b>HT (% možnosti)</b> | <b>RH (% možnosti)</b> |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>DH + DH</i>         | 100                    | 0                      | 0                      |
| <i>DH + HT</i>         | 50                     | 50                     | 0                      |
| <i>DH + RH</i>         | 0                      | 100                    | 0                      |
| <i>HT + HT</i>         | 25                     | 50                     | 25                     |
| <i>HT + RH</i>         | 0                      | 50                     | 50                     |
| <i>RH + RH</i>         | 0                      | 0                      | 100                    |

Poligenske ali multifaktorske bolezni povzročajo kombinacija majhnih sprememb v več genih, po navadi v kombinaciji z okoljskimi faktorji, ki povzročajo izražanje bolezni. Raziskave kažejo, da so mutacije na več genih lahko tudi nekakšni predispozicijski faktorji<sup>7</sup> za vedenjske bolezni kot so alkoholizem ter tudi nekatere duševne bolezni. Tretja oblika genskih bolezni pa so bolezni, ki jih povzročajo sprememba zgradbe ali števila kromosomov, na primer duplikacija, delecija, inverzija ter premestitev oz. translokacija dela kromosoma. Pri teh mutacijah sam gen oz. geni niso mutirani. Genetske bolezni lahko povzročajo tudi neizražanje določenih genov oz. skupine genov, kot npr. pri Prader-Willi sindromu<sup>8</sup> (Genetic Alliance, 2009).

### **2.2.1. Polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP)**

Polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP-ji) so najpogostejša oblika genske variacije v človeškem genomu. Gre za razlikovanje enega nukleotida v določenem lokusu, ki se pojavi pri več kot 1 % populacije. Te variacije se lahko dogajajo približno enkrat na vsakih 100 do 300 nukleotidov in so vzrok za približno 90 % genetskih variacij med ljudmi. Vplivajo lahko na fenotip, torej na zaznavne lastnosti (npr. barva dlake pri nekaterih živalih), na našo dovzetnost do raznih bolezni kot tudi na odzivnost na zdravila (Shastri, 2009).

<sup>7</sup> Predispozicijski faktorji – faktorji, ki zvišajo možnost za pojav določene bolezni.

<sup>8</sup> Prader – Willi sindrom – genska bolezen, ki jo povzročajo spremembe na kromosomu 15.

SNP-ji delujejo kot kromosomske oznake za specifične regije DNK, ki jih lahko preučimo za variacije, ki bi lahko povzročile bolezen ali spremenile odzivnost na zdravila. SNP-ji, ki so povezani z boleznimi, so lahko uporabni za diagnostične teste, SNP-ji, ki pa vplivajo na odzivnost posameznikov na zdravila, pa omogočajo personalizirano medicino<sup>9</sup>. V osnovni genetiki lahko SNP-je uporabimo za lociranje genov na kromosomih. Skeniranje genoma, da bi odkrili lokacije SNP-jev, lahko pomaga znanstvenikom narediti kromosomske zemljevide, ki omogočajo identifikacijo genov, ki vplivajo na določeno lastnost (Shastry, 2009).

Za KVČB je trenutno znanih več kot 200 različnih lokusov, povezanih z nastankom bolezni. Posamezni lokus sam po sebi sicer nima znatnega vpliva na nastanek bolezni, vendar pa se vpliv veča z vsakim dodatnim lokusom. Med najvplivnejše SNP-je spadajo tisti, ki ležijo na genu *NOD2*, recimo rs2066844. Ti SNP-ji se lahko uporabljajo kot bioznačevalci, saj lahko z njimi diagnosticiramo bolezen ter določimo najprimernejšo terapijo (Burton et al. 2007).

#### **2.2.1.1. SNP rs1800629**

Ta SNP leži na genu *TNF* na kromosomu 6, pri katerem gre za substitucijo med gvaninom in adeninom. Raziskave kažejo, da ima ta SNP vlogo pri odzivu na anti-TNF terapijo, specifično pri zdravilih infliximab, etanercept in adalimumab (Humira) (Fonseca et al. 2005).

#### **2.2.1.2. SNP rs1061622**

Ta SNP leži na genu *TNFRSF1B* na kromosomu 1, pri katerem pride do zamenjave timina z gvaninom. Raziskave kažejo, da ima ta SNP tudi vlogo pri odzivu na anti-TNF terapijo, vendar je večino raziskav bila narejenih pri bolnikih s psoriazom<sup>10</sup> (Gonzalez et al. 2015), (Murdaca et al. 2017).

#### **2.2.1.3. SNP rs1801274**

Ta SNP leži na genu *FCGR2A* na kromosomu 1. Tukaj gre za substitucijo adenina s citozinom ali pa substitucijo adenina z gvaninom. Raziskave kažejo, da ta SNP vpliva na dovzetnost za bolezen kot so malarija, lupus in razna kronična vnetja. Povezava je bila tudi ugotovljena med tem SNP-jem in odzivom na zdravilo trastuzumab (Botticelli et al. 2015).

---

<sup>9</sup> Personalizirana medicina – oblika zdravljenja, kjer se zdravila pacientu določijo glede na njihov genski zapis in s tem izboljšajo kvaliteto zdravljenja ter tudi zmanjšajo možnost za slab odziv na zdravila.

<sup>10</sup> Psoriza – drugo ime za kožno bolezen luskavico.

### 2.2.2. Genetski faktorji za Crohnovo bolezen

Prva študija genetskih faktorjev za CD sega v leto 1996 in je odkrila dovzetni lokus na kromosomu 16, ki so ga poimenovali IBD1. Le-tega so v nadaljnjih študijah potrdili in leta 2001 specifično povzročitveno mutacijo lokalizirali na tri nizko frekvenčne kodirajoče variante v genu *NOD2* (takrat znanem tudi kot *CARD15* gen) (Liu & Anderson, 2014).

Velik napredek v genetiki CD so prinesle asociacijske študije celotnega genoma (v nadaljevanju GWAS, ang. za genome wide association studies). Prva GWAS<sup>11</sup>, pri bolnikih s CD je bila narejena na Japonski populaciji leta 2005, in je odkrila gen *TNFSF15* kot potencialni lokus, ki povečuje tveganje za nastanek CD (Yamazaki K, 2005). Kasnejše študije so to ugotovitev tudi potrdile. Naslednja dva gena, *ATG16L1* in *IRGM* sta sprva pokazala na vlogo avtofagije pri patogenezi CD. Drugi geni, na primer *CARD9* ter *IRF5*, pa bi naj imeli vlogo pri delovanju oz. odzivu imunskega sistema. Približno 30 % teh variant je skupnih z UC, medtem ko je blizu 50 % skupnih z vsaj eno avtoimunsko boleznijo (npr. diabetesom tipa 1). To dokazuje, da obstaja genetsko prekrivanje med CD in drugimi imuno-povezanimi boleznimi. Za razliko od ostalih avtoimunskih bolezni, imajo geni v HLA<sup>12</sup> regiji le majhen vpliv na povečano tveganje za CD. To je v nasprotju z UC, kjer variacije v tej regiji v največji meri povečajo tveganje. Te zgodnje GWAS so pokazale, da je z izjemo *NOD2*, tipičen učinek enega lokusa majhen, tako, da so identificirani lokusi razložili le del genetskega faktorja, ki prispeva k tveganju za CD (Liu & Anderson, 2014).

Zaradi potrebe po večjem številu vzorcev se je ustanovil International IBD Genetics Consortium ali IIBDGC, ki je združil raziskovalce in prejšnje baze podatkov, pridobljenih z GWAS. Prva študija iz leta 2008 je odkrila 21 novih lokusov, dve leti kasneje pa še 30, kar je pripeljalo do skupno 71 znanih lokusov. Raziskava leta 2012 pa je to število skoraj podvojila na 140 znanih lokusov. Skupaj z lokusi za UC, je število KVČB lokusov 163, kar je največje znano število lokusov za katerokoli kompleksno bolezen (Jostins, 2012). Med vsemi temi geni se 6 od 8 genov, ki so znani za Mendelejevo dovzetnost za mikobakterijsko bolezen<sup>13</sup>(MSMD), pokriva s KVČB. Med 8 znanimi geni za Lepro<sup>14</sup>, se jih 7 ponovno pokriva s KVČB. Skupno je 66 lokusov

---

<sup>11</sup> GWAS – Genome-Wide Association Study – primerjava genomov različnih osebkov za razlike, ki bi lahko povzročale določeno bolezen.

<sup>12</sup> HLA regija – human leucocyte antigen regija

<sup>13</sup> Mendelejeva dovzetnost za mikobakterijsko bolezen – redka genska bolezen, kjer zaradi defektov v določenih genih pride do večje dovzetnosti za mikobakterijske okužbe

<sup>14</sup> Lepra – znana tudi kot gobavost, je vnetje, ki ga povzroči bakterija *Mycobacterium leprae*. Za njo so značilni tipični granulomi oz. »gobe«.

povezanih s KVČB in drugimi imunskimi boleznimi. To pokrivanje nakazuje, da bi lahko selekcijski pritisk, ki ga vodijo mikobakterijske okužbe, oblikoval genetsko arhitekturo CD (Liu & Anderson, 2014). Po najnovejših raziskavah bi naj trenutno obstajalo več kot 200 genetskih variacij, ki vplivajo na tveganje za CD, in večina teh bi naj zelo šibko učinkovala s spremembo količine, časa in lokacije genske ekspresije. Točen mehanizem vpliva teh variacij na tveganje za CD ni znan, vendar najverjetneje povzročajo določene spremembe v delovanju imunskega sistema (Liu & Anderson, 2014).

CD sam po sebi ni deden, vendar imajo potomci staršev s to boleznijo povečano tveganje, in sicer otroci enega starša s CD imajo 7 % do 9 % višjo možnost za CD ter 10 % višjo tveganje za katero od oblik KVČB. V primeru, da imata oba starša CD, pa je tveganje za nastanek bolezni 35 % (Ellinghaus et al. 2015).

### **2.3. Okoljski faktorji**

Hitro višanje števila bolnikov s CD in UC v razvitih državah, pojav CD pri zakonskih partnerjih ter pomanjkanje popolne enakosti za CD pri monozigotnih<sup>15</sup> dvojčkih, so močni argumenti za vlogo okoljskih faktorjev pri KVČB. Primera okoljskih faktorjev sta kajenje, ki je faktor tveganja pri CD in pa zaščitni faktor pri UC (glejte podpoglavje 2.3.1) ter apendektomija<sup>16</sup>, ki je zaščitni faktor za UC. Med številnimi drugimi faktorji, ki so jih testirali, (npr. mikrobe, diete, zdravila, droge, stres ter socialni status) bi lahko tveganje za CD povzročale atipične Mikobakterije, oralna kontracepcija ter antibiotiki (Jantchou et al, 2006).

