



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

Doktorska disertacija

**Biološki procesi in napovedovanje neodzivnosti na
zaviralce dejavnika tumorske nekroze pri Crohnovi
bolezni z integracijo genomskih podatkov**

Januar, 2021

Gregor Jezernik



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

Doktorska disertacija

**Biološki procesi in napovedovanje neodzivnosti na
zaviralce dejavnika tumorske nekroze pri Crohnovi
bolezni z integracijo genomskih podatkov**

Gregor Jezernik

Mentor: red. prof. Uroš Potočnik

Somentor: red. prof. Pavel Skok

UDK: 616.3-002.2:577.1/.2 (043.3)

Januar, 2021

POVZETEK

Biološki procesi in napovedovanje neodzivnosti na zaviralce dejavnika tumorske nekroze pri Crohnovi bolezni z integracijo genomskih podatkov

Razvoj bioloških zdravil je pomembno prispeval k možnostim zdravljenja raka in imunsko pogojenih bolezni. Med najpogosteje uporabljenimi biološkimi zdravili so zaviralci dejavnika tumorske nekroze (TNF). Crohnova bolezen je pogosta imunsko pogojena bolezen prebavil, ki se zdravi z zaviralci TNF. Kljub tarčnemu delovanju zaviralcev TNF del bolnikov s Crohnovo boleznijo žal ne doseže dobrega odziva na zaviralce TNF že ob uvedbi terapije ali pa sprva dober odziv na zaviralce TNF s časom izzveni. Neodzivnost na zaviralce TNF predstavlja pomeni izgubo nadzora nad pogosto hudim bolezenskim stanjem bolnika s Crohnovo boleznijo, ki je po nepotrebnem izpostavljen potencialno hudim neželenim stranskim učinkom bioloških zdravil, in tudi precejšnje finančno breme za zdravstveno blagajno. Ti razlogi utemeljujejo potrebo po napovedovanju odziva na biološka zdravila, po možnosti še pred uvedbo zdravljenja.

V doktorski disertaciji smo celostno raziskali biološke označevalce odziva na zaviralce dejavnika tumorske nekroze na ravni DNA in RNA ter maščobnih kislin v vzorcih periferne venske krvi skupine slovenskih bolnikov s Crohnovo boleznijo, ki se je zdravila z adalimumabom. Rezultate teh analiz smo uporabili za oblikovanje novih napovednih modelov s pristopi strojnega učenja, t.i. metode podpornih vektorjev. Za namene iskanja vzročnih bioloških procesov, ki pogojujejo neodzivnost na zaviralce dejavnika tumorske nekroze, smo sistematsko preučili gensko ontologijo že objavljenih bioloških označevalcev odziva na zaviralce dejavnika tumorske nekroze v kronični vnetni črevesni bolezni. Za primerjalno analizo genske ontologije smo zbrali tudi biološke označevalce odziva v revmatoidnem artritisu. Ker je neodzivnost pogostejša med pediatričnimi bolniki, smo analizo genske ontologije razširili še na vzročne gene pediatričnih dednih oblik kronične vnetne črevesne bolezni in sindrome s klinično sliko, skladno s kronično vnetno črevesno boleznijo. Dodatno smo tudi poskusili ponoviti že objavljen napovedni model odziva na infliksimab, ki temelji na izražanju petih genov v črevesni sluznici.

Rezultati genske ontologije že objavljenih označevalcev kažejo na povezavo med krvnimi lipoproteini in odzivom na zaviralce dejavnika tumorske nekroze pri kronični vnetni črevesni

bolezni, kot tudi pri revmatoidnem artritisu. Na osnovi rezultatov genske ontologije pediatričnih dednih oblik kronične vnetne črevesne bolezni lahko sklepamo, da so zelo zgodnje pediatrične oblike z nastopom bolezni pred šestim letom starosti ločena genetska entiteta in je neodzivnost pogojena z drugimi procesi, npr. s primarno imunsko pomanjkljivostjo.

Analiza bioloških podatkov na ravni DNA in RNA ter maščobnih kislin ni pokazala biološkega označevalca, ki bi dosegel statistično značilnost, kar odraža tudi analiza napovedne moči s pristopi strojnega učenja. Profili maščobnih kislin nimajo napovedne moči za določevanje odziva na zaviralce dejavnika tumorske nekroze, genomski in transkriptomski podatki pa imajo le nizko napovedno moč. Napovedni model na osnovi že objavljenega modela izražanja genov v črevesni sluznici smo uspešno ponovili in prenesli na drugo učinkovino (adalimumab). Na osnovi izražanja štirih genov v vneti in nevneti črevesni sluznici je možno napovedati odziv na zaviralce dejavnika tumorske nekroze s natančnostjo do 100 %. Nato smo še analizirali diagnostično napovedno moč bioloških podatkov s vključitvijo bioloških podatkov zdravih prostovoljcev, ki so že bili na voljo. Napovedni model na osnovi dednega zapisa in profilov maščobnih kislin je z natančnostjo do 100 % ločil med zdravimi prostovoljci in bolniki s Crohnovo boleznijo.

Ključne besede: Crohnova bolezen, genomika, transkriptomika, adalimumab, izid zdravljenja, genska ontologija

SUMMARY

Biological processes and predicting non-response to tumor necrosis factor inhibitors in Crohn's disease by integrating genomic data

The development of biological drugs has significantly contributed to therapeutic options in cancer and immune-mediated chronic diseases. Tumor necrosis factor (TNF) inhibitors are one of the most commonly used biological drugs. Crohn's disease is a common gastrointestinal immune disease that is treated with TNF inhibitors. Despite the targeted action of TNF inhibitors, some patients with Crohn's disease unfortunately do not respond to TNF inhibitors or lose response to TNF inhibitors over time. Non-response to TNF inhibitors usually represents a loss of control over severe symptoms, unnecessarily exposes Crohn's disease patients to potentially severe side effects of biological medicines and represents a significant burden on the health fund. These reasons justify the need to predict the response to biological drugs, preferably before initiating treatment.

In this doctoral dissertation we thoroughly investigated the biological markers of response to tumor necrosis factor inhibitors on the level of DNA, RNA and fatty acids in samples of peripheral venous blood of a group of Slovenian patients with Crohn's disease treated with adalimumab. The results were used to design new predictive models with machine learning approaches, i.e. support vector machines. To investigate biological processes causal for non-response to tumor necrosis factor inhibitors, we systematically examined the genetic ontology of previously published biological markers of response to tumor necrosis factor inhibitors in inflammatory bowel disease. We expanded the search to biological response markers in rheumatoid arthritis for comparative gene ontology analysis. Since non-response is more common among pediatric patients, we also extended the gene ontology analysis to causal genes for pediatric hereditary forms of chronic inflammatory bowel disease and syndromes with clinical characteristics consistent with inflammatory bowel disease. In addition, we attempted to replicate a published predictive model of response to infliximab based on the expression of five genes in the intestinal mucosa.

The results of the gene ontology analysis of previously reported response markers suggest an association between blood lipoproteins and the response to tumor necrosis factor inhibitors in inflammatory bowel disease as well as in rheumatoid arthritis. Based on the results of

gene ontology analysis of pediatric inherited forms of inflammatory bowel disease, we conclude that very early pediatric forms with an onset before the age of six are a separate genetic entity and are their non-response is likely caused by other processes, e.g. primary immune deficiency.

Analysis of biological data on the level of DNA, RNA and fatty acids did not reveal biological markers with statistical significance, which is also reflected by the analysis of predictive power through machine learning approaches. Fatty acid profiles have no predictive power to determine response to tumor necrosis factor inhibitors while genomic and transcriptomic data has low predictive power. The predictive model based on the previously published intestinal mucosa gene expression model was successfully replicated and applied to another biological drug (adalimumab). Based on the expression of four genes in the inflamed and non-inflamed intestinal mucosa, it is possible to predict the response to tumor necrosis factor inhibitors with an accuracy of up to 100 %. We then further analyzed the diagnostic predictive power of biological data by incorporating already available biological data of healthy volunteers. A predictive model based on genetic data and fatty acid profiles distinguished between healthy volunteers and patients with Crohn's disease with an accuracy of up to 100 %.

Key words: Crohn's disease, genomics, transcriptomics, adalimumab, treatment outcome, gene ontology

Kazalo vsebine

| | | |
|-----------|--|----|
| 1 | Uvod..... | 1 |
| 1.1 | Klinična opredelitev in patogeneza kronične vnetne črevesne bolezni..... | 1 |
| 1.1.1 | Crohnova bolezen..... | 2 |
| 1.1.1.1 | Pojavnost Crohnove bolezni..... | 4 |
| 1.1.1.2 | Ekstraintestinalne manifestacije Crohnove bolezni..... | 5 |
| 1.1.2 | Pediatrične oblike KVČB..... | 6 |
| 1.1.3 | Patogeneza na molekularni in celični ravni..... | 7 |
| 1.1.4 | Dednost Crohnove bolezni..... | 11 |
| 1.1.4.1 | Genetika pediatričnih oblik KVČB..... | 12 |
| 1.1.5 | Okoljski dejavniki tveganja..... | 13 |
| 1.1.5.1 | Črevesni mikroorganizmi in prehrana pri CD..... | 14 |
| 1.2 | Diagnostični pristopi pri CD..... | 15 |
| 1.3 | Terapevtski pristopi..... | 18 |
| 1.3.1 | Biološka zdravila..... | 20 |
| 1.3.1.1 | Zaviralci dejavnika tumorske nekroze..... | 22 |
| 1.4 | Napovedovanje odziva na zaviralce TNF..... | 23 |
| 2 | Raziskovalna metodologija..... | 26 |
| 2.1 | Namen doktorske disertacije..... | 26 |
| 2.2 | Cilji doktorske disertacije..... | 26 |
| 2.3 | Teze doktorske disertacije..... | 27 |
| 2.4 | Pričakovani izvorni znanstveni prispevek..... | 27 |
| 2.5 | Predpostavke in morebitne omejitve raziskovalnega dela..... | 28 |
| 2.5.1 | Kriteriji za vključitev bolnikov v študijo..... | 28 |
| 2.5.2 | Kriteriji za izključitev bolnikov iz študije..... | 28 |
| 2.5.3 | Preiskovanci..... | 29 |
| 2.6 | Materiali in metode <i>in silico</i> študije..... | 29 |
| 2.6.1 | Iskanje literature in bioloških označevalcev..... | 29 |
| 2.6.1.1 | Iskanje vzročnih genov za pediatrične oblike KVČB..... | 29 |
| 2.6.1.2 | Izbor bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF..... | 30 |
| 2.6.2 | Metoda genske ontologije..... | 32 |
| 2.6.2.1 | Oblikovanje mrež bioloških označevalcev..... | 32 |
| 2.6.2.2 | Analiza GO bioloških označevalcev..... | 34 |
| 2.7 | Materiali in metode laboratorijske študije..... | 35 |
| 2.7.1 | Odvzem bioloških vzorcev za laboratorijske analize..... | 35 |
| 2.7.2 | Določevanje odziva na zaviralce TNF- α | 35 |
| 2.7.3 | Izolacija mononuklearnih celic periferne venske krvi..... | 36 |
| 2.7.4 | Sočasna izolacija DNA in RNA..... | 37 |
| 2.7.5 | Določevanje genotipa po celotnem genomu..... | 39 |
| 2.7.6 | Določevanje izražanja genov..... | 40 |
| 2.7.6.1 | Načrtovanje zaporedij začetnih oligonukleotidov..... | 40 |
| 2.7.6.2 | Prepis izolirane RNA v cDNA z reverzno transkripcijo..... | 41 |
| 2.7.6.3 | Kvantitativni PCR v realnem času..... | 42 |
| 2.7.6.3.1 | Analiza specifičnosti produktov qPCR z gelsko elektroforezo..... | 43 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| 2.7.6.4 | Normalizacija, izračun in interpretacija izražanja genov..... | 45 |
| 2.7.7 | RNA-seq..... | 45 |
| 2.7.7.1 | Analiza in interpretacija rezultatov metode RNA-seq..... | 46 |
| 2.7.8 | Določevanje ravni maščobnih kislin..... | 46 |
| 2.8 | Materiali in metode <i>in vitro</i> študije..... | 47 |
| 2.8.1 | Inducibilni sistem TNF..... | 47 |
| 2.9 | Statistične metode..... | 49 |
| 2.10 | Metoda podpornih vektorjev..... | 50 |
| 3 | Rezultati..... | 51 |
| 3.1 | Rezultati <i>in silico</i> študije..... | 51 |
| 3.1.1 | Genska ontologija pediatričnih oblik KVČB..... | 51 |
| 3.1.1.1 | Primerjalna analiza podskupin vzročnih genov KVČB..... | 54 |
| 3.1.2 | Genska ontologija bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF..... | 59 |
| 3.1.2.1 | Označevalci odziva na zaviralce TNF v RA..... | 59 |
| 3.1.2.2 | Označevalci odziva na zaviralce TNF pri KVČB..... | 63 |
| 3.1.2.3 | Primerjalna analiza označevalcev odziva pri KVČB in RA..... | 64 |
| 3.2 | Rezultati laboratorijske študije..... | 65 |
| 3.2.1 | Rezultati analize genetskih označevalcev na čipu GSA..... | 65 |
| 3.2.2 | Rezultati analize izražanja genov..... | 66 |
| 3.2.2.1 | Analiza izražanja posameznih RNA-označevalcev..... | 66 |
| 3.2.2.2 | RNA-seq..... | 67 |
| 3.2.3 | Rezultati analize izražanja izbranih genov v celičnem modelu..... | 67 |
| 3.2.4 | Rezultati analiz napovednih modelov..... | 68 |
| 3.2.4.1 | Značilnosti množic vhodnih podatkov..... | 68 |
| 3.2.4.2 | Optimizacija strojnega učenja..... | 70 |
| 3.2.4.3 | Napovedni modeli odziva na zaviralce TNF..... | 73 |
| 3.2.4.4 | Diagnostični napovedni model na osnovi dednega zapisa in maščobnih kislin..... | 75 |
| 4 | Razprava..... | 76 |
| 4.1 | Potrditev oziroma zavrnitev tez doktorske disertacije..... | 85 |
| 5 | Sklep..... | 86 |
| 6 | Literatura in viri..... | 87 |
| 7 | Priloge..... | 104 |
| 7.1 | Članek kot sestavni del doktorske disertacije..... | 104 |
| 7.1.1 | Izvirni znanstveni članek 1..... | 104 |
| 7.1.2 | Izvirni znanstveni članek 2..... | 104 |
| 7.1.3 | Izvirni znanstveni članek 3..... | 104 |
| 7.2 | Izjava Komisije RS za medicinsko etiko..... | 2 |
| Zahvale..... | | 3 |

Kazalo tabel

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Povzetek Montrealske klasifikacije CD (21)..... | 3 |
| Tabela 2: Opredelitev podskupin pediatričnih oblik KVČB. (57)..... | 7 |
| Tabela 3: Indeksi bolezenske aktivnosti pri CD in opredelitev pragov aktivnosti..... | 17 |
| Tabela 4: Merila za klinično značilen odziv na zaviralce TNF..... | 36 |
| Tabela 5: Pari začetnih oligonukleotidov za kvantitativni PCR v realnem času..... | 41 |
| Tabela 6: Reakcijska mešanica za eno reakcijo reverzne transkripcije..... | 42 |
| Tabela 7: Program termociklerja za reverzno transkripcijo..... | 42 |
| Tabela 8: 10 µL reakcijska mešanica za qPCR..... | 43 |
| Tabela 9: Protokol termociklerja za qPCR-reakcijo..... | 43 |
| Tabela 10: Vsebnost 10-kratne založne raztopine TBE-pufra..... | 44 |
| Tabela 11: Vsebnost 6-kratne barvne raztopine za nanašanje vzorcev..... | 44 |
| Tabela 12: Seznam vzročnih genov za pediatrično KVČB po podskupinah..... | 51 |
| Tabela 13: Statistično značilni rezultati analiz GO posameznih podskupin monogenih dednih pediatričnih oblik KVČB..... | 53 |
| Tabela 14: Seznam vzročnih genov za odraslo kompleksno KVČB po podskupinah..... | 55 |
| Tabela 15: Izbrani statistično značilni rezultati primerjalne analize GO med PED in ADULT-1..... | 56 |
| Tabela 16: Izbrani statistično značilni rezultati primerjalne analize GO med PED in ADULT-2..... | 57 |
| Tabela 17: Izbrani statistično značilni rezultati primerjalne analize GO med POD6A in NAD6A..... | 58 |
| Tabela 18: Seznam genov, v katerih ležijo DNA-označevalci odziva na zaviralce TNF pri RA..... | 59 |
| Tabela 19: Seznam RNA-označevalcev odziva na zaviralce TNF pri RA..... | 60 |
| Tabela 20: Seznam proteinskih označevalcev odziva na zaviralce TNF pri RA..... | 61 |
| Tabela 21: Izbrani statistično značilni rezultati genske ontologije bioloških označevalcev odziva na zaviralce pri KVČB..... | 62 |
| Tabela 22: Izbrani statistično značilni rezultati primerjalne analize genske ontologije bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF v KVČB in RA..... | 64 |
| Tabela 23: Izbrani statistični trendi genetskih označevalcev odziva na zaviralce TNF..... | 66 |
| Tabela 24: Izražanje izbranih genov v biopsijah črevesnega tkiva bolnikov s CD..... | 66 |
| Tabela 25: Množica genetskih parametrov za strojno učenje..... | 68 |
| Tabela 26: Množica parametrov maščobnih kislin za strojno učenje..... | 69 |
| Tabela 27: Množica parametrov izražanja genov poskusa RNA-seq za strojno učenje..... | 70 |
| Tabela 28: Značilnosti napovednih modelov odziva na zaviralce TNF, učenih na različnih kombinacijah učnih množic..... | 74 |
| Tabela 29: Množica genetskih parametrov za diagnostični napovedni model..... | 75 |
| Tabela 30: Značilnosti diagnostičnih napovednih modelov, učenih na različnih kombinacijah učnih množic..... | 75 |

Kazalo slik

| | |
|---|----|
| Slika 1: Delež bolnikov s Crohnovo boleznijo po Montrealski klasifikaciji | 4 |
| Slika 2: Pogoste ekstraintestinalne manifestacije Crohnove bolezni..... | 6 |
| Slika 3: Patogenetske spremembe v črevesni sluznici bolnikov s Crohnovo boleznijo | 8 |
| Slika 4: Patogeneza KVČB na celični ravni v prebavni cevi..... | 10 |
| Slika 5: Vpliv genetskih in okoljskih dejavnikov tveganja na razvoj KVČB..... | 12 |
| Slika 6: Ustaljeni terapevtski pristopi pri zdravljenju KVČB..... | 19 |
| Slika 7: Shema molekularne strukture zaviralcev TNF | 23 |
| Slika 8: Primer genske mreže pred in po obdelavi v orodju CytoScape..... | 33 |
| Slika 9: Primer nastavitve programskega orodja ClueGO | 34 |
| Slika 10: Ilustracija falkonke po centrifugiranju z gostotnim gradientom..... | 37 |
| Slika 11: Ločevanja faz po centrifugiranju z dodanim kloroforom | 38 |
| Slika 12: Shema gojenja osnovne celične kokulture..... | 48 |
| Slika 13: Simuliranje vnetja črevesne sluznice v kokulturi | 48 |
| Slika 14: Simuliranje terapije z zaviralci TNF v kokulturi | 49 |
| Slika 15: Genska mreža genov PSMB9 in RAD23A..... | 63 |
| Slika 16: Grafični prikaz asociacijske analize podatkov čipa GSA z odzivom na zaviralce TNF | 65 |
| Slika 17: Graf izražanja izbranih genov v biopsijah črevesnega tkiva | 67 |
| Slika 18: Protokol strojnega učenja z metodo podpornih vektorjev | 72 |
| Slika 19: Vennov diagram preseka štirih množic podatkov | 73 |

Uporabljene kratice in okrajšave

| | |
|-----------------|---|
| 5-ASA | 5-aminosalicilati |
| ACTB | aktin beta |
| B2M | beta-2 mikroglobulin |
| CD | Crohnova bolezen |
| CDAI | Crohn's Disease Activity Index |
| CDEIS | Crohn's Disease Index of Severity |
| CMP | minimalno število branj na milijon |
| CRP | C-reaktivni protein |
| DAS28 | Disease Activity Score |
| DEPC | dietil pirokarbonat |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| eQTL | kvantitativni lokus izražanja |
| ESPGHAN | European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition |
| G0S2 | G0/G1-preklopni protein 2 |
| GO | genska ontologija |
| GSA | Global Screening Array |
| GSAC | Global Screening Array Consortium |
| GWAS | asociacijska študija celotnega genoma |
| HBI | Harvey-Bradshawov indeks |
| IBDQ | Inflammatory Bowel Disease Questionnaire |
| IC | Nedoločen kolitis |
| IgG1 | imunoglobulin G 1 |
| IIBDGC | International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium |
| IL11 | interlevkin 11 |
| IS | imunosupresivi |
| K2EDTA | kalijeva sol etilendiamintetraocetne kisline |
| KME | Komisija RS za medicinsko etiko |
| KSi | kortikosteroidi |
| KVČB | kronična vnetna črevesna bolezen |
| LPS | lipopolisaharid |
| MaRIA | Magnetic Resonance Index of Activity |
| MeSH | Medical Subject Headings |
| NCBI GTR | National Center for Biotechnology Information Genetic Testing Registry |
| OMIM | Online Mendelian Inheritance in Man |
| PEG | polietilenglikol |
| PMA | 12-miristat 13-acetat |
| qPCR | kvantitativna verižna reakcija s polimerazo |

| | |
|----------------|---|
| RA | revmatoidni artritis |
| RIN | RNA integrity number |
| RNA | ribonukleinska kislina |
| RNaseq | sekvenciranje transkriptov RNA naslednje generacije |
| S100A8 | S100 kalcij vezajoč protein A8 |
| S100A9 | S100 kalcij vezajoč protein A9 |
| SES-CD | Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease |
| TBE | tris-borat-EDTA |
| Th17 | celice T pomagalk 17 |
| TLR | tolični receptor |
| TNF | dejavnik tumorske nekroze |
| TNFAIP6 | TNF-alfa inducirani protein 6 |
| TRIS | 2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol |
| UC | ulcerozni kolitis |

Uporabljeni simboli

| <i>OZNAKA</i> | <i>VELIČINA</i> | <i>ENOTA</i> |
|----------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| c | množinska koncentracija | M (mol/L); mM (mmol/L); μM (μmol/L) |
| Δ | delta | / |
| f | število obratov | rpm; rcf |
| λ | valovna dolžina | nm |
| m | masa | kg; g; mg; μg |
| P | moč | W |
| T | temperatura | °C |
| t | čas | h; min; s |
| V | volumen | L; dL; mL; μL |

1 Uvod

Kronična vnetna črevesna bolezen (v nadaljevanju KVČB) je pogosta, imunsko pogojena kompleksna bolezen prebavne cevi (1). Za KVČB je značilno izrazito kronično in napredujoče vnetje prebavil (1). Vzrok za nastanek KVČB ni znan, vendar so raziskave na molekularni ravni potrdile nepravilne imunske odzive genetsko pogojenega gostitelja na črevesne mikroorganizme kot gonilno silo patogeneze KVČB (2). V zadnjih dveh desetletjih so biološka zdravila proti dejavniku tumorske nekroze (v nadaljevanju zaviralci TNF) bistveno prispevala k učinkovitosti terapije, posebej pri hujših oblikah KVČB (3). Omejitve terapije z zaviralci TNF je pogojena z neodzivnostjo nanje ali razvoj protiteles na učinkovino. Približno tretjina bolnikov ne doseže zadovoljivega odziva na zaviralce TNF že ob prvem ciklu terapije, druga tretjina pa odziv na zaviralce TNF sčasoma izgubi (4). Biološki procesi, ki pogojujejo neodzivnost na zaviralce TNF, niso dobro poznani, prav tako je objavljenih le malo bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF, ki so dovolj zanesljivi za prenos v klinično prakso (4, 5).

1.1 Klinična opredelitev in patogeneza kronične vnetne črevesne bolezni

Matthew Baille je leta 1793 prvi objavil članek, v katerem opisuje smrtonosno bolezen prebavil, ki se sklada s sodobnim opisom kronične vnetne črevesne bolezni (6), pojem "ulcerativni kolitis" pa je leta 1859 prvič uporabil Sir Samuel Wilks (7). Do druge polovice 20. stoletja je bila KVČB opisana kot vnetna bolezen prebavil, ki jo povzročijo črevesna tuberkuloza ali druge kronične okužbe prebavil. K temu razumevanju so prispevala epidemiološka opažanja naraščajoče razširjenosti bolezni in podobnosti med simptomi KVČB ter tuberkulozo prebavil goveda, t.i. Johnejevo boleznijo (8, 9). Leta 1932 so Crohn, Ginzburg in Oppenheimer opisali vnetje tankega črevesa, ki je ločena entiteta od črevesne tuberkuloze (10), kar je bila prva sodobnejša opredelitev KVČB kot bolezni, katere vzrok za nastanek bolezni ni prvotno okužba prebavil. Broberger in Perlmann sta leta 1959 prvič opisala vlogo avtoimunskih procesov pri KVČB (11), kasneje so sledile objave o pomenu avtoimunskih procesov in protiteles, kot so na primer antinevtrofilna citoplazemska protitelesa (12). Kljub naraščajoči razširjenosti KVČB v razvitem svetu je razširjenost v razvijajočem se svetu ostala nizka, kar je bil povod za oblikovanje t.i. higienske hipoteze

(13, 14). Higienska hipoteza opisuje oslabitev imunskega sistema zaradi vse večje higiene prebivalstva v razvitem svetu in posledično nizke izpostavljenosti mikroorganizmom, kar vodi do nepravilnega imunskega odziva na črevesne mikroorganizme, tudi na neškodljive in koristne seve (15). V zadnjem desetletju so študije na molekularni in genetski ravni izpostavile pomen nepravilnosti v imunskem odzivu gostitelja na črevesne mikroorganizme (2, 16), vendar točen vzrok nastanka KVČB ostaja neznan.

Sodobna opredelitev opisuje KVČB kot kronično vnetje prebavil, kjer vzrok vnetja ni znan oziroma kjer vzrok vnetja ni okužba, alergija, zastrupitev, avtoimunska reakcija, sevanje, tumor ali ishemija prebavil. Opredeljena sta dva klinično značilna podtipa KVČB, to sta Crohnova bolezen (v nadaljevanju CD) in ulcerozni kolitis (v nadaljevanju UC). V kolikor ni možno določiti kliničnega podtipa, se bolezen opredeli kot intermediarni kolitis (v nadaljevanju IC). V klinični praksi imajo poseben pomen pediatrične oblike KVČB, saj imajo pogosteje nenavaden potek in in je odzivnost na ustaljene terapevtske pristope slabša (17, 18).

1.1.1 Crohnova bolezen

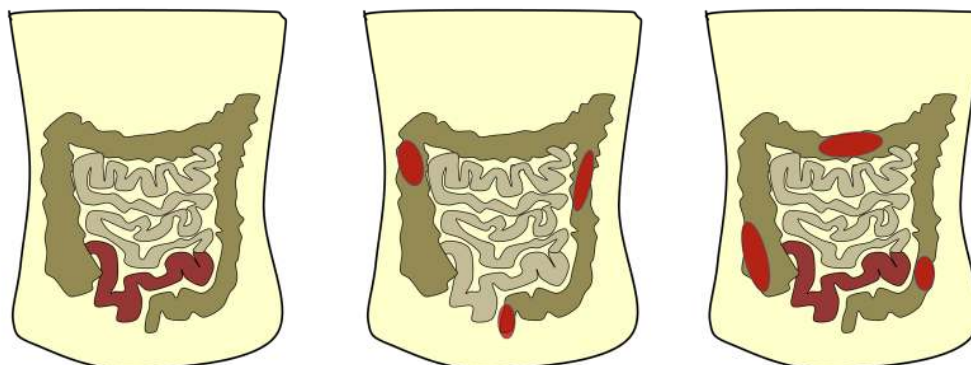
Crohnova bolezen je bila poimenovana po gastroenterologu Burrillu Bernardu Crohnu, ki je skupaj s Leonom Ginzburgom in Gordonom Oppenheimerjem prvi opisal vnetje tankega črevesa, katerega vzrok ni bil jasen (10). Prvotni opis CD je temeljil na prisotnosti vnetja v tankem črevesu, pri čemer je bilo vnetje debelega črevesa brez vnetja tankega črevesa diagnosticirano kot UC. Leta 1960 je Lockhart-Mummery opisal CD s simptomi izključno v debelem črevesu kot entiteto, ločeno od UC (19). Opisana opažanja so vodila do oblikovanja Dunajske (20) in pozneje Montrealske klasifikacije KVČB (21).

Tabela 1: Povzetek Montrealske klasifikacije CD (21)

| Starost ob diagnozi | | | |
|----------------------------|--|---------|--|
| A1 | 16 let ali mlajši | | |
| A2 | Od 17 do 40 let | | |
| A3 | Nad 40 let | | |
| Lokacija bolezni | Možne kombinacije lokacij bolezni | | |
| L1 | Terminalni ileum | L1 + L4 | Terminalni ileum in zgornja prebavna cev |
| L2 | Kolon | L2 + L4 | Kolon in zgornji prebavna cev |
| L3 | Ileokolon | L3 + L4 | Ileokolon in zgornja prebavna cev |
| L4 | Zgornja prebavna cev | / | / |
| Dominantni fenotip | Dominantni fenotip s perianalnimi zapleti | | |
| B1 | Nestriktirajoča, nepenetrirajoča | B1p | Nestriktirajoča, nepenetrirajoča, perianalni zapleti |
| B2 | Striktirajoča | B2p | Striktirajoča in perianalni zapleti |
| B3 | Penetrirajoča | B3p | Penetrirajoča in perianalni zapleti |

Medtem ko UC sprva prizadene le danko in nato napreduje po debelem črevesu, se vnetje pri CD lahko pojavi kjerkoli v prebavni cevi, najpogosteje se pojavi v zadnjem delu tankega črevesa (v nadaljevanju terminalni ileum) in v debelem črevesu (v nadaljevanju kolon). To se odraža v Montrealski klasifikaciji, ki razvršča CD v tri podtipe glede na lokacijo bolezni: prisotnost bolezni izključno v terminalnem ileumu (L1), prisotnost bolezni izključno v kolonu (L2) in prisotnost bolezni tako v terminalnem ileumu, kot tudi v kolonu (L3). Modifikator lokacije L4 služi opisu prisotnosti simptomov v zgornji prebavni cevi, npr. aftozni ulkus. V zadnjem desetletju literatura navaja vse večji pomen lokacije bolezni tako za namene diagnostike kot za zdravljenje; nastajajo tudi pobude po ločevanju CD samo glede na prisotnost simptomov v tankem črevesu (22).

| Delež bolnikov s Crohnovo boleznijo po Montrealski klasifikaciji | | |
|--|-----------------------------|---------------------------------|
| Terminalni ileum (L1) 30 % bolnikov | Kolon (L2) 30 % bolnikov | Ileokolon (L3) 40 % bolnikov |



Slika 1: Delež bolnikov s Crohnovo boleznijo po Montrealski klasifikaciji

Slika 1 prikazuje shematsko porazdelitev CD glede na lokacijo bolezni. Po trenutno uporabljenem ločevanju na osnovi Montrealske klasifikacije spada 30 % bolnikov s CD v L1, 40 % bolnikov v L3 in preostalih 30 % v L2. Povzeto in prirejeno po Dulai, 2019. (22)

Patogenetske spremembe črevesja pri CD pogosto segajo globoko v tkivo, kar vodi do zapletov, kot so abscesi (ognojki), strikture, fistule in stenoze (20, 21). Montrealska klasifikacija opisuje te spremembe z dominantnim fenotipom bolezni: nestriktirajoča in nepenetrirajoča (B1), striktirajoča (B2) ali penetrirajoča bolezen (B3) (21). Dodatno je opisan modifikator za perianalne manifestacije bolezni (p).