Pri okoljskih faktorjih za CD in tudi v povezavi z drugimi imunskimi boleznimi je pogosto omenjena *higienska hipoteza*, ki pravi, da boljši higienski pogoji zmanjšajo pojav okužb kar lahko posledično vodi v razvoj imunskih bolezni. Po tej hipotezi bi izpostavljenost različnim mikrobom lahko igrala zaščitno vlogo proti imunskim boleznim, saj bi uravnovešala odziv pro-vnetnih Th1 celic ter regulatornih T celic. Takšen mehanizem bi dal telesu zaščito pri nadaljnjih izpostavljenostih alergenom in antigenom in zmanjšal prevalenco bolezni kot je KVČB. Čeprav bi naj po tej hipotezi izpostavljenost mikrobom predstavljala zaščitni dejavnik za CD, je raziskava pokazala, da je večja izpostavljenost mikrobom povečala tveganje za CD (Salgado et al, 2017).

---

<sup>15</sup> Monozigotni dvojčki – enojajčni dvojčki (razvijejo se iz ene same jajčece).

<sup>16</sup> Apendektomija – operacija, kjer se odstrani slepič

*Helicobacter pylori*<sup>17</sup> je bakterija, ki jo pogosto dobimo v otroštvu, in je manj pogosta v razvitem svetu, kjer je večja prisotnost KVČB. Meta-analiza 23 študij je dokazala, da je *H. pylori* negativno povezana s CD in UC. Imela naj bi tudi imela nekakšno zaščitno vlogo pri drugih imunskih boleznih kot je npr. astma<sup>18</sup>. Pred KVČB naj bi ščitila tako, da zviša ekspresijo genov, ki so povezani s funkcijo T-regulativnih celic<sup>19</sup>. To bakterijo v telesu pogosto uničimo z uporabo antibiotikov in zdravila Mesalazin<sup>20</sup> (Molodecky & Kaplan, 2010).

Med odkritimi faktorji so tudi izpostavljenost enteričnim<sup>21</sup> patogenom, apendektomija pred diagnozo CD in kajenje. Tip človeka, po raziskavah opisan kot najbolj dovzeten za CD, je belec moškega spola, mlajši od 40 let, iz manjše družine, brez virusnih okužb v otroštvu, ki je bil izpostavljen enteričnim patogenom, je imel apendektomijo pred diagnozo CD in je kadilec (Salgado et al, 2017).

### 2.3.1. Kajenje

Med kajenjem in KVČB je bil dokazan paradoksen odnos. Meta-analiza je namreč pokazala, da imajo aktivni kadilci manjšo možnost za pridobitev UC v primerjavi z nekadilci in bivšimi kadilci. V nasprotju pa imajo aktivni kadilci večjo možnost za pridobitev CD. Točen mehanizem vpliva kajenja na razvoj KVČB ni znan. V epitelnih celicah črevesja so nikotinski acetilholinski receptorji (nAChRs), katerih ekspresija je bila tudi zaznana na T celicah, kar kaže, da bi nikotin lahko direktno reguliral funkcijo le-teh. Klinične študije pri UC so kasneje dokazale le neznatne pozitivne učinke, zato lahko sklepamo, da nikotin ni glavni faktor vpliva na KVČB. Povezava med kajenjem in KVČB je dobro zabeležena. Zanimivo je dejstvo, da je v državah z najmanjšo incidenco KVČB največ kadilcev. Na primer, v Kanadi je incidenca KVČB večja kot v Južni Koreji, čeprav je prevalenca kajenja v Kanadi (22 %) manjša kot pa v Južni Koreji (65 %) (Molodecky & Kaplan, 2010).

Podobna zveza je bila predpostavljena za pasivno izpostavljenost kajenju, vendar analize niso našle povezave med otroško in prednatalno izpostavljenostjo kajenju s KVČB. Možen razlog je,

---

<sup>17</sup> *Helicobacter pylori* – gram-negativna bakterija, ki je pogosto najdena v želodcu.

<sup>18</sup> Astma – dolgo ročno vnetna bolezen bronhijev v pljučih.

<sup>19</sup> T-regulativne celice – celice, ki modulirajo imunski sistem in držijo toleranco do lastnih antigenov ter zavirajo avtoimunske bolezni.

<sup>20</sup> Mesalazin – proti-vnetno zdravilo, uporabljeno za zdravljenje KVČB.

<sup>21</sup> Enteričnim – iz črevesja oz. živi v črevesju.



da gre pri tveganju za KVČB in kajenju za zvezo, odvisno od doze kajenja, kjer pasivno kajenje predstavlja manjšo mero izpostavljenosti (Molodecky & Kaplan, 2010).

#### **2.4. Anti-TNF terapija in adalimumab (Humira®)**

Preden lahko govorimo o anti-TNF terapiji, moramo razjasniti, kaj sploh je TNF. TNF (tumor necrosis factor) ali dejavnik tumorske nekroze, je eden izmed telesnih obrambnih mehanizmov. To je prvi citokin, ki se pojavi v krvi po stresu ali poškodbah. Deluje z aktivacijo dveh receptorjev, in sicer TNFR1, ki inducira pro-vnetni odziv ter tudi pomaga pri anti-apoptotičnem<sup>22</sup> odzivu. Tako so recimo miši, pri katerih so ta receptor onesposobili, zaščitene pred mnogimi boleznimi, saj imajo znatno manjši vnetni odziv. Drugi receptor je TNFR2, ki aktivira razne signalne poti. Njegova vloga je pomoč pri obnavljanju telesa ter homeostazi. Miši, pri katerih so ta receptor onesposobili, so imele augmentirano patologijo. To nakazuje na to, da bi lahko bila selektivna blokada TNFR1 celo bolj učinkovita, kot splošna blokada TNF, kar je bilo dokazano v miših. Anti-TNF terapija je torej blokada delovanja citokina TNF. Terapija se je dokazala za uspešno že v svoji začetni fazi pri zdravljenju revmatoidnega artritisa, še posebej s ko-terapijo z metotreksatom, ki je zaviralec imunskega sistema (Monaco et al. 2015).

Zdravilo adalimumab, katerega tržno ime je Humira, je prišlo v uporabo leta 2002. Adalimumab je človeško monoklonsko TNF $\alpha$  protitelo, ki blokira delovanje TNF $\alpha$ . Uporablja se za zdravljenje revmatoidnega artritisa v kombinaciji z metotreksatom ter za zdravljenje CD. Raziskave tudi nakazujejo na delovanje pri psoriazi. Stranski učinki za Humiro so v primerjavi z drugimi sistemskimi zdravili manjši, najpogostejši je rahlo vnetje v predelu vbrižga zdravila. Humira pa sicer tudi za dvakrat poveča možnost za resne okužbe, najbolj znana je reaktivacija tuberkuloze. Zaradi povišane možnosti za okužbe, kot je tuberkuloza, je priporočeno relativno redno testiranje, zaradi možnosti pancitopenije<sup>23</sup> pa so priporočeni občasni jetrni in krvni testi.

---

<sup>22</sup> Apoptoza – kontrolirana celična smrt.

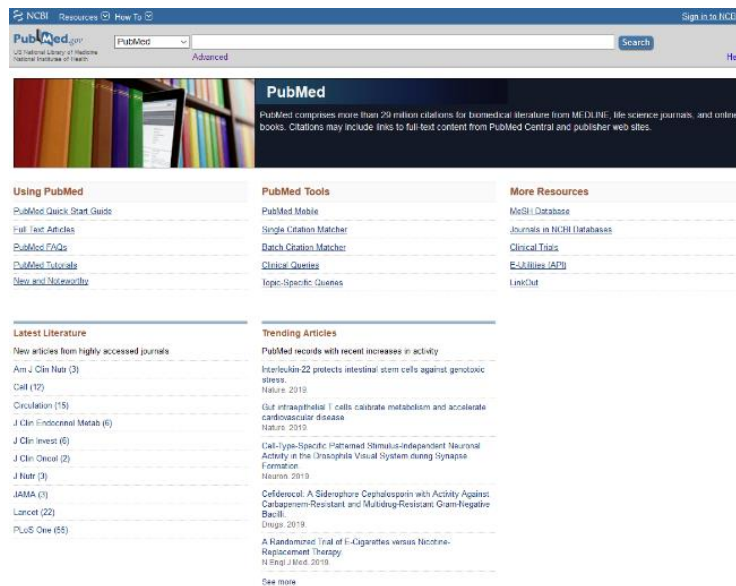
<sup>23</sup> Pancitopenija – stanje, kjer je zmanjšano število vseh treh krvničk (rdečih krvničk, belih krvničk ter trombocitov).

### 3. PRAKTIČNI DEL

#### 3.1. Metode dela ter material

##### 3.1.1. Pregled literature in izbor polimorfizmov

Preden smo se lotili praktičnega dela, smo morali pregledati literaturo ter poiskati polimorfizme, ki bi lahko imeli vlogo pri odzivnosti pacienta na anti-TNF terapijo. Pri tem nam je pomagal brskalnik PubMed. PubMed je brskalnik, ki omogoča dostop do MEDLINE baze podatkov, kjer lahko iščemo članke povezane z medicino, zdravstvom ter drugimi biomedicinskimi vedami. Članke lahko iščemo z uporabo terminov, kot so imena in priimki avtorjev, naslovi člankov, ključne besede itd., ter kakršnokoli kombinacijo teh (Roberts, 2001).



Slika 1: Domača stran brskalnika PubMed (Avtor, 2019)

Z uporabo PubMed-a smo poiskali članke, ter s preučevanjem le-teh izbrali tri SNP-je, ki bi lahko imeli vpliv na odzivnost na zdravljenje. Izbrani SNP-ji so bili rs1061622 v genu *TNFRSF1B*, rs1800629 v genu *TNF* in rs1801274 v genu *FCGR2A*. Razlog za izbor teh SNP-jev je bil, da vsi kodirajo beljakovine, ki sodelujejo pri imunskem odzivu, povezani ali z avtoimunskimi boleznimi (*FCGR2A*) ali pa s *TNF* (*TNFRSF1B* in *TNF*), in ker so študije že nakazale možno povezavo med odzivom na anti-TNF terapijo in temi SNP-ji.

*Tabela 2: Beljakovine in vloge beljakovin, kodiranih v danih genih*

| <b>Ime gena</b> | <b>Kromosom</b> | <b>Beljakovina, ki jo kodira</b>               | <b>Vloga beljakovine</b>  |
|-----------------|-----------------|--|---|
| <i>TNFRSF1B</i> | 1               | TNF-receptor                                   | Tvori heterokompleks, ki vpliva na dve anti-apoptotični beljakovini |
| <i>TNF</i>      | 6               | Provnetni citokin, ki spada v TNF superdružino | Apoptoza, koagulacija, diferenciacija, celična proliferacija        |
| <i>FCGR2A</i>   | 1               | IgG receptor                                   | Pomaga pri fagocitozi in pri čiščenju imunskih kompleksov           |

### **3.1.2. Načrtovanje začetnih oligonukleotidov z orodjem Primer3**

Oligonukleotidi so majhni odseki nukleinskih kislin, ki so narejene v laboratoriju in so v obliki enojne vijačnice. Uporabljajo se za sekvenciranje DNK, za PCR reakcije (verižna reakcija s polimerazo) ter tudi za druge reakcije. V reakcijah kot je PCR, se dvojna vijačnica DNK prekine pri čemer nastaneta dve enojnovrvični DNK verigi, na katere se komplementarno vežejo začetni oligonukleotidi, ki označujejo začetek in konec DNK verige, ki ga želimo pomnožiti. (Lehninger, 1982), (Biosyn.com, 2014).

Primer3 je program, ki omogoča načrtovanje začetnih oligonukleotidov za določene odseke DNK. V program vnesemo sekvenco DNK, ki vsebuje spremembo, ki jo želimo genotipizirati, ter željeno dolžino PCR produkta, program pa na osnovi sekvence oblikuje začetne oligonukleotide. Dobljene začetne oligonukleotide smo nadalje analizirali s programom Oligoanalyzer 3.1, da bi lahko izbrali tiste, ki so primerni. Primerni so tisti, ki ne oblikujejo sekundarnih struktur.

### **3.1.3. Načrtovanje restrikcijskih encimov s programom GeneRunner**

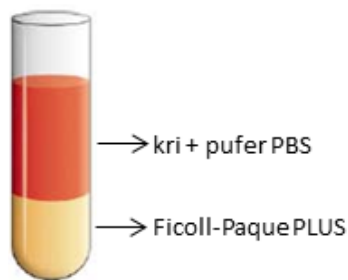
Program GeneRunner nam omogoča določevanje restrikcijskih mest in restrikcijskih encimov. Restrikcijska mesta so pozicije na DNK, kjer so prepoznana mesta za restrikcijske encime in na teh mestih restrikcijski encimi »prerežejo« DNK. Uporabni so za genotipizacijo SNP-jev, saj lahko izberemo takšnega, ki reže v primeru enega alela, medtem ko v primeru drugega alela ne reže. S tem dobimo različne dolžine produktov, ki jih lahko analiziramo z gelsko elektroforezo. V program smo vnesli našo sekvenco DNK in poiskali restrikcijska mesta ter encime za SNP-je, ki smo jih raziskovali.

### 3.1.4. Genotipizacija – PCR in RFLP

Genotipizacijo smo opravljali na predhodno izoliranih DNK molekulah iz vzorcev bolnikov s CD, zdravljenih z anti-TNF terapijo z adalimumabom, ki so bili na voljo v biobanki Centra za humano molekularno genetiko in farmakogenomiko Medicinske fakultete, Univerze v Mariboru. Izolacija DNK je potekala po naslednjem protokolu.

#### Zbiranje limfocitov:

Pri izolaciji limfocitov smo začeli s pripravo vzorca. Kri, ki je bila odvzeta v epruveto z EDTA smo prenesli v novo sterilno centrifugirko ter dodali pufer PBS<sup>24</sup>. Raztopino smo dobro premešali. V novo sterilno centrifugirko smo nalili Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS (GE Healthcare)<sup>25</sup>, na katerega smo previdno in počasi ob steni nalivali celotno suspenzijo krvi in PBS-a. Paziti smo morali, da se raztopina ni pomešala s Ficoll-om, kot prikazuje spodnja slika (Slika 2).

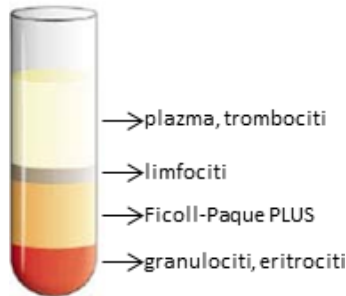


*Slika 2: Mešanica krvi in pufera PBS nanešenega na Ficoll (Avtor, 2018).*

Centrifugirko smo nato centrifugirali. Po centrifugiranju smo dobili vzorec, razdeljen na štiri faze, ki so vidne na sliki (Slika 3): eritrocite, Ficoll, limfocite in krvno plazmo.

<sup>24</sup> PBS – pufer, ki vsebuje dinatrijev hidrogenfosfat, natrijev klorid ter občasno kalijev klorid in kalijev dihidrogenfosfat.

<sup>25</sup> Ficoll – raztopina polisaharida, ki se uporablja za ločevanje krvi.



*Slika 3: Krvni vzorec, ki je po centrifugiranju razdeljen na štiri faze (Avtor, 2018).*

Krvno plazmo smo odstranili, drugo fazo z limfociti pa smo s pipeto prenesli v sterilno centrifugirko, katerim smo nato dodali pufer PBS. Raztopino smo nato centrifugirali. Po koncu centrifugiranja smo supernatant odsesali, limfocitom pa smo dodali PBS, vorteksirali in ponovno centrifugirali. Supernatant smo nato s pomočjo pipete v celoti odsesali in limfocite, ki so ostali, shranili v zmrzovalnik pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do njihove nadaljne uporabe.

#### Izolacija DNK:

DNK smo izolirali s TRI reagentom (Sigma-Alrich), pri čemer smo limfocite najprej lizirali z zaporednim pipetiranjem v TRI reagentu ter dodali kloroform. Po dodatku kloroforma in centrifugiranju, se mešanica loči v 3 faze, vodna faza vsebuje RNK, vmesna faza DNK in organska faza proteine. Vsako od komponent nadalje izoliramo ločeno. Po odstranitvi vodne faze za izolacijo RNK, smo DNK precipitirali iz vmesne in organske faze tako, da smo dodali absolutni etanol. Mikrocentrifugirko smo nato vorteksirali in pustili stati na sobni temperaturi 2 – 3 min. Nato smo mešanico centrifugirali. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in ga shranili pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  za izolacijo proteinov. Pelet DNK smo dvakrat sprali v natrijevem citratu / 10 % etanolu in dobro vorteksirali. Med vsakim spiranjem smo pustili pelet DNK stati z občasnim mešanjem. Sledilo je centrifugiranje. Supernatant smo z odlivanjem zavrgli. Pelet DNK smo sprali v 75 % etanolu in pustili stati 10 – 20 min pri sobni temperaturi. Vzorce smo ponovno centrifugirali in supernatant po koncu centrifugiranja zavrgli. Pelet DNK smo nato posušili na zraku in ga raztopili v vodi. Raztopljeno DNK smo nato shranili na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  v hladilniku.

Genotipizacija naših vzorcev je obsegala tri tehnike in sicer verižno reakcijo s polimerazo (PCR, ang. za polymerase chain reaction), polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP, ang. za restriction fragment length polymorphism) ter gelsko elektroforezo.

PCR je tehnika, kjer s pomočjo encima polimeraze, začetnih oligonukleotidov, prostih nukleotidov (dNTP-jev) in toplotnega ciklizatorja eksponentno podvajamo našo DNK. Sama reakcija poteka v več ciklih, vsak cikel pa ima tri korake. Prvi korak je dvig temperature v PCR aparaturi na okoli 95°C, da se vezi v dvojno vijačni DNK prekinejo, nato se temperatura zniža in na posamezni verigi se vežejo začetni oligonukleotidi. Nato se temperatura spet dvigne na 72°C, pri čemer encim polimeraza poišče mesto, kjer so se na verigo vezali začetni oligonukleotidi, ter prične z izgradnjo komplementarne verige, s tem da dodaja proste nukleotide v smeri 5' – proti – 3'. Ti trije koraki se ponovijo 30 – 40-krat (Garibyan & Avashia, 2014).

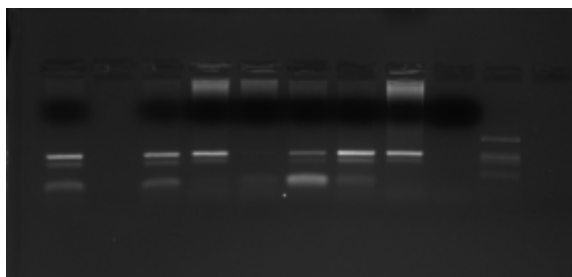
RFLP je tehnika, pri kateri DNK vzorec restrikcijski encimi razrežejo na restrikcijskih mestih. Ker restrikcijski encimi režejo odseke DNA na različnih mestih, in so torej ti restrikcijski fragmenti različno dolgi, jih lahko nato po velikosti ločimo z gelsko elektroforezo (Dai & Long, 2015).

Gelska elektroforeza je tehnika, kjer lahko ločimo posamezne dele makromolekul (DNK, RNK ter proteine) glede na njihovo velikost in naboj (Lee et al. 2012). Za gelsko elektroforezo smo pripravili gel, narejen iz agaroze, pufra TBE<sup>26</sup> ter vode. Koncentracija agaroze v gelu je bila 2 % (1.6 g / 80 mL). Vse to smo dali v erlenmajerico ter v mikrovalovni pečici segrevali, dokler se ni agarosa popolnoma raztopila, in nato dodali še etidijev bromid. Gel smo nato vlili v modele ter vstavili glavničke, ki bodo omogočili nastanek žepkov v gelu, v katere bomo lahko nanесли vzorce. Ko se je gel strdil, smo ga položili v elektroforezno kadičko s TBE pufrom. DNA vzorce smo obarvali z barvilom in nanесли v luknjice na gelu, v eno od lukenj pa smo dodali velikostni standard<sup>27</sup>, ter skozi gel spustili električni tok (~ 120 V). V aparaturi smo gel pustili približno 20 do 30 minut, in ga nato poslikali pod ultravijolično svetlobo (Slika 4).