1.1.1.1 Pojavnost Crohnove bolezni

Pojavnost CD v večini držav razvitega sveta postopoma narašča, v nekaterih pa se pojavnost v zadnjem desetletju ni bistveno spremenila (23, 24). V primerjavi z razvitim svetom je pojavnost CD v razvijajočem se svetu relativno nizka, vendar zaradi vse bolj razširjene industrializacije in urbanizacije ter prevzemanja prehranskih navad razvitega sveta narašča (23, 24). V Evropi je opazen značilen porast pojavnosti od juga proti severu in od vzhoda proti zahodu (24). Pojavnost CD na severu Evrope znaša 6,3 na 100.000 prebivalcev, na jugu pa 3,6 na 100.000 (25). Na Danskem je pojavnost leta 1980 znašala 5,2 na 100.000 prebivalcev, do leta 2013 pa je narasla na 9,1 na 100.000. Epidemiološke študije v Franciji so navajale pojavnost CD 4,2 na 100.000 prebivalcev v letih od 1988 do 1990 ter 9,5 na

100.000 prebivalcev v letih od 2009 do 2011 (26). Naraščajoča pojavnost od vzhoda proti zahodu Evrope je v zadnjem desetletju vse manj izrazita, kar kažejo tudi podatki kohorte bolnikov iz zahodne Madžarske, kjer je pojavnost CD narastla na 8,9 na 100,000, kar je primerljivo s pojavnostjo v državah zahodne Evrope (27). Pojavnost CD v ZDA in Kanadi je primerljiva z pojavnostjo v Evropi. Pojavnost CD je bila najvišja v Novi Škotski v Kanadi in je leta 2009 znašala 21,4 na 100.000 prebivalcev (28).

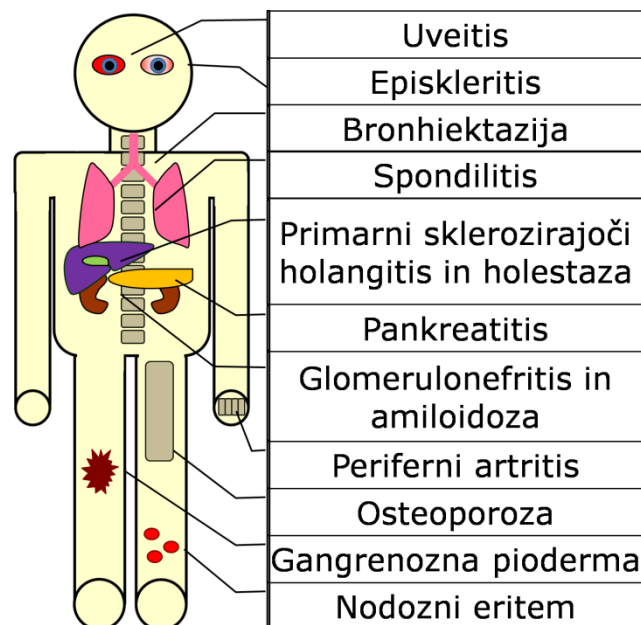
1.1.1.2 Ekstraintestinalne manifestacije Crohnove bolezni

Od 6 do 47 % vseh bolnikov s KVČB ima ekstraintestinalne manifestacije (v mednarodni literaturi se uporablja tudi izraz imunsko pogojene manifestacije bolezni) (29-31). Prisotnost bolezni v kolonu, perianalna CD in kajenje so povezani s povišanim tveganjem za manifestacije izven prebavne cevi (30). Za CD je značilnih več manifestacij zunaj črevesja, ki se lahko pojavljajo v mišično-skeletnem sistemu, koži, jetrih, ledvicah, srcu, ožilju in pljučih (29).

Najpogostejše so manifestacije v mišično-skeletnem sistemu, ki prizadenejo do 40 % vseh bolnikov s KVČB (32, 33). Prisotnost in intenzivnost simptomov v mišično-skeletnem sistemu je povezana z aktivnostjo KVČB (34). Pogosti manifestaciji v sklepih sta vnetni periferni artritis in spondilitis (29). Pri 5 do 10 % vseh bolnikov s CD se pojavi tudi osteoporoza in posledično zmanjšana mineralna gostota kosti (35-37).

Pogoste so tudi kožne manifestacije, ki jih ima do 15 % vseh bolnikov s KVČB (30). Kožne manifestacije v KVČB so zelo raznolike, vendar sta najpogostejši obliki nodozni eritem in gangrenozna pioderma (38, 39). Opazovalne študije so tudi pokazale višjo pojavnost luskavice pri bolnikih s CD kot v splošni populaciji (40, 41).

Druge značilne manifestacije so episkleritis, uveitis, primarni sklerozirajoči holangitis, holestaza, holangiokarcinom in pankreatitis, redkeje tudi bronhiektazije in ledvične manifestacije, kot so npr. glomerulonefritis in amiloidoza (29-31).



Slika 2: Pogoste ekstraintestinalne manifestacije Crohnove bolezni

Slika 2 prikazuje shemo človeškega telesa z obarvanimi deli človeškega telesa, kjer se pri CD pogosto pojavljajo simptomi zunaj črevesja. Ekstraintestinalne manifestacije so navedene na desni. Povzeto in prirejeno po Kalla, 2014. (42)

1.1.2 Pediatrične oblike KVČB

Večina primerov KVČB se prvič pojavi med 20. in 40. letom starosti, od 15 do 30 % vseh primerov pa se pojavi pred 20. letom starosti (43, 44). V Sloveniji je pojavnost pediatrične KVČB med letoma 2002 in 2010 znašala 7,6 na 100.000 otrok in mladostnikov na leto, od tega 4,5 s pediatrično CD (45). Pediatrična KVČB je pogosteje podtipa CD kot pa UC, vendar je delež pediatričnih bolnikov, ki so opredeljeni kot IC, višji kot pri oblikah KVČB pri odraslih (17, 46). Za pediatrične oblike CD je značilno zelo razširjeno in globoko vnetje prebavil ter slabši odziv na uveljavljene terapije (17, 18), kot tudi na biološka zdravila (47). Ker ima tretjina vseh pediatričnih monogenih dednih bolezni s prizadetim imunskim sistemom klinično sliko skladno s KVČB, sta natančna diagnoza in izbor učinkovite terapije brez genetskega testiranja otežena (48). Pogost zaplet pediatrične CD je huda malabsorpcija hranil, ki lahko vodi do podhranjenosti in razvojnega zaostanka (49). Dodatni zapleti, ki se pojavljajo v pediatričnih oblikah CD, so oslabil imunski sistem in posledično kronične okužbe prebavil, kot tudi dihal in kože (50). Zaradi pogoste rabe antibiotikov pri okužbah prebavil so pri pediatrični CD potrebne presaditve črevesne flore (51). Opisane značilnosti

pediatrične CD so vplivale na razvoj prilagojenih diagnostični in terapevtskih algoritmov za pediatrično CD (ESPGHAN) (52-56).

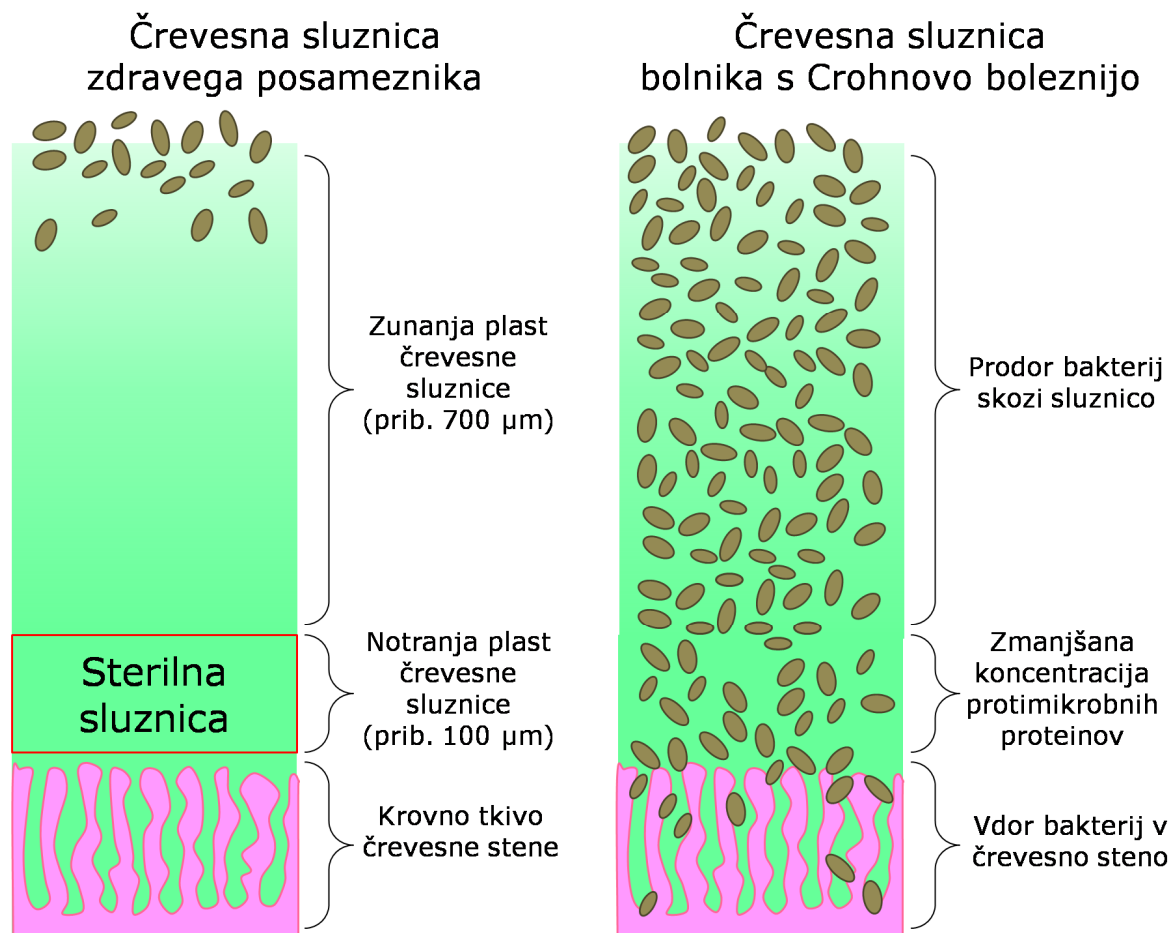
Tabela 2: Opredelitev podskupin pediatričnih oblik KVČB. (57)

| Podskupina | Skrajšana oznaka | Starost ob nastopu bolezni |
|--|------------------|----------------------------|
| Neonatalna KVČB (ang. <i>neonatal IBD</i>) | NEO-IBD | Manj kot 28 dni |
| Infantilna KVČB (ang. <i>infantile-onset IBD</i>) | INF-IBD | Manj kot 2 leti |
| KVČB z zelo zgodnjim nastopom (ang. <i>very early onset IBD</i>) | VEO-IBD | Manj kot 6 let |
| KVČB z zgodnjim nastopom (ang. <i>early onset IBD</i>) | EO-IBD | Manj kot 10 let |
| Pediatrična KVČB (ang. <i>pediatric-onset IBD</i>) | PED-IBD | Manj kot 17 let |

1.1.3 Patogeneza na molekularni in celični ravni

Nekoč je bila KVČB opisana kot posledica okužb oziroma kot črevesna tuberkuloza ali pa kot izključno avtoimunska bolezen. Sodobno razumevanje KVČB opisuje patogenezo kot nepravilni imunski odziv genetsko pogojenega gostitelja na črevesne mikroorganizme ob prisotnosti patogenih okoljskih dejavnikov (2, 16). Žarišče patogeneze CD je sluznica tankega in debelega črevesja, kjer je najvišja koncentracija mikroorganizmov v prebavni cevi in posledično največ interakcij oziroma sovplivanja črevesja z mikroorganizmi (58).

Na celični ravni je pri bolnikih s CD opazna manjša gostota in moteno delovanje čašastih celic in Panethovih celic v črevesni steni (59-61). Čašaste celice proizvajajo večino mucinov, ki predstavljajo glavni gradnik črevesne sluznice, Panethove celice pa izločajo protimikrobne proteine, predvsem defensine, kot tudi lizocim in fosfolipazo A2 (62). V manjši meri lahko mucine in β -defensin izločajo tudi enterociti (63).



Slika 3: Patogenetske spremembe v črevesni sluznici bolnikov s Crohnovo boleznijo

Slika 3 prikazuje primerjavo preseka zdrave črevesne sluznice (na levi strani) in preseka črevesne sluznice bolnika s Crohnovo boleznijo (na desni strani). Črevesna sluznica pri CD nima dovolj visoke koncentracije protimikrobnih proteinov, da bi bil sloj tik nad kolonskimi kriptami sterilan. Razvidno je prodiranje črevesnih mikroorganizmov skozi celotno črevesno sluznico do krovnega tkiva prebavne cevi. Privzeto in prirejeno po Wehkamp, 2016. (58)

Posledica pomanjkanja protimikrobnih proteinov je prodiranje mikroorganizmov vse do krovnega tkiva, upočasnjeno izločanje mucinov pa oslabi obnavljanje že kontaminirane črevesne sluznice. Razlog za oslabelelo delovanje čašastih in Panethovih celic so najverjetneje spremembe v avtofagiji in v prepoznavanju mikroorganizmov oziroma mikrobnih molekul (59-61), ki so značilne za CD na ravni genetike (2, 16).

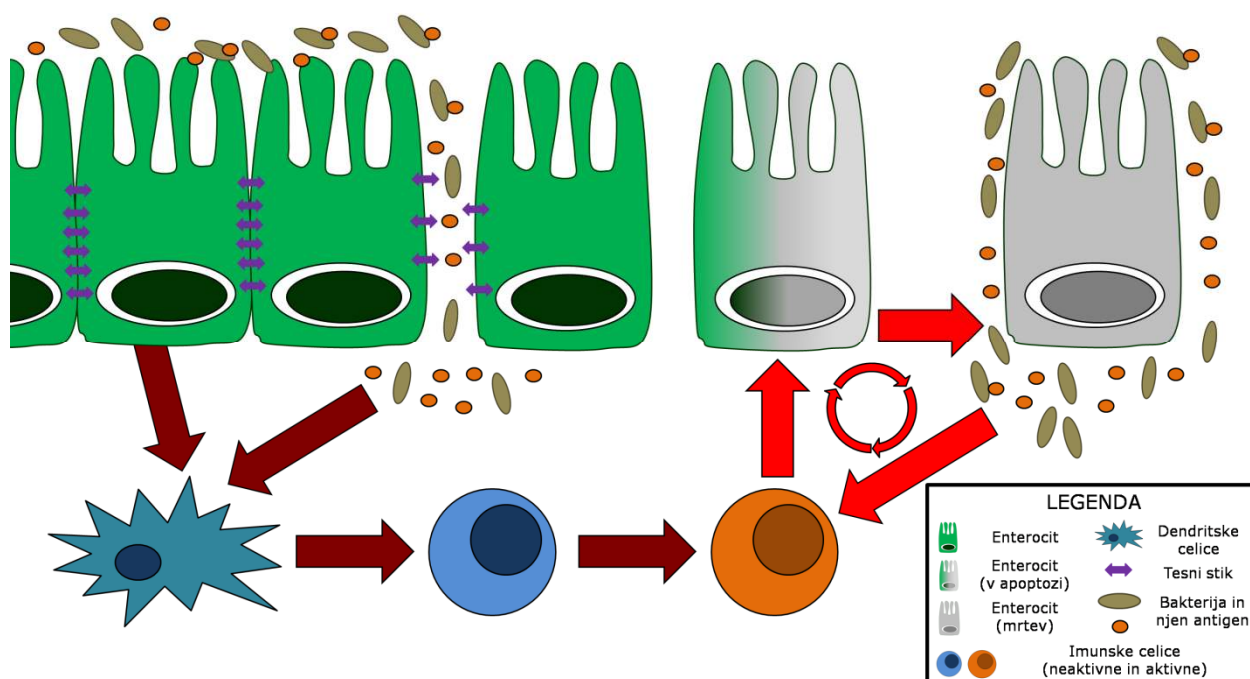
Prodiranje mikroorganizmov skozi črevesno sluznico do krovnega tkiva prebavil je za Crohnovo bolezen zelo pogost pojav (58). Krovno tkivo prebavne cevi ima kompleksen sistem uravnavanja lastne tolerance na vsebnost črevesne sluznice. Za prepoznavanje

mikrobnih molekul, prisotnih v črevesni sluznici, enterociti v tankem črevesu in kolonu izražajo več tipov receptorjev TLR (64, 65). Funkcijo predstavljanja antigenov iz črevesne sluznice dendritskim celicam pod krovnim tkivom opravljajo predvsem M-celice, lahko pa to vlogo pasivno opravljajo tudi enterociti, saj izražajo molekule MHC-II (66) in lahko proizvajajo MHC-II-peptidne komplekse (67). Kljub sposobnosti krovnega tkiva, da »tolerira« neškodljive mikroorganizme v črevesni sluznici, je pri CD koncentracija le-teh dovolj visoka, da preobremeni zmogljivost tolerance enterocitov in vodi v kronično sprožanje vnetnih procesov (58). V literaturi se pojavlja tudi hipoteza, da je patogeneza CD analogna avtoimunskim boleznim. Trenutno se vzrok za nastanek mnogih avtoimunskih bolezni pripisuje izgubi tolerance na lastne antigene, pri CD bi bil analogni vzrok izguba tolerance na črevesne mikroorganizme (68).

Za krovno tkivo pri bolnikih s CD je značilna tudi oslabela integriteta tesnega stika med celicami krovnega tkiva in nepravilna regulacija tesnega stika (69). Študije na molekularni ravni navajajo povečanje izražanja proteina CLDN2 in zmanjšanje izražanja CLDN3, CLDN5 in CLDN8 v vneti sluznici debelega črevesa (70, 71). Zeissig et al. navajajo kot vzrok motenj tesnega stika v aktivni bolezni vpliv primarnih vnetnih molekul v CD, to sta TNF- α in IFN- γ , ki predvsem povečata izražanje CLDN2 in zmanjšata izražanje CLDN5 in CLDN8, kar povzroči značilne spremembe tesnega stika v CD. Pokazali so tudi, da so spremembe izražanja genov tesnega stika prisotne tudi v remisiji (70). Pomanjkljivosti tesnega stika med celicami krovnega tkiva tako vodijo do kroničnega prodiranja mikroorganizmov v lamino proprio, kjer prisotne imunske celice sprožijo adaptivni imunski sistem (72).

Pri vseh oblikah KVČB so značilne spremembe profila imunskih celic in delovanje le-teh. Najpogosteje so opažene spremembe delovanja makrofagov (73), dendritskih celic (74, 75) in večine podtipov B-celic (76). Za CD so značilne tudi spremembe delovanja Th17-limfocitov (77-79) in manjši delež regulatornih celic T (80). Zmanjšan delež regulatornih celic T vodi predvsem v nenehno aktivacijo makrofagov in celic Th17 (77) in do izgube tolerance na lastne antigene ter posledične avtoimunske procese v prebavni cevi (81). Pri CD je opazno še nepojasnjeno obdajanje črevesja (predvsem kolona) z maščobnim tkivom (82). V maščobnem tkivu se nahajajo makrofagi, kot tudi preadipociti in adipociti, ki se lahko pod vplivom vnetnih molekul prav tako diferencirajo v makrofage. Pri CD lahko makrofagi iz maščobnega tkiva vdrejo v lamino proprio in sprožijo vnetje ali pa prispevajo k širšemu vnetnemu odzivu (83).

Nenehni vdori mikroorganizmov v notranjost črevesja in nekontrolirani vnetni odziv nanje vodijo do še večjega uničenja črevesne stene na mestu infiltracije mikroorganizmov, kar poveča površino, skozi katero lahko mikroorganizmi prodirajo v notranjost črevesja, in tako je število imunskih celih, izpostavljenih molekulam mikroorganizmov, še večje. To vodi v »začaran krog« nenehnega vdora mikroorganizmov in vnetja, ki se širi vzdolž prebavne cevi in tudi delno navznoter v maščobno tkivo, ki obdaja prebavno cev (83).



Slika 4: Patogeneza KVČB na celični ravni v prebavni cevi

Slika 4 prikazuje shemo patogeneze KVČB na celični ravni v črevesni sluznici in krovnem tkivu črevesne stene. Na shemi je prikazan prodor mikroorganizmov do krovnega tkiva in nato v lamino proprio, sprožitev adaptivnega imunskega sistema, nenadzorovano vnetje in uničenje črevesne stene ter prodor novih mikroorganizmov v lamino proprio. Povzeto in prirejeno po shemi map05321 v podatkovni bazi KEGG. (84)

1.1.4 Dednost Crohnove bolezni

O vplivu dednosti na nastanek KVČB so že poročale zgodnje epidemiološke študije, ki so opazile povečano pojavnost KVČB pri sorodnikih bolnikov do tretjega kolena (85). Prav tako študije enojajčnih dvojčkov poročajo fenotipsko ujemanje med 27 in 56 % za CD. To pomeni, da v kolikor prvi dvojček zboli za CD, ima drugi dvojček med 27 in 56 % verjetnosti, da bo tudi zbolel za CD (86).

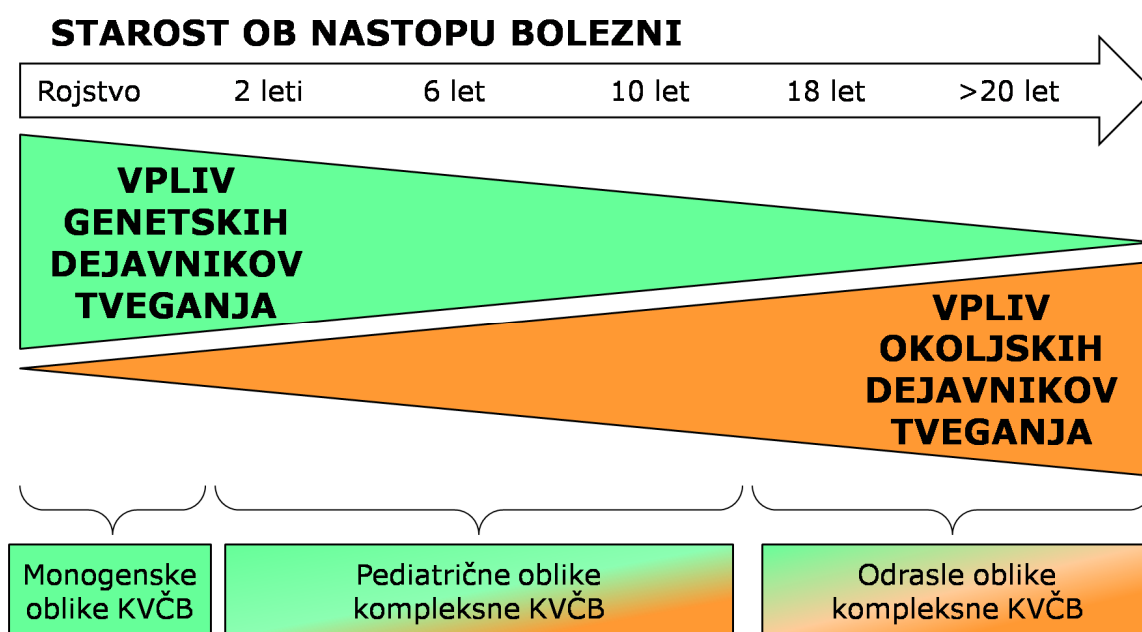
Asociacijske študije celotnega genoma oziroma GWAS (ang. *genome-wide association studies*, kratica GWAS) so identificirale 163 genskih lokusov, povezanih s patogenezo KVČB, od tega je 30 značilnih le za CD, 23 pa le za UC (2). Kasneje so razširjene mednarodne GWAS identificirale še 38 novih genskih lokusov, tako da je do sedaj znanih 201 KVČB genskih lokusov (16). Z izjemo lokusov v nekaterih genih (npr. *NOD2* in *IL23R*) ima večina lokusov, povezanih s KVČB, zelo nizko razmerje obetov (med 1,0 in 1,5) (2, 16). Vendar pa znani genski lokusi razložijo le 13,6 % pričakovanega prispevka dednosti k patogenezi CD (2). Razlog za to je najverjetneje previsoka ocena dednosti zaradi omejitev študij dvojčkov, v katerih ni možno natančno oceniti vpliva okolja (87, 88). Dodatna omejitev so pomanjkljivosti metod določevanja genotipa v asociacijskih študijah celotnega genoma, saj le-te niso primerne za identifikacijo variant z nizko frekvenco in srednje visokim razmerjem obetov (87). Prav tako algoritem za izračun prispevka dednosti znanih lokusov ne upošteva učinka genskih interakcij ter vpliva epigenetike (87, 88). Kljub opisanim omejitvam so študije na genetski ravni bistveno prispevale k razumevanju bolezni na molekularni ravni. Izpostavile so več celičnih procesov, vpletenih v patogenezo CD, med drugim prepoznavanje mikroorganizmov oz. mikrobnih molekul (89), avtofagijo (60, 90), regulacijo integritete testnega stika (69) in regulacijo imunskih celic ter vnetnih procesov (91, 92).

Med leti 2005 in 2015 so bile študije genetike kompleksnih bolezni osredotočene predvsem na identifikacijo genskih lokusov z asociacijskimi študijami celotnega genoma oz. metaanalizami GWAS (93). Sedaj je večina genskih lokusov, povezanih s pogostimi kompleksnimi boleznimi, že znana, zato je v zadnjih nekaj letih vse večji poudarek na funkcijskih študijah. V ospredju je iskanje vzročnega gena v genskem lokusu. Za približno 80 % vseh genskih lokusov, povezanih s KVČB, ni bilo možno jasno določiti vzročnega gena, nekateri lokusi pa se celo nahajajo v delih dednega zapisa, kjer ni bližnjega gena (t.i. genske puščave) (2, 16). Pogosta pristopa iskanja vzročnega gena so študije ekspresijskega

kvantitativnega lokusa (ang. *eQTL*) (94) in »fino tarčno sekvenciranje genskega lokusa« (95).

1.1.4.1 Genetika pediatričnih oblik KVČB

Za kompleksne bolezni je značilno, da so za patogenezo potrebni tako genetski kot tudi okoljski dejavniki tveganja, medtem ko je za nastanek monogenske dedne bolezni dovolj le ena patogena sprememba dednega zapisa. Bolniki z monogenetskimi dednimi boleznimi so v večini primerov prizadeti že v zgodnjem otroštvu ali celo pred rojstvom. Tako patogene mutacije v genih *IL10*, *IL10RA* in *IL10RB* povzročijo monogenško dedno obliko KVČB (47, 96).



Slika 5: Vpliv genetskih in okoljskih dejavnikov tveganja na razvoj KVČB

Slika 5 prikazuje diagram vpliva genetskih in okoljskih dejavnikov tveganja za KVČB. Z leve proti desni naraščata starost nastopa bolezni in delež vpliva okoljskih dejavnikov tveganja medtem ko vpliv genetskih dejavnikov t na patogenezo KVČB upada. Povzeto in prirejeno po Okou, 2014. (97)

Pediatrične oblike KVČB predstavljajo širok spekter, od monogenetskih dednih bolezni do mladostniških kompleksnih oblik. Pri pediatričnih primerih kompleksnih bolezni se domneva, da je vpliv genetskih dejavnikov pomembnejši (višji), saj pediatrični bolniki

pogosto niso bili dovolj dolgo izpostavljeni okoljskim dejavnikom tveganja, da bi prispevek le-teh presegal prispevek genetskih dejavnikov (97). Genetika pediatričnih oblik KVČB ima torej poseben pomen za raziskovanje, saj je pričakovan pomemben vpliv patogenih genetskih dejavnikov. Vendar je bilo do sedaj opravljeno le manjše število asociacijskih študij celotnega genoma na izključno pediatričnih bolnikih s KVČB.

Prva asociacijska študija celotnega genoma pediatrične CD je identificirala dva lokusa (v genih *TNFRSF6* in *PSMGI*), vendar sta se lokusa kasneje izkazala kot statistično značilna tudi za odrasle kompleksne oblike CD(98). Ostrowski in sodelavci opisujejo obogatitev redkih patogenih genetskih sprememb pri otrocih s KVČB, ni pa odkrila novih genskih lokusov, ki bi bili značilni le za pediatrične oblike KVČB (99). Kasneje so Cleynen et al. opisali povezavo med nižjo starostjo ob postavitvi diagnozi in tremi že znanimi KVČB genskimi lokusi (v genih *MST1*, *NOD2* in *MHC*) (100). Prav tako asociacijska študija celotnega genoma pediatrične UC poroča o povečanem učinku lokusov v genih HLA-razreda v povezavi s patogenezo pediatrične UC (101).

1.1.5 Okoljski dejavniki tveganja

V svojem življenju je genetsko pogojen posameznik izpostavljen okoljskim dejavnikom tveganja, katerih seštevek v določenem življenjskem obdobju skupaj s prirojenimi genetskimi dejavniki doseže prag patogeneze KVČB. Na pomen okoljskih dejavnikov tveganja kaže tudi demografski podatek o porazdelitvi bolnikov po starosti ob diagnozi KVČB. Medtem ko 15 do 30 % bolnikov s KVČB oboli pred 20. letom starosti, v 70 do 85 % primerov bolezen nastopi po 20. letu starosti, najpogosteje med 20. in 40. letom starosti (43, 44). Študije opisujejo več okoljskih dejavnikov tveganja za patogenezo KVČB, med drugim kajenje (102, 103), prehranske navade razvitega sveta (104, 105), uporabo antibiotikov v otroštvu, odstranitev slepiča (105) in okužbe z določenimi patogenimi sevi bakterij (106). Pri tem je zanimiv podatek, da je kajenje dejavnik tveganja le za CD (102), pri UC pa študije navajajo opuščanje kajenja kot dejavnik tveganja, samo kajenje pa celo kot zaščitni dejavnik s terapevtskim učinkom, kar se opaža predvsem pri moških bolnikih z UC (107, 108).