---

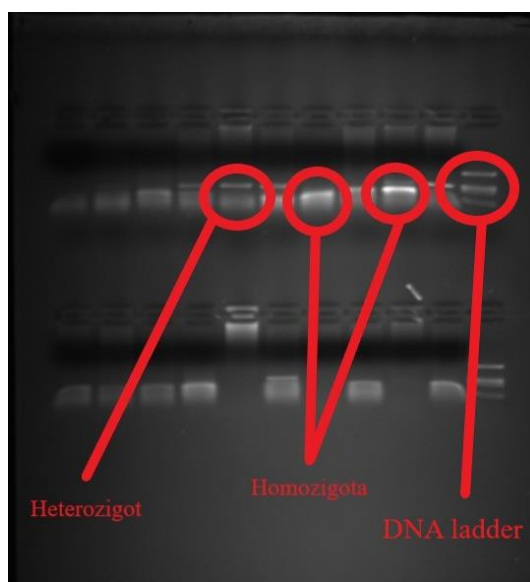
<sup>26</sup> TBE – pufer, ki vsebuje Tris bazo, borovo kislino in EDTA

<sup>27</sup> velikostni standard– skupek fragmentov DNA z znano velikostjo



*Slika 4: Primer gela po PCR reakciji, poslikanega pod UV svetlobo (Avtor, 2018)*

Temu je sledila sama genotipizacija. Iz pridobljenih slik smo lahko glede na velikost produkta nato določili genotip vsakemu vzorcu. Velikost smo določili s pomočjo velikostnega standarda, ki nam je povedal približno velikost nastalega produkta. Divji tip je imel največjo velikost, heterozigot je imel dve različni velikosti, homozigot pa je imel manjšo velikost. Primer genotipizacije je viden na Sliki 5. Genotip vsakega vzorca smo nato zabeležili v tabeli.



*Slika 5: Primer rezultata RFLP, s katerim lahko genotipiziramo vzorce (Avtor, 2018).*

### 3.2. Statistična obdelava podatkov

Podatke smo statistično obdelali s programskim paketom SPSS. S tem programom lahko opravljamo razne statistične analize npr. korelacijske in regresijske metode, opisno statistične metode, in še druge. S SPSS programom smo analizirali rezultate genotipizacije. Za asociacijsko analizo smo uporabili Fisherjev natančni test, ki se uporablja za primerjavo frekvenc in za analizo varianc. Za vsak SNP smo tako dobili p-vrednost, (ki je signifikantna pri  $p < 0,05$ ), intervale zaupanja ( $CI_{95\%}$ ) in razmerje obetov (OR). OR nam pove, kakšen je doprinos SNP-ja za nastanek določene bolezni. Izbrali smo tudi 95% interval zaupanja, za vse signifikantne rezultate pa vzeli tiste, ki so imeli p-vrednost  $< 0,05$ .

## 4. REZULTATI

Odziv pacienta na anti-TNF terapijo se je določal glede na število točk, doseženih po izpolnitvi vprašalnika IBDQ. IBDQ je vprašalnik, ki nam pove, kakšna je kvaliteta življenja pacienta s KVČB. Bolniki so vprašalnik izpolnili pred pričetkom zdravljenja ter 4, 12, 20 in 30 tednov po začetku zdravljenja. Maksimalno število točk, ki jih lahko posameznik doseže pri vprašalniku, je 224 točk. Za potrditev odziva na anti-TNF terapijo, je moralo biti število točk vprašalnika nad 170, ali pa razlika med IBDQ točkami pred začetkom zdravljenja ter po določenem tednu zdravljenja večja od 22 (deltaIBDQ).

### 4.1. Genotipizacija

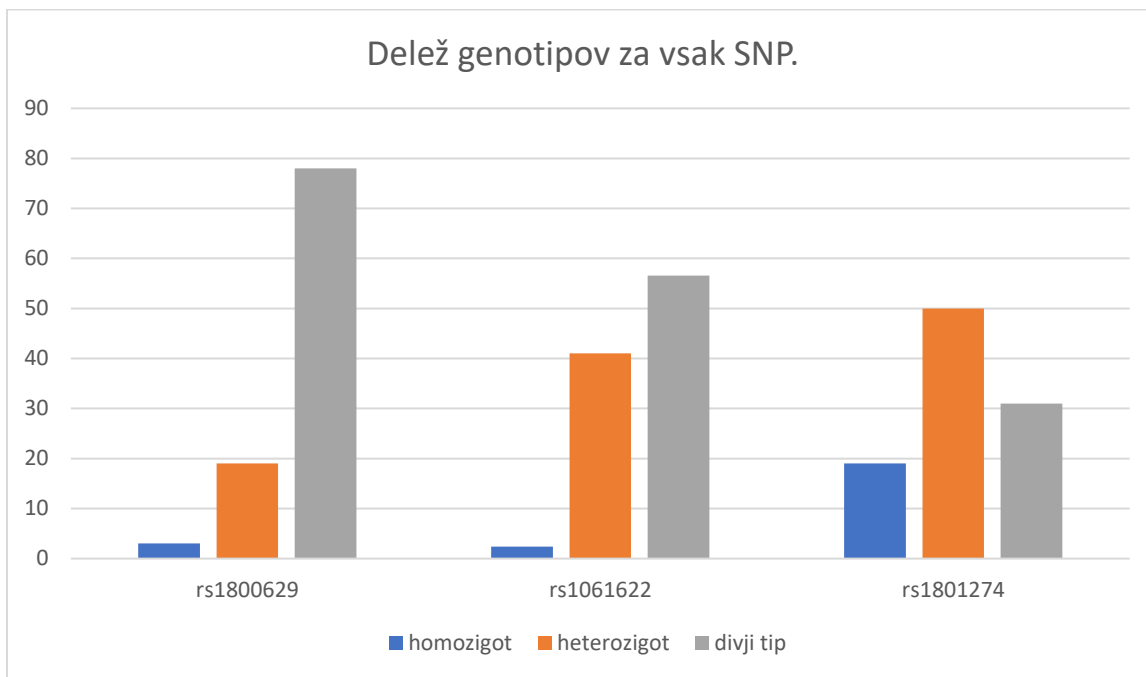
Rezultati genotipizacije so predstavljeni v Tabeli 3 ter Grafu 1.

*Tabela 3: Rezultati genotipizacije po SNP-jih in genotipih.*

| <i>SNP ID</i>    | Število uspešno genotipiziranih posameznikov | Homozigot   | Heterozigot | Divji tip   |
|------------------|--|-------------|-------------|-------------|
| <i>rs1800629</i> | 68   | 2 (2,9 %)   | 13 (19,1 %) | 53 (78 %)   |
| <i>rs1061622</i> | 83   | 2 (2,4 %)   | 34 (41 %)   | 47 (56,6 %) |
| <i>rs1801274</i> | 68   | 13 (19,1 %) | 34 (50 %)   | 21 (30,9 %) |



Graf 1: Delež genotipov za vsak SNP.



#### 4.2. Genotipi SNP-jev, glede na odziv na anti-TNF terapijo

V prvem delu smo naredili analizo glede na odziv na anti-TNF terapijo, ki smo ga določili na podlagi števila točk, doseženih pri IBDQ vprašalniku, ki so ga bolniki izpolnili pred začetkom zdravljenja z anti-TNF terapijo ter 4, 12, 20 in 30 tednov po zdravljenju. Za dober odziv smo smatrali število točk vprašalnika nad 170 v določenem tednu, ali pa razliko med IBDQ točkami pred začetkom zdravljenja ter po določenem tednu zdravljenja, ki je bila večja od 22 (deltaIBDQ).

##### 4.2.1. SNP rs1800629

Skupno je bilo za SNP rs1800629 uspešno genotipiziranih 68 vzorcev, od tega sta imela 2 posameznika genotip AA, 13 jih je imelo genotip AG, 53 pa GG. V Tabeli 4 je prikazano število odzivnikov in neodzivnikov glede na genotip ter statistična analiza, narejena za genotipske modele (reesivni in dominantni model) za SNP rs1800629. Iz tabele je razvidno, da nismo dosegli statistično značilne razlike med genotipom polimorfizma SNP rs1800629 in odzivom na anti-TNF terapijo z adalimumabom, je pa opazna nekoliko višja frekvenca genotipa GG pri neodzivnikih ter genotipa AG pri odzivnikih.

#### **4.2.2. SNP rs1061622**

Skupno je bilo za SNP rs1061622 uspešno genotipiziranih 83 vzorcev, od tega sta 2 imela genotip GG, 34 jih je imelo genotip GT, 53 pa genotip TT. V Tabeli 5 je prikazano število odzivnikov in neodzivnikov glede na genotip ter statistična analiza, narejena za genotipske modele (reesivni in dominantni model) za SNP rs1061622. Tudi za ta SNP nismo dosegli statistično značilne razlike med genotipom polimorfizma in ozivom na zdravljenje, je pa v skupini neodzivnikov opaziti več bolnikov z genotipom GG in GT.

#### **4.2.3. SNP rs1801274**

Skupno je bilo za SNP rs1801274 uspešno genotipiziranih 68 vzorcev, od tega je imelo genotip CC 13 bolnikov, genotip CT 34 bolnikov ter genotip TT 21 bolnikov. V Tabeli 6 je prikazano število odzivnikov in neodzivnikov glede na genotip ter statistična analiza, narejena za genotipske modele (reesivni in dominantni model) za SNP rs1801274. Statističnih značilnih povezav pri tej vrsti analize za analiziran SNP nismo dosegli.

Tabela 4: Število odzivnikov/neodzivnikov glede genotip SNP-ja rs1800629 po tednih ter statistična analiza.

|                |         | odzivniki |              | neodzivniki |              | odzivniki |              | neodzivniki |             | odzivniki |       | neodzivniki |  |
|----------------|---------|-----------|--------------|-------------|--------------|-----------|--------------|-------------|-------------|-----------|-------|-------------|--|
|                |         | 0. teden  | 4. teden     |             | 12. teden    |           | 20. teden    |             | 30. teden   |           |       |             |  |
| SNP            | Genotip | n (%)     | n (%)        | n (%)       | n (%)        | n (%)     | n (%)        | n (%)       | n (%)       | n (%)     | n (%) | n (%)       |  |
| rs1800629      | AA      | 2 (2,9)   | 1 (2,2)      | 1 (4,3)     | 1 (2,2)      | 1 (4,5)   | 1 (2,2)      | 1 (4,5)     | 2 (4,2)     | 0 (0)     |       |             |  |
|                | AG      | 13 (19,1) | 11 (24,5)    | 2 (8,7)     | 10 (21,7)    | 3 (13,6)  | 10 (21,7)    | 3 (13,6)    | 10 (20,8)   | 3 (15)    |       |             |  |
|                | GG      | 53 (78)   | 33 (72,3)    | 20 (87)     | 35 (76,1)    | 18 (81,8) | 35 (76,1)    | 18 (81,8)   | 36 (75)     | 17 (85)   |       |             |  |
| AA+AG proti GG |         | p         | 1,000        |             | 0,546        |           | 0,546        |             | 1,000       |           |       |             |  |
|                |         | OR        | 2,000        |             | 2,143        |           | 2,143        |             | 1,435       |           |       |             |  |
|                |         | 95% CI    | 0,119-33,509 |             | 0,128-35,943 |           | 0,128-35,943 |             | 1,224-1,682 |           |       |             |  |
| AA proti AG+GG |         | p         | 0,235        |             | 0,758        |           | 0,758        |             | 0,525       |           |       |             |  |
|                |         | OR        | 0,413        |             | 0,707        |           | 0,707        |             | 0,529       |           |       |             |  |
|                |         | 95% CI    | 0,104-1,642  |             | 0,197-2,537  |           | 0,197-2,537  |             | 0,132-2,126 |           |       |             |  |

Tabela 5: Število odzivnikov/neodzivnikov glede genotip SNP-ja rs1061622 po tednih ter statistična analiza.

|                |         | odzivniki |              | neodzivniki |             | odzivniki |              | neodzivniki |             | odzivniki |       | neodzivniki |  |
|----------------|---------|-----------|--------------|-------------|-------------|-----------|--------------|-------------|-------------|-----------|-------|-------------|--|
|                |         | 0. teden  | 4. teden     |             | 12. teden   |           | 20. teden    |             | 30. teden   |           |       |             |  |
| SNP            | Genotip | n (%)     | n (%)        | n (%)       | n (%)       | n (%)     | n (%)        | n (%)       | n (%)       | n (%)     | n (%) | n (%)       |  |
| rs1061622      | GG      | 2 (2,4)   | 1 (2)        | 1 (3)       | 2 (3,7)     | 0 (0)     | 1 (1,9)      | 1 (3,3)     | 2 (3,4)     | 0 (0)     |       |             |  |
|                | GT      | 34 (41)   | 19 (38)      | 15 (45,5)   | 19 (35,2)   | 15 (51,7) | 22 (41,5)    | 12 (40)     | 21 (35,6)   | 13 (54,2) |       |             |  |
|                | TT      | 47 (56,6) | 30 (60)      | 17 (51,5)   | 33 (61,1)   | 14 (48,3) | 30 (56,5)    | 17 (56,7)   | 36 (61)     | 11 (45,8) |       |             |  |
| GG+GT proti TT |         | p         | 0,502        |             | 0,353       |           | 1,000        |             | 0,230       |           |       |             |  |
|                |         | OR        | 1,412        |             | 1,684       |           | 0,997        |             | 1,850       |           |       |             |  |
|                |         | 95% CI    | 0,582-3,426  |             | 0,677-4,187 |           | 0,404-2,462  |             | 0,709-4,823 |           |       |             |  |
| GG proti GT+TT |         | p         | 1,000        |             | 0,540       |           | 1,000        |             | 1,000       |           |       |             |  |
|                |         | OR        | 1,531        |             | 1,558       |           | 1,793        |             | 1,421       |           |       |             |  |
|                |         | 95% CI    | 0,092-25,367 |             | 1,324-1,833 |           | 0,108-29,747 |             | 1,234-1,637 |           |       |             |  |

Tabela 6: Število odzivnikov/neodzivnikov glede genotip SNP-ja rs1801274 po tednih ter statistična analiza.

|                |         | odzivniki   |             | neodzivniki |             | odzivniki |             | neodzivniki |             | odzivniki |           | neodzivniki |       |
|----------------|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|-------------|-------|
|                |         | 4. teden    |             |             | 12. teden   |           |             | 20. teden   |             |           | 30. teden |             |       |
| SNP            | Genotip | n (%)       | n (%)       | n (%)       | n (%)       | n (%)     | n (%)       | n (%)       | n (%)       | n (%)     | n (%)     | n (%)       | n (%) |
| rs1801274      | CC      | 13 (19,1 %) | 10 (22,2)   | 3 (13)      | 9 (19,6)    | 4 (18,2)  | 9 (19,6)    | 4 (18,2)    | 10 (20,8)   | 3 (15)    |           |             |       |
|                | CT      | 34 (50 %)   | 23 (51,1)   | 11 (47,8)   | 22 (47,8)   | 12 (54,5) | 22 (47,8)   | 12 (54,5)   | 22 (45,8)   | 12 (60)   |           |             |       |
|                | TT      | 21 (30,9 %) | 12 (26,7)   | 9 (39,1)    | 15 (32,6)   | 6 (27,3)  | 15 (32,6)   | 6 (27,3)    | 16 (33,3)   | 5 (25)    |           |             |       |
| CC proti CT+TT | p       |             | 0,519       |             | 1,000       |           | 1,000       |             | 0,741       |           |           |             |       |
|                | OR      |             | 0,525       |             | 0,914       |           | 0,914       |             | 0,671       |           |           |             |       |
|                | 95% CI  |             | 0,129-2,134 |             | 0,248-3,371 |           | 0,248-3,371 |             | 0,164-2,750 |           |           |             |       |
| CC+CT proti TT | p       |             | 0,406       |             | 0,782       |           | 0,782       |             | 0,575       |           |           |             |       |
|                | OR      |             | 0,566       |             | 1,290       |           | 1,290       |             | 1,500       |           |           |             |       |
|                | 95% CI  |             | 0,195-1,644 |             | 0,420-3,965 |           | 0,420-3,965 |             | 0,462-4,865 |           |           |             |       |

### **4.3. Genotipi glede na IBDQ in delta IBDQ lestvico**

Nadalje smo analizirali povezavo med genotipi izbranih polimorfizmov ter odzivom glede na vrednosti IBDQ in deltaIBDQ kot zvezne spremenljivke. Za to vrsto analize smo kot statistični test uporabili neparametrični Mann-Whitney U test, saj gre za nepravilno razporeditev podatkov in zaradi tega t-test ni mogoč.

#### **4.3.1. SNP rs1800629**

Statistična analiza za SNP rs1800629 glede na IBDQ in deltaIBDQ je prikazana v Tabeli 7. Iz tabele je razvidno, da imajo bolniki z genotipom AG ali GG v začetnih tednih zdravljenja višjo vrednost IBDQ v primerjavi z bolniki z genotipom AA, vendar ta vrednost pri bolnikih z genotipom AA precej naraste v 20. tednu zdravljenja, ko močno naraste tudi deltaIBDQ. Kakorkoli, povezava ni statistično signifikantna, najverjetneje zaradi majhnega števila posameznikov z genotipom AA.

#### **4.3.2. SNP rs1061622**

Statistična analiza za SNP rs1061622 glede na IBDQ in deltaIBDQ je prikazana v Tabeli 8. Iz tabele je razvidno, da imajo bolniki z genotipom GG pred začetkom terapije nižjo IBDQ vrednost, kar nakazuje na hujšo obliko CD, vendar se ta vrednost že po 4. tednih zdravljenja izenači s posamezniki z genotipom GT ali TT. Vrednosti IBDQ kot tudi delta IBDQ nato skozi celotno obdobje 30 tednov ostajajo konstantne ne glede na genotipo.

#### **4.3.3. SNP rs1801274**

Statistična analiza za SNP rs1801274 glede na IBDQ in deltaIBDQ je prikazana v Tabeli 9. Iz tabele je razvidno, da imajo posamezniki z genotipom TT pred začetkom zdravljenja nižjo vrednost IBDQ v primerjavi s posamezniki z genotipom CC ali CT ( $p=0,003$ ). Po 4. in 12. tednih zdravljenja pa se pokaže občutno izboljšanje IBDQ vrednosti pri bolnikih z genotipom TT, saj deltaIBDQ statistično značilno naraste glede na stanje pred začetkom zdravljenja v primerjavi z bolniki z genotipom CC ali CT ( $p=0,05$ ). Za SNP rs1801274 smo tako potrdili statistično značilno povezavo med genotipom in odzivom na anti-TNF terapijo z adalimumabom.

Tabela 7: Vrednosti IBDQ in delta IBDQ glede na genotip po tednih zdravljenja ter statistična analiza za SNP rs1800629.

| <i>rs1800629</i>     |            | IBDQ     | IBDQ     | delta IBDQ | IBDQ      | delta IBDQ | IBDQ      | delta IBDQ | IBDQ      | delta IBDQ |
|----------------------|------------|----------|----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
|                      |            | 0. teden | 4. teden |            | 12. teden |            | 20. teden |            | 30. teden |            |
|                      | AA         | 121      | 148,25   | 27,25      | 136,5     | 15,5       | 182,33    | 61,33      | 182,33    | 61,33      |
|                      | AG         | 152,46   | 178,18   | 25,72      | 169,72    | 17,26      | 174,88    | 22,42      | 169,98    | 17,52      |
|                      | GG         | 154,41   | 172,21   | 17,83      | 176,18    | 21,8       | 176,9     | 22,6       | 176,71    | 22,33      |
| <i>AA + AG vs GG</i> | p-vrednost | 0,412    | 0,610    | 0,290      | 0,510     | 0,673      | 0,970     | 0,728      | 0,647     | 0,882      |
| <i>GG + AG vs AA</i> | p-vrednost | 0,088    | 0,764    | 0,985      | 0,369     | 1,000      | 0,738     | 0,300      | 0,985     | 0,079      |

Tabela 8: Vrednosti IBDQ in delta IBDQ glede na genotip po tednih zdravljenja ter statistična analiza za SNP rs1061622.

| <i>rs1061622</i>      |            | IBDQ     | IBDQ     | delta IBDQ | IBDQ      | delta IBDQ | IBDQ      | delta IBDQ | IBDQ      | delta IBDQ |
|-----------------------|------------|----------|----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
|                       |            | 0. teden | 4. teden |            | 12. teden |            | 20. teden |            | 30. teden |            |
|                       | GG         | 135,5    | 141,5    | 6,00       | 170       | 34,5       | 171       | 35,5       | 173,96    | 38,46      |
|                       | GT         | 152,03   | 168,32   | 16,29      | 168,05    | 16,02      | 174,18    | 22,15      | 171,37    | 19,34      |
|                       | TT         | 151,55   | 169,6    | 18,05      | 175,54    | 23,99      | 174,53    | 22,98      | 176,98    | 25,42      |
| <i>GG+GT proti TT</i> | p-vrednost | 0,829    | 0,639    | 0,538      | 0,276     | 0,256      | 0,751     | 0,649      | 0,232     | 0,220      |
| <i>GG proti GT+TT</i> | p-vrednost | 0,382    | 0,132    | 0,547      | 0,826     | 0,444      | 0,871     | 0,444      | 0,917     | 0,494      |