Študije priseljencev v državah z visoko pojavnostjo kažejo na poseben pomen okoljskih dejavnikov tveganja v otroštvu, ko se imunski sistem in »toleranco« na mikroorganizme v črevesju še razvija. Pri prvi generaciji priseljencev je namreč pojavnost KVČB podobna kot

v izvorni državi, pri drugi generaciji pa je pojavnost bolj primerljiva s prebivalstvom v državi priselitve (109). Kljub značilnim razlikam v dednem zapisu priseljencev in domačega prebivalstva torej pojavnost KVČB pogojujejo v večini okoljski dejavniki tveganja. Študije opisujejo tudi presenetljivo podobnost fenotipov KVČB v različnih populacijah (110), kar bi pomenilo, da bolezen konvergira v isti fenotip ne glede na etnični izvor bolnika.

1.1.5.1 Črevesni mikroorganizmi in prehrana pri CD

Mišji modeli z okvarjenim izražanjem proteina interlevkina 10 (v nadaljevanju IL10) simulirajo monogeno dedno obliko KVČB z mutacijo v genu *IL10*. Brez IL10 miši zelo zgodaj razvijejo kronično vnetje kolona, ki je skladno z analognim fenotipom KVČB pri ljudeh (111). V kolikor pa miši s pomanjkanjem IL-10 od začetka življenja živijo v sterilnem okolju in uživajo sterilno hrano, se kronično vnetje kolona ne razvije, a se kolon vname kmalu po uživanju nesterilne hrane (112). Ker je prisotnost črevesnih mikroorganizmov nujen pogoj za patogenezo KVČB, bi sterilizacija prebavne cevi in uživanje sterilne hrane vodila do izboljšanja bolezenskega stanja ali celo do ozdravljenja, v kolikor niso prisotni avtoimunski procesi. Vendar ta pristop ni smiseln, saj so črevesni mikroorganizmi nujen del prebavne cevi, ki prispevajo k homeostazi črevesja, presnovi drugače neprebavljivih hranil, sintezi pomembnih kratkih maščobnih kislin in tudi obrambi pred nekaterimi patogenimi sevi mikroorganizmov (61, 68).

Procesi v prebavni cevi so posledica tesno prepletenega medsebojnega vplivanja črevesja, imunskega sistema, črevesnih mikroorganizmov in drugih okoljskih dejavnikov, npr. zaužitih hranil (68). Ta visoka raven soodvisnosti onemogoča enostavno opredeljevanje vzročnosti in otežuje iskanje ključnih patogenih sprememb. Vpliv črevesnih mikroorganizmov na prebavno cev in lokalne imunske celice je že dolgo znan, literatura v zadnjem desetletju opisuje tudi njihov sistemski vpliv na zdravje ljudi (113). Iz tega stališča lahko črevesne mikroorganizme razumemo kot podaljšek prebavnega traka ali celo kot dodaten človeški organ (114).

Spremenjen profil črevesnih mikroorganizmov je povezan s patogenezo mnogih kompleksnih bolezni in je opisan pri KVČB(68), revmatoidnem artritisu (v nadaljevanju tudi RA) (115, 116), Parkinsonovi bolezni (117), multipli sklerozi (118) in depresiji (119). Pri bolnikih s KVČB se spremenjeni profil črevesnih mikroorganizmov izrazi predvsem v povišani koncentraciji invazivnih sevov *Escherichia coli* (120) in bakterij iz rodov

Clostridium (121) in *Fusobacterium* (122) ter nižji koncentraciji bakterij iz rodov *Roseburia* in *Phascolarctobacterium* (121). Pri CD so pogosteje prisotne tudi bakterije rodov *Yersinia* in *Listeria* (123). Literatura opisuje tudi ugoden učinek nekaterih sevov bakterij na KVČB, ki spadajo v rodove *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* in *Faecalibacterium* (122). Za patogen profil črevesnih mikroorganizmov pri KVČB je značilno tudi zmanjšanje koncentracij kratkih maščobnih kislin, ki imajo pomembno vlogo pri homeostazi črevesja (124).

Zaužita hrana predstavlja pomemben okoljski dejavnik, ki neposredno vpliva na populacijski profil črevesnih mikroorganizmov z vnosom novih mikrobnih populacij in hranil. Za države z visoko pojavnostjo KVČB je značilna t.i. »zahodna dieta«, ki vsebuje mnogo preprostih sladkorjev, beljakovin, nasičenih in ω -6-maščobnih kislin ter malo vlaknin in ω -3-maščobnih kislin (125). Posledica visokih koncentracij preprostih sladkorjev in proteinov je hitro in nenadzorovano večanje populacije črevesnih mikroorganizmov, še posebej pa oportunističnih bakterijskih sevov (104, 125). Zmanjšan vnos vlaknin negativno vpliva na peristaltiko, izločanje blata in zmanjša bakterijsko sintezo kratkih maščobnih kislin (124). S spremenjenim profilom zaužitih maščobnih kislin so celični procesi v imunskem sistemu in v celicah krovne tkiva bolj dovzetni za vnetne procese (126, 127).

1.2 Diagnostični pristopi pri CD

Diagnostični pristopi pri CD temeljijo na opazovanju in spremljanju sprememb v črevesju. Pri tem je najpomembnejša diagnostična metoda kolonoskopija oziroma ileokolonoskopija, s katero se opišejo endoskopsko vidne spremembe sluznice in obseg vnetja v kolonu in ileumu. Pomanjkljivost metode je njena invazivna narava in posledično hudo nelagodje bolnika tudi ob uporabi anestezije. Problematična je tudi kvantifikacija ileokolonoskopije. Najpogosteje sta uporabljena endoskopska indeksa CDEIS (128) in SES-CD (129), pri določevanju deleža razširjenosti vnetja pa je prisotna določena mera subjektivnosti ocenjevalca.

Pri spremljanju obolenja v prebavni cevi je pomembna tudi magnetna resonanca (MR), posebej v primeru zapletov ali aktivne bolezni. MR-endografija je zelo natančna pri opisu striktur, fibroz (130), perianalnih simptomov (130) in lezij v tankem črevesju (131). Prav tako ima indeks aktivnosti bolezni za magnetno resonanco MaRIA natančnost, primerljivo s CDEIS pri določevanju odziva na terapijo (132). Omejitev pri uporabi magnetne resonance predstavljajo predvsem strošek uporabe in dostopnost preiskave.

Ultrazvok (UZ) trebuha služi predvsem kot podpora diagnostiki, saj kljub vse višji občutljivosti metoda ne dosega specifičnosti, da bi lahko neodvisno in natančno določila prisotnost KVČB. Vendar je slikovna metoda neinvazivna in njena visoka občutljivost je koristna pri zgodnjem odkrivanju zapletov ter rednem spremljanju že opisanih sprememb v črevesju (133).

V klinični praksi se uporablja več seroloških označevalcev. Praviloma jih uporabljajo predvsem za spremljanje bolezenske aktivnosti, ker imajo kot samostojni diagnostični označevalci premajhno občutljivost in specifičnost (134). Rutinsko se najpogosteje meri označevalec akutnega vnetja C-reaktivni protein (v nadaljevanju CRP) (135). Medtem ko vrednosti CRP v krvi ne korelirajo dobro z razširjenostjo vnetja v črevesju, pa le-ta dobro odraža stopnjo sistemskega vnetja in korelira z aktivnostjo bolezni (135). Pogosto merjen serološki označevalec vnetja je interleukin 6 (IL-6). Kljub dejstvu, da številni bolniki IL-6 ne izražajo, je natančen označevalec vnetja v podskupini bolnikov, ki ga izražajo (136). Pri opredeljevanju podtipa KVČB so koristni imunološki testi, kot so protitelesa proti nevtrofilcem (ANCA), protitelesa proti *S. cerevisiae* (ASCA), protitelesa proti proteinu C zunanje membrane (anti-Ompc) in protitelesa proti glikoproteinu 2 (anti-GP2) (137, 138). Uporabna označevalca vnetja v spodnji prebavni cevi sta tudi kalprotektin in lektoferin v blatu (139), ki bolje odražata vnetje v prebavilih kot serološki označevalci (140).

Za kvantifikacijo bolezenske aktivnosti CD je objavljenih več indeksov. Prvi takšen je bil CDAI-indeks (ang. *Crohn's Disease Activity Index*) (141). CDAI v osmih sklopih le na osnovi simptomov oceni aktivnosti bolezni. Kasneje je bil objavljen HBI-indeks (ang. *Harvey-Bradshaw index*). HBI je krajši od CDAI in ima le pet sklopov, med drugim tudi subjektivno oceno bolnikovega počutja (142). Guyatt et al. so leta 1989 objavili IBDQ-vprašalnik (ang. *Inflammatory Bowel Disease Questionnaire*), pri čimer so si prizadevali za podrobnejši opis bolnikovega počutja in učinka bolezni na socialne funkcije (143). IBDQ-vprašalnik je na voljo v številnih skrajšanih različicah (144). Bolezenska aktivnost se lahko spremlja tudi s CDEIS ali SES-CD endoskopskimi indeksi.

Tabela 3: Indeksi bolezenske aktivnosti pri CD in opredelitev pragov aktivnosti

| Indeks | Opredelitev pragov aktivnosti bolezni | | Opredelitev kliničnega odziva na terapijo |
|--------|--|-------------------------------|--|
| HBI | < 5 | remisija | Zmanjšanje vrednosti HBI za 3 |
| | od 5 do 7 | blaga aktivnost | |
| | od 8 do 16 | srednja aktivnost | |
| | > 16 | visoka aktivnost | |
| CDAI | ≤ 150 | remisija | Zmanjšanje vrednosti CDAI za 70 ALI 25 % zmanjšanje v kolikor je CDAI > 220 |
| | od 151 do 219 | blaga aktivnost | |
| | od 220 do 450 | srednja aktivnost | |
| | > 450 | visoka aktivnost | |
| IBDQ | Razvrstitev je odvisna od različice vprašalnika in želene senzitivnosti/specifičnosti. | | Zmanjšanje vrednosti IBDQ za 16 do 32 |
| CDEIS | < 3 | remisija | Zmanjšanje vrednosti CDEIS za 50 % |
| | od 3 do 8 | blaga endoskopska aktivnost | |
| | od 9 do 12 | srednja endoskopska aktivnost | |
| | > 12 | visoka endoskopska aktivnost | |
| SES-CD | od 0 do 2 | remisija | Zmanjšanje vrednosti SES-CD za 50 % |
| | od 3 do 6 | blaga endoskopska aktivnost | |
| | od 7 do 15 | srednja endoskopska aktivnost | |
| | > 15 | visoka endoskopska aktivnost | |

V literaturi so opisane korelacije med ocenami HBI, CDAI in IBDQ. Irvine in sodelavci so leta 1994 objavili korelacijo med IBDQ- in CDAI-kriteriji z naslednjo linearno enačbo (145):

$$IBDQ = -0,24 \times HBI + 205,2$$

Nato so Vermeire in sodelavci leta 2010 objavili korelacijo med HBI- in CDAI-kriteriji z naslednjo enačbo(146):

$$CDAI = 22,222 \times HBI + 66,667$$

Na osnovi teh objavljenih enačb je možno pretvarjati tudi med IBDQ in CDAI na osnovi zapisane enačbe:

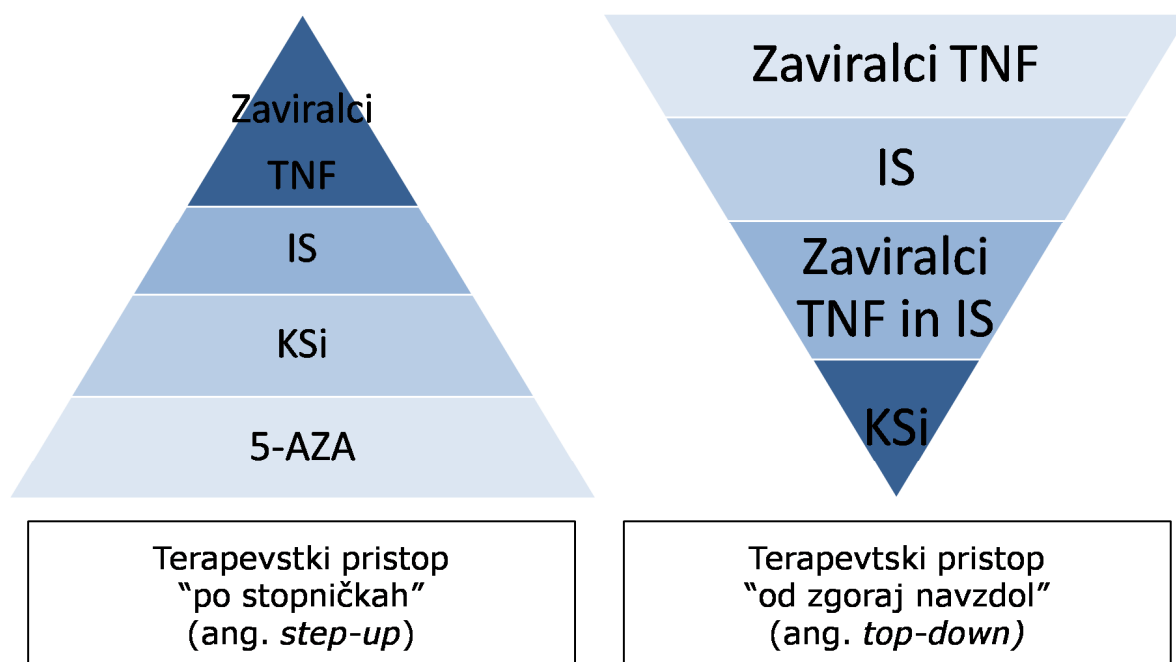
$$HBI = -0,188 \times IBDQ + 35,484$$

1.3 Terapevtski pristopi

CD je kronična bolezen, ki je ni možno popolnoma ozdraviti, vendar je s primerno terapijo možno lajšati simptome in doseči tudi daljša obdobja minimalne bolezenske aktivnosti oziroma t.i. remisijo. V nadaljevanju bodo opisani terapevtski pristopi, temelječi na osnovi najnovejših priporočil, ki sta jih opisali združenji European Crohn's and Colitis Organization (ECCO) (147) in British Society of Gastroenterology (148).

Klasični ustaljeni terapevtski pristop se pri CD deli na več ravni, terapija pa se stopnjuje glede na aktivnost bolezni in odziv na uporabljene učinkovine. Terapija prve izbire so 5-aminosalicilati (v nadaljevanju 5-ASA), naslednja terapevtska stopnja zajema uporabo kortikosteroidov (v nadaljevanju KSi) in tudi imunosupresivov (v nadaljevanju IS), pri tem pa se lahko sočasno uporabljajo tudi antibiotiki. V kolikor se na navedene učinkovine bolnik ne odziva dovolj dobro ali pa obstajajo kontraindikacije, je naslednja terapevtska stopnja uporaba bioloških zdravil. Trenutno je za CD na voljo več različnih bioloških zdravil, od teh so najbolj pogosto uporabljeni in najštevilčnejši zaviralci TNF, na voljo so tudi protitelesa proti integrinu $\alpha 4\beta 7$ (149, 150) in protitelesa proti interlevkinu 12 in 23 (151). V kolikor je aktivnost bolezni visoka in nenadzorovana ali pa se pojavijo hudi zapleti, so potrebni operativni posegi za odstranitev in resekcijo prizadetega, običajno stenotičnega dela črevesja. Verjetnost, da bo bolnik v obdobju deset let po potrditvi diagnoze CD potreboval vsaj en operativni poseg, je 47 % (152).

Zgoraj opisani klasični terapevtski pristop je poimenovan »stopnjevalni« ali »po stopničkah« (ang. *step-up*). Opisan je tudi drug, sodobnejši pristop, ki se imenuje »od zgoraj navzdol« (ang. *top-down*). Pri tem pristopu se v primeru srednje aktivne ali visoko aktivne CD prične zdravljenje z uporabo bioloških zdravil takoj. Terapija se nato lahko kombinira s souporabo imunosupresivov in se še dodatno stopnjuje s kortikosteroidi in/ali 5-aminosalicilati. Ta pristop je namenjen hitremu doseganju izboljšanja, v izogib dlje časa trajajoči aktivni bolezni, ki bi vodila do potrebe po operativnih posegih in daljših obdobjih uporabe kortikosteroidov ali imunosupresivov.



Slika 6: Ustaljeni terapevtski pristopi pri zdravljenju KVČB

Slika 6 prikazuje shemo stopnjevanja pri ustaljenih terapevtskih pristopih (na levi) in novih pristopih, priporočenih za stopnjevanje terapije (na desni). Bolniki v skladu s piramido na levi pričnejo terapijo spodaj in jo stopnjujejo navzgor, pri obrnjeni piramidi na desni pa se zdravljenje prične na vrhu in stopnjevanje poteka proti dnu. Povzeto in prirejeno po Tsui, 2018 (153).

Poleg uporabe farmacevtskih učinkovin ima pri nadzoru simptomov CD posebno vlogo dieta. Bolniki s CD se namreč med aktivno boleznijo pogosto izogibajo obrokom ali pa pojedjo manj, kot zahteva njihov metabolizem in življenjski slog, saj s tem zmanjšajo intenzivnost simptomov, kot so driska, slabost in bolečina v trebuhu. Kronični vnetni procesi v prebavni cevi prav tako vodijo do slabe absorpcije hranil, kar skupaj s pomanjkljivim prehranjevanjem vodi do splošne podhranjenosti. Priporočila European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) (154) poudarjajo redno spremljanje telesne teže in ravni mikrohranil (npr. železa, kalcija in vitamina D) za zgodnje odkrivanje podhranjenosti. Razen preprečevanja podhranjenosti ima klinična prehrana tudi terapevtske učinke. Pri CD z blago do zmerno aktivnostjo je možno lajšati simptome z dieto z minimalnim ostankom, ki vsebuje lahko prebavljiva živila z zelo malo vsebnostjo vlaknin, kar zmanjša volumen blata in omogoča hitrejši prehod skozi prebavno cev ter posledično zmanjša obremenjenost prebavne

cevi. Čeprav lahko prilagojena dieta z živili lajša simptome CD, nima zadostnega terapevtskega učinka in društvo ESPEN poudarja, da trenutno ni diete z živili, ki bi zanesljivo skrajšala trajanje bolezenskega zagona.

V kolikor dieta z živili ni zadostna, mora bolnik prejeti hranila po enteralni ali parenteralni poti. Enteralna prehrana je učinkovita pri preprečevanju podhranjenosti pri CD, prav tako pa ima terapevtske učinke. ESPEN priporoča sočasno uporabo enteralne prehrane ob terapiji s farmacevtskimi učinkovinami, saj bistveno zmanjša aktivnost prebavne cevi in omogoča pospešeno celjenje ran. Če izključno enteralna prehrana ni zadostna ali pa obstajajo kontraindikacije za povečanje volumna enteralne prehrane, lahko bolnik hranila prejme delno ali popolnoma po parenteralni poti. Parenteralna prehrana je indicirana predvsem pri najhujših oblikah CD in CD z mnogimi zapleti. Kljub terapevtski učinkovitosti enteralne in parenteralne prehrane ob terapiji s farmacevtskimi učinkovinami društvo ESPEN le-te ne priporoča za dolgoročno ohranjanje nizke bolezenske aktivnosti ali kot samostojne terapije pri odraslih bolnikih s CD (154).

Priporočila ESPEN (154) glede enteralne in parenteralne prehrane se za pediatrične bolnike razlikujejo, saj je pri omenjenih bolnikih enteralna prehrana kot samostojna terapija ob nastopu bolezni in njenih ponovnih zagonih zelo priporočljiva. Pri pediatričnih bolnikih ima enteralna prehrana primerljivo učinkovitost kot KSi pri sprožanju remisije, z značilno manj stranskimi učinki (155-157). Ob nezadostnem odzivu na enteralno prehrano se lahko terapija stopnjuje z delno ali popolno parenteralno prehrano, ki naj traja vsaj 7 dni, preden se prične ustaljen terapevtski pristop s farmacevtskimi učinkovinami (156, 158). Priporočila ESPEN so skladna s priporočili društev European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) in European Society of Paediatric Research (ESPR), ki prav tako poudarjajo uporabo enteralne in parenteralne prehrane kot prve terapije pri pediatrični KVČB (159, 160).

1.3.1 Biološka zdravila

Biološka zdravila so po zakonodaji Evropske unije opredeljena kot zdravila, ki vsebujejo eno ali več aktivnih učinkovin biološkega izvora. Po tej opredelitvi so biološka zdravila vse snovi, izolirane iz živih organizmov, torej kri, izolati iz krvi, celice, tkiva, cepiva, bakterije, virusi in terapevtske beljakovine (161). V ožjem pomenu se besedna zveza »biološko

zdravilo« uporablja za terapevtske rekombinantne proteine, kot so na primer monoklonska protitelesa.

Pred razvojem bioloških zdravil so bile v klinični uporabi skoraj izključno kemično sintetizirane učinkovine, t.i. »male molekule«. Za male molekule so značilni pogosti neželeni stranski učinki, ki so posledica delovanja ne samo na molekularno tarčo, ampak tudi nadruge biološke procese (162). Z razvojem tehnologije rekombinantnih proteinov pa je možno oblikovati in sintetizirati biološko zdravilo, ki ciljano deluje na izbrano molekularno tarčo (163). Uporaba bioloških zdravil je omogočila učinkovito zdravljenje številnih vrst raka, monogenih dednih bolezni in imunsko pogojenih bolezni.

Vendar imajo tudi biološka zdravila kljub tarčnemu delovanju in visokemu terapevtskemu potencialu v praksi več omejitev. Pri zdravljenju z biološkimi zdravili se lahko pojavijo hudi neželeni stranski učinki zaradi intenzivnega delovanja na terapevtsko tarčo ali imunogenosti učinkovine, kar se najpogosteje kaže kot preobčutljivost na mestu infuzije (3).

Strošek zdravljenja z biološkimi zdravili je visok, kar je posledica visokih stroškov razvoja učinkovin, proizvodnih procesov in potrebnih kliničnih raziskav, preden se zdravilo lahko pojavi na trgu (164). Načeloma cena učinkovin bistveno pade, ko patent originalne učinkovine poteče in postane učinkovina generična. Za vstop generične male molekule na trg je potrebno dokazati samo identičnosti molekulske strukture, za biološka zdravila pa je potrebno dokazati podobnost strukture in učinka v celičnih modelih ter nato še ekvivalentni učinek dokazati s klinično študijo (165). Iz tega razloga generična biološka zdravila v klasičnem pomenu ne obstajajo, ampak se uporablja izraz »podobna biološka zdravila« (v literaturi je uveljavljen izraz »biosimilarji«). Strošek razvoja podobnega biološkega zdravila ostaja znaten, zato se strošek zdravljenja z biološkimi zdravili bistveno ne zmanjša po poteku patenta originalne učinkovine (165).

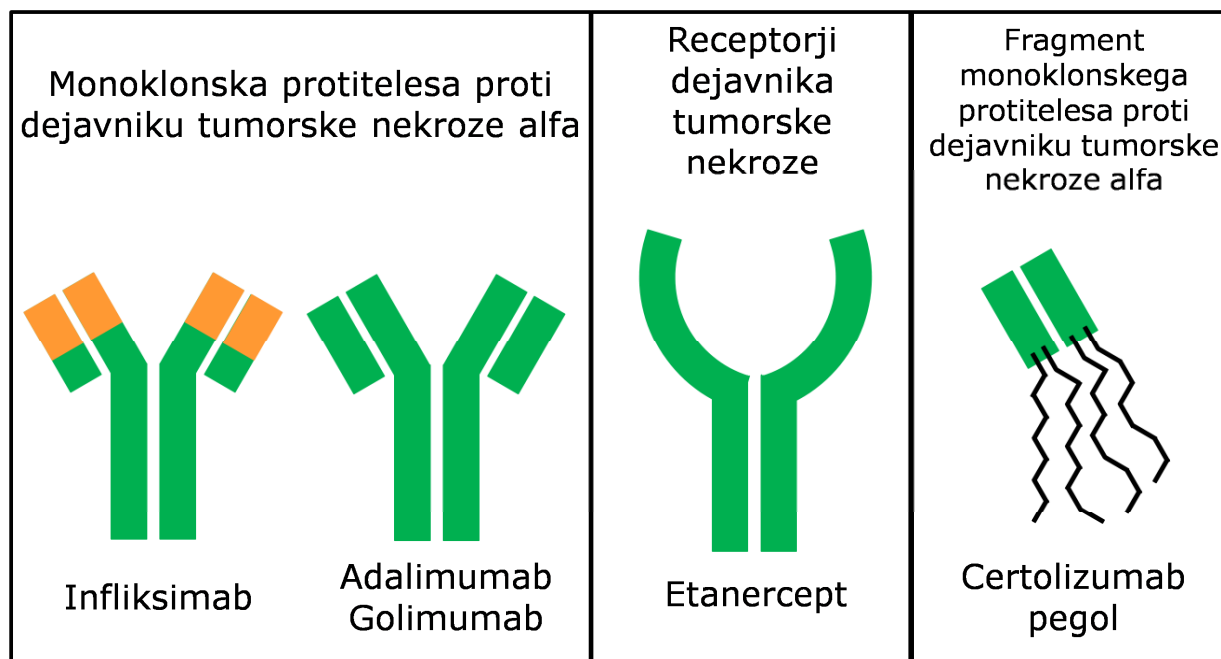
Pri zdravljenju z biološkimi zdravili ima poseben pomen pojav neodzivnosti (5). Prva biološka zdravila so imela v celoti ali delno aminokislinska zaporedja drugih živalskih vrst in so bila posledično zelo imunogena, zato se je neodzivnost pripisovala predvsem oblikovanju protiteles proti nečloveškim aminokislinskim zaporedjem v biološkem zdravilu. Vendar se protitelesa proti biološkim zdravilom pojavljajo tudi pri učinkovinah, ki imajo v celoti človeška aminokislinska zaporedja (5, 148). Pogost je tudi pojav neodzivnosti že ob prvem ciklu terapije, brez prisotnosti protiteles proti biološkemu zdravilu. V klinični praksi neodzivnost bolnika na biološka zdravila predstavlja izgubo nadzora nad boleznijo, omejene terapevtske možnosti, nepotrebno izpostavljanje bolnika potencialnim hudim stranskim

učinkom biološkega zdravila, kot tudi neučinkovito porabo drage biološke učinkovine in breme za zdravstveno blagajno (5, 148).

1.3.1.1 Zaviralci dejavnika tumorske nekroze

Carswell et al. so leta 1975 prvi opisali tumor nekrotizirajoči faktor alfa (v nadaljevanju TNF) kot dejavnik tumorske nekroze, prisoten v serumu (166). TNF je protein, ki ima v človeškem telesu izrazit vpliv na vnetne procese in je eden izmed prevladujočih regulatorjev imunskega sistema. Za CD so značilni povišano izražanje TNF in motnje v regulaciji bioloških sistemov, povezanih s TNF (4). Iz tega razloga imajo biološka zdravila, ki delujejo proti TNF, izrazit terapevtski učinek v CD. Razvoj zaviralcev TNF je bistveno prispeval k uspešnemu nadzoru bolezenskih simptomov v CD, pogostejši in daljši remisiji bolezni ter zmanjšani potrebi po operativnih posegih (3).

Prvi zaviralec TNF na trgu je bil infliksimab (komercialno ime Remicade®). Infliksimab je himerno monoklonsko IgG1-protitelo, sestavljeno iz mišjih variabilnih Fab-delov in človeškega konstantnega Fc-dela (167). Delež mišjih aminokislinskih zaporedij znaša pribl. 25 %, kar prispeva k imunogenosti na učinkovine. Le nekaj mesecev po infliksimabu je bil na voljo že drug zaviralec TNF, etanercept (komercialno ime Enbrel®). Etanercept je popolnoma človeški sintetični protein, sestavljen iz TNF-receptorja in neposredno vezanega konstantnega Fc-dela IgG1-protitelesa (168). Infliksimabu in etanerceptu je sledil adalimumab (komercialno ime Humira®), ki je popolnoma človeško IgG1-protitelo proti TNF (169). Nato se je na trgu pojavil certolizumab pegol (komercialno ime Cimzia®), ki je počlovečen variabilni Fab-del IgG1-protitelesa s polietilenglikolnim (PEG) repom (170). Kasneje je bil na voljo tudi golimumab (komercialno ime Simponi®), ki je, podobno kot adalimumab, popolnoma človeško IgG1-protitelo proti TNF, vendar je bila učinkovina sintetizirana z drugim postopkom (171). Leta 2013 je bilo v EU na voljo prvo infliksimabu podobno biološko zdravilo, poimenovano CT-P13 (172) (komercialno ime Remsima®), leta 2018 pa prvo adalimumabu podobno biološko zdravilo pod komercialnim imenom Hyrimoz® (173). Zaviralci TNF so bili sprva preizkušeni v kliničnih študijah za zdravljenje revmatoidnega artitisa, kasneje pa še pri bolnikih s CD, in sicer z novimi kliničnimi študijami ali z ekstrapolacijo v primeru podobnih bioloških zdravil. Za zdravljenje CD so registrirani vsi zaviralci TNF, razen etanercepta, ki pri CD nima zadostnega terapevtskega učinka. Iz klinične prakse je objavljenih več poročil o tem, da lahko uporaba etanercepta izzove KVČB (174).



Slika 7: Shema molekularne strukture zaviralcev TNF

Slika 7 prikazuje shemo strukture zaviralcev TNF. Od leve proti desni so na sliki prikazana biološka zdravila infliximab, adalimumab oziroma golimumab, etanercept in certolizumab pegol. Z zeleno barvo so označena človeška aminokislinska zaporedja, z oranžno pa mišja. Pri certolizumabu pegol je s črno označen polietilenglikolni rep. Povzeto in prirejeno po Weir, 2006. (175)

1.4 Napovedovanje odziva na zaviralce TNF

Neodzivnost na biološka zdravila lahko nastopi ob prvem ciklu terapije (v nadaljevanju primarna neodzivnost) ali pa se odziv sčasoma izgubi (v nadaljevanju sekundarna neodzivnost). V teoriji imajo primarno neodzivni bolniki molekularno patogenezo preko biološke poti, na katere učinkovina ne vpliva, sekundarna neodzivnost pa nastane zaradi protiteles proti biološkemu zdravilu ali spremembe molekularnega poteka bolezni (4, 176, 177).

Molekularni mehanizmi neodzivnosti na zaviralce TNF še vedno niso dobro pojasnjeni. Schmitt et al. so izpostavili pomen črevesnih celic TNFR2⁺ IL23R⁺ T, ki oblikujejo odpornost na zaviralce TNF na molekularni ravni, pri tem pa izpostavili pomen IL-23 pri nastanku neodzivnosti (178). Vzroke za neodzivnost je možno deloma pripisati strukturnim in farmakološkim lastnostnim bioloških zdravil. Zaviralci TNF se lahko razgradijo s

proteinskim katabolizmom, s procesi, povezanimi z vezanjem protiteles na Fc-receptorje, ali pa s lizosomsko razgradnjo po vezanju na membranski TNF (179-181).