Tabela 9: Vrednosti IBDQ in delta IBDQ glede na genotip po tednih zdravljenja ter statistična analiza za SNP rs1801274.

| <i>rs1801274</i>     |            | IBDQ         | IBDQ     | delta IBDQ   | IBDQ      | delta IBDQ   | IBDQ      | delta IBDQ | IBDQ      | delta IBDQ |
|----------------------|------------|--------------|----------|--------------|-----------|--------------|-----------|------------|-----------|------------|
|                      |            | 0. teden     | 4. teden |              | 12. teden |              | 20. teden |            | 30. teden |            |
|                      | CC         | 158,08       | 178,58   | 16,5         | 175,24    | 17,17        | 176,74    | 18,67      | 176,25    | 18,18      |
|                      | CT         | 159,53       | 174,64   | 15,11        | 176,15    | 16,62        | 179,13    | 19,72      | 178,43    | 18,9       |
|                      | TT         | 139,38       | 168,23   | 28,85        | 169,02    | 29,64        | 172,67    | 33,29      | 170,58    | 31,2       |
| <i>CC + CT vs TT</i> | p-vrednost | <b>0,003</b> | 0,316    | <b>0,050</b> | 0,146     | <b>0,050</b> | 0,388     | 0,343      | 0,224     | 0,165      |
| <i>TT + CT vs CC</i> | p-vrednost | 0,569        | 0,590    | 0,975        | 0,478     | 0,845        | 0,674     | 0,888      | 0,353     | 0,743      |

## 5. RAZPRAVA

V raziskovalni nalogi smo analizirali povezavo treh izbranih polimorfizmov SNP z odzivom na anti-TNF terapijo z adalimumabom pri slovenskih bolnikih s Crohnovo boleznijo. Analizirali smo SNP rs1061622 v genu *TNFRSF1B*, rs1800629 v genu *TNF* in rs1801274 v genu *FCGR2A*. Statistično najznačilnejšo povezavo smo ugotovili za SNP rs1801274 v genu *FCGR2A*, za katerega so bolniki z genotipom TT pokazali boljši odziv na terapijo z adalimumabom v primerjavi z bolniki z genotipom CC ali CT.

### 5.1. SNP rs1800629

Za SNP rs1800629 smo uspešno genotipizirali 68 vzorcev. Ker je frekvenca genotipa AA za izbran polimorfizem zelo majhna, smo v naši skupini našli le dva bolnika (2,95%) s tem genotipom. Bolnikov z genotipom AG je bilo 13 (19,1%), z genotipom GG pa 53 (77,95%). Frekvence dobljenih genotipov so primerljive z evropsko populacijo.

Za ta SNP nismo dokazali statistično značilne povezave med različnimi genotipi in odzivom na terapijo, kar se razlikuje od drugih raziskav, ki nakazujejo na večjo odzivnost heterozigotov na terapijo. V študiji Netz et al. so odkrili, da ima heterozigotni genotip 4 krat večjo odzivnost kot divji tip (Netz et al. 2017). V naši študiji smo nakazali na nekoli slabši odziv bolnikov z genotipom GG v primerjavi z bolniki z genotipom AG, kar je primerljivo z omenjeno študijo.

### 5.2. SNP rs1061622

Za SNP rs1061622 smo uspešno genotipizirali 83 vzorcev. Frekvenca za genotip GG je bila tudi tukaj zelo majhna, zato smo imeli v naši skupini le dva bolnika (2,4 %) s tem genotipom. Bolnikov z genotipom GT je bilo 34 (41 %), bolnikov z genotipom TT pa 47 (56,6 %). Te frekvence so prav tako primerljive z evropsko populacijo.

Tudi za ta SNP nismo dobili statistično značilne povezave, kar se tiče odziva na anti-TNF terapijo. Študija Gonzalez et al. nakazuje, da bi naj nosilci alela G imeli večjo možnost za neodziv na terapijo. (Gonzalez et al., 2015). V naši študiji smo zasledili trend, da je pa skupini neodzivnikov opaziti več bolnikov z genotipom GG in GT, kar j skladno z dosedanjimi opažanji. Smo pa prav tako opazili, da imajo bolniki z genotipom GG težjo obliko CD, saj so imeli precej nižjo vrednost IBDQ pred začetkom zdravljenja.

### 5.3.SNP rs1801274

Pri SNP-ju rs1801274 smo genotipizirali 68 vzorcev. 13 (19,1 %) od teh je imelo genotip CC, 34 (50 %) jih je imelo genotip CT, 21 (30,9 %) pa genotip TT.

TT je imel povprečno začetno vrednost IBDQ 139,38. Ta je narastla v četrtem tednu na 168,23 (delta IBDQ = 28,85). To je bil prvi signifikanten podatek, ki je nakazoval na močnejši odziv na terapijo ( $p = 0,05$ ). V dvanajstem tednu je narastla vrednost IBDQ na 169,02 (delta IBDQ = 29,64,  $p=0,05$ ). Te vrednosti nakazujejo na boljši odziv posameznikov z genotipom TT na terapijo z anti-TNF terapijo z adalimumabom po 4. in 12. tednih zdravljenja. Do podobnih zaključkov so prišli Avila – Pedretti et al, ki so pa takšno študijo izvajali na pacientih z revmatoidnih artritisa (Avila – Pedretti et al. 2015).

## 6. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Inštitucije, kot sta Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo in Medicinska fakulteta imata velik vpliv na družbo, saj se v svojem izobraževalnem in raziskovalnem delu dotikata pomembnih družbenih problemov ter jih poskušata reševati na družbeno-odgovoren način. S tem pristopom poskušata lajšati probleme današnjega modernega sveta, kar je seveda velik interes nam, kot prebivalcem tega sveta. Pri svojem delu se prav tako zavedajo vpliva na okolje, zato je pomembno, da ravnajo okolju prijazno ter z vsemi ekološkimi standardi.

Pri nalogi smo se specifično dotaknili medicinskega področja, natančneje personalizirane medicine, ki v prihodnosti omogoča drugačen pristop do zdravljenja bolnikov, ki trpijo za Crohnovo bolezen. Izsledki raziskav pripomorejo k razvoju kvalitetnih in klinično uporabnih diagnostičnih bioznačevalcev, kar posledično predstavlja boljšo kakovost življenja bolnikov, preprečevanje hudih poslabšanj bolezni, zmanjša izostanek iz šole oz. z dela ter zmanjša stroške zdravljenja. Dobra stran genetskih raziskav oz. učinkovitih genetskih biomarkerjev je v tem, da na bolnika ne vplivajo oz. do njega niso invazivni, ter lahko zmanjšajo uporabo invazivnih preiskav, kot so kolonoskopije. Klinično najbolj uporabni bi bili bioiznačevalci, ki bi zanesljivo napovedali posameznike s težjim potekom bolezni ter pri tej skupini tiste posameznike, ki ne bi imeli pozitivnega odgovora na zdravljenje z anti-TNF terapijo.



## 7. ZAKLJUČEK

Namen naše raziskovalne naloge je bil ugotoviti povezavo med tremi izbranimi SNP-ji ter odzivnostjo bolnikov na anti-TNF terapijo. To povezavo smo testirali z genotipizacijo izbranih polimorfizmov s tehniko PCR-RFLP ter z uporabo vprašalnika IBDQ.

Ugotovili smo, da imajo bolniki z genotipom TT SNP-ja rs1801274 boljši odziv na terapijo v četrtem in dvanajstem tednu po začetku zdravljenja. Takšni bioznačevalci pomembno prispevajo k razvoju personalizirane medicine, katere cilj je v prihodnosti prilagoditi terapijo na posameznikov genotipov, ter s tem močno izboljšati kvaliteto življenja bolnikov s Crohnovo boleznijo, kot tudi bolnikov s sorodnimi boleznimi.

Naši rezultati se razlikujejo od rezultatov nekaterih drugih raziskovalcev, ki so ugotovili povezavo med vplivom SNP-ja rs1800169 ter SNP-ja rs1061622. Mi te povezave nismo odkrili, kar je najverjetneje posledica majhnega števila vzorcev in posledično posameznih genotipov, ki so v populaciji redkeje zastopani.

## 8. VIRI IN LITERATURA

Agabegi, S. S., & Agabegi, E. D. (2008). *Step-up to medicine*. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins.

Alliance, G., & Screening Services, T. N. Y.-M.-A. C. for G. and N. (2009). *Understanding Genetics. Understanding Genetics: A New York, Mid-Atlantic Guide for Patients and Health Professionals*. Genetic Alliance. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23304754>

Amgen, MGH, Broad form IBD Therapeutics Initiative. (n.d.). *Gen. Eng. Biotechnol. News*, 34(4), 14.

Andersen, V., Olsen, A., Carbonnel, F., Tjønneland, A., & Vogel, U. (2012). Diet and risk of inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease*, 44(3), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2011.10.001>

Aroniadis, O., & Brandt, L. (2013). Fecal microbiota transplantation: past, present and future. *Current Opinion in Gastroenterology*, 29(1), 79–84. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32835a4b3e>

Baumgart, D., & Carding, S. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*, 369(9573), 1627–1640. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60750-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60750-8)

- Baumgart, D., & Sandborn, W. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*, *369*(9573), 1641–1657. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60751-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60751-X)
- Bennett, C., Condon, T., Grimm, S., Chan, H., & Chiang, M. (1994). Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides. *Journal of Immunology*, *152*(7), 3530–3540.
- Bennike, T., Birkelund, S., Stensballe, A., & Andersen, V. (2014). Biomarkers in inflammatory bowel diseases: current status and proteomics identification strategies. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(12), 3231–3244. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i12.3231>
- Boyapati, R., Satsangi, J., & Tzer Ho, G. (2015). Pathogenesis of Crohn's disease. *F1000Prime Reports*, *7*. <https://doi.org/10.12703/P7-44>
- Broomé, U., & Bergquist, A. (2006). Primary sclerosing cholangitis, inflammatory bowel disease, and colon cancer. *Seminars in Liver Disease*, *26*(1), 31–41. <https://doi.org/10.1055/s-2006-933561>
- Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., & Lakatos, P. (2013). The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *Journal of Crohn's & Colitis*, *7*(4), 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.01.010>
- Cario, E. (2010). Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflammatory Bowel Diseases*, *16*(9), 1583–1597. <https://doi.org/10.1002/ibd.21282>
- Charlebois, A., Rosenfeld, G., & Bressler, B. (2016). The Impact of Dietary Interventions on the Symptoms of Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(8), 1370–1378. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.760515>
- Colman, R., & Rubin, D. (2014). Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Crohn's & Colitis*, *8*(12), 1569–1581. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2014.08.006>
- Coskun, M. (2014). Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Frontiers in Medicine*, *1*, 24. <https://doi.org/10.3389/fmed.2014.00024>
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., & Cortot, A. (2011). Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, *140*(6), 1785–1794.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.055>
- Crespi, B. J. (2010). The origins and evolution of genetic disease risk in modern humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1206*(1), 80–109. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05707.x>

- Crohn's & Colitis Foundation of America*. (n.d.). Retrieved from <http://www.ccfa.org>
- crohnsandcolitis.org. (2013). Crohn's Disease | Crohn's & Colitis UK. Retrieved December 18, 2018, from <https://www.crohnsandcolitis.org.uk/about-inflammatory-bowel-disease/crohns-disease>
- D'Haens, G., Panaccione, R., Higgins, P., Vermeire, S., Gassull, M., Chowers, Y., ... Travis, S. (2011). The London Position Statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD with the European Crohn's and Colitis Organization: when to start, when to stop, which drug to choose, and how to predict response? *The American Journal of Gastroenterology*, *106*(2), 199–212, quiz 213. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.392>
- Dave, M., Mehta, K., Luther, J., Baruah, A., Dietz, A., & Faubion, W. (2015). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *21*(11), 2696–2707. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000543>
- Deventer, S. van, Wedel, M., Baker, B., Xia, S., Chuang, E., & Miner, P. (2006). A phase II dose ranging, double-blind, placebo-controlled study of alicaforsen enema in subjects with acute exacerbation of mild to moderate left-sided ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *23*(10), 1415–1425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02910.x>
- Dotan, I., & Rachmilewitz, D. (2005). Probiotics in inflammatory bowel disease: possible mechanisms of action. *Current Opinion in Gastroenterology*, *21*(4), 426–430.
- Društvo za kronično vnetno črevesno bolezen. (2005). O KVČB (društvo kvcb). Retrieved December 18, 2018, from <http://www.kvcb.si/index.php/o-drustvu/o-kvcb>
- Durkschein, F., Petritsch, W., & Hammer, H. (2016). Diet therapy for inflammatory bowel diseases: The established and the new. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(7), 2179–2194. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i7.2179>
- Easy Fisher Exact Test Calculator. (n.d.). Retrieved February 5, 2019, from <https://www.socscistatistics.com/tests/fisher/default2.aspx>
- Ellinghaus, D., Bethune, J., Petersen, B.-S., & Franke, A. (2015). The genetics of Crohn's disease and ulcerative colitis – *status quo* and beyond. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *50*(1), 13–23. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.990507>
- Elson, C., Cong, Y., Weaver, C., Schoeb, T., McClanahan, T., Fick, R., & Kastelein, R. (2007). Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology*, *132*(7), 2359–2370. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.104>
- Encyclopaedia Britannica*. (2018). Retrieved from <https://www.britannica.com/science/single-nucleotide-polymorphism>

- Fakhoury, M., Negrulj, R., Mooranian, A., & Al-Salami, H. (2014). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *Journal of Inflammation Research*, 7, 113–120. <https://doi.org/10.2147/JIR.S65979>
- Feller, M., Huwiler, K., Schoepfer, A., Shang, A., Furrer, H., & Egger, M. (2010). Long-term antibiotic treatment for Crohn's disease: systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clinical Infectious Diseases*, 50(4), 473–480. <https://doi.org/10.1086/649923>
- Feuerstein, J. D., & Cheifetz, A. S. (2017). Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clinic Proceedings*, 92(7), 1088–1103. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.04.010>
- Fransen, K., Mitrovic, M., van Diemen, C. C., & Weersma, R. K. (2011). The quest for genetic risk factors for Crohn's disease in the post-GWAS era. *Genome Medicine*, 3(2), 13. <https://doi.org/10.1186/gm227>
- Gajendran, M., Loganathan, P., Catinella, A. P., & Hashash, J. G. (2018). A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-Month*, 64(2), 20–57. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2017.07.001>
- Gandhi, S., Narula, N., Marshall, J., & Farkouh, M. (2012). Are patients with inflammatory bowel disease at increased risk of coronary artery disease? *The American Journal of Medicine*, 125(10), 956–962. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2012.03.015>
- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, G. 2015 D. and I. I. and P. (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)*, 388(10053), 1545–1602. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31678-6)
- GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)*, 388(10053), 1459–1544. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31012-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31012-1)
- Genetic Alliance., & New York-Mid-Atlantic Consortium for Genetic and Newborn Screening Services. (2009). *Understanding genetics : a New York, Mid-Atlantic guide for patients and health professionals*. Genetic Alliance.
- genome.gov. (2015). FAQ About Genetic Disorders - National Human Genome Research Institute (NHGRI). Retrieved December 20, 2018, from <https://www.genome.gov/19016930/faq-about-genetic-disorders/>

- genome.gov. (2018). FAQ About Genetics, Disease Prevention and Treatment - National Human Genome Research Institute (NHGRI). Retrieved December 20, 2018, from <https://www.genome.gov/19016938/faq-about-genetics-disease-prevention-and-treatment/>
- genome.gov. (2018). Specific Genetic Disorders - National Human Genome Research Institute (NHGRI). Retrieved December 20, 2018, from <https://www.genome.gov/10001204/specific-genetic-disorders/>
- Ghouri, Y., Richards, D., Rahimi, E., Krill, J., Jelinek, K., & DuPont, A. (2014). Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 7, 473–487. <https://doi.org/10.2147/CEG.S27530>
- Gilardi, D., Fiorino, G., Genua, M., Allocca, M., & Danese, S. (2014). Complementary and alternative medicine in inflammatory bowel diseases: what is the future in the field of herbal medicine? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 8(7), 835–846. <https://doi.org/10.1586/17474124.2014.917954>
- Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. (2015). *Lancet*, 385(9963), 117–171. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61682-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61682-2)
- González-Lara, L., Batalla, A., Coto, E., Gómez, J., Eiris, N., Santos-Juanes, J., ... Coto-Segura, P. (2015). The TNFRSF1B rs1061622 polymorphism (p.M196R) is associated with biological drug outcome in Psoriasis patients. *Archives of Dermatological Research*, 307(5), 405–412. <https://doi.org/10.1007/s00403-014-1533-z>
- Gracie, D., Williams, C., Sood, R., Mumtaz, S., Bholah, M., Hamlin, P., & Ford, A. (2017). Negative Effects on Psychological Health and Quality of Life of Genuine Irritable Bowel Syndrome-type Symptoms in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 15(3), 376–384.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.05.012>
- Greenstein, A., Janowitz, H., & Sachar, D. (1976). The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: a study of 700 patients. *Medicine (Baltimore)*, 55(5), 401–412. <https://doi.org/10.1097/00005792-197609000-00004>
- Guindi, M., & Riddell, R. (2004). Indeterminate colitis. *Journal of Clinical Pathology*, 57(12), 1233–1244. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.015214>
- Ha, F., & Khalil, H. (2015). Crohn's disease: a clinical update. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 8(6), 352–359. <https://doi.org/10.1177/1756283X15592585>
- Halpin, S., & Ford, A. (2012). Prevalence of symptoms meeting criteria for irritable bowel syndrome in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *The*

- American Journal of Gastroenterology*, 107(10), 1474–1482.  
<https://doi.org/10.1038/ajg.2012.260>
- Hanauer, S., & Sandborn, W. (2001). Management of Crohn's disease in adults. *American Journal of Gastroenterology*, 96(3), 635–643. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03671.x>
- Henderson, P., Anderson, N., & Wilson, D. (2014). The diagnostic accuracy of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 109(5), 637–645. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.131>
- Ho, F., & Khalil, H. (2015). Crohn's disease: A clinical update. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1177/1756283X15592585>
- IBD Facts*. (n.d.). Retrieved from <http://thegreatbowelmovement.org/awareness-tools/ibd-facts/>
- Inflammatory Bowel Disease*. (2015). World Gastroenterology Organization. Retrieved from <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/inflammatory-bowel-disease-english-2015.pdf>
- Jantchou, P., Monnet, E., & Carbonnel, F. (n.d.). [Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis (excluding tobacco and appendectomy)]. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 30(6–7), 859–867. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16885870>
- Jantchou, P., Morois, S., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M., & Carbonnel, F. (2010). Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study. *The American Journal of Gastroenterology*, 105(10), 2195–2201. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.192>
- Jones, S., Banks, R., Haidar, A., Gearing, A., Hemingway, I., Ibbotson, S., ... Axon, A. (1995). Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gut*, 36(5), 724–730. <https://doi.org/10.1136/gut.36.5.724>
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, D. P., Hui, K. Y., ... Whittaker, P. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491(7422), 119–124. <https://doi.org/10.1038/nature11582>
- Karimuddin, A., & Gilles, G. (n.d.). Surgery for Abdominal/Intestinal Crohn's Disease. *Trusted Therapies*. Retrieved from <https://trustedtherapies.com/articles/64-surgery-for-abdominal-intestinal-crohn-s-disease>
- Kornbluth, A., & Sachar, D. (2004). Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *American Journal of Gastroenterology*, 99(7), 1371–1385. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.40036.x>