Znano je, da imajo pri odzivnosti na zaviralce TNF pri CD pomemben vpliv klinične značilnosti bolezni. Literatura opisuje kot pomemben dejavnik neodzivnosti na zaviralce TNF prodiranje učinkovine skozi razjede v črevesni sluznici in posledično izločanje biološkega zdravila v blatu. Študije potrjujejo hipotezo o izločanju učinkovine v blato na osnovi opažanj slabšega odziva v primeru visoke bolezenske aktivnosti in zelo razširjenih razjed črevesne stene (182-185). Pomembna sta tudi dominantni fenotip in lokacija bolezni po Montrealski klasifikaciji (186), kot tudi trajanje bolezni, pri čemer je krajše trajanje bolezni povezano z odzivnostjo (187, 188). Z dobrim odzivom na zaviralce je povezana tudi souporaba kortikosteroidov in imunosupresivov (189). Neodzivnost na zaviralce TNF je pogosta pri pediatričnih bolnikih (190, 191), medtem ko je pri odraslih bolnikih nižja starost povezana z dobrim odzivom na zaviralce TNF (192).

Najbolje opisan serološki dejavnik neodzivnosti na zaviralce TNF so protitelesa proti biološkemu zdravilu. Z merjenjem protiteles proti zaviralcem TNF (193, 194) in ravni učinkovine v krvi (195) je mogoče med zdravljenjem optimizirati terapijo s povečanjem odmerka biološkega zdravila ali krajšanjem intervala med aplikacijami in natančneje oceniti verjetnost dobrega odziva. Drugi serološki napovedniki odziva so visok CRP ob pričetku terapije (196, 197), upadanje laktoferina v blatu med terapijo (198) in prisotnost ter podtip protiteles proti nevtrofilcem (199, 200).

Kljub temu klinični napovedni označevalci odziva na zaviralce TNF niso zadostni za natančno napoved odziva pred pričetkom terapije. Zaradi problematike neodzivnosti je nastala potreba po novih bioloških označevalcih odziva na molekularni ravni. Na genetski ravni je objavljenih že več genetskih označevalcev odziva na učinkovine, ki so »male molekule«, med njimi so najbolj opisani geni, ki zapisujejo citokrome P450(201). V klinični praksi je tudi že nekaj bioloških označevalcev odziva na biološka zdravila. Tako se v primeru cetuksimaba določi *KRAS*-genotip primarnega tumorja, saj bo cetuksimab učinkovit le, če v genu *KRAS* ni mutacij (202, 203). Podobno se v vzorcu tkiva raka dojke izmeri izražanje HER2-receptorja za določevanje učinkovitosti trastuzumaba (204).

Med najpogosteje raziskanimi biološkimi označevalci za napoved odziva na zaviralce TNF so polimorfizmi posameznega nukleotida (v nadaljevanju SNP) v genih, povezanih z izražanjem TNF, npr. v genih *NFKB1*, *TNF*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1A* in *IL1B* (205). Kasneje je bilo objavljenih več genetskih označevalcev odziva v genih, ki niso neposredno povezani

z izražanjem TNF, npr. *ATG16L1* (206). Vendar pa posamezni biološki označevalci odziva na zaviralce TNF nimajo zadostne natančnosti za napovedovanje odziva. Iz tega razloga se biološki označevalci odziva združujejo v kompleksnejše napovedne modele. Arijs et al. so objavili profil izražanja petih bioloških označevalcev (geni *TNFAIP6*, *S100A8*, *IL11*, *G0S2* in *S100A9*) v črevesni sluznici za napovedovanje odziva na infliksimab pri CD (207), kasneje je bila natančnost tega profila potrjena tudi za adalimumab v neodvisni kohorti (208). Natančnost napovednih modelov na osnovi ene ravni bioloških podatkov je lahko omejena, zato je v zadnjih letih objavljenih vse več raziskav, v katerih je združenih več ravni bioloških podatkov. Integracija več ravni bioloških podatkov omogoča odkrivanje skritih sinergij med različnimi ravnmi podatkov in tako izboljša napovedno moč modela (209, 210).

2 Raziskovalna metodologija

2.1 Namen doktorske disertacije

Namen doktorske disertacije je:

- celostno pregledati, zbrati in kritično preučiti že objavljene biološke označevalce odziva na zaviralce TNF pri CD;
- podrobno preučiti biološke procese odzivnosti na zaviralce TNF pri CD z uporabo tako *in silico* kot tudi *in vitro* pristopov;
- oblikovati klinično uporaben napovedni model odzivnosti na zaviralce TNF pri CD z naprednimi statističnimi metodami.

2.2 Cilji doktorske disertacije

Cilj doktorske disertacije je:

- celostno raziskati genomiko in transkriptomiko odzivnosti oz. neodzivnosti na zdravljenje z zaviralci TNF pri bolnikih s CD;
- integrirati več ravni bioloških označevalcev in kliničnih podatkov ter na osnovi teh povezav natančno določiti napovedno moč označevalca odziva na zaviralce TNF pri bolnikih s CD z uporabo metod strojnega učenja;
- rezultate integracije bioloških označevalcev dodatno analizirati z uporabo orodij genske ontologije in podrobneje preučiti biološke mehanizme, ki prispevajo k odzivnosti bodisi neodzivnosti na zdravljenje z zaviralci TNF pri bolnikih s CD;
- na osnovi rezultatov analize genske ontologije dodatno pojasniti statistično značilno obogatene signalne poti na ravni proteinov na relevantni in že dobro okarakterizirani celični liniji, ki izraža TNF (npr. Jurkat, HL-60 ali THP-1).

2.3 Teze doktorske disertacije

1. Variabilnost v posameznih bioloških procesih in molekularnih mehanizmih močno pogojuje primarno neodzivnost in nastanek sekundarne neodzivnosti na zaviralce TNF pri bolnikih s CD.
2. Biološki označevalci (genske variante in profil izražanja genov) so povezani z odzivnostjo na zaviralce TNF pri bolnikih s CD in so uporabni kot napovedni označevalci odziva.
3. Z združevanjem več ravni bioloških in kliničnih podatkov je možno z metodami strojnega učenja oblikovati kombinacijo označevalcev odziva na zaviralce TNF z napovedno močjo, ki je uporabna za klinične aplikacije.
4. Na ravni celičnih modelov je možno z rezultati genske ontologije in biološkimi označevalci odziva pojasniti biološke procese, ki pogojujejo odzivnost na zaviralce TNF.

2.4 Pričakovani izvorni znanstveni prispevek

V naši študiji pričakujemo, da bomo prepoznali nove biološke označevalce odziva oziroma novo integrirano kombinacijo bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF pri CD. Prav tako pričakujemo, da bi z novimi biološkimi označevalci odziva lahko bolje razumeli biološke procese, ki prispevajo k odzivnosti oziroma neodzivnosti na zaviralce TNF.

Pričakovani rezultati naše študije bodo k znanosti prispevali z identifikacijo novih bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF, s čimer bo možno še pred uvedbo biološkega zdravila bolje oceniti pričakovan odziv bolnika na zaviralce TNF. Natančnejša napoved odziva bi tako prispevala k uresničevanju principov natančne (»personalizirane«) medicine, povečanju uspešnosti terapije in zmanjševanju bremena za zdravstveno blagajno. Z boljšim razumevanjem bioloških procesov, ki pogojujejo neodzivnost na zaviralce TNF, pa bi bilo možno razviti nove terapevtske učinkovine ali oblikovati nove terapevtske pristope.

2.5 Predpostavke in morebitne omejitve raziskovalnega dela

Raziskava je primarno omejena s številom bolnikov, ki prejemajo zaviralce TNF (do največ 150), s tem je omejena statistična moč raziskave. Prav tako metode strojnega učenja potrebujejo množice podatkov popolnoma brez manjkajočih vrednosti (ang. »missing values«), kar bi potencialno pomenilo izključitev atributa/značilnosti (npr. genetskega označevalca ali kliničnega parametra) iz osnovne podatkovne baze za učenje napovednega modela.

2.5.1 Kriteriji za vključitev bolnikov v študijo

V raziskavo smo dodatno vključili še nove bolnike s CD, ki se zdravijo z zaviralci TNF. Za zdravljenje z zaviralci TNF in morebitno vključitev v študijo morajo bolniki s klinično in histopatološko potrjeno diagnozo CD izpolnjevati enega od naslednjih kriterijev:

- nezadosten odgovor na dva ali več kombinacij ustaljene terapije (aminosalicilati, kortikosteroidi in/ali imunosupresivi);
- srednje huda in huda CD, kjer se pri stalnem zdravljenju z ustaljeno terapijo pojavijo hudi neželeni učinki;
- izjemoma po presoji konzilija za odobritev terapije z zaviralci TNF v primeru zelo akutnega poteka bolezni.

2.5.2 Kriteriji za izključitev bolnikov iz študije

Izključitveni kriteriji za študijo bodo sledeči:

- neželeni stranski učinki na zaviralce TNF med zdravljenjem;
- resni zapleti Crohnove bolezni (stenoze, simptomatske obstruktivne in intestinalne strikture, ognojki, totalna kolektomija);
- resne okužbe v zadnjih treh letih;
- pozivni test na tuberkulozo ali aktivna tuberkuloza;
- maligne bolezni;
- nosečnost in dojenje;
- listerioza;
- pozitiven test na HIV;

- dokazana zloraba drog in alkohola;
- sladkorna bolezen;
- zmerno do hudo srčno popuščanje.

Opisani vključitveni oz. izključitveni kriteriji se skladajo s kriteriji za že vključene bolnike s CD, za katere so na voljo klinični in genetski podatki.

2.5.3 Preiskovanci

V raziskavi smo uporabili vzorce 102 bolnikov s CD, ki so bili vključeni v preliminarno farmakogenetsko študijo, za katero smo pridobili mnenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko pod šifro KME 80/10/07, 21p/12/07 (206). Dodatno smo v raziskavo vključili 6 novih preiskovancev, ki se zdravijo z zaviralci TNF. Za novo vključene preiskovance smo pridobili mnenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko pod šifro KME 0120-194/2019/4. Kot kontrolno skupino smo izbrali podskupino obstoječe množice vzorcev 390 zdravih prostovoljcev.

2.6 Materiali in metode *in silico* študije

2.6.1 Iskanje literature in bioloških označevalcev

Pri sistematskem iskanju literature smo uporabili podatkovno zbirko PubMed (NCBI, Bethesda, Maryland, ZDA). Pri izboru iskalnih nizov oziroma ključnih besed smo uporabili izraze, zabeležene v podatkovni zbirki sinonimov MeSH (NCBI, Bethesda, Maryland, ZDA). V kolikor v zbirki MeSH pojmi niso bili zadostno opredeljeni ali niso bili dlje časa uporabljeni v literaturi, smo iskalne nize razširili s preprostimi ključnimi besedami.

2.6.1.1 Iskanje vzročnih genov za pediatrične oblike KVČB

Pri iskanju literature z objavljenimi vzročnimi geni za pediatrične oblike KVČB v podatkovni zbirki PubMed smo uporabili naslednjo kombinacijo ključnih besed:

- ("Inflammatory Bowel Diseases"[Mesh] OR "Pediatric Crohn's disease" [Supplementary Concept] OR "pediatric inflammatory bowel disease" OR "Crohn Disease"[Mesh] OR "Colitis, Ulcerative"[Mesh] OR indeterminate colitis) AND

- ("Pediatrics"[Mesh] OR "Mendelian" OR "neonatal" OR "infantile" OR "very early onset" OR "early onset") AND
- ("Genetics"[Mesh] OR "gene" OR "heritability" OR "heritable").

Iskanje literature smo nato še razširili v podatkovnih zbirkah OMIM in NCBI GTR (NCBI, Bethesda, Maryland, ZDA) ter ORPHANET(211) z naslednjimi ključnimi besedami:

- pediatric inflammatory bowel disease,
- pediatric indeterminate colitis,
- pediatric Crohn's disease,
- pediatric ulcerative colitis,

Vključitveni kriteriji za študije o vzročnih genih za pediatrične oblike KVČB so bili naslednji:

- bolezen ustreza opisu ali ima klinično sliko, skladno s KVČB, CD, UC ali IC;
- pri opisani bolezni se simptomi v veliki večini primerov (več kot 90 %) prvič pojavijo pred 18. letom starosti;
- v literaturi je starost ob nastopu bolezni jasno in natančno opisana;
- opisana bolezen je potrjeno dedna bolezen in ima visoko penetranco (več kot 90 %);
- bolezen je povezana z mutacijami v znanem genu oziroma genskem lokusu.

Iskanje literature v podatkovni zbirki je potekalo decembra 2018, vključene so bile študije, objavljene od januarja 1984 do decembra 2018.

2.6.1.2 Izbor bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF

Pri iskanju literature z objavljenimi biološkimi označevalci odziva na zaviralce TNF smo uporabili kombinacijo tematskih sklopov ključnih besed:

- ("Infliximab"[Mesh] OR Adalimumab"[Mesh] OR "Etanercept"[Mesh] OR "golimumab" [Supplementary Concept] OR "Certolizumab Pegol"[Mesh] OR "Tumor Necrosis Factor-alpha/antagonists and inhibitors"[Mesh] OR "anti-tumor necrosis factor" OR ("Tumor Necrosis Factor-alpha"[Mesh] AND "Antibodies, Monoclonal"[Mesh]) OR ("tumor necrosis factor-alpha inhibitor") OR ("Tumor Necrosis Factor-alpha"[Mesh] AND "Biosimilar Pharmaceuticals"[Mesh]) OR

"TNFA inhibitor" OR "TNF inhibitor" OR "Anti-TNF therapy" OR "Anti-TNFA therapy" OR "TNFi") AND

- ("Treatment Outcome"[Mesh] OR "predictor" OR "responder" OR "nonresponder" OR "non-responder" OR "Biomarkers"[Mesh] OR "biological marker" OR "therapy response" OR "response biomarker" OR "outcome biomarker" OR "response predictor" OR "outcome predictor") AND
- ("Genetics"[Mesh] OR "genetics"[Subheading] OR "Genomics"[Mesh] OR "Genome"[Mesh] OR "SNP" OR "CNV" OR "Transcriptome"[Mesh] OR transcriptomics OR (RNA AND expression) OR "Proteome"[Mesh] OR proteomics OR (protein AND expression)) AND
- NOT ("tocilizumab" OR "Dose-Response Relationship, Drug"[Mesh] OR dose OR dosing).

Pri iskanju bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF smo kot ključne besede za kronično vnetno črevesno bolezen oziroma za revmatoidni artritis navedli:

- kronična vnetna črevesna bolezen: ("Inflammatory Bowel Diseases"[Mesh] OR "Crohn Disease"[Mesh] OR "Colitis, Ulcerative"[Mesh] OR indeterminate colitis);
- revmatoidni artritis: ("Arthritis, Rheumatoid"[Mesh] OR ("Rheumatoid" AND "Arthritis"))).

Vključitveni kriteriji za študije o bioloških označevalcih odziva na zaviralce TNF so bili naslednji:

- odzivnost oziroma neodzivnost na zaviralce TNF je jasno opredeljena z že objavljenimi in ustaljenimi kriteriji za merjenje aktivnosti bolezni (npr. vprašalnik IBDQ za KVČB, DAS28 za revmatoidni artritis);
- biološki označevalci so bili merjeni pred uvedbo terapije;
- kvantitativni biološki označevalci imajo jasno opredeljeno smer asociacije ali pa imajo »robustno metodo« normalizacije vrednosti parametrov.

Iskanje literature v podatkovni zbirki je potekalo novembra 2018, študije so bile objavljene od januarja 2004 do novembra 2018.

2.6.2 Metoda genske ontologije

Genska ontologija (v nadaljevanju GO) je bioinformatična iniciativa za poenotenje opisa funkcije genov. Funkcija posameznega gena je opredeljena na osnovi objavljenih funkcijskih študij genov s strogo hierarhijo nadpomenk in podpomenk. Podatkovna zbirka genske ontologije se redno posodablja in predstavlja aktualen in celosten opis funkcije genov. S pomočjo podatkovne zbirke pojmov GO je možno sistematično osmisliti seznam genov in primerjati več seznamov genov med sabo. Programska orodja GO lahko tudi opredelijo, ali je frekvenca pojavnosti pojma GO med geni v seznamu statistično značilna glede na seznam genov in frekvence v vseh znanih genih.

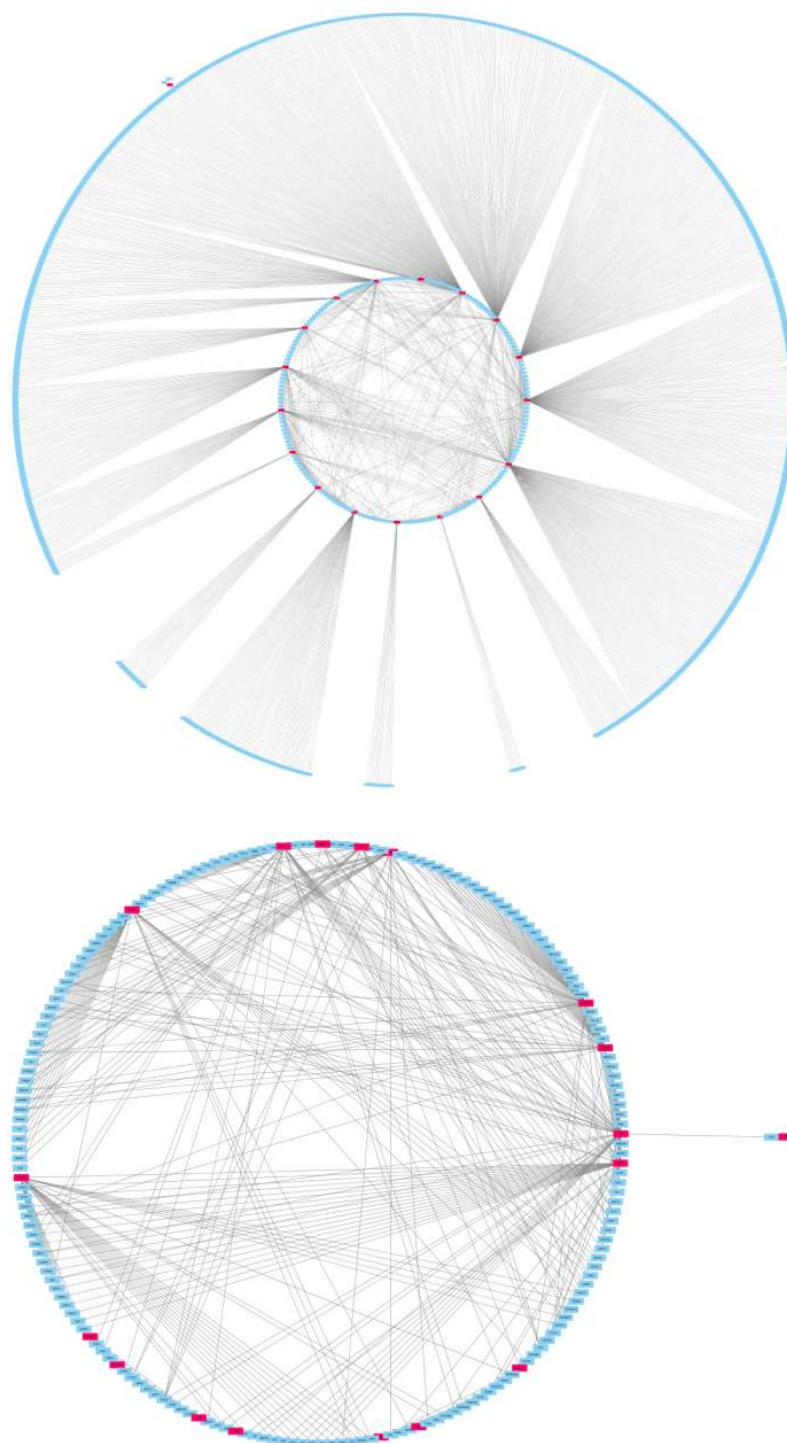
Pri oblikovanju mrež genov oziroma bioloških označevalcev smo uporabili podatkovno zbirko BIOGRID (212, 213) in programsko orodje CytoScape (214) (različico 3.7.0). Za analize posameznih seznamov genov, mrež genskih interakcij in za primerjalno analizo GO smo uporabili orodji ClueGO (215) (različico v2.5.1.) in CluePedia (216) (različico v1.5.1.), ki sta integrirani v orodje CytoScape. Z namenom primerljivosti vseh rezultatov analiz GO so bile pri vseh analizah 31.7.2018 naložene podatkovne zbirke, ki so aktualne glede na časovno obdobje zbrane literature. Statistično značilne rezultate smo nato še potrdili s spletnim orodjem g:Profiler (217).

2.6.2.1 Oblikovanje mrež bioloških označevalcev

Rezultati študij izražanja genov prikažejo sliko biološkega sistema v trenutku jemanja vzorca. Ker vzorčenje v kratkih časovnih intervalih pri preučevanju izražanja genov pri ljudeh ni možno, je število vpogledov v dogajanje na molekularni ravni omejeno. Zaradi kompleksnosti in visoke ravni integracije bioloških sistemov ni možno točno določiti, kaj je vodilo do opazovane slike izražanja genov in kako se bo izražanje genov spremenilo s časom. Prav tako so lahko analize pojmov GO zgolj na osnovi statistično značilnih rezultatov nezadostne. Zato se analize pojmov GO pogosto razširijo še na t.i. mreže, ki vsebujejo gene z dokazanimi interakcijami z več preiskovanimi geni. S tem je možno oblikovati približek dogajanja pred in po odvzemu vzorca.

Za oblikovanje mrež bioloških označevalcev smo na osnovi prvotnih seznamov pridobili podatke o interakcijah preiskovanih bioloških označevalcev v podatkovni zbirki BIOGRID in smo jih zbrali v obliki razpredelnice .xlsx. Razpredelnico smo nato naložili v orodje CytoScape in izbrisali biološke označevalce, ki so imeli interakcije samo z enim

preiskovanim označevalcem, pri čemer je bil v pomoč krožni raspored (ang. *Circular Layout*).

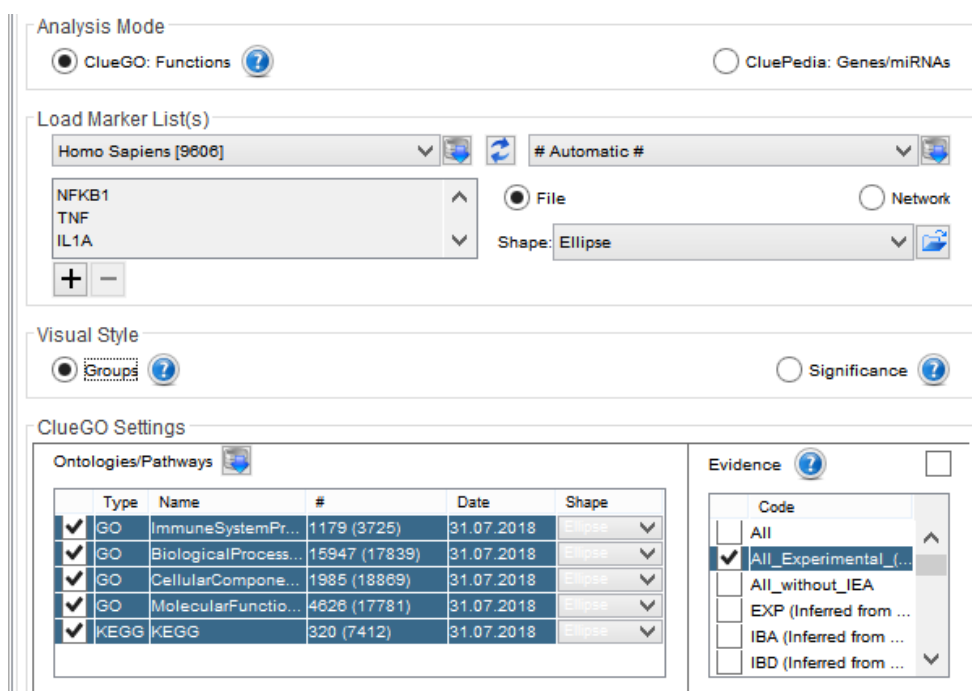


Slika 8: Primer genske mreže pred in po obdelavi v orodju CytoScape

Slika 8 prikazuje primer mreže bioloških označevalcev pred (zgoraj) in po (spodaj) izbrisu tistih označevalcev, ki imajo dokazano interakcijo le z enim preiskovanim biološkim označevalcem. Preiskovani biološki označevalci so prikazani z rdečo barvo, novi biološki označevalci iz podatkovne zbirke BIOGRID so označeni z modro barvo.

2.6.2.2 Analiza GO bioloških označevalcev

Pri uporabi orodja ClueGO smo uporabili podatkovne zbirke GO *Immune System Process*, *Biological Process*, *Cellular Component* in *Molecular Function* ter KEGG, ki so bile naložene 31.7.2018. Pri tem smo omejili definicijo genov na vse objavljene eksperimentalne dokaze (ang. *All_Experimental*). Ostale možnosti analize GO v orodju ClueGO niso bile spremenjene.



Slika 9: Primer nastavitve programskega orodja ClueGO

Slika 9 prikazuje primer okna ClueGO pred analizo. Izbrana je definicija za *Homo Sapiens* pod šifro 9606, seznam genov pa je kopiran kot preprosto besedilo v okence pod izbiro organizma. Z modro so označene izbrane podatkovne zbirke (spodaj na levi) in raven dokaznega gradiva definicije pojma (spodaj na desni).

2.7 Materiali in metode laboratorijske študije

2.7.1 Odvzem bioloških vzorcev za laboratorijske analize

Za namene laboratorijskih analiz smo vsem vključenim bolnikom odvzeli vzorce periferne venske krvi. Pri nekaterih bolnikih so bili odvzeti tudi vzorci črevesnega tkiva ob klinično indiciranih kolonoskopijah.

Vzorci periferne venske krvi so bili odvzeti z ustaljenim postopkom venepunkcije na Oddelku za gastroenterologijo UKC MB ali na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko UKC MB. Za izolacijo DNA in RNA smo kri zbirali v epruветah z dodano kalijevo soljo etilendiamintetraoetne kisline (K₂EDTA) prostornine 4 mL BD Vacutainer® EDTA (BD, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA), za namene biokemijskih preiskav seruma pa smo jo zbirali v epruветah prostornine 4mL z dodanimi pospeševalci strjevanja krvi in separacijskim gelom BD Vacutainer® Gel (BD, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA).

Vzorci tkiva črevesja za namene laboratorijske študije so bili pri bolnikih obstoječe kohorte, skladno z mnenjem KME, odvzeti le ob medicinsko indicirani kolonoskopiji. Med kolonoskopijo so bili ob rutinskem odvzemu biopsije črevesja odvzeti tudi vzorci vnetega črevesnega tkiva in tkiva brez znakov vnetja tik ob mestu odvzema vnetega tkiva. Vzorce tkiv smo shranili v vialah z 1 mL stabilizatorja RNeasy (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA), kar je predstavljalo vsaj petkratnik prostornine odvzetega vzorca tkiva in zadostuje priporočilom proizvajalca glede uporabe stabilizatorja. Po navodilih proizvajalca smo vial hranili 24 h v hladilniku na +4 °C, nato pa 24 h v zamrzovalniku na -20 °C, potem šele na -80 °C do izolacije.

2.7.2 Določevanje odziva na zaviralce TNF- α

Klinične podatke bolnikov za določevanje statusa bolnika smo zbirali med obravnavo v ambulanti ob vstopu v študijo, ob rednih kontrolah ali pa smo jih kasneje izpisali iz podatkovnega sistema MEDIS. Status odzivnosti ali neodzivnosti na zaviralce TNF smo določili z uveljavljenimi kriteriji iz literature. Pri pretvarjanju med HBI, CDAI in IBDQ so bile uporabljene že objavljene korelacije (145, 146). V kolikor je bilo na voljo več podatkov za bolnika iz različnih časovnih obdobj, smo upoštevali dolgoročni odziv na zaviralce TNF, in sicer 30. teden po začetku terapije ali kasneje.

Tabela 4: Merila za klinično značilen odziv na zaviralce TNF

| Kriterij | Merilo za klinično značilen odziv na zaviralce TNF |
|-----------------|---|
| HBI | Zmanjšanje vrednosti HBI za ≥ 3 ALI vrednost HBI po terapiji < 5 |
| CDAI | Zmanjšanje vrednost CDAI za ≥ 70 ALI 25 % zmanjšanje, v kolikor je CDAI pred terapijo > 220 ALI vrednost CDAI po terapiji ≤ 150 |
| IBDQ | Zmanjšanje vrednosti IBDQ ≥ 22 ALI vrednost IBDQ po terapiji ≥ 170 |

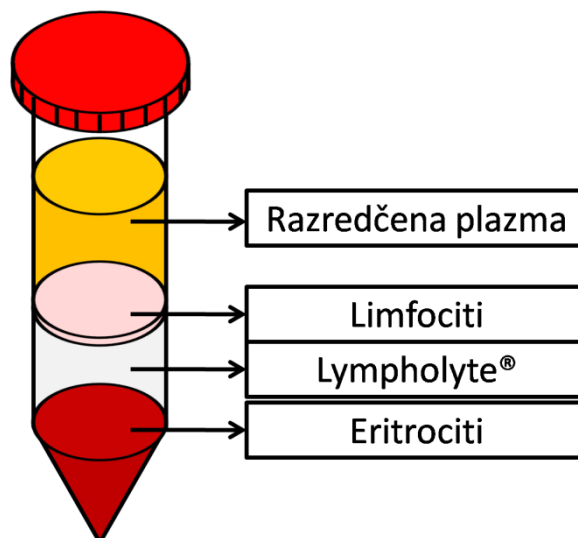
2.7.3 Izolacija mononuklearnih celic periferne venske krvi

Izolacija mononuklearnih celic periferne venske krvi (v nadaljevanju PBMC) je potekala po principu centrifugiranja z gradientom gostote.

Odvzeto periferno vensko krvi v EDTA-epruветah smo prenesli v sterilno 50 mL falkonko (vsebnik na sliki 10), nato smo dodali enako prostornino sterilnega PBS-pufra, hkrati pa smo pripravili drugo 50 mL falkonko z enako prostornino celičnega separacijskega medija Lympholyte® (Cedarlane, Burlington, Kanada). Prostornina odvzete periferne venske krvi je bila najpogosteje pribl. 12 mL, tako je bila prostornina dodanega PBS-pufra in pripravljenega medija Lympholyte® 12 mL. Kri in PBS smo pomešali s pipeto, nato smo mešanico nanесли na separacijski medij v drugi falkonki s počasnim nanosom ob steni falkonke in centrifugirali pri 1.800 obratih na minuto ($800 \times g$) na 18°C za 30 minut, pri čemer je bila zavora nastavljena na najnižjo možno nastavitev.

Vsebina falkonke po centrifugiranju je prikazana na sliki 10. Po centrifugiranju z gostotnim gradientom smo najprej odstranili sloj razredčene plazme s trombociti in ga prenesli v 15 mL centrifugirki ali v več 2 mL mikrocentrifugirk ter ga shranili v zamrzovalniku na -20°C . Nato smo sloj s PBMC nad separacijskim medijem prenesli v tretjo sterilno falkonko. Na koncu smo odvzeli še pribl. 1 mL separacijskega medija, obogatenega z eritrociti, in ga prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko ter shranili v zamrzovalniku na -20°C . Pri na novo zbranih vzorcih smo k eritrocitom dodali 1 mL vodne raztopine, ki vsebuje 40 % glicerola in 1,4 % NaCl.

Slika 10: Ilustracija falkonke po centrifugiranju z gostotnim gradientom



Slika 10 prikazuje shemo falkonke po centrifugiranju z gostotnim gradientom. Med zgornjim rumenim slojem razredčene plazme s trombociti in prozornim slojem Lympholyte® medija leži tanek rožnatobel sloj limfocitov. Na dnu se posede rdeč sloj gradientnega medija, bogatega z eritrociti.

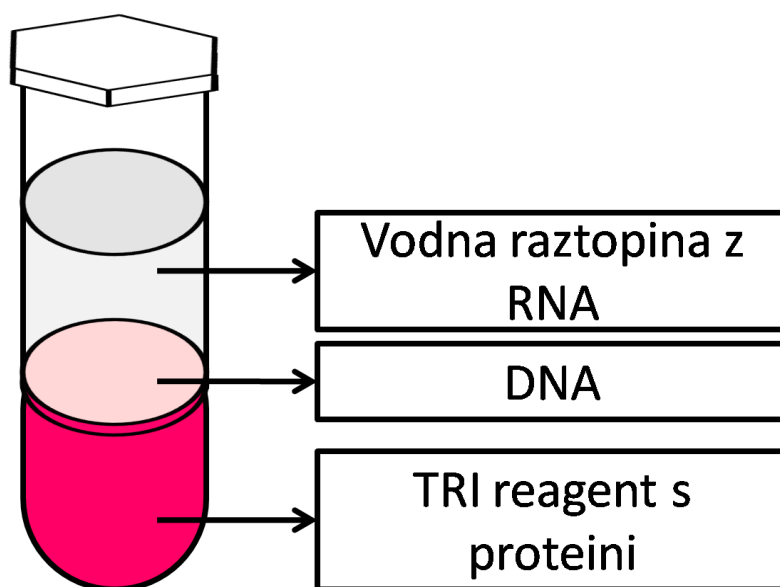
V tretjo falkonko z limfociti smo dolili PBS-pufer do oznake 20 mL, nato smo 15 minut centrifugirali pri 1.400 obratih na minuto (pribl. $480 \times g$) na 18°C . Po centrifugiranju smo supernatant odlili, v falkonko smo dodali 20 mL sterilnega PBS-pufra, nato pa z vorteksiranjem pelet resuspendirali. Pri na novo vključenih bolnikih smo resuspendirane limfocite ločili v dve 15 mL centrifugirki za namene ločene izolacije DNA in RNA. Nato smo ponovno 15 minut centrifugirali pri 1.400 obratih na minuto (pribl. $480 \times g$) na 18°C . Supernatant smo po centrifugiranju ponovno odlili in falkonko oziroma centrifugirki shranili na -80°C do nadaljnje izolacije.

2.7.4 Sočasna izolacija DNA in RNA

Vzorci celic (PBMC ali celic iz celičnih poskusov) so bili pred izolacijo shranjeni v zamrzovalniku na -80°C . Ko smo jih prinesli iz zamrzovalnika, smo takoj nanесли 1500 μL TRI reagenta (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija) za stabilizacijo in denaturacijo vzorca. Celice smo nato razbili s ponovnim pipetiranjem, dokler ni bilo več vidnih koščkov peleta limfocitov, nato smo inkubirali 5 min na sobni temperaturi. Za namene izolacije RNA smo biopsije črevesnega tkiva predhodno homogenizirali v TRI

reagentu z Bullet Blender homogenizatorjem (Next Advance Inc., Troy, New York, ZDA), od tod pa izolacija RNA poteka po enakem postopku kot pri PBMC.

Mešanico s TRI reagentom smo prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko in dodali 300 μ L 100 % v/v kloroforma (Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija). Zaprto mikrocentrifugirko smo vorteksirali pribl. 15 s oziroma dokler raztopina ni postala motno bele do blede rožnate barve. Vzorec smo nato inkubirali od 2 do 15 min na sobni temperaturi. Mešanico smo 15 min centrifugirali pri 12.000 rcf na 4°C, tako da se je vzorec ločil v tri faze.



Slika 11: Ločevanja faz po centrifugiranju z dodanim kloroformom

Slika 11 prikazuje ločevanje vzorca v tri faze po prvotnem centrifugiranju. V zgornji prozorni vodni fazi se nahaja RNA, med prozorno in spodnjo rdečo fazo se nahajajo DNA obliki bele oborine, v spodnji rdeči fazi pa so prisotni beljakovine in druge celične komponente.

Za izolacijo RNA smo zgornjo vodno fazo prenesli v novo 2 mL mikrocentrifugirko, dodali 750 μ L 100 % v/v izopropanola (Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija) in premešali z obračanjem. Vzorec smo inkubirali od 5 do 10 minut in nato 10 min centrifugirali pri 12.000 rcf na 4°C. Po centrifugiranju je na dnu mikrocentrifugirke nastal viden, delno prozoren pelet RNA. Supernatant smo odlili in dodali 1500 μ L 75 % v/v etanola, pelet smo resuspendirali z vorteksiranjem in nato 5 min centrifugirali pri 7.500 rcf na 4°C. Supernatant smo ponovno odlili in RNA v sterilnem okolju sušili 5 min oziroma dokler RNA-pelet ni postal bele barve. Pelet RNA smo nato raztopili v 60 μ L vode, ki je bila tretirana z 0,1 %

dietilnega pirokarbonata (v nadaljevanju DEPC) in dvakrat avtoklavirana. Raztopljeno RNA smo nato čim prej shranili v zamrzovalniku na -80°C do nadaljnje analize.

Sočasno z izolacijo RNA smo izvedli izolacijo DNA. Po odstranitvi vodne faze RNA na začetku protokola za izolacijo RNA smo v prvo 2 mL mikrocentrifugirko dodali 450 μL 100 % etanola (Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija) in počasi premešali z obračanjem, dokler bela oborina DNA ni postala delno prozorna in se posedla na dno rdeče raztopine. Vzorec smo inkubirali pribl. 3 min na sobni temperaturi in nato 5 min centrifugirali pri 2.000 rcf na 4°C . Supernatant smo odpipetirali in shranili za izolacijo proteinov. Pelet DNA v prvi 2 mL mikrocentrifugirki smo trikrat spirali. Protokol spiranja zajema dodatek 1500 μL 0,1 M natrijevega citrata v 10 % v/v vodni raztopini etanola in 30 min inkubacije s pogostim mešanjem z obračanjem mikrocentrifugirke. Inkubaciji sledi 5-minutno centrifugiranje pri 2.000 rcf na 4°C in nato odstranjevanje supernatanta. Po treh spiranjih smo v 2 mL mikrocentrifugirko dodali 1500 μL 75 % v/v etanola in premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. Vzorec smo inkubirali 20 min in nato 5 min centrifugirali pri 2.000 rcf na 4°C . Supernatant smo odstranili in DNA-pelet sušili na zraku v sterilnem okolju pribl. 5 min. Nato smo DNA raztopili v 300 μL sterilne vode s ponavljajočim pipetiranjem. Vzorec smo shranili v hladilniku na $+4^{\circ}\text{C}$.

2.7.5 Določevanje genotipa po celotnem genomu

Genotipe smo določili z uporabo metod celostnega pregleda genoma. Za metode celostnega pregleda genoma je potrebna določena kvaliteta vhodne raztopine DNA. Pred poskusom smo izmerili koncentracijo ($\lambda = 260 \text{ nm}$) in čistost DNA ($\lambda = 260 \text{ nm}$ in $\lambda = 280 \text{ nm}$) v 2 μL vzorcu DNA, nanesenem na nosilcu Plate3 za spektrofotometričen sistem Biotek Synergy 2 (Biotek, Winooski, Vermont, ZDA), po navodilih proizvajalca. Izbrali smo vrednost razmerja 1,8 med absorbanco pri 260 in 280 nm kot merilo zadovoljive čistosti DNA. Pri na novo vključenih vzorcih smo po merjenju koncentracije in čistosti DNA določili tudi raven degradacije DNA z elektroforezo z DNA-čipom za Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, ZDA) po navodilih proizvajalca.

Za obstoječe DNA-vzorke bolnikov s CD so že na voljo podatki genotipov iz čipa Immunochip (v nadaljevanju iChip) iz študije Jostinsa in sodelavcev (2). Po zahtevah IIBDGC (International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium) je Illumina (San Diego, Kalifornija, ZDA) po meri proizvedla Infinium čip z 196.524 genetskimi označevalci,

ki so bili izbrani na osnovi objavljenih genetskih študij imunsko pogojenih kompleksnih bolezni. Zbirko genetskih podatkov smo za na novo vključene vzorce, kot tudi za obstoječe vzorce, še razširili z novejšim čipom Illumina GSA (ang. *Global Screening Array*) različice GSA_24v1. Čip GSA omogoča določevanje 571.151 genetskih označevalcev, ki jih je konzorcij GSAC (ang. *Global Screening Array Consortium*) izbral na osnovi najnovejših mednarodnih genetskih študij celotnega genoma. DNA-vzorce smo za genotipizacijo na čipu GSA pripravili po navodilih proizvajalca (koncentracija 40 ng/μL, razmerje $\lambda = 260$ nm in $\lambda = 280$ nm prib. 1,8) v plastičnih ploščicah s 96 vodnjaki in poslali na analizo na *Institut für Klinische Molekular biologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel* (Kiel, Nemčija).

Genetski podatki obstoječe kohorte in zdravih kontrol, pridobljenih z uporabo čipa iChip, so že bili filtrirani do primerne kvalitete in analizirani. Analizo kvalitete surovih podatkov, pridobljenih s čipom GSA, smo izvedli s programskih orodjem PLINK (218) po priporočilih iz literature (219). Asociacijske analize smo izvedli s programskim orodjem PLINK. Prag statistične značilnosti smo določili kot p -vrednost, nižjo od 5×10^{-8} , prag statističnega trenda pa 10^{-5} , kar sta najpogosteje uporabljeni merili za analize celotnega genoma v literaturi (220). Podatke smo vizualizirali z R programskim paketom *qqman* (221).

2.7.6 Določevanje izražanja genov

2.7.6.1 Načrtovanje zaporedij začetnih oligonukleotidov

Geni so bili izbrani na osnovi že objavljenega napovednega modela za določevanje odziva na infliksimab pri CD, ki so ga objavili Arijs in sodelavci (207). Za načrtovanje začetnih oligonukleotidov smo do mRNA-zaporedij tarčnih in referenčnih genov dostopali v podatkovni zbirki NCBI Nucleotide (NCBI, Bethesda, Maryland, ZDA). Začetne oligonukleotide smo načrtovali z orodji Primer3 (222) in IDT OligoAnalyzer 3.1 (IDT DNA Technologies, Coralville, Iowa, ZDA). Primerno pripenjanje smo nato potrdili še z orodjem Primer-BLAST (NCBI, Bethesda, Maryland, ZDA). Sintezo oligonukleotidov smo naročili pri podjetju Sigma (Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija). Lastnosti in zaporedja začetnih oligonukleotidov so opisana v tabeli 6.

Tabela 5: Pari začetnih oligonukleotidov za kvantitativni PCR v realnem času

| GEN | REFEREČNA ŠTEVILKA | ZAPOREDJI 5'-3' |
|---------|--------------------|--|
| TNFAIP6 | NM_007 115.3 | GGCCATCTCGCAACTTA CAGCACAGACATGAAATCCAA |
| S100A8 | NM_001 319 196.1 | GCTAGAGACCGAGTGTCTCA ACGCCCATCTTTATCACCAG |
| S100A9 | NM_002 965.3 | GTGCGAAAAGATCTGCAAAA TCAGCTGCTTGTCTGCATTT |
| G0S2 | NM_015 714.3 | TACCACAAGCATCCACCAAA TCCTTCCTCCCTAGTGCAA |
| IL11 | NM_000 641.3 | TTCCCTGAAGACCCTGGAG CTCACGGCCCAGTCAAGT |
| ACTB | NM_001 101.3 | CATCGAGCACGGCATCGTCA TAGCACAGCCTGGATAGCAAC |
| B2M | NM_004 048.2 | TTCTGGCCTGGAGGCTATC TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC |

2.7.6.2 Prepis izolirane RNA v cDNA z reverzno transkripcijo

Za reverzno transkripcijo RNA v cDNA smo uporabili komplet reagentov *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA). Pred prepisom izolirane RNA v cDNA smo izmerili koncentracijo ($\lambda = 260$ nm) in čistost RNA ($\lambda = 260$ nm in $\lambda = 280$ nm) v 2 μ L vzorcu, nanesenem na nosilcu Plate3 za spektrofotometričen sistem Biotek Synergy 2 (Biotek, Winooski, Vermont, ZDA), po navodilih proizvajalca in nato pripravili vzorec RNA ter ga razredčili z vodo, ki je bila tretirana z 0,1 % DEPC in dvakrat avtoklavirana, tako da je bila končna koncentracija RNA 100 ng/ μ L. Reagente smo po navodilih proizvajalca dodali v zaporedju, ki je opisan v tabeli 7. Mešanico reagentov smo za nekaj sekund postavili na vibracijski mešalnik, da smo vsebino pomešali, nato pa smo pribl. 10 s centrifugirali. V novo 200 μ L mikrocentrifugirko oziroma v plastični PCR-nastavek z 12 ali 96 vodnjaki po 200 μ L smo dodali 10 μ L RNA in nato dodali 10 μ L pripravljene reakcijske mešanice. Vsebino smo počasi premešali z uporabo pipete, nato pa vstavili v termopomnoževalnik (Biometra GmbH, Göttingen, Nemčija), nastavljen na program, kot je opisan v tabeli 8.

Tabela 6: Reakcijska mešanica za eno reakcijo reverzne transkripcije

| REAGENT | VOLUMEN |
|---|-------------|
| 10x pufer za reverzno transkriptazo | 2 μ L |
| 25x mešanica nukleotidov | 0,8 μ L |
| 10x naključni oligonukleotidi | 2 μ L |
| MultiScribe™ reverzna transkriptaza | 1 μ L |
| Zaviralec RNaz | 1 μ L |
| PCR H ₂ O | 3,2 μ L |
| Vzorec mRNA-koncentracije 100 ng/ μ L | 10 μ L |

Tabela 7: Program termociklerja za reverzno transkripcijo

| KORAK | <i>T</i> | <i>t</i> |
|-------|----------|----------|
| 1 | 25 °C | 10 min |
| 2 | 37 °C | 120 min |
| 3 | 85 °C | 5 min |
| 4 | 4 °C | / |

2.7.6.3 Kvantitativni PCR v realnem času

Pripravljeno cDNA smo redčili na končno koncentracijo 2,5 ng/ μ L v razmerju 1:20 z vodo, ki je bila tretirana z 0,1 % DEPC in dvakrat avtoklavirana. Za poskuse kvantitativnega PCR v realnem času (v nadaljevanju qPCR) smo uporabili komercialno dostopno pripravljeno mešanico *SYBR™ Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA). Za vsak par oligonukleotidov smo v novi 2 mL mikrocentrifugirki pripravili reakcijsko mešanico v zaporedju, opisanem v tabeli 9, nato smo jih za nekaj sekund premešali z uporabo vibracijskega mešalnika in centrifugirali pribl. 10 s. V vodnjak plastične ploščice za qPCR (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija) smo pripravili trojnice posameznega vzorca cDNA po 2 μ L na vodnjak, nato smo v vodnjake dodali po 8 μ L reakcijske mešanice. Ploščico za qPCR smo pokrili s folijo za qPCR (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija) in centrifugirali 1 min. Pripravljeno ploščico smo nato postavili v qPCR-termocikler LightCycler® 480 (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija) in nastavili program, kot je opisan v tabeli 10. Specifičnost produktov qPCR smo preverili z analizo talilnih krivulj in analizo z gelsko elektroforezo.

Tabela 8: 10 μ L reakcijska mešanica za qPCR

| SESTAVINA | VHODNA KONCENTRACIJA | VOLUMEN | KONČNA KONCENTRACIJA |
|----------------------------|----------------------|-------------|----------------------|
| SYBR™ Green PCR Master Mix | 2x | 5 μ L | 1x |
| Začetni oligonukleotid I | 2,5 μ M | 1,2 μ L | 0,3 μ M |
| Začetni oligonukleotid II | 2,5 μ M | 1,2 μ L | 0,3 μ M |
| PCR H ₂ O | / | 0,6 μ L | / |
| <i>Vzorec cDNA</i> | 2,5 ng/ μ L | 2 μ L | 0,5 ng/ μ L |

Tabela 9: Protokol termociklerja za qPCR-reakcijo

| KORAK | | <i>T</i> | <i>t</i> |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------|
| Začetna denaturacija cDNA | | 95 °C | 10 min |
| 40x | Denaturacija cDNA | 95 °C | 15 s |
| | Pripenjanja cDNA | 60 °C | 30 s |
| | Elongacija cDNA | 72 °C | 30 s |
| Analiza talilnih krivulj | Denaturacija cDNA | 95°C $\Delta T = 4,4$ °C/s | 10 s |
| | Renaturacija cDNA | 40 °C $\Delta T = 2,2$ °C/s | 30 s |
| | Pričetek merjenja fluorescence | 65 °C $\Delta T = 4,4$ °C/s | 1 s |
| | Kontinuirano merjenje fluorescenc | 95 °C $\Delta T = 0,11$ °C/s | / |
| Konec | | 37 °C | 10 s |

2.7.6.3.1 Analiza specifičnosti produktov qPCR z gelsko elektroforezo

10-kratno založno raztopino tris-borat-EDTA (v nadaljevanju TBE) pufru smo pripravili s koncentracijami, kot je opisano v tabeli 11. 2 % agarozni gel smo pripravili z mešanjem 1,6 g agaroze (Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija) in 80 mL 1-kratnega TBE-pufra v 200 mL erlenmajerici. Mešanico smo raztopili s pregrevanjem na nastavitvi moči 600 W v mikrovalovni pečici (Gorenje, Velenje, Slovenija) pribl. 2 do 3 min. Ko se je agarosa popolnoma raztopila v TBE-pufu in ni bilo več vidnih zrn, smo v raztopino s pipeto dodali 4 μ L raztopine etidijevega bromida (Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija) s koncentracijo 10 mg/mL. Raztopino smo počasi prelili iz erlenmajerice v plastični nosilec z

kalupi za oblikovanje žepkov v gelu za elektroforezo (Biometra GmbH, Göttingen, Nemčija). Strjen agarozni gel smo vstavili v kad za elektroforezo, tako da je 1-kratna raztopina TBE-pufra v kadi segala pribl. 2 mm nad površino gela. Produkte qPCR smo redčili s 6-kratno barvno raztopino za nanašanje DNA-vzorcev (opisana v tabeli 12) v razmerju 1:6 in jih nanegli v žepke v 2 % agaroznem gelu. Stalni tok 150 V je 20 min dovajal električni sistem P25 (Biometra GmbH, Göttingen, Nemčija). Po končani elektroforezi smo agarozne gele slikovno analizirali s sistemom G:Box sistemu (Syngene, Indija) po priloženem protokolu proizvajalca za slikanje pri valovnih dolžinah ultravijolične svetlobe.

Tabela 10: Vsebnost 10-kratne založne raztopine TBE-pufra

| SESTAVINA | PROIZVAJALEC | KONCENTRACIJA |
|-----------|--|---------------|
| TRIS | Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija | 890 mM |
| Borat | Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija | 890 mM |
| EDTA | Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija | 20 mM |

Tabela 11: Vsebnost 6-kratne barvne raztopine za nanašanje vzorcev

| SESTAVINA | PROIZVAJALEC | KONCENTRACIJA |
|--------------------|--|---------------|
| TRIS-HCl pH 7,6 | Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija | 10 mM |
| EDTA | Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija | 60 mM |
| Glicerol | Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija | 60 % v/v |
| Bromofenol modro | Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija | 0,03 % v/v |
| Ksilencianol modro | Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija | 0,03 % v/v |

2.7.6.4 Normalizacija, izračun in interpretacija izražanja genov

Surove podatke fluorescence qPCR, izpisane iz programskega orodja instrumenta LightCycler® 480, smo normalizirali po metodi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ z izražanjem dveh referenčnih genov (223). Izračunano povprečje praznih ciklov (Ct) trojnikov preiskovanih tarčnih genov ($Ct_{tarčni\ gen}$) smo normalizirali z geometričnim povprečjem praznih ciklov trojnikov dveh referenčnih genov (Ct_{ACTB} in Ct_{B2M}) po navedeni enačbi:

$$\Delta Ct_{preiskovanega\ vzorca} = Ct_{tarčni\ gen} - \left(\sqrt[2]{Ct_{ACTB} \times Ct_{B2M}} \right)$$

$$\Delta Ct_{kontrola} = Ct_{tarčni\ gen} - \left(\sqrt[2]{Ct_{ACTB} \times Ct_{B2M}} \right)$$

Nato smo izračunali parameter $\Delta\Delta Ct$ iz povprečja vseh ΔCt preiskovanih vzorcev in povprečja ΔCt -kontrol po navedeni enačbi:

$$\Delta\Delta Ct = \overline{\Delta Ct_{preiskovanih\ vzorcev}} - \overline{\Delta Ct_{kontrola}}$$

Izražanje gena glede na izbrano kontrolno skupino vzorcev smo izrazili s parametrom R_iK , ki ga iz vrednosti $\Delta\Delta Ct$ izračunamo po navedeni enačbi:

$$R_iK = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Podatke smo pretvorili v normalizirano linearno obliko $2^{-\Delta Ct}$ za statistične analize.

2.7.7 RNA-seq

Pred sekvenciranjem RNA-molekul smo po merjenju koncentracije in čistosti RNA določili tudi raven integritete RNA z elektroforezo z RNA-čipom za Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, ZDA) po navodilih proizvajalca, pri čemer smo določili kot zadovoljiv RIN (ang. *RNA integrity number*) 7 ali več. Iz založnega originalnega vzorca RNA smo pripravili v novi 1,5 mL mikrocentrifugirki 50 μ L razredčenega RNA-vzorca s koncentracijo 100 ng/ μ L, ki smo ga poslali na suhem ledu na Kitajsko v podjetje BGI (BGI, Guangdong, Kitajska) za analizo RNA-seq. V podjetju BGI so analizo RNA-seq izvedli z uporabo aparature BGISEQ500 (BGI, Guangdong, Kitajska) in kompleta reagentov *LncRNA library construction kitom* (BGI, Guangdong, Kitajska) za določevanje zaporedja parnih koncev 2×100 baznih parov.

2.7.7.1 Analiza in interpretacija rezultatov metode RNA-seq

Podatke RNA-seq smo v celoti obdelali s programskimi paketi v programskem okolju R (The R Foundation, Dunaj, Avstrija). Surove podatke RNA-seq v obliki zapisa *fasta* smo pretvorili v obliko zapisa *fastq*. Kvaliteto surovih podatkov RNA-seq smo najprej pregledali z uporabo programskega paketa FastQC (224), nato pa še z Rsubread (225, 226). Prav tako smo s paketom Rsubread nato izvedli poravnavo odčitkov, pri čemer smo uporabili referenčni genom GRCh37/hg19. Po poravnavi smo glede na minimalno število branj na milijon (v nadaljevanju CMP) filtrirali gene s $CPM < 0,3$ oziroma gene z najnižjimi ravni izražanja in najnižjim številom odčitkov. Nato smo zaradi razlik v velikosti knjižnic med vzorci izvedli normalizacijo med knjižnicami s programskim paketom edgeR (227) s pristopom obrezane srednje vrednosti M (ang. TMM) (228). Po normalizaciji knjižnic smo določili diferencialno izražanje genov s programskim paketom Limma (229), pri čemer smo uporabili pristop Voom (230). Za anotacijo identificiranih genov smo uporabili paket org.Hs.eg.db (231), pri čemer smo uporabili zbirko definicij simbolov ENTREZ (NCBI, Bethesda, Maryland, ZDA). Za statistično značilnost smo določili prag q -vrednosti modelov Limma ≤ 0.05 po popravku stopnje lažnega odkritja (ang. FDR) (232). Rezultate analize RNA-seq smo vizualizirali z uporabo paketa Plotly (233).

2.7.8 Določevanje ravni maščobnih kislin

Raven maščobnih kislin v membranah eritrocitov obstoječih vzorcev so določili Cencič Kodba in sodelavci (234). Iz vzorcev eritrocitov, pridobljenih po centrifugiranju z gradientom gostote, so izolirali celokupne lipide z ekstrakcijo v trdi fazi. Nato so lipide ločili na nepolarne lipide in polarne fosfolipide. Po saponifikaciji faze s polarnimi fosfolipidi je sledila esterifikacija z borovim trifluorid-metanolom. Hlapljivi esteri maščobnih kislin so se nato analizirali s plinsko kromatografijo s plamensko ionizacijskim detektorjem (v nadaljevanju GC-FID). Dodatno sta bili določeni tudi ravni dveh maščobnih aldehydnih dimetil acetalov (heksadekanalni in oktadekanalni dimetil acetal).

2.8 Materiali in metode *in vitro* študije

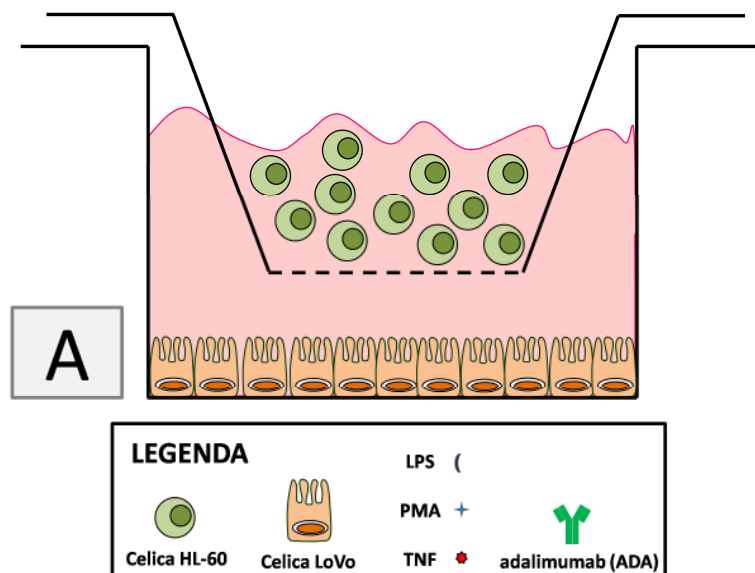
2.8.1 Inducibilni sistem TNF

Za namene potrditvenih poskusov bioloških označevalcev odziva v celičnih modelih smo oblikovali inducibilni model TNF s kokulturo celic debelega črevesa in levkocitov, ki izražajo TNF. Kot modelno celično linijo debelega črevesa smo uporabili celično linijo adenokarcinoma debelega črevesa LoVo, kot modelno celično linijo levkocitov s sposobnostjo izražanja TNF pa smo izbrali celično linijo akutne promielocitne levkemije HL-60, ki se lahko diferencira v obliko, podobno monocitom oziroma makrofagom s sposobnostjo izražanja TNF.

Celice LoVo smo gojili v mediju DMEM/F12 GlutaMax (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA) z dodanimi 10 % fetalnega govejega seruma (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA). Celice HL-60 smo gojili v mediju RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA) z dodanimi 10 % fetalnega govejega seruma (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA). Založno celično kulturo LoVo smo gojili v plastičnih bučkah za adherentne celične kulture (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Nemčija), HL-60 pa v bučkah za suspenzijske celične kulture (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Nemčija). Obe celični kulturi sta bili gojeni na 37 °C v vlažni 5 % CO₂-atmosferi. Celični medij smo zamenjali po potrebi.

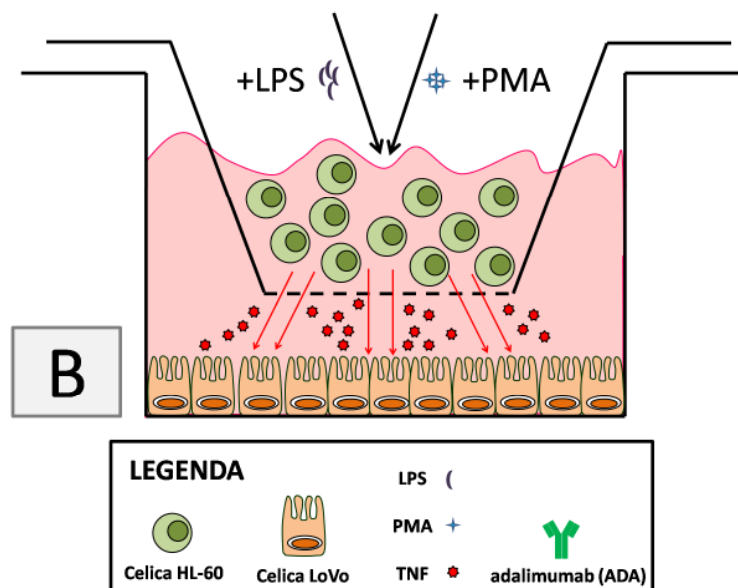
Inducibilni sistem TNF smo oblikovali v plastičnih posodah s šestimi vodnjaki za gojenje celic (VWR, Inc., West Chester, Pennsylvania, ZDA) s PET-vložki za gojenje celičnih kultur (VWR, Inc., West Chester, Pennsylvania, ZDA). Vložki za gojenje kokultur imajo na dnu membrano s porami velikosti 4 µm, kar omogoča prehajanje proteinov, ne pa bakterij ali celic. V notranjosti vložka smo gojili celično kulturo HL-60, v notranjosti vodnjakov pa celično kulturo LoVo. Celice HL-60 smo zasejali v vložek v koncentraciji 3×10^5 celic, LoVo pa smo v vodnjak zasejali v koncentraciji $2,5 \times 10^5$ celic. Izražanje TNF smo sprožili z dodatkom 50 ng/mL bakterijskega lipopolisaharida (LPS) (Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija) in 50 ng/mL forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) (Sigma, Merck Group, Darmstadt, Nemčija) v notranjost vložka. Izražen TNF je nato pronical skozi pore v notranjost vodnjaka s celično linijo LoVo. Izražanje TNF v celični kulturi HL-60 in prisotnost TNF v vodnjaku s celicami LoVo smo potrdili z uporabo kompleta ELISA za določevanje TNF (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA) po navodilih proizvajalca. Pri poskusu z zaviralcem TNF smo po sprožanju izražanja TNF v celični liniji

HL-60 v notranjost vodnjaka s celicami LoVo dodali 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ adalimumaba Humira® (AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen/Rhein, Nemčija). Po vzorčenju celic LoVo smo jih centrifugirali in shranili v zamrzovalniku pri -80°C do izolacije RNA.