- Kotanko, P., Carter, M., & Levin, N. (2006). Intestinal bacterial microflora--a potential source of chronic inflammation in patients with chronic kidney disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 21(8), 2057–2060. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl281>
- Langhorst, J., Wulfert, H., Lauche, R., Klose, P., Cramer, H., Dobos, G., & Korzenik, J. (2015). Systematic review of complementary and alternative medicine treatments in inflammatory bowel diseases. *Journal of Crohn's & Colitis*, 9(1), 86–106. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jju007>
- Limketkai, B., Sepulveda, R., Hing, T., Shah, N., Choe, M., Limsui, D., & Shah, S. (2018). Prevalence and factors associated with gluten sensitivity in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 53(2), 147–151. <https://doi.org/10.1080/00365521.2017.1409364>
- Liu, J. Z., & Anderson, C. A. (2014). Genetic studies of Crohn's disease: Past, present and future. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 28(3), 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2014.04.009>
- Liu, S., Ren, J., Hong, Z., Yan, D., Gu, G., Han, G., ... Li, J. (2013). Efficacy of erythropoietin combined with enteral nutrition for the treatment of anemia in Crohn's disease: a prospective cohort study. *Nutrition in Clinical Practice*, 28(1), 120–127. <https://doi.org/10.1177/0884533612462744>
- Liu, S., Ren, J., Zhao, Y., Han, G., Hong, Z., Yan, D., ... Li, J. (2013). Nonthyroidal illness syndrome: is it far away from Crohn's disease? *Journal of Clinical Gastroenterology*, 47(2), 153–159. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e318254ea8a>
- Liu, T., & Stappenbeck, T. (2016). Genetics and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of Pathology*, 11, 127–148. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044152>
- Lopetuso, L., Napoli, M., Rizzatti, G., & Gasbarrini, A. (2018). The intriguing role of Rifaximin in gut barrier chronic inflammation and in the treatment of Crohn's disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 27(6), 543–551. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1483333>
- Lu, D., Ji, X., Liu, X., Li, H., & Zhang, C. (2014). Pulmonary manifestations of Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(1), 133–141. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.133>
- Mahadeva, U., Martin, J., Patel, N., & Price, A. (2002). Granulomatous ulcerative colitis: a reappraisal of the mucosal granuloma in the distinction of Crohn's disease from ulcerative colitis. *Histopathology*, 41(1), 50–55. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01416.x>
- Maloy, K., & Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature10208>

- Molodecky, N. A., & Kaplan, G. G. (2010). Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology & Hepatology*, 6(5), 339–346. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567592>
- Monaco, C., Nanchahal, J., Taylor, P., & Feldmann, M. (2015). Anti-TNF therapy: past, present and future. *International Immunology*, 27(1), 55–62. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu102>
- Mowat, C., Cole, A., Windsor, A., Ahmad, T., Arnott, I., Driscoll, R., ... Bloom, S. (2011). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 60(5), 571–607. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.224154>
- Mukhopadhyaya, I., Hansen, R., El-Omar, E., & Hold, G. (2012). IBD-what role do Proteobacteria play? *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 9(4), 219–230. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.14>
- NA, S. (2002). Granulomas in the diagnosis of intestinal Crohn's disease: a myth exploded? *Histopathology*, 41(2), 166–168. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01441.x>
- National Library of Medicine - National Institutes of Health. (n.d.). Retrieved from <https://www.nlm.nih.gov/>
- Netz, U., Carter, J. V., Eichenberger, M. R., Dryden, G. W., Pan, J., Rai, S. N., & Galandiuk, S. (2017). Genetic polymorphisms predict response to anti-tumor necrosis factor treatment in Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, 23(27), 4958–4967. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i27.4958>
- Nguyen, G. C., Loftus, E. V., Hirano, I., Falck-Ytter, Y., Singh, S., Sultan, S., ... Yang, Y.-X. (2017). American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Management of Crohn's Disease After Surgical Resection. *Gastroenterology*, 152(1), 271–275. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.038>
- NHS. (2017). Inflammatory bowel disease - NHS. Retrieved December 18, 2018, from <https://www.nhs.uk/conditions/inflammatory-bowel-disease/>
- NM\_000594.3(TNF):c.-488G>A Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI. (n.d.). Retrieved February 7, 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/225964/>
- NM\_021642.3(FCGR2A):c.497A>G (p.His166Arg) Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI. (n.d.). Retrieved February 7, 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/14823/>
- Pagani, A., Nai, A., Corna, G., Bosurgi, L., Rovere-Querini, P., Camaschella, C., & Silvestri, L. (2011). Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. *Blood*, 118(3), 736–746. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-337212>



- Pinto, R. Del, Pietropaoli, D., Chandar, A., Ferri, C., & Cominelli, F. (2015). Association Between Inflammatory Bowel Disease and Vitamin D Deficiency: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(11), 2708–2717. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000546>
- Polymerase Chain Reaction (PCR). (n.d.). Retrieved January 30, 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
- Pouchitis: Treatment at Mayo Clinic. (2015). *Mayo Clinic*. Retrieved from <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/pouchitis/care-at-mayo-clinic/treatment/con-20036404>
- Prantera, C., & Scribano, M. (2009). Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease: why, when, and how. *Current Opinion in Gastroenterology*, 25(4), 329–333. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32832b20bf>
- PubMed. (n.d.). Retrieved from <https://www.nlm.nih.gov/bsd/pubmed.html>
- Ramirez, S., Haskó, J., Skuba, A., Fan, S., Dykstra, H., McCormick, R., ... Persidsky, Y. (2012). Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *The Journal of Neuroscience*, 32(12), 4004–4016. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4628-11.2012>
- Rani, R. A., Raja Ali, R., & Lee, Y. (2016). Irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease overlap syndrome: pieces of the puzzle are falling into place. *Intestinal Research*, 14(4), 297–304. <https://doi.org/10.5217/ir.2016.14.4.297>
- Rashvand, S., Behrooz, M., Samsamikor, M., Jacobson, K., & Hekmatdoost, A. (2018). Dietary patterns and risk of ulcerative colitis: a case-control study. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 31(3), 408–412. <https://doi.org/10.1111/jhn.12544>
- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). (n.d.). Retrieved January 30, 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>
- Roifman, I., Sun, Y., Fedwick, J., Panaccione, R., Buret, A., Liu, H., ... Beck, P. (2009). Evidence of endothelial dysfunction in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7(2), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.10.021>
- Sales-Campos, H., Basso, P. J., Alves, V. B. F., Fonseca, M. T. C., Bonfá, G., Nardini, V., & Cardoso, C. R. B. (2015). Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 48(2), 96–107. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143774>

- Salgado, V. C. L., Luiz, R. R., Boechat, N., Schorr, B. C., Leão, I. S., Nunes, T., & Zaltman, C. (2017). Crohn's disease environmental factors in the developing world: A case-control study in a statewide catchment area in Brazil. *World Journal of Gastroenterology*, *23*(30), 5549–5556. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i30.5549>
- Sartor, R. (2016). Review article: the potential mechanisms of action of rifaximin in the management of inflammatory bowel diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, *43 Suppl 1*, 27–36. <https://doi.org/10.1111/apt.13436>
- Scheinfeld, N. (2005). Adalimumab: a review of side effects. *Expert Opinion on Drug Safety*, *4*(4), 637–641. <https://doi.org/10.1517/14740338.4.4.637>
- Scribano, M. (2015). Role of Rifaximin in Inflammatory Bowel Disease Treatment. *Mini Rev Med Chem*, *16*(3), 225–229.
- Shastri, B. S. (2009). SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype (pp. 3–22). Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_1)
- Stein, J., Hartmann, F., & Dignass, A. (2010). Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *7*(11), 599–610. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.151>
- Stein, M. M., Hrusch, C. L., Sperling, A. I., & Ober, C. (2018). Effects of an FcγRIIA polymorphism on leukocyte gene expression and cytokine responses to anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. *Genes & Immunity*, *1*. <https://doi.org/10.1038/s41435-018-0038-8>
- Summers, R., Elliott, D., Qadir, K., Urban, J., Thompson, R., & Weinstock, J. (2003). Trichuris suis seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology*, *98*(9), 2034–2041. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2003.07660.x>
- Terdiman, J. P., Gruss, C. B., Heidelbaugh, J. J., Sultan, S., & Falck-Ytter, Y. T. (2013). American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Use of Thiopurines, Methotrexate, and Anti-TNF-α Biologic Drugs for the Induction and Maintenance of Remission in Inflammatory Crohn's Disease. *Gastroenterology*, *145*(6), 1459–1463. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.047>
- Thomas, S., & Baumgart, D. (2012). Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology*, *20*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s10787-011-0104-6>
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet*, *389*(10080), 1741–1755. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
- Twyman, R. M. (2009). Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis. *Encyclopedia of Neuroscience*, 871–875. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00866-4>

- UCLA. (2012). Ulcerative Colitis vs Crohn's Disease - UCLA Center for Inflammatory Bowel Diseases - Los Angeles, CA. Retrieved December 18, 2018, from <https://www.uclahealth.org/gastro/ibd/ulcerative-colitis-vs-crohns-disease>
- Vaos, G., Kostakis, I., Zavras, N., & Chatzemichael, A. (2013). The role of calprotectin in pediatric disease. *BioMed Research International*, 2013, 542363. <https://doi.org/10.1155/2013/542363>
- Wang, G., Ren, J., Liu, S., Chen, J., Gu, G., Wang, X., ... Li, J. (2012). Clinical characteristics of non-perianal fistulating Crohn's disease in China: a single-center experience of 184 cases. *Chinese Medical Journal*, 125(14), 2405–2410.
- Wang, M.-H., & Picco, M. F. (2017). Crohn's Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 46(3), 449–461. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2017.05.002>
- Warner, J. (2011). Inflammatory Bowel Disease Health Center. *WebMD*. Retrieved from <http://www.webmd.com/ibd-crohns-disease/news/20110221/inflammatory-bowel-disease-raises-clot-risk>
- Waugh, N., Cummins, E., Royle, P., Kandala, N., Shyangdan, D., Arasaradnam, R., ... Johnston, R. (2013). Faecal calprotectin testing for differentiating amongst inflammatory and non-inflammatory bowel diseases: systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*, 17(55), xv–xix, 1-211. <https://doi.org/10.3310/hta17550>
- Wong, J. J., Sceats, L., Dehghan, M., Wren, A. A., Sellers, Z. M., Limketkai, B. N., ... Park, K. T. (2018). Depression and Health Care Use in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy145>
- Wright, K., Rooney, N., Feeney, M., Tate, J., Robertson, D., Welham, M., & Ward, S. (2005). Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology*, 129(2), 437–453. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.026>
- Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427–434. <https://doi.org/10.1038/nature06005>
- Yamazaki K., McGovern D., Ragoussis J., Paolucci M., ... Nakamura Y. (2005). Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum Mol Genet.* 2005 Nov 15;14(22), 3499-506.
- Zhao, X., Liang, P., Liu, J., Jiang, H., Fan, X., Chen, G., & Zhou, C. (2017). Elevation of arachidonylethanolamide levels by activation of the endocannabinoid system protects against colitis and ameliorates remote organ lesions in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(6), 5664–5670. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5222>