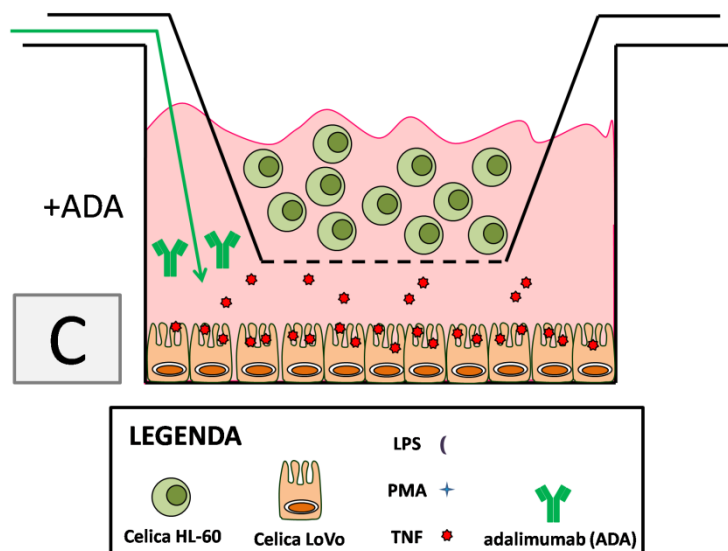
Slika 12: Shema gojenja osnovne celične kokulture

Slika 12 prikazuje shemo sistema za gojenje celičnih kokultur z uporabo vložkov s poroznimi membranami. Celice HL-60 so gojene v vložku, celice LoVo so gojene v notranjosti vodnjaka.



Slika 13: Simuliranje vnetja črevesne sluznice v kokulturi

Slika 13 prikazuje shemo poskusa s kokulturo po dodatku LPS in PMA, ki sta sprožila diferenciacijo celične kulture HL-60 in izražanje TNF. TNF, ki je prikazan z rdečo, pronica skozi porozni membrano v celični medij celične kulture LoVo v notranjosti vodnjakov.



Slika 14: Simuliranje terapije z zaviralci TNF v kokulturi

Slika 14 prikazuje shemo poskusa s kokulturo po sprožanju izražanja TNF in dodajanju TNF-zaviralca adalimumab v celični medij celic LoVo. Adalimumab je deloval predvsem na TNF, vezan na celice LoVo pa tudi na še nevezane TNF-molekule v celičnem mediju.

2.9 Statistične metode

Za statistično analizo smo uporabili orodje SPSS Statistics 23 (IBM Statistics, Armonk, New York, ZDA). Porazdelitev podatkov smo preverili s statističnimi testi, tako smo test hi-kvadrat uporabili za kategorične spremenljivke in t-test neodvisnih vzorcev po Shapiro-Wilkovem testu normalnosti za zvezne spremenljivke v neodvisnih skupinah. Glede na porazdelitev podatkov smo uporabili primeren neparametrični (Mann-Whitneyjev U-test in Kruskal-Wallisov test) ali parametrični statistični test (T-test neodvisnih vzorcev). Za statistične teste genetskih podatkov smo uporabili programsko orodje PLINK. Statistično značilne analize programskega orodja PLINK smo nato še potrdili v statističnem programskem orodju SPSS Statistics 23 z uporabo ekvivalentnega statističnega testa (Fisherjev eksaktni test ali Waldov test). Ničelne domneve smo zavračali s 5 % tveganjem. Statistično značilno razliko smo upoštevali pri vrednosti $\leq 0,05$ po Bonferronijevi korekciji.

2.10 Metoda podpornih vektorjev

Metoda podpornih vektorjev je nadzorovan algoritem strojnega učenja, kar pomeni, da se pred učenjem podatki razdelijo na učno in potrditveno množico. Med učenjem ima algoritem na voljo le učno množico. Algoritem metode podpornih vektorjev na osnovi učne množice izriše N -dimenzionalni prostor, pri čemer je N število atributov posameznega elementa množice. Nato v N -dimenzionalnem prostoru algoritem izriše $(N-1)$ -dimenzionalno ploskev, ki elemente učne množice optimalno razdeli glede na opredeljen klasifikacijski parameter. Če ima element dve lastnosti, bo algoritem v 2-dimenzionalni ravnini izrisal 1-dimenzionalno krivuljo, v primeru treh lastnosti bo v 3-dimenzionalnem prostoru izrisal 2-dimenzionalno ravnino in tako dalje.

Po učenju napovednega modela se natančnost le-tega ovrednoti z razvrščanjem elementov potrditvene množice, ki jih algoritem ni imel na voljo med učenjem. Kvaliteta modela se določi na osnovi parametrov senzitivnosti (občutljivosti), specifičnosti in natančnosti. Ti se izračunajo po naslednjih enačbah:

- senzitivnost (občutljivost)

$$\text{senzitivnost} = \frac{\text{število resnično pozitivnih elementov}}{\text{število vseh pozitivnih elementov}}$$

- specifičnost

$$\text{specifičnost} = \frac{\text{število resnično negativnih elementov}}{\text{število vseh negativnih elementov}}$$

- natančnost

$$\text{natančnost} = \frac{\text{število resnično pozitivnih in negativnih elementov}}{\text{število vseh pozitivnih in negativnih elementov}}$$

Napovedne modele smo izdelali in ovrednotili z uporabo programskega okolja R, različica 3.4.3 (The R Foundation, Dunaj, Avstrija), in z uporabo R-paketa e1071 različice 1.6–8(235). Pred učenjem končne različice smo optimizirali parametre paketa e1071 ("cost" in "gamma"), razmerja velikosti učne in potrditvene množice ter števila ugnezenih modelov.

3 Rezultati

3.1 Rezultati *in silico* študije

3.1.1 Genska ontologija pediatričnih oblik KVČB

Z iskalnimi zahtevami, določenimi v poglavju 2.6.1.1, smo zbrali skupaj 29 študij, ki so ustrezale kriterijem. V zbranih 29 študijah je bilo opisanih 75 genomskih regij, ki so povezane z monogenetskimi dednimi boleznimi, ki imajo klinično sliko, skladno s KVČB. Genomske regije smo razdelili v podskupine, kot so opredeljene v tabeli 2. Sezname genov in pripadnost podskupinam je povzeta v tabeli 13.

Tabela 12: Seznam vzročnih genov za pediatrično KVČB po podskupinah

| Vzročni gen | Monogenska dedna bolezen | Pripadnost podskupinam |
|----------------|---|---------------------------|
| <i>ADAM17</i> | Pomanjkanje ADAM17 (50) | NEO-IBD |
| <i>IL10</i> | Neonatalna KVČB zaradi napačne IL-10-signalizacije (50, 96) | NEO-IBD |
| <i>IL10RA</i> | Neonatalna KVČB zaradi napačne IL-10-signalizacije (50, 96, 236) | NEO-IBD |
| <i>IL10RB</i> | Neonatalna KVČB zaradi napačne IL-10-signalizacije (50, 96, 236) | NEO-IBD |
| <i>TRIM22</i> | Vzročni gen neonatalnega sindroma, podobnega KVČB (237) | NEO-IBD |
| <i>EGFR</i> | Neonatalna vnetna kožna in črevesna bolezen 2 (96, 238) | NEO-IBD |
| <i>TTC7A</i> | Pomanjkanje TTC7A (50, 239) | NEO-IBD |
| <i>EPCAM</i> | Tuftingova enteropatija (240) | NEO-IBD |
| <i>WAS</i> | Wiskott-Aldrichov sindrom razvoja celic B in T (50) | NEO-IBD, INF-IBD |
| <i>DKC1</i> | Hoyeraal–Hreidarssonov sindrom (50) | NEO-IBD, INF-IBD |
| <i>RTEL1</i> | Hoyeraal–Hreidarssonov sindrom (50) | NEO-IBD, INF-IBD |
| <i>IL21</i> | Pomanjkanje IL-21 (241) | NEO-IBD, INF-IBD |
| <i>NCF4</i> | Vzročni gen sindroma, podobnega KVČB (242) | NEO-IBD, INF-IBD |
| <i>BTK</i> | Agammaglobulinemija ali hipogammaglobulinemija (50, 243) | INF-IBD |
| <i>PIK3R1</i> | Agammaglobulinemija ali hipogammaglobulinemija (50, 244) | INF-IBD |
| <i>CD79B</i> | Agammaglobulinemija ali hipogammaglobulinemija (245) | INF-IBD |
| <i>AIRE</i> | Avtoimunska poliendokrinopatija kandidiaza, ekto dermalna distrofija (96, 238, 246) | INF-IBD |
| <i>CHD7</i> | Sindrom CHARGE (247) | INF-IBD |
| <i>COG6</i> | Kongenitalna motnja glikozilacije tipa 3 (96, 238, 248, 249) | INF-IBD |
| <i>CD19</i> | Pogosta variabilna imunska pomanjkljivost 3 (247, 250, 251) | INF-IBD |
| <i>MS4A1</i> | Pogosta variabilna imunska pomanjkljivost 5 (247, 252) | INF-IBD |
| <i>CD81</i> | Pogosta variabilna imunska pomanjkljivost 6 (247, 253) | INF-IBD |
| <i>MEFV</i> | Družinska sredozemska vročica (50) | INF-IBD |
| <i>CD40LG</i> | Sindrom hiper IgM tipa 1 (50) | INF-IBD |
| <i>AICDA</i> | Sindrom hiper IgM tipa 2 (50, 254) | INF-IBD |
| <i>CD40</i> | Sindrom hiper IgM tipa 3 (247) | INF-IBD |
| <i>FOXP3</i> | Sindrom IPEX (50) | NEO-IBD, INF-IBD, VEO-IBD |
| <i>DCLRE1C</i> | Omenov sindrom (247) | INF-IBD |
| <i>IL7R</i> | Omenov sindrom (247) | INF-IBD |

| | | |
|------------------|--|-----------------------------------|
| <i>RAG1</i> | Omenov sindrom (247) | INF-IBD |
| <i>RAG2</i> | Omenov sindrom (247) | INF-IBD |
| <i>PLCG2</i> | Dedna okvara fosfolipaze C- γ 2 (50) | INF-IBD |
| <i>ITCH</i> | Avtoimunska sistemska bolezen z obraznim dismorfizmom (96, 238, 255) | INF-IBD, VEO-IBD |
| <i>COL7A1</i> | Distrofična buloza (50, 256) | INF-IBD, VEO-IBD |
| <i>IL2RA</i> | Imunodeficienca 41 z limfoproliferacijo in avtoimunostjo (50) | INF-IBD, VEO-IBD |
| <i>STAT1</i> | Imunske pomanjkljivosti tipa 31a, 31b in 31c (50) | INF-IBD, VEO-IBD |
| <i>ADA</i> | Huda sistemska imunska pomanjkljivost (50) | INF-IBD, VEO-IBD |
| <i>CD3G</i> | Huda sistemska imunska pomanjkljivost (50) | INF-IBD, VEO-IBD |
| <i>IL2RG</i> | Huda sistemska imunska pomanjkljivost (50) | INF-IBD, VEO-IBD |
| <i>LIG4</i> | Huda sistemska imunska pomanjkljivost (50) | INF-IBD, VEO-IBD |
| <i>CASP8</i> | Pomanjkanje kaspaze 8 (96, 238) | VEO-IBD |
| <i>CR2</i> | Pogosta variabilna imunska pomanjkljivost 7 (247) | VEO-IBD |
| <i>LRBA</i> | Pogosta variabilna imunska pomanjkljivost 8 (247) | VEO-IBD |
| <i>TGFBR1</i> | Loeys-Dietzov sindrom tipa 1 (96, 238) | VEO-IBD |
| <i>TGFBR2</i> | Loeys-Dietzov sindrom tipa 2 (96, 238) | VEO-IBD |
| <i>MASP2</i> | Pomanjkanje MASP2 (96, 238) | VEO-IBD |
| <i>ITK</i> | Huda sistemska imunska pomanjkljivost (247) | VEO-IBD |
| <i>LCK</i> | Huda sistemska imunska pomanjkljivost (247) | VEO-IBD |
| <i>ZAP70</i> | Huda sistemska imunska pomanjkljivost (247) | VEO-IBD |
| <i>TNFRSF13B</i> | Pomanjkanje TACI (96, 238, 247) | VEO-IBD |
| <i>SKIV2L</i> | Trihohepatoenterični sindrom (50) | INF-IBD, VEO-IBD, EO-IBD |
| <i>TTC37</i> | Trihohepatoenterični sindrom (50) | VEO-IBD |
| <i>MSH5</i> | Vzročni gen otroškega dednega sindroma, podobnega KVČB (257) | VEO-IBD |
| <i>SH2D1A</i> | X-vezan limfoproliferativni sindrom 1 (50) | VEO-IBD |
| <i>XLP1</i> | X-vezan limfoproliferativni sindrom 1 (247) | VEO-IBD |
| <i>SLAMF1</i> | X-vezan limfoproliferativni sindrom 1 z okvaro SLAMF1 (247) | VEO-IBD |
| <i>XLP2</i> | X-vezan limfoproliferativni sindrom 2 (247) | VEO-IBD |
| <i>UNG</i> | Sindrom hiper IgM tipa 5 (247) | VEO-IBD, EO-IBD |
| <i>ITGB2</i> | Pomanjkanje adhezije levkocitov 1 (50, 258) | INF-IBD, VEO-IBD, EO-IBD, PED-IBD |
| <i>XIAP</i> | X-vezan limfoproliferativni sindrom 2 (50, 259) | INF-IBD, VEO-IBD, EO-IBD, PED-IBD |
| <i>G6PC3</i> | Prirojena nevtropenija (50) | VEO-IBD, EO-IBD, PED-IBD |
| <i>GUCY2C</i> | Družinska dedna driska (50) | VEO-IBD, EO-IBD, PED-IBD |
| <i>SLC37A4</i> | Dedna bolezen shranjevanja glikogena tipa Ib (50) | VEO-IBD, EO-IBD, PED-IBD |
| <i>HPS1</i> | Hermansky-Pudlakov sindrom 1 (50) | VEO-IBD, EO-IBD, PED-IBD |
| <i>HPS4</i> | Hermansky-Pudlakov sindrom 4 (50) | VEO-IBD, EO-IBD, PED-IBD |
| <i>HPS6</i> | Hermansky-Pudlakov sindrom 6 (50) | VEO-IBD, EO-IBD, PED-IBD |
| <i>DOCK8</i> | Sindrom hiper IgE (50) | EO-IBD |
| <i>FERMT1</i> | Kindlerjev sindrom (50, 260) | VEO-IBD, EO-IBD, PED-IBD |
| <i>MVK</i> | Pomanjkanje mevalonat kinaze (257) | EO-IBD |

| | | |
|---------------|---|-----------------|
| <i>PTEN</i> | PTEN-sindrom hamartoma tumorja (261) | EO-IBD |
| <i>IKBKG</i> | X-vezana ektodermalna imunska pomanjkljivost (50) | EO-IBD |
| <i>CTLA4</i> | Avtoimunski limfoproliferativni sindrom tipa 5 (96, 238, 262) | EO-IBD, PED-IBD |
| <i>ICOS</i> | Pogosta variabilna imunska pomanjkljivost 1 (50) | EO-IBD, PED-IBD |
| <i>STXBP2</i> | Družinska hemofagocitna limfohistiocitoza tipa 5 (50) | EO-IBD, PED-IBD |
| <i>STAT3</i> | Sindrom hiper IgE (257) | EO-IBD, PED-IBD |

Orodje ClueGO rezultate analiz GO prikaže kot statistično značilne skupine nadpomenk in podpomenk pojmov GO, zato bomo pri rezultatih poročali le o podpomenkah najnižje možne ravni v posamezni skupini rezultatov. Podpomenke pojmov GO najnižje ravni najbolj specifično opišejo, kar je skupnega preiskovani skupini genov. Rezultati analize genske ontologije posameznih podskupin in združene skupine vseh vključenih genov so zbrani v tabeli 14.

Tabela 13: Statistično značilni rezultati analiz GO posameznih podskupin monogenih dednih pediatričnih oblik KVČB

| Podskupina | GO ID | Pojem GO | <i>p</i> vrednost | Delež asociiranih genov |
|------------|------------|---|------------------------|-------------------------|
| Vsi geni | KEGG:05340 | <i>Primary immunodeficiency</i> | $1,99 \times 10^{-30}$ | 48,65 % |
| Vsi geni | KEGG:04659 | <i>Th17 cell differentiation</i> | $3,14 \times 10^{-11}$ | 11,21 % |
| Vsi geni | GO:0045321 | <i>leukocyte activation</i> | $4,48 \times 10^{-11}$ | 6,04 % |
| Vsi geni | KEGG:05145 | <i>Toxoplasmosis</i> | $1,55 \times 10^{-9}$ | 9,73 % |
| Vsi geni | GO:0002520 | <i>immune system development</i> | $2,77 \times 10^{-9}$ | 5,76 % |
| Vsi geni | KEGG:04660 | <i>T cell receptor signaling pathway</i> | $1,37 \times 10^{-8}$ | 9,71 % |
| Vsi geni | KEGG:04068 | <i>FoxO signaling pathway</i> | $1,57 \times 10^{-7}$ | 7,58 % |
| Vsi geni | KEGG:04662 | <i>B cell receptor signaling pathway</i> | $3,09 \times 10^{-7}$ | 11,27 % |
| Vsi geni | KEGG:04630 | <i>Jak-STAT signaling pathway</i> | $1,07 \times 10^{-6}$ | 6,17 % |
| Vsi geni | GO:0042100 | <i>B cell proliferation</i> | $1,23 \times 10^{-6}$ | 18,75 % |
| Vsi geni | KEGG:04064 | <i>NF-kappa B signaling pathway</i> | $2,89 \times 10^{-6}$ | 8,42 % |
| Vsi geni | GO:0042113 | <i>B cell activation</i> | $1,45 \times 10^{-5}$ | 12,50 % |
| Vsi geni | KEGG:04672 | <i>Intestinal immune network for IgA production</i> | $1,63 \times 10^{-5}$ | 12,24 % |
| Vsi geni | KEGG:04658 | <i>Th1 and Th2 cell differentiation</i> | $3,74 \times 10^{-5}$ | 7,61 % |
| Vsi geni | KEGG:05321 | <i>Inflammatory bowel disease (IBD)</i> | $7,91 \times 10^{-5}$ | 9,23 % |
| Vsi geni | GO:0042098 | <i>T cell proliferation</i> | $2,15 \times 10^{-3}$ | 6,67 % |
| Vsi geni | GO:0097696 | <i>STAT cascade</i> | $1,97 \times 10^{-3}$ | 6,85 % |
| NEO | GO:0002703 | <i>regulation of leukocyte mediated immunity</i> | $3,54 \times 10^{-5}$ | 4,05 % |
| NEO | KEGG:05321 | <i>Inflammatory bowel disease (IBD)</i> | $4,79 \times 10^{-5}$ | 4,62 % |
| INF | KEGG:05340 | <i>Primary immunodeficiency</i> | $1,22 \times 10^{-22}$ | 32,43 % |
| INF | KEGG:04662 | <i>B cell receptor signaling pathway</i> | $2,92 \times 10^{-7}$ | 8,45 % |
| INF | KEGG:04659 | <i>Th17 cell differentiation</i> | $3,33 \times 10^{-6}$ | 5,61 % |

| | | | | |
|-----|------------|---|------------------------|---------|
| INF | GO:0002200 | <i>somatic diversification of immune receptors</i> | $5,06 \times 10^{-5}$ | 25,00 % |
| INF | KEGG:04064 | <i>NF-kappa B signaling pathway</i> | $5,25 \times 10^{-5}$ | 5,26 % |
| INF | KEGG:05321 | <i>Inflammatory bowel disease (IBD)</i> | $2,44 \times 10^{-4}$ | 6,15 % |
| INF | GO:0097696 | <i>STAT cascade</i> | $3,64 \times 10^{-4}$ | 5,48 % |
| INF | GO:0042098 | <i>T cell proliferation</i> | $6,70 \times 10^{-4}$ | 4,00 % |
| INF | KEGG:04658 | <i>Th1 and Th2 cell differentiation</i> | $7,36 \times 10^{-4}$ | 4,35 % |
| INF | GO:0042100 | <i>B cell proliferation</i> | $7,38 \times 10^{-4}$ | 9,38 % |
| INF | GO:0042113 | <i>B cell activation</i> | $2,15 \times 10^{-3}$ | 6,25 % |
| INF | KEGG:04672 | <i>Intestinal immune network for IgA production</i> | $2,10 \times 10^{-3}$ | 6,12 % |
| VEO | KEGG:04659 | <i>Th17 cell differentiation</i> | $8,00 \times 10^{-11}$ | 8,41 % |
| VEO | KEGG:05340 | <i>Primary immunodeficiency</i> | $5,26 \times 10^{-9}$ | 16,22 % |
| VEO | KEGG:04658 | <i>Th1 and Th2 cell differentiation</i> | $1,32 \times 10^{-6}$ | 6,52 % |
| EO | KEGG:05340 | <i>Primary immunodeficiency</i> | $4,73 \times 10^{-5}$ | 8,11 % |
| EO | KEGG:04920 | <i>Adipocytokine signaling pathway</i> | $1,55 \times 10^{-4}$ | 4,35 % |

3.1.1.1 Primerjalna analiza podskupin vzročnih genov KVČB

Za primerjalno analizo podskupin smo opredelili skupino genomskih regij, povezanih z odraslo kompleksno obliko KVČB (šifra ADULT-1), na osnovi že objavljenih 201 genomskih regij (2, 16), najnovejših študij »finega kartiranja« vzročnega gena (95) in podatkovnih zbirk eQTL(263) (ang. expression quantitative trait loci). Dodatno smo opredelili sekundarno podskupino vzročnih genov za odraslo kompleksno KVČB (šifra ADULT-2) na osnovi definicije pojma GO *Inflammatory Bowel Disease* (ko05321), ki je opredeljen na osnovi eksperimentalnih dokazov o vpletenosti genov v patogenezo KVČB v prebavni cevi. Seznama genov obeh podskupin odrasle kompleksne oblike KVČB sta zbrana v tabeli 15.

Tabela 14: Seznam vzročnih genov za odraslo kompleksno KVČB po podskupinah

| Podskupina GWAS (ADULT-1) | | | | Podskupina KEGG (ADULT-2) | |
|------------------------------|-----------|---------|----------|------------------------------|--------|
| ADAM30 | DNMT3B | LSP1 | RSPO3 | FOXP3 | IL5 |
| ADCY3 | EPO | LTBR | SH2B3 | IFNG | IL6 |
| ADO | ERAP2 | LY75 | SLC10A4 | IFNGR1 | JUN |
| AHSA2 | F5 | MAP3K8 | SLC39A8 | IFNGR2 | MAF |
| ATG16L1 | FCGR2A | MFSD13A | SLC9A3 | IL10 | NFATC1 |
| B3GNT2 | FIGNL1 | MST1 | SMAD3 | IL12A | NFKB1 |
| BACH2 | FOSL2 | MTMR3 | SMURF1 | IL12B | NOD2 |
| BORCS5 | FUT2 | NDFIP1 | SP140 | IL12RB1 | NR1F3 |
| BTBD8 | GNA12 | NDUFAF1 | STAT1 | IL12RB2 | RELA |
| C5orf66 | GPR35 | NFATC1 | STAT3 | IL13 | RORA |
| CALM3 | GPX4 | NFKB1 | SULT1A2 | IL17A | SMAD2 |
| CARD9 | HDAC7 | NFKBIZ | TAB2 | IL17F | STAT1 |
| CCDC116 | ICOSLG | NOD2 | TAGAP | IL18 | STAT3 |
| CCDC82 | IL10 | NR5A2 | TEF | IL18R1 | STAT4 |
| CCDC88B | IL15RA | NXPE1 | THADA | IL18RAP | STAT6 |
| CCL8 | IL23R | PARK7 | TMEM50B | IL1A | TBX21 |
| CCR3 | INAVA | PF4V1 | TNFRSF18 | IL1B | TGFB1 |
| CD226 | IRF5 | PHACTR2 | TNFSF15 | IL2 | TGFB2 |
| CD244 | IRF8 | PLA2G4A | TNFSF18 | IL21R | TGFB3 |
| CD28 | ITGAL | PRKAB1 | TRAF3IP2 | IL22 | TLR2 |
| CD40 | ITIH4 | PRKCB | TRIB1 | IL23A | TLR4 |
| CD6 | JAK2 | PTGER4 | TSPAN14 | IL23R | TLR5 |
| CDKAL1 | JAZF1 | PTK2B | TUBD1 | IL2RG | TNF |
| CISD1 | KIF3B | PTPN2 | UBAC2 | | |
| CPEB4 | KIR3DL1 | PTPN22 | UBLCP1 | | |
| CREM | LACC1 | RASGRP1 | UCN | | |
| CRTC3 | LIFR | RGS14 | UQCC1 | | |
| CTSZ | LINC01475 | RIT1 | USP12 | | |
| DAP | LPXN | RMI2 | ZBTB38 | | |
| DENND1B | LRRC32 | RNASET2 | ZFP36L1 | | |
| DGKE | LRRK2 | RPL3 | ZFP90 | | |

V nadaljevanju bo podskupina vseh vzročnih genov za monogenske dedne oblike KVČB označena s šifro PED. Rezultati primerjalnih analiz genske ontologije so zbrani v tabelah 14, 15 in 16. Kot v poglavju 3.1.1. poročamo le o podpomenkah najnižje možne ravni v posamezni skupini rezultatov GO.

Tabela 15: Izbrani statistično značilni rezultati primerjalne analize GO med PED in ADULT-1

| GO ID | Pojem GO | <i>p</i> -vrednost | Delež asociiranih genov v obeh podskupinah | Specifičnost pojma GO |
|------------|--|------------------------|--|-----------------------|
| KEGG:05340 | <i>Primary immunodeficiency</i> | $8,12 \times 10^{-22}$ | 48,65 % | PED |
| KEGG:04659 | <i>Th17 cell differentiation</i> | $9,52 \times 10^{-19}$ | 21,50 % | Ni specifičen |
| KEGG:05321 | <i>Inflammatory bowel disease (IBD)</i> | $1,62 \times 10^{-16}$ | 27,69 % | ADULT-1 |
| GO:0002682 | <i>regulation of immune system process</i> | $8,04 \times 10^{-16}$ | 6,97 % | ADULT-1 |
| GO:0045321 | <i>leukocyte activation</i> | $1,62 \times 10^{-14}$ | 10,57 % | Ni specifičen |
| KEGG:04672 | <i>Intestinal immune network for IgA production</i> | $9,09 \times 10^{-13}$ | 28,57 % | ADULT-1 |
| GO:0046649 | <i>lymphocyte activation</i> | $3,54 \times 10^{-12}$ | 11,17 % | Ni specifičen |
| GO:0031401 | <i>positive regulation of protein modification process</i> | $2,45 \times 10^{-10}$ | 5,43 % | ADULT-1 |
| GO:0097696 | <i>STAT cascade</i> | $3,64 \times 10^{-10}$ | 19,18 % | ADULT-1 |
| KEGG:04658 | <i>Th1 and Th2 cell differentiation</i> | $6,67 \times 10^{-10}$ | 16,30 % | Ni specifičen |
| GO:0002520 | <i>immune system development</i> | $9,85 \times 10^{-10}$ | 9,05 % | PED |
| GO:0080134 | <i>regulation of response to stress</i> | $1,60 \times 10^{-9}$ | 5,22 % | ADULT-1 |
| KEGG:04630 | <i>Jak-STAT signaling pathway</i> | $3,27 \times 10^{-9}$ | 11,11 % | ADULT-1 |
| KEGG:04660 | <i>T cell receptor signaling pathway</i> | $3,58 \times 10^{-9}$ | 14,56 % | PED |
| GO:0007259 | <i>JAK-STAT cascade</i> | $4,34 \times 10^{-9}$ | 18,31 % | ADULT-1 |
| GO:1904894 | <i>positive regulation of STAT cascade</i> | $2,00 \times 10^{-8}$ | 22,00 % | ADULT-1 |
| KEGG:04064 | <i>NF-kappa B signaling pathway</i> | $1,82 \times 10^{-7}$ | 13,68 % | Ni specifičen |
| GO:0046425 | <i>regulation of JAK-STAT cascade</i> | $3,18 \times 10^{-7}$ | 17,19 % | ADULT-1 |
| KEGG:04514 | <i>Cell adhesion molecules (CAMs)</i> | $4,58 \times 10^{-7}$ | 10,34 % | ADULT-1 |
| KEGG:04662 | <i>B cell receptor signaling pathway</i> | $9,74 \times 10^{-7}$ | 15,49 % | PED |
| GO:0032653 | <i>regulation of interleukin-10 production</i> | $9,42 \times 10^{-6}$ | 28,00 % | ADULT-1 |
| GO:0042098 | <i>T cell proliferation</i> | $2,09 \times 10^{-5}$ | 13,33 % | Ni specifičen |
| GO:0030098 | <i>lymphocyte differentiation</i> | $2,10 \times 10^{-5}$ | 15,79 % | PED |
| GO:0030217 | <i>T cell differentiation</i> | $3,51 \times 10^{-5}$ | 18,18 % | PED |
| KEGG:04068 | <i>FoxO signaling pathway</i> | $7,37 \times 10^{-5}$ | 9,09 % | PED |
| GO:0042113 | <i>B cell activation</i> | $9,08 \times 10^{-4}$ | 14,58 % | PED |
| GO:0042100 | <i>B cell proliferation</i> | $9,82 \times 10^{-4}$ | 18,75 % | PED |
| GO:0002200 | <i>somatic diversification of immune receptors</i> | $6,82 \times 10^{-2}$ | 25,00 % | PED |

Tabela 16: Izbrani statistično značilni rezultati primerjalne analize GO med PED in ADULT-2

| GO ID | Pojem GO | p-vrednost | Delež asociiranih genov v obeh podskupinah | Specifičnost pojma GO |
|------------|---|------------------------|--|-----------------------|
| KEGG:05321 | <i>Inflammatory bowel disease (IBD)</i> | $2,33 \times 10^{-90}$ | 73,85 % | ADULT-2 |
| KEGG:04659 | <i>Th17 cell differentiation</i> | $3,17 \times 10^{-49}$ | 33,64 % | ADULT-2 |
| KEGG:04060 | <i>Cytokine-cytokine receptor interaction</i> | $8,67 \times 10^{-38}$ | 14,44 % | ADULT-2 |
| KEGG:04658 | <i>Th1 and Th2 cell differentiation</i> | $2,17 \times 10^{-32}$ | 28,26 % | ADULT-2 |
| KEGG:04630 | <i>Jak-STAT signaling pathway</i> | $1,72 \times 10^{-28}$ | 17,28 % | ADULT-2 |
| KEGG:05340 | <i>Primary immunodeficiency</i> | $5,35 \times 10^{-27}$ | 48,65 % | PED |
| GO:0045321 | <i>leukocyte activation</i> | $2,53 \times 10^{-22}$ | 10,57 % | Ni specifičen |
| GO:0001817 | <i>regulation of cytokine production</i> | $7,74 \times 10^{-22}$ | 8,33 % | ADULT-2 |
| KEGG:04380 | <i>Osteoclast differentiation</i> | $2,53 \times 10^{-20}$ | 16,41 % | ADULT-2 |
| KEGG:04660 | <i>T cell receptor signaling pathway</i> | $1,07 \times 10^{-17}$ | 17,48 % | Ni specifičen |
| GO:0002696 | <i>positive regulation of leukocyte activation</i> | $1,69 \times 10^{-17}$ | 15,08 % | Ni specifičen |
| GO:0032660 | <i>regulation of interleukin-17 production</i> | $2,96 \times 10^{-16}$ | 66,67 % | ADULT-2 |
| GO:0042110 | <i>T cell activation</i> | $3,38 \times 10^{-16}$ | 12,93 % | Ni specifičen |
| GO:0032620 | <i>interleukin-17 production</i> | $7,80 \times 10^{-16}$ | 62,50 % | ADULT-2 |
| GO:0007159 | <i>leukocyte cell-cell adhesion</i> | $3,43 \times 10^{-15}$ | 11,45 % | Ni specifičen |
| GO:0050863 | <i>regulation of T cell activation</i> | $5,80 \times 10^{-15}$ | 14,05 % | Ni specifičen |
| KEGG:04620 | <i>Toll-like receptor signaling pathway</i> | $1,20 \times 10^{-14}$ | 15,38 % | ADULT-2 |
| GO:0002520 | <i>immune system development</i> | $2,95 \times 10^{-13}$ | 8,23 % | PED |
| KEGG:04068 | <i>FoxO signaling pathway</i> | $1,24 \times 10^{-11}$ | 11,36 % | PED |
| KEGG:04662 | <i>B cell receptor signaling pathway</i> | $3,73 \times 10^{-11}$ | 16,90 % | PED |
| GO:0097696 | <i>STAT cascade</i> | $5,18 \times 10^{-11}$ | 16,44 % | ADULT-2 |
| KEGG:04064 | <i>NF-kappa B signaling pathway</i> | $5,68 \times 10^{-11}$ | 13,68 % | PED |
| GO:0042113 | <i>B cell activation</i> | $4,67 \times 10^{-10}$ | 20,83 % | Ni specifičen |
| KEGG:04672 | <i>Intestinal immune network for IgA production</i> | $5,79 \times 10^{-10}$ | 20,41 % | Ni specifičen |
| GO:1904894 | <i>positive regulation of STAT cascade</i> | $7,17 \times 10^{-10}$ | 20,00 % | ADULT-2 |
| GO:0007259 | <i>JAK-STAT cascade</i> | $1,06 \times 10^{-9}$ | 15,49 % | ADULT-2 |
| GO:0032615 | <i>interleukin-12 production</i> | $1,85 \times 10^{-9}$ | 32,00 % | ADULT-2 |
| GO:0032655 | <i>regulation of interleukin-12 production</i> | $1,85 \times 10^{-9}$ | 32,00 % | ADULT-2 |
| KEGG:04668 | <i>TNF signaling pathway</i> | $6,00 \times 10^{-9}$ | 11,11 % | ADULT-2 |
| KEGG:04621 | <i>NOD-like receptor signaling pathway</i> | $6,08 \times 10^{-9}$ | 8,33 % | ADULT-2 |
| GO:0050864 | <i>regulation of B cell activation</i> | $5,72 \times 10^{-8}$ | 21,62 % | Ni specifičen |
| GO:0042100 | <i>B cell proliferation</i> | $6,79 \times 10^{-7}$ | 21,88 % | PED |
| GO:0030217 | <i>T cell differentiation</i> | $6,23 \times 10^{-6}$ | 15,91 % | PED |
| GO:0002200 | <i>somatic diversification of immune receptors</i> | $1,99 \times 10^{-4}$ | 33,33 % | PED |

Pri preliminarni primerjalni analizi med podskupinami genov, povezanih s pediatričnimi monogenetskimi dednimi oblikami KVČB, so se statistično značilne razlike pojavile samo, kadar smo primerjali podskupino vzročnih genov sindromov z nastopom bolezni pred 6. letom starosti in podskupin po 6. letu starosti. Za povečanje statistične moči smo primerjali GO vseh vzročnih genov sindromov z nastopom bolezni pred 6. letom starosti (v nadaljevanju podskupina POD6A) in sindromov z nastopom bolezni po 6. letu starosti (v nadaljevanju podskupina NAD6A). Rezultati primerjalne analize POD6A in NAD6A so zbrani v tabeli 18.

Tabela 17: Izbrani statistično značilni rezultati primerjalne analize GO med POD6A in NAD6A

| GO ID | Pojem GO | <i>p</i> -vrednost | Delež asociiranih genov v obeh podskupinah | Specifičnost pojma GO |
|------------|---|------------------------|--|-----------------------|
| KEGG:05340 | <i>Primary immunodeficiency</i> | $8,82 \times 10^{-32}$ | 48,65 % | POD6A |
| KEGG:04659 | <i>Th17 cell differentiation</i> | $3,39 \times 10^{-12}$ | 11,21 % | Ni specifičen |
| KEGG:04660 | <i>T cell receptor signaling pathway</i> | $1,99 \times 10^{-9}$ | 9,71 % | NAD6A |
| KEGG:04662 | <i>B cell receptor signaling pathway</i> | $5,64 \times 10^{-8}$ | 11,27 % | POD6A |
| GO:0046651 | <i>lymphocyte proliferation</i> | $8,69 \times 10^{-8}$ | 8,18 % | Ni specifičen |
| GO:0032943 | <i>mononuclear cell proliferation</i> | $9,20 \times 10^{-8}$ | 8,11 % | Ni specifičen |
| KEGG:04630 | <i>Jak-STAT signaling pathway</i> | $1,57 \times 10^{-7}$ | 6,17 % | POD6A |
| GO:0042100 | <i>B cell proliferation</i> | $2,79 \times 10^{-7}$ | 18,75 % | POD6A |
| KEGG:04064 | <i>NF-kappa B signaling pathway</i> | $5,24 \times 10^{-7}$ | 8,42 % | Ni specifičen |
| GO:0050863 | <i>regulation of T cell activation</i> | $3,35 \times 10^{-6}$ | 6,61 % | NAD6A |
| GO:0042113 | <i>B cell activation</i> | $3,39 \times 10^{-6}$ | 12,50 % | POD6A |
| KEGG:04672 | <i>Intestinal immune network for IgA production</i> | $3,65 \times 10^{-6}$ | 12,24 % | POD6A |
| KEGG:04658 | <i>Th1 and Th2 cell differentiation</i> | $7,91 \times 10^{-6}$ | 7,61 % | Ni specifičen |
| GO:0030098 | <i>lymphocyte differentiation</i> | $8,45 \times 10^{-6}$ | 10,53 % | NAD6A |
| KEGG:05321 | <i>Inflammatory bowel disease (IBD)</i> | $1,76 \times 10^{-5}$ | 9,23 % | POD6A |
| GO:0050870 | <i>positive regulation of T cell activation</i> | $4,23 \times 10^{-5}$ | 7,79 % | NAD6A |
| GO:0030217 | <i>T cell differentiation</i> | $4,85 \times 10^{-5}$ | 11,36 % | NAD6A |
| GO:0030888 | <i>regulation of B cell proliferation</i> | $1,79 \times 10^{-4}$ | 14,29 % | POD6A |
| GO:0002200 | <i>somatic diversification of immune receptors</i> | $4,34 \times 10^{-4}$ | 25,00 % | POD6A |
| GO:0097696 | <i>STAT cascade</i> | $4,47 \times 10^{-4}$ | 6,85 % | POD6A |
| GO:0042098 | <i>T cell proliferation</i> | $4,59 \times 10^{-4}$ | 6,67 % | POD6A |
| KEGG:04920 | <i>Adipocytokine signaling pathway</i> | $4,07 \times 10^{-3}$ | 4,35 % | NAD6A |

3.1.2 Genska ontologija bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF

3.1.2.1 Označevalci odziva na zaviralce TNF v RA

Z iskalnimi nizi, določenimi v poglavju 2.6.1.2, za revmatoidni artritis smo zbrali skupaj 99 študij, ki so ustrezale kriterijem. Od tega je 52 študij objavilo označevalce odziva na ravni DNA, 11 študij je objavilo označevalce odziva na ravni RNA, 34 študij je objavilo označevalce odziva na ravni proteinov in 2 študiji, ki sta objavili označevalce odziva na več ravneh. Skupaj so študije objavile 57 različnih DNA-označevalcev odziva, 175 različnih RNA-označevalcev odziva in 115 različnih proteinskih označevalcev odziva na zaviralce TNF. Seznam DNA-označevalcev odziva na zaviralce TNF je zapisan v tabeli 19, seznam RNA-označevalcev v tabeli 20, seznam proteinskih označevalcev pa v tabeli 21. tabela 22 prikazuje izbrane statistično značilne rezultate genske ontologije označevalcev odziva na zaviralce TNF v RA.

Tabela 18: Seznam genov, v katerih ležijo DNA-označevalci odziva na zaviralce TNF pri RA

| | | | |
|---------|----------|---------|----------|
| AFF3 | FCGR3A | MAP3K14 | STXBP6 |
| ARAP2 | GBP6 | MAPK14 | TLR1 |
| BACH2 | GFRA1 | MED15 | TLR5 |
| C9orf72 | HLA-C | MOB3B | TLR9 |
| CCL21 | HLA-DRB1 | MSK1 | TNF |
| CD19 | IFNK | MSK2 | TNFR1A |
| CD226 | IL10 | MYD88 | TNFRSF1A |
| CD28 | IL6 | NFKB1 | TNFRSF1B |
| CD84 | KLRC1 | NLRP3 | TNFSFR1B |
| CERS6 | KLRD1 | NUBPL | TRAF1 |
| CHUK | LMO4 | PDE3A | TRAILR1 |
| CNTN5 | LTA | PDZD2 | WDR27 |
| CST5 | MAFB | PON1 | |
| EYA4 | MAP2K6 | PTPRC | |
| FCGR2A | MAP3K1 | QKI | |

Tabela 19: Seznam RNA-označevalcev odziva na zaviralce TNF pri RA

| Asociacija | Z odzivnostjo na zaviralce TNF | | | | Z neodzivnostjo | |
|------------|--------------------------------|----------|-----------|----------|-----------------|-----------|
| | Povišano | | Zmanjšano | | Povišano | Zmanjšano |
| | AADAT | MCP | ADAM12 | IL1B | AP1S2 | HLA-DQA1 |
| | ADGRE5 | MED12L | ADAMTS1 | KCNJ13 | CDK2 | IGHM |
| | APP | MGLL | ADAMTS5 | LAMR1 | DPPA4 | MBD1 |
| | BCL2A1 | MPP7 | ADM | LRRIQ3 | ERBB2 | MST1R |
| | C5 | MRPL22 | AKAP9 | MTCBP-1 | FOXA2 | NF1 |
| | CCL4 | MTURN | ARL6 | MYO10 | IL11 | NOS2 |
| | CD11C | NBN | ATP6V0A2 | NFKBIA | LGALS3BP | NR2F6 |
| | CD83 | NEXN | ATP6V0E2 | NPRL2 | MAP2K3 | S100A8 |
| | CD84 | NR4A2 | BEX2 | OGG1 | MEIS1 | S100A9 |
| | CMIP | NT5C3A | C15ORF40 | OR2L3 | MX2 | |
| | CMPK2 | PCGF5 | CATSPER3 | OR6C74 | OAS1 | |
| | CSRNP1 | PCSK6 | CCL3 | OSM | OAS2 | |
| | DUSP1 | PDE3A | CHRND | PALD1 | PPARG | |
| | EGF | PDE4B | CHST3 | PDE4B | SERPING1 | |
| | EGR2 | PKHD1L1 | CLIC3 | PFKFB4 | | |
| | EGR3 | PMAIP1 | COLGALT2 | PGK1 | | |
| | FRMD3 | PPCDC | CXCL2 | PIGO | | |
| | G0S2 | PPP1R15A | CXCL8 | PIGV | | |
| | GBP1 | PSTPIP2 | CYP3A4 | PIH1D2 | | |
| | GBP5 | PTGS2 | DDX39B | PPP1R15A | | |
| | GBP7 | PTPRD | DND1 | PSMB9 | | |
| | GCH1 | RANBP17 | EDC3 | PTGDS | | |
| | GCNT2 | RNASE3 | EIF4E2 | PXT1 | | |
| | GMPR | RNF11 | ELOVL4 | RAD23A | | |
| | GPD2 | RUNX1 | EPS15 | RAMP3 | | |
| | GRAMD1B | SCN2B | FAIM | RASGRP3 | | |
| | GTF2F2 | SESTD1 | FAM221A | RNF19B | | |
| | GTPBP2 | SLK | FBXO10 | SH2D2A | | |
| | HERPUD2 | SQSTM1 | FBXO5 | SLC7A6OS | | |
| | HIF1A | STAT1 | FSCN1 | SORBS3 | | |
| | HSPC159 | STAT2 | FSD1 | TMEM186 | | |
| | IFIT1B | TAP2 | GPN2 | TPRA1 | | |
| | IFNG | TAS2R50 | GSX1 | UNQ5840 | | |
| | KNG1 | TMEM268 | HIRIP3 | UQCRES1 | | |
| | LGALS13 | TMOD2 | HLA-DPB1 | ZBTB6 | | |
| | LUC7L3 | TPM1 | HOPX | ZFP36L2 | | |
| | MAP4K2 | UVRAG | HSCB | ZNF2 | | |
| | | VEPH1 | | ZNF425 | | |
| | | XRN1 | | | | |
| | | YPEL5 | | | | |

Tabela 20: Seznam proteinskih označevalcev odziva na zaviralce TNF pri RA

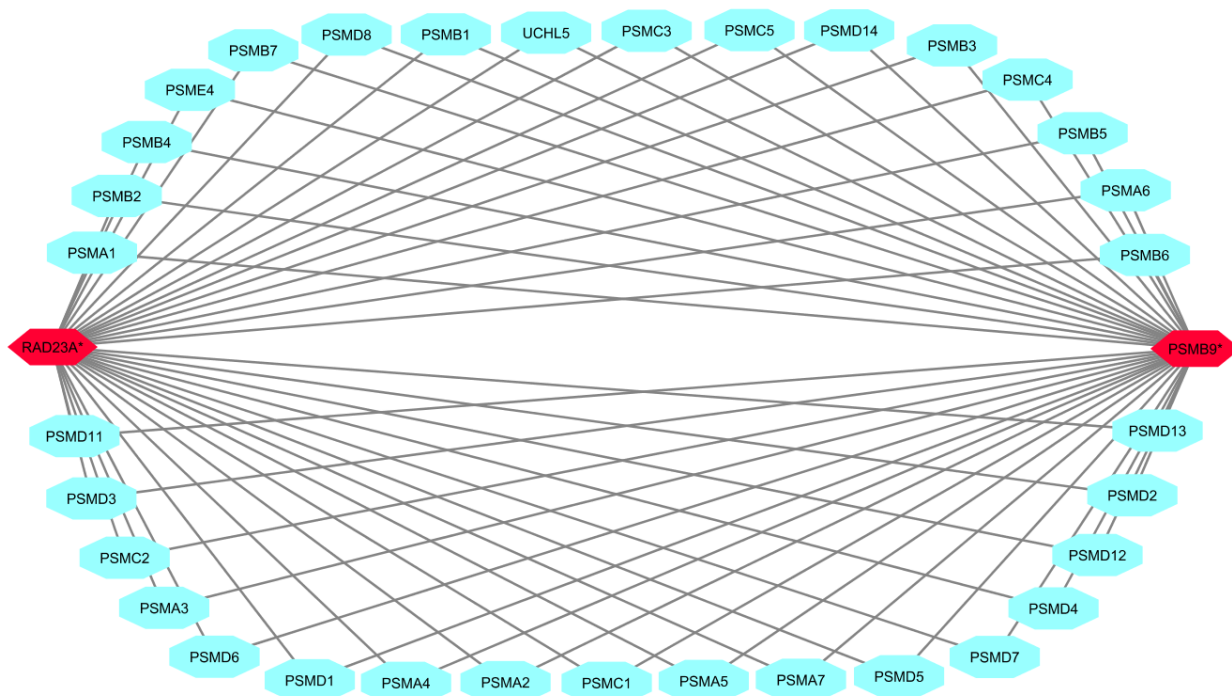
| Asociacija | Z odzivnostjo na zaviralce TNF | | | | Z neodzivnostjo | |
|------------|--------------------------------|-----------|-----------|----------|-----------------|-----------|
| | Povišano | | Zmanjšano | | Povišano | Zmanjšano |
| | APOE | IL15 | AGPAT4 | MRPL33 | A2M | ABI3BP |
| | AZGP1 | IL1A | ANAPC11 | MYO15A | ADAMTSL2 | APOA1 |
| | BGN | IL1B | ATP5H | NEK5 | APMAP | CCL2 |
| | C1R | IL1R2 | BIRC5 | NONO | APOA2 | CFHR4 |
| | CAST | IL1RA | CX3CL1 | PALLD | APOB | EGF |
| | CCL11 | IL6 | FAP | PGLS | APOC1 | TCFL5 |
| | CD30 | ITIH3 | FCN1 | RIN2 | APOC3 | |
| | CLU | OGN | FOXC2 | RPL13A | APOM | |
| | COMP | PGA3 | GMNN | RPL7 | C3 | |
| | CPN2 | PLAU | H3F3A | RPLP0P6 | C4B | |
| | CRP | PLG | ICAM1 | RPS12 | C8A | |
| | CSF2 | PROS1 | IL2 | SCNN1B | CFL1 | |
| | CXCL10 | RPL36A | IL33 | TF | F9 | |
| | CXCL13 | S100A8 | IL34 | TNFSF11 | FN1 | |
| | DYNC1I1 | S100A9 | IL6 | TNFSF13B | GSN | |
| | FGF1 | STUB1 | MC1R | TRAF3IP2 | HPX | |
| | FMOD | TMPRSS11A | MC3R | UBA52 | IL17 | |
| | HP | TNF | MC5R | WDR83OS | ITIH1 | |
| | HSP58 | TNFRSF1A | | | ITIH2 | |
| | IL12P40 | TNFRSF1B | | | LGALS3BP | |
| | IL12P70 | TPPP3 | | | MASP2 | |
| | | | | | PF4 | |
| | | | | | SH3BGRL3 | |
| | | | | | TAGLN2 | |
| | | | | | THBS1 | |
| | | | | | TPM3 | |
| | | | | | TPM4 | |
| | | | | | TRAF1 | |

Tabela 21: Izbrani statistično značilni rezultati genske ontologije bioloških označevalcev odziva na zaviralce pri KVČB

| GO ID | Pojem GO | Podskupina | <i>p</i> -vrednost | Delež asociiranih genov v podskupini |
|------------|--|--|------------------------|--------------------------------------|
| GO:0072562 | <i>blood microparticle</i> | Proteinski označevalci s povečanim izražanjem pri neodzivnosti | $1,18 \times 10^{-17}$ | 8,44 % |
| KEGG:04668 | <i>TNF signaling pathway</i> | DNA-označevalci | $9,32 \times 10^{-15}$ | 12,04 % |
| GO:0072562 | <i>blood microparticle</i> | Proteinski označevalci s povečanim izražanjem pri odzivnosti | $1,71 \times 10^{-11}$ | 7,14 % |
| KEGG:04620 | <i>Toll-like receptor signaling pathway</i> | DNA-označevalci | $4,56 \times 10^{-10}$ | 9,62 % |
| KEGG:04064 | <i>NF-kappa B signaling pathway</i> | DNA-označevalci | $6,67 \times 10^{-9}$ | 9,47 % |
| GO:0034368 | <i>protein-lipid complex remodeling</i> | Proteinski označevalci s povečanim izražanjem pri neodzivnosti | $6,88 \times 10^{-9}$ | 26,32 % |
| GO:0006956 | <i>complement activation</i> | Proteinski označevalci s povečanim izražanjem pri neodzivnosti | $1,93 \times 10^{-8}$ | 21,74 % |
| GO:0007249 | <i>I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling</i> | DNA-označevalci | $5,00 \times 10^{-6}$ | 4,43 % |
| GO:0019218 | <i>regulation of steroid metabolic process</i> | Proteinski označevalci s povečanim izražanjem pri odzivnosti | $1,01 \times 10^{-5}$ | 11,11 % |
| GO:0070325 | <i>lipoprotein particle receptor binding</i> | Proteinski označevalci s povečanim izražanjem pri odzivnosti | $3,25 \times 10^{-5}$ | 16,67 % |
| KEGG:05323 | <i>Rheumatoid arthritis</i> | RNA-označevalci z zmanjšanim izražanjem pri odzivnosti | $7,05 \times 10^{-5}$ | 6,67 % |
| KEGG:04064 | <i>NF-kappa B signaling pathway</i> | RNA-označevalci z zmanjšanim izražanjem pri odzivnosti | $9,30 \times 10^{-5}$ | 6,32 % |
| GO:0032663 | <i>regulation of interleukin-2 production</i> | RNA-označevalci s povečanim izražanjem pri odzivnosti | $1,30 \times 10^{-4}$ | 13,33 % |

Razširjena analiza genskih mrež podskupin bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF v RA je pokazala nove pojme GO v obstoječih skupinah pojmov GO, ni pa pokazala novih skupin pojmov GO, razen v skupini, ki vsebuje pojma KEGG:03050 *proteasome* ($p = 4,89 \times 10^{-60}$) in GO:0000502 *proteasome complex* ($p = 7,61 \times 10^{-58}$). Ta skupina pojmov GO se pojavi med rezultati genske mreže GO RNA-označevalcev z zmanjšanim izražanjem pri

dobrem odzivu na zaviralce TNF. K visoki statistični značilnosti prispeva predvsem visoko število genov, ki ima interakcijo s *PSMB9* (264) in *RAD23A* (265), kot prikazuje slika 15.



Slika 15: Genska mreža genov PSMB9 in RAD23A

Slika 15 prikazuje odsek genske mreže RNA-označevalcev z zmanjšanim izražanjem pri dobrem odzivu na zaviralce TNF, ki ga oblikujeta gena *PSMB9* in *RAD23A*. Gen *PSMB9* in *RAD23A* imata interakcije z velikim številom genov, ki sodelujejo pri oblikovanju proteasoma.

3.1.2.2 Označevalci odziva na zaviralce TNF pri KVČB

Z iskalnimi nizi, določenimi v poglavju 2.6.1.2, smo za KVČB zbrali skupaj 40 študij, ki so ustrezale kriterijem. Zbirka zbranih študij, ki so poročale o bioloških označevalcih odziva na zaviralce TNF v KVČB, se ne razlikuje od zbirke v članku Goleta in sodelavcev(5). Pri preliminarni analizi zbranih bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF je prišlo do zanemarljivih razlik v *p*-vrednosti, ker so bile različice definicij GO snete z medmrežja v različnih časovnih obdobjih. V nadaljevanju se bomo glede genske ontologije bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF pri KVČB sklicevali na rezultate, ki so jih objavili Gole in sodelavci (5).

3.1.2.3 Primerjalna analiza označevalcev odziva pri KVČB in RA

Prvotna primerjalna analiza skupin pojmov GO osnovnih podskupin bioloških označevalcev je pokazala le manjše prekrivanje med podpomenkami, medtem ko je primerjalna analiza razširjenih genskih mrež pokazala zmerno prekrivanje med podpomenkami statistično značilnih skupin pojmov GO. Izbrani statistično značilni rezultati primerjalne analize razširjenih genskih mrež bioloških označevalcev odziva so zbrani v tabeli 23.

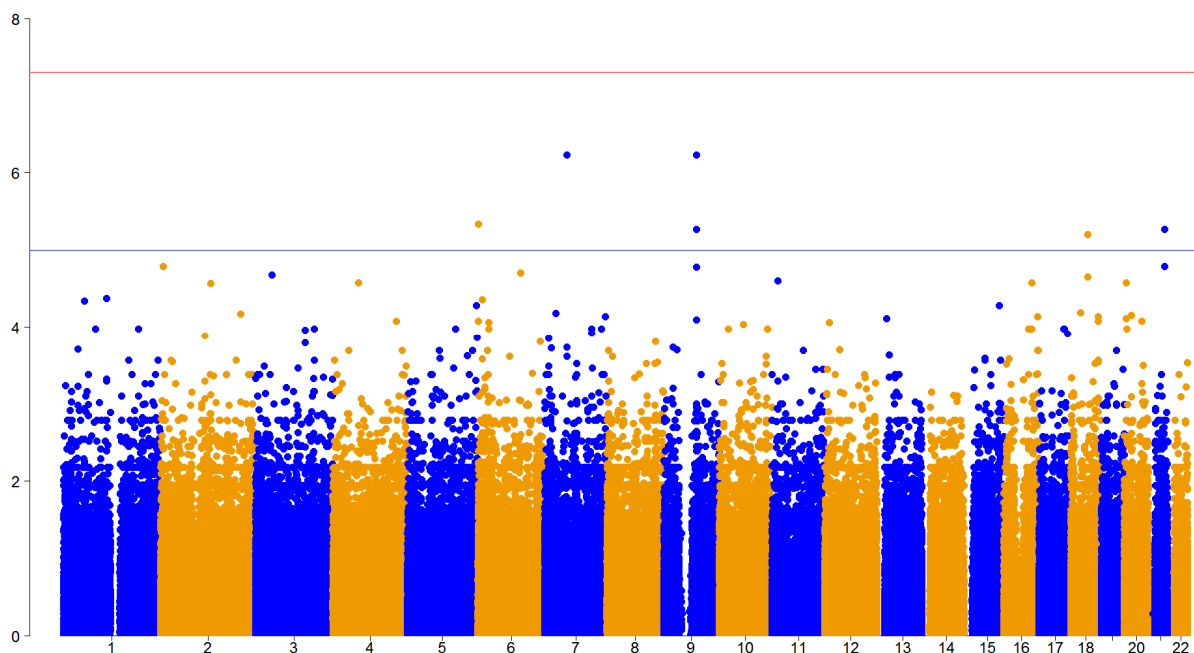
Tabela 22: Izbrani statistično značilni rezultati primerjalne analize genske ontologije bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF v KVČB in RA

| GO ID | Pojem GO | Najnižja <i>p</i> -vrednost (KVČB) | Delež asociiranih genov (KVČB) | Najnižja <i>p</i> -vrednost (RA) | Delež asociiranih genov (RA) |
|------------|--|------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| GO:0007249 | <i>I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling</i> | $3,83 \times 10^{-13}$ | 11,46 % | $5,00 \times 10^{-6}$ | 4,43 % |
| GO:0033993 | <i>response to lipid</i> | $5,14 \times 10^{-9}$ | 9,00 % | $1,48 \times 10^{-20}$ | 12,14 % |
| GO:0033554 | <i>cellular response to stress</i> | $3,19 \times 10^{-9}$ | 5,67 % | $3,23 \times 10^{-25}$ | 9,42 % |
| GO:0071396 | <i>cellular response to lipid</i> | $5,29 \times 10^{-7}$ | 9,04 % | $4,08 \times 10^{-20}$ | 13,93 % |
| GO:0048545 | <i>response to steroid hormone</i> | $3,63 \times 10^{-4}$ | 10,49 % | $2,92 \times 10^{-11}$ | 15,45 % |

3.2 Rezultati laboratorijske študije

3.2.1 Rezultati analize genetskih označevalcev na čipu GSA

Za analizo genetskih označevalcev odziva na zaviralce TNF na čipu GSA je bilo po kontroli kvalitete na voljo skupaj 82 vzorcev bolnikov z dobro opisanim odzivom na zaviralce TNF. Odziv smo določili na podlagi kriterija vprašalnika IBDQ in dolgoročnega odziva (> 30 tednov). 58 od 82 (70,7 %) bolnikov je imelo dober odziv na zaviralce TNF, preostalih 24 (29,3 %) pa nezadosten odziv. Rezultati analize genetskih označevalcev na čipu GSA so grafično prikazani na sliki 16, rezultati statističnih trendov so povzeti v tabeli 24.



Slika 16: Grafični prikaz asociacijske analize podatkov čipa GSA z odzivom na zaviralce TNF

Slika 16 prikazuje Manhattan graf analize GSA podatkov. Na horizontalni osi so kromosomi po vrstnem redu, na vertikalni osi pa negativna vrednost desetiškega logaritma p-vrednosti posameznega genetskega označevalca.

Tabela 23: Izbrani statistični trendi genetskih označevalcev odziva na zaviralce TNF

| Pozicija na dednem zapisu (GRCh38.p12) | dbSNP ID | Kandidatni geni | <i>p</i> -vrednost | Frekvenca alela v GBR, Ensembl | Frekvenca alela v odzivnikih | Frekvenca alela v neodzivnikih |
|--|------------|--|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 9:80243435 | rs7018904 | <i>NPAPI4</i> | $5,84 \times 10^{-7}$ | 0,330 | 0,5208 | 0,1466 |
| 7:56613559 | rs13310169 | <i>TRIM60P16</i> , <i>CHCHD2</i> , <i>ZNF713</i> | $5,86 \times 10^{-7}$ | 0,181 | 0,3696 | 0,06034 |
| 6:1220853 | rs238031 | / | $4,63 \times 10^{-6}$ | 0,214 | 0,3333 | 0,06034 |
| 9:80192588 | rs12554086 | / | $5,37 \times 10^{-6}$ | 0,346 | 0,5208 | 0,1724 |
| 21:38984722 | rs2836808 | / | $5,43 \times 10^{-6}$ | 0,055 | 0,3125 | 0,05172 |
| 18:46666934 | rs16960373 | <i>ST8SIA5</i> | $6,24 \times 10^{-6}$ | 0,066 | 0,2708 | 0,03448 |

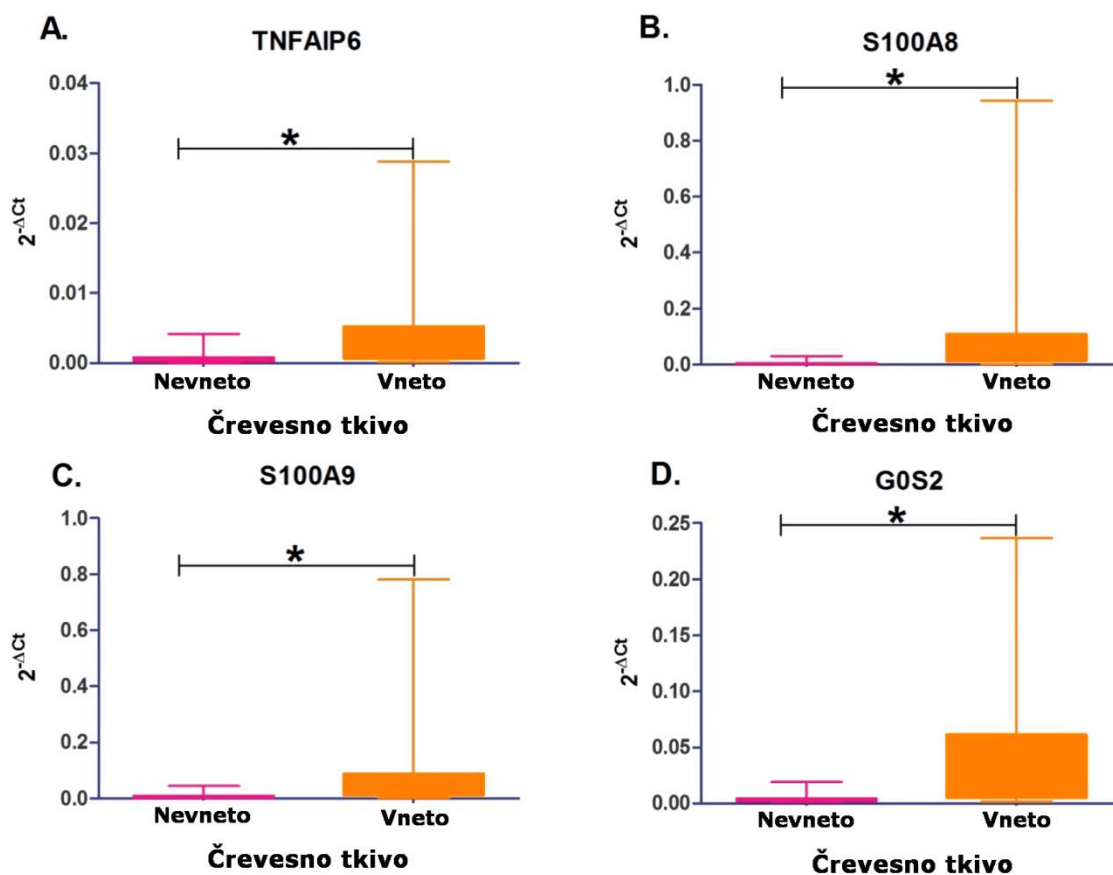
3.2.2 Rezultati analize izražanja genov

3.2.2.1 Analiza izražanja posameznih RNA-označevalcev

Izražanje *TNFAIP6*, *S100A8*, *S100A9*, *G0S2* in *IL11* smo analizirali v vzorcih biopsij vnetega črevesnega tkiva in črevesnega tkiva tik ob vnetju za namen potrditve že objavljenega napovednega modela odziva na infliksimab pri CD. V vzorcih nismo ugotovili izražanja *IL11*. Razlike v izražanju genov med vnetimi in nevnetimi tkivi so zbrane v tabeli 25, grafično pa so rezultati prikazali na sliki 17.

Tabela 24: Izražanje izbranih genov v biopsijah črevesnega tkiva bolnikov s CD

| Gen | <i>p</i> -vrednost | Kvocien spremembe izražanja med vnetimi in nevnetimi tkivi |
|----------------|-----------------------|--|
| <i>TNFAIP6</i> | $2,62 \times 10^{-4}$ | 4,34 |
| <i>S100A8</i> | $1,80 \times 10^{-5}$ | 9,42 |
| <i>S100A9</i> | $2,50 \times 10^{-5}$ | 6,81 |
| <i>G0S2</i> | $1,00 \times 10^{-3}$ | 3,85 |
| <i>IL11</i> | / | / |



Slika 17: Graf izražanja izbranih genov v biopsijah črevesnega tkiva

3.2.2.2 RNA-seq

Analiza podatkov RNA-seq 3 odzivnikov in 3 neodzivnikov na zaviralce TNF po statistični obdelavi in korekciji *p*-vrednosti ni pokazala statistično značilnih razlik med preiskovanimi odzivniki in neodzivniki na zaviralce TNF.

3.2.3 Rezultati analize izražanja izbranih genov v celičnem modelu

Analiza izražanj petih genov v treh vzorcih celičnih modelov (kontrola, obdelane z LPS in PMA ter obdelane z LPS, PMA in adalimumabom) ni pokazala statistično značilnih razlik v izražanju teh petih genov.

3.2.4 Rezultati analiz napovednih modelov

3.2.4.1 Značilnosti množic vhodnih podatkov

Učni časi za oblikovanje napovednih modelov rastejo s številom vzorcev in številom različnih atributov, ki jih ima posamezen vzorec. Zaradi tega je smiselno omejiti število atributov na osnovi statistično značilnih razlik med preiskovanimi podskupinami. Za strojno učenje imamo na voljo štiri različne množice podatkov:

- genetski podatki (iChip in GSA),
- profili maščobnih kislin,
- rezultati poskusov qPCR,
- podatki RNA-seq.

Genetske podatke smo omejili na 50 genetskih označevalcev, ki so bili najbolj statistično značilni v asociacijski analizi v poglavju 3.2.1 (tabela 26), in 10 genetskih označevalcev, povezanih s profili maščobnih kislin (266). Profile maščobnih kislin smo omejili na 30 neodvisnih parametrov (tabela 27), 9 izračunanih sestavljenih parametrov pa smo zavrgli, saj lahko narava sestavljenih parametrov negativno vpliva na napovedno moč pri strojnem učenju. Množico podatkov RNA-seq smo omejili na 50 parametrov z najvišjimi absolutnimi vrednostmi desetiškega logaritma kvocienta izražanja med odzivniki in neodzivniki na zaviralce TNF (tabela 28).

Tabela 25: Množica genetskih parametrov za strojno učenje

| Št. | SNP | Št. | SNP | Št. | SNP | Št. | SNP |
|-----|------------|-----|------------|-----|------------|-----|-------------|
| 1 | rs7033100 | 16 | rs74347120 | 31 | rs12954330 | 46 | rs11757235 |
| 2 | rs7018904 | 17 | rs889545 | 32 | rs73162202 | 47 | rs62470463 |
| 3 | rs13310169 | 18 | rs6139726 | 33 | rs6133205 | 48 | rs36018030 |
| 4 | rs238031 | 19 | rs2069933 | 34 | rs72738698 | 49 | rs72788429 |
| 5 | rs12554086 | 20 | rs814318 | 35 | rs238040 | 50 | rs2912755 |
| 6 | rs2836808 | 21 | rs9379896 | 36 | rs17087232 | 51 | rs2850146 |
| 7 | rs16960373 | 22 | rs4927055 | 37 | rs11700355 | 52 | rs11175814 |
| 8 | rs6734894 | 23 | rs80177991 | 38 | rs72693267 | 53 | rs857355 |
| 9 | rs9984705 | 24 | rs62020347 | 39 | rs10845459 | 54 | rs12438154 |
| 10 | rs17176689 | 25 | rs2617939 | 40 | rs1015811 | 55 | rs354060 |
| 11 | rs11966072 | 26 | rs6944353 | 41 | rs12354621 | 56 | rs16853022 |
| 12 | rs12636553 | 27 | rs2194766 | 42 | rs6678663 | 57 | rs113791932 |
| 13 | rs71364562 | 28 | rs12481256 | 43 | rs74130464 | 58 | rs1535 |
| 14 | rs948570 | 29 | rs71534155 | 44 | rs57491367 | 59 | rs72758110 |
| 15 | rs1025412 | 30 | rs16940375 | 45 | rs75373252 | 60 | rs1370525 |

Tabela 26: Množica parametrov maščobnih kislin za strojno učenje

| | |
|----|---|
| 1 | Miristinska kislina |
| 2 | Pentadekanojska kislina |
| 3 | Palmitinska kislina |
| 4 | Palminat |
| 5 | Palmitoleinska kislina |
| 6 | Margarinska kislina |
| 7 | Stearinska kislina |
| 8 | Stearat |
| 9 | Enkrat nenasičene trans- maščobne kisline |
| 10 | Oleinska kislina |
| 11 | Cis-vakcenska kislina |
| 12 | Linolna kislina |
| 13 | Arahidinska kislina |
| 14 | (9E,12Z,15E)-9,12,15-oktadekatrienojska kislina |
| 15 | γ -linolenska kislina |
| 16 | Gondoinska kislina |
| 17 | Alfa-linolenska kislina |
| 18 | Stearidonska kislina |
| 19 | Eikozadienoinska kislina |
| 20 | Behenska kislina |
| 21 | Dihomo- γ -linolenska kislina |
| 22 | Erukinska kislina |
| 23 | Arahidonska kislina |
| 24 | Eikozapentaenoinska kislina |
| 25 | Lignocerinska kislina |
| 26 | Nervonska kislina |
| 27 | Adrenska kislina |
| 28 | Osbondova kislina |
| 29 | Dokozapentaenoinska kislina (DPA) |
| 30 | Dokozaheksaenoinska kislina (DHA) |

Tabela 27: Množica parametrov izražanja genov poskusa RNA-seq za strojno učenje

| | ENTREZID | SYMBOL | | ENTREZID | SYMBOL |
|----|-----------|--------------|----|----------|-----------|
| 1 | 6992 | PPP1R11 | 26 | 266727 | MDGA1 |
| 2 | 3119 | HLA-DQB1 | 27 | 28409 | IGHV3-73 |
| 3 | 3117 | HLA-DQA1 | 28 | 28921 | IGKV2-28 |
| 4 | 10917 | BTNL3 | 29 | 28935 | IGKV1-27 |
| 5 | 6557 | SLC12A1 | 30 | 221711 | SYCP2L |
| 6 | 23500 | DAAM2 | 31 | 29906 | ST8SIA5 |
| 7 | 3134 | HLA-F | 32 | 28834 | IGLC7 |
| 8 | 3123 | HLA-DRB1 | 33 | 162632 | USP32P1 |
| 9 | 6444 | SGCD | 34 | 3105 | HLA-A |
| 10 | 79937 | CNTNAP3 | 35 | 28803 | IGLV3-10 |
| 11 | 2944 | GSTM1 | 36 | 85508 | SCRT2 |
| 12 | 204962 | SLC44A5 | 37 | 388248 | LOC388248 |
| 13 | 3047 | HBG1 | 38 | 400499 | LOC400499 |
| 14 | 28772 | IGLV10-54 | 39 | 28775 | IGLV7-46 |
| 15 | 100133172 | FAM66A | 40 | 474170 | LRRC37A2 |
| 16 | 3904 | LAIR2 | 41 | 388813 | LOC388813 |
| 17 | 408186 | OVOS | 42 | 28939 | IGKV1-13 |
| 18 | 285830 | HLA-F-AS1 | 43 | 714 | C1QC |
| 19 | 22986 | SORCS3 | 44 | 26047 | CNTNAP2 |
| 20 | 414062 | CCL3L3 | 45 | 400680 | LINC00664 |
| 21 | 100505635 | LOC100505635 | 46 | 55747 | NA |
| 22 | 3127 | HLA-DRB5 | 47 | 80862 | ZNRD1-AS1 |
| 23 | 2172 | FABP6 | 48 | 6262 | RYR2 |
| 24 | 100505618 | NA | 49 | 713 | C1QB |
| 25 | 22854 | NTNG1 | 50 | 286333 | FAM225A |

3.2.4.2 Optimizacija strojnega učenja

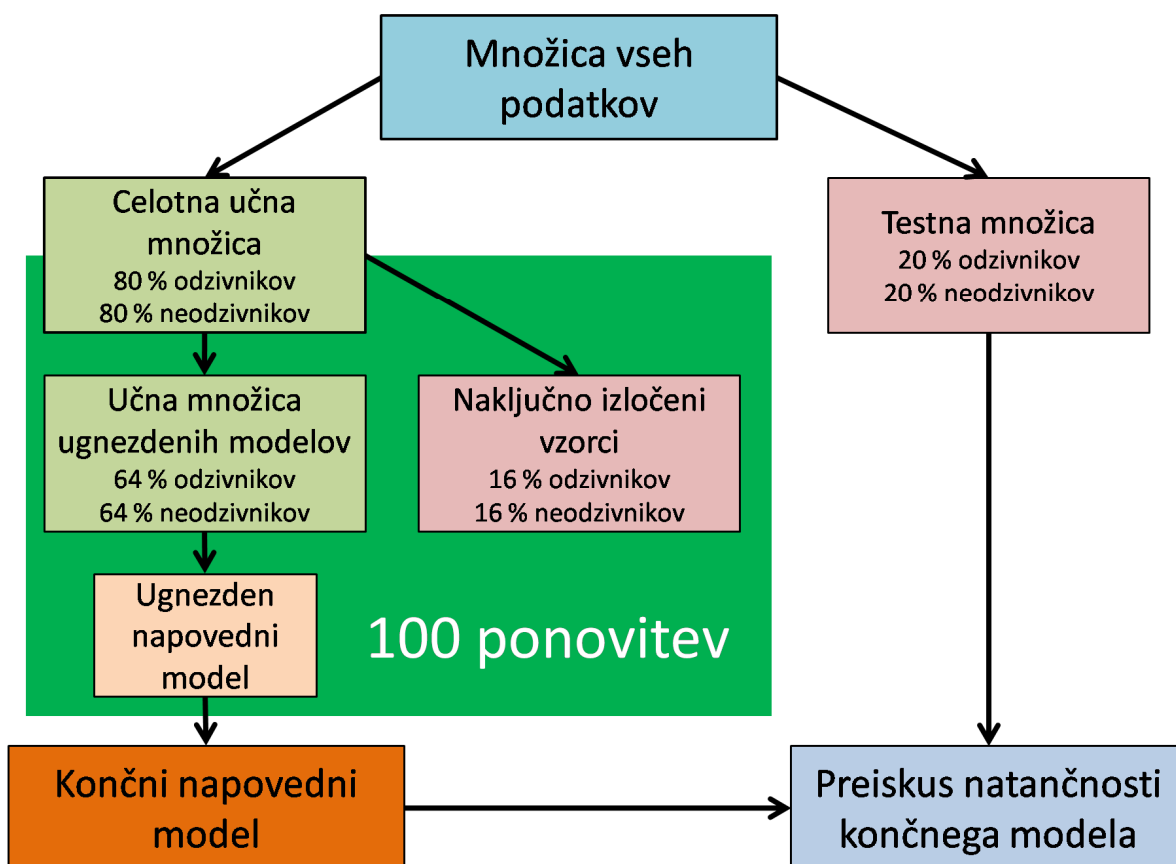
Optimizacija parametrov metode podpornih vektorjev je pokazala statistično značilen padec napovedne moči modela pri vrednosti parametrov $cost < 100$ in $gamma < 1$. Pri višjih vrednostih $cost$ lahko model oblikuje bolj kompleksne kriterije za razvrščanje, ki so lahko pristranski za prvotno množico podatkov in nenatančni v praksi. Visoke vrednosti $gamma$ parametra omejujejo prostorske razsežnosti podatkov in s tem nerealno omejujejo značilnosti učne množice, kar vodi do pristranskosti in nenatančnosti v praksi. Iz tega razloga smo določili kot optimalne vrednosti parametrov $cost = 100$ in $gamma = 1$, kar sta najnižji vrednosti, pri katerih ni statistično značilnega padca napovedne moči. Vrednosti sta hkrati privzeti vrednosti R-paketa `e1071`.

Sledila je optimizacija razmerja velikosti učne in potrditvene množice. V literaturi so med najpogosteje uporabljenimi razmerja 50:50 (1:1), 80:20 (4:1) in 90:10 (9:1). Analiza ni

pokazala razlik v napovedni moči med različnimi razmerji, tako da smo se odločili za srednjo vrednost med pogosto uporabljenimi vrednostmi in delili podatke v razmerju 80:20.

Na koncu smo še izvedli optimizacijo števila potrebnih ugnezenih modelov, pri čemer je potrebno doseči kompromis med zeleno napovedno močjo in dolžino učnih časov modela. Optimalna vrednost, pri kateri je večina napovednih modelov dosegla 100 % napovedno moč za analizirane podatke v najkrajšem možnem času, je 100 ugnezenih modelov.

Za zmanjšanje učinka pristranskosti modela pri vzorcih, zajetih v prvotni množici, smo oblikovali modele po pristopu »*bootstrap aggregating*«, pri katerem se oblikuje več ugnezenih modelov, ki so učeni na različnih podmnožicah prvotne učne množice in skupaj oblikujejo končni napovedni model. Za oceno napovedne moči bioloških označevalcev smo oblikovali 100 takšnih napovednih modelov po 100 ugnezenih modelov. Rezultat optimizacije napovednih modelov je protokol strojnega učenja, prikazan na sliki 18.

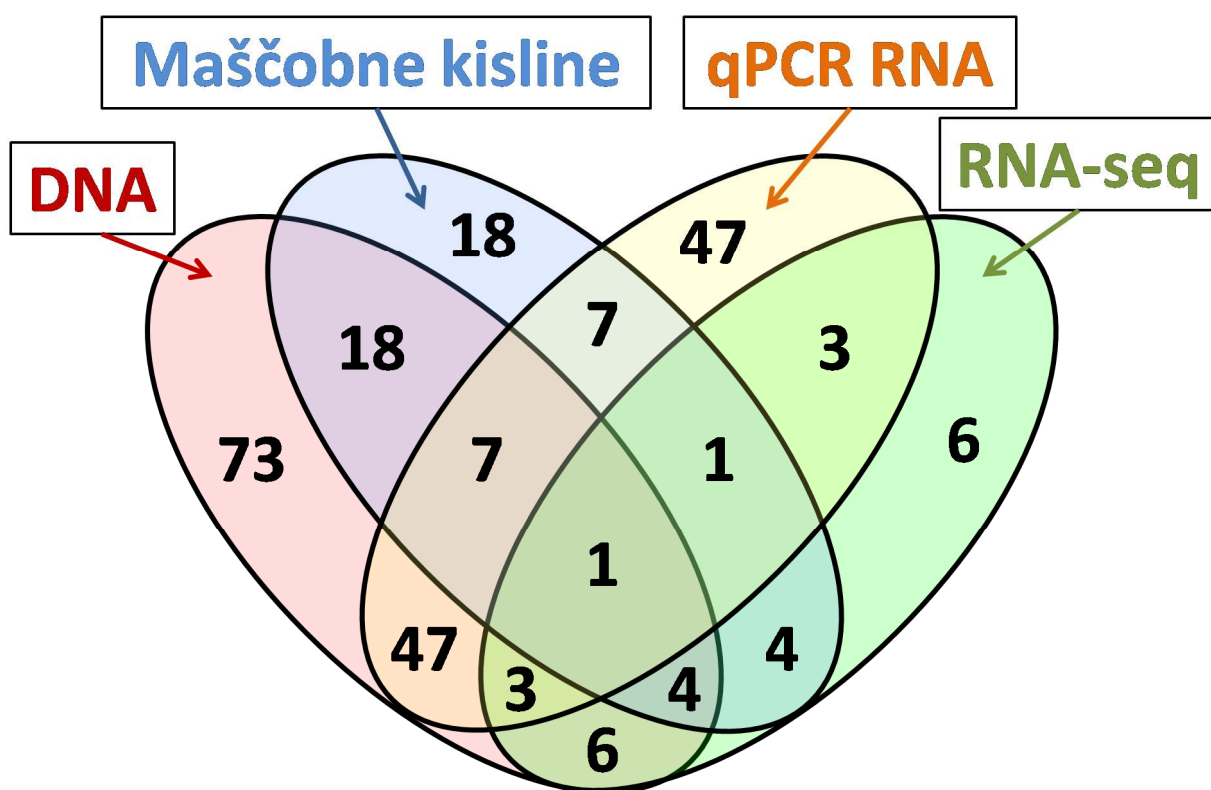


Slika 18: Protokol strojnega učenja z metodo podpornih vektorjev

Slika 18 prikazuje shemo protokola strojnega učenja enega napovednega modela, sestavljenega iz 100 ugnezdenih modelov. Prvotna množica podatkov se deli v razmerju 4:1 na učno in potrditveno množico, nato se učna množica ponovno deli v razmerju 4:1 na učno množico ugnezdenih modelov in naključno izločene vzorce, kar omogoči zmanjšanje pristranskosti končnih modelov. Po oblikovanju 100 ugnezdenih napovednih modelov se natančnost le-tega preveri s testno množico, katere model ni imel na voljo med učenjem.

3.2.4.3 Napovedni modeli odziva na zaviralce TNF

Napovedne modele smo oblikovali po protokolu, opisanem v poglavju 3.2.4.1, in na sliki 18. Pri učenju napovednega modela je potrebno zadostno število vzorcev v preiskovanih skupinah, v našem primeru so to odzivniki in neodzivniki na zaviralce TNF. Pri nekaterih kombinacijah vrst podatkov ni bilo na voljo dovolj vzorcev oziroma dovolj neodzivnikov, da bi lahko učili napovedne modele. Presek štirih vrst podatkov in število vzorcev, ki ima na voljo te podatke, je prikazan na sliki 19, značilnosti napovednih modelov je opisana v tabeli 29.



Slika 19: Vennov diagram preseka štirih množic podatkov

Slika 19 prikazuje Vennov diagram presekov štirih množic podatkov. Številke predstavljajo število bolnikov s CD, ki so prejeli zaviralce TNF, za katere je na voljo določena vrsta podatkov. DNA-podatki (iChip in GSA) so označeni z rdečo barvo, profili maščobnih kislin z modro barvo, podatki qPCR z oranžno barvo in podatki RNA-seq z zeleno barvo.

Tabela 28: Značilnosti napovednih modelov odziva na zaviralce TNF, učenih na različnih kombinacijah učnih množic

| Kombinacija učnih množic | Št. vzorcev (odzivniki in neodzivniki) | Občutljivost | Specifičnost | Natančnost |
|---|--|----------------------|--------------|------------|
| Genetski podatki | 73 (49 in 24) | 71,10 % | 68,65 % | 70,28 % |
| Profili maščobnih kislin | 18 (12 in 6) | 100 % | 0 % | 50 % |
| Analiza qPCR | 47 (30 in 17) | 100 % | 100 % | 100 % |
| Podatki RNA-seq | 6 (3 in 3) | 74,67 % | 64,67 % | 69,67 % |
| Genetski podatki Profili maščobnih kislin | 18 (12 in 6) | 100 % | 0 % | 50 % |
| Genetski podatki Analiza qPCR | 47 (30 in 17) | 100 % | 100 % | 100 % |
| Genetski podatki Podatki RNA-seq | 6 (3 in 3) | 75,33 % | 69,00 % | 71,17 % |
| Profili maščobnih kislin Analiza qPCR | 7 (4 in 3) | 100 % | 0 % | 50 % |
| Profili maščobnih kislin Podatki RNA-seq | 4 (2 in 2) | 100 % | 0 % | 50 % |
| qPCR analiza Podatki RNA-seq | 3 (3 in 0) | Analiza ni smiselna. | | |
| Genetski podatki Profili maščobnih kislin Analiza qPCR | 7 (4 in 3) | 100 % | 0 % | 50 % |
| Genetski podatki Profili maščobnih kislin Podatki RNA-seq | 4 (2 in 2) | 100 % | 0 % | 50 % |
| Genetski podatki Analiza qPCR Podatki RNA-seq | 3 (3 in 0) | Analiza ni smiselna. | | |
| Profili maščobnih kislin Analiza qPCR Podatki RNA-seq | 1 (1 odzivnik) | Analiza ni smiselna. | | |
| Genetski podatki Profili maščobnih kislin Analiza qPCR Podatki RNA-seq | 1 (1 odzivnik) | Analiza ni smiselna. | | |

3.2.4.4 Diagnostični napovedni model na osnovi dednega zapisa in maščobnih kislin

Dodatno smo na osnovi podatkov dednega zapisa (iChip in GSA) in profilov maščobnih kislin 55 zdravih prostovoljcev in 77 bolnikov s CD oblikovali napovedni model za diagnostične namene. Za diagnostične namene smo izbrali novo podmnožico genetskih podatkov na osnovi statistično značilnih razlik med zdravimi kontrolami in bolniki s CD. Seznam genetskih parametrov, ki smo jih uporabili pri strojnem učenju diagnostičnega napovednega modela, je zbran v tabeli 30. Značilnosti in kvaliteta napovednih modelov pa je opisana v tabeli 31.

Tabela 29: Množica genetskih parametrov za diagnostični napovedni model

| Št. | SNP | Št. | SNP | Št. | SNP |
|-----|------------|-----|------------|-----|-------------|
| 1 | rs6679677 | 22 | rs6740462 | 43 | rs3091316 |
| 2 | rs9286879 | 23 | rs2111485 | 44 | rs12946510 |
| 3 | rs6837335 | 24 | rs1517352 | 45 | rs12942547 |
| 4 | rs10065637 | 25 | rs3197999 | 46 | rs7240004 |
| 5 | rs864745 | 26 | rs2930047 | 47 | rs727088 |
| 6 | rs16967103 | 27 | rs11742570 | 48 | rs11879191 |
| 7 | rs2945412 | 28 | rs2188962 | 49 | rs17694108 |
| 8 | rs516246 | 29 | rs6863411 | 50 | rs913678 |
| 9 | rs2284553 | 30 | rs11741861 | 51 | rs7282490 |
| 10 | rs10797432 | 31 | rs6871626 | 52 | rs2266959 |
| 11 | rs9847710 | 32 | rs1819333 | 53 | rs2413583 |
| 12 | rs798502 | 33 | rs1456896 | 54 | rs2850146 |
| 13 | rs4728142 | 34 | rs10758669 | 55 | rs11175814 |
| 14 | rs11150589 | 35 | rs4743820 | 56 | rs857355 |
| 15 | rs6017342 | 36 | rs10781499 | 57 | rs12438154 |
| 16 | rs35675666 | 37 | rs12722515 | 58 | rs354060 |
| 17 | rs4845604 | 38 | rs11010067 | 59 | rs16853022 |
| 18 | rs4656958 | 39 | rs559928 | 60 | rs113791932 |
| 19 | rs3024505 | 40 | rs7134599 | 61 | rs1535 |
| 20 | rs925255 | 41 | rs17293632 | 62 | rs72758110 |
| 21 | rs7608910 | 42 | rs26528 | 63 | rs1370525 |

Tabela 30: Značilnosti diagnostičnih napovednih modelov, učenih na različnih kombinacijah učnih množic

| Kombinacija učnih množic | Št. vzorcev (kontrola in bolniki) | Občutljivost | Specifičnost | Natančnost |
|--|-----------------------------------|--------------|--------------|------------|
| Genetski podatki | 132 (55 in 77) | 89,33 % | 76,36 % | 83,84 % |
| Profili maščobnih kislin | 132 (55 in 77) | 100 % | 81,71 % | 92,31 % |
| Genetski podatki Profili maščobnih kislin | 132 (55 in 77) | 100 % | 100 % | 100 % |

4 Razprava

Kompleksne bolezni prebavil so v literaturi pojasnjene kot posledica genetskih in okoljskih dejavnikov. Ni presenetljivo, da je pri patogenezi pediatričnih oblik kompleksnih bolezni pomen vpliva genetskih dejavnikov višji, saj otroci pogosto niso bili dovolj dolgo izpostavljeni okoljskim dejavnikom, da bi le-ti imeli prevladujoč vpliv na patogenezo bolezni. Klinična opažanja in rezultati analiz kažejo tudi na nižjo verjetnost odziva na zaviralce TNF (191). Iz teh dejstev smo oblikovali delovno hipotezo, da so genetski dejavniki, ki imajo višji prispevek k patogenezi pediatrične KVČB, tudi vzročni dejavnik za nižjo verjetnost odziva na zaviralce TNF. Zato smo analizirali gensko ontologijo genov, ki so vzročni za pediatrične oblike KVČB. Analizo smo razširili tudi na sindrome, ki imajo klinično sliko, skladno s KVČB, saj se diagnostični in terapevtski postopki v veliki meri prekrivajo.

Primerjalna analiza med vzročnimi geni pediatrične KVČB in dvema množicama genov, povezanih s kompleksno odraslo KVČB kaže na značilne razlike v patogenezi pediatričnih in odraslih oblik KVČB. Pediatričnim in odraslim oblikam KVČB so skupne motnje diferenciacije celic T pomagalk 17, medtem ko so motnje signalne poti Jak-STAT in diferenciacije celic T pomagalk 1 in 2 značilne predvsem za odrasle oblike KVČB. Specifično za pediatrične oblike KVČB so med najbolj značilnimi rezultati analize GO primarna pomankjivost imunskega sistema, natančneje razmnoževanje celic B, in razvoj imunskega sistema. Prav tako je primerjalna analiza med podskupinami vzročnih genov pediatričnih dednih oblik KVČB pokazala, da k opisanim značilnostim genske ontologije pediatričnih oblik KVČB prispevajo predvsem vzročni geni sindromov z nastopom bolezni pred 6. letom starosti. Iz tega lahko sklepamo, da so sindromi z nastopom bolezni po 6. letu starosti bolj podobni odrasli KVČB, medtem ko so sindromi z nastopom pred 6. letom starosti ločena entiteta.

K temu razumevanju rezultatov in sklepanju prispevajo tudi naša opažanja med zbiranjem podatkov. Pri iskanju prekrivanja med pediatričnimi in odraslimi podskupinami vzročnih genov smo našli le tri gene (*STAT1*, *STAT3* in *CD40*), ki so neposredno povezani s pediatričnimi oblikami KVČB in so povezani s patogenezo kompleksne KVČB. Dodatno smo opazili tudi, da so do sedaj bile objavljene le tri študije kompleksne pediatrične KVČB. Prvo takšno študijo so objavili Scherr in sodelavci (98), ki so izpostavili gena *TNFRSF6* in *PSMG1*, vendar so poznejše študije pokazale, da gena nista specifična za pediatrične

kompleksne oblike KVČB. Kasneje so Ostrowski in sodelavci (99) pokazali, da se genetska arhitektura pediatrične kompleksne in odrasle kompleksne KVČB bistveno ne razlikuje, le da imajo pediatrični bolniki višjo frekvenco srednje redkih in zelo redkih mutacij v genih, ki so povezani s patogenezo kompleksne KVČB. Cleynen in sodelavci (100) so objavili študijo, ki je pokazala, da so trije geni (*MST1*, *MHC* in *NOD2*) povezani z nižjo starostjo ob nastopu bolezni, niso pa specifično povezani s pediatrično kompleksno KVČB.

Naš zaključek glede analize genske ontologije pediatričnih oblik KVČB in sindromov s skladno klinično sliko je, da so pediatrične oblike KVČB zelo verjetno ločena genetska entiteta. Glede na rezultate sklepamo, da k neodzivnosti na zaviralce TNF pri pediatričnih oblikah najverjetneje bolj pripomorejo primarne pomanjkljivosti imunskega sistema in bistveno manj motnje uravnavanja imunskega sistema ter procesi v prebavni cevi, ki so značilni za odraslo kompleksno KVČB. Iz tega izhaja, da delovno hipotezo večjega vpliva genetskih dejavnikov na patogenezo in hkrati neodzivnost na zaviralce TNF pri pediatričnih oblikah KVČB zavračamo. Na osnovi rezultatov lahko le sklepamo, da je vzrok neodzivnosti na zaviralce TNF lahko primarna pomanjkljivost imunskega sistema, pri katerem ta vrsta biološkega zdravila ne bo imela učinka. Glede na naša opažanja tudi spodbujamo nove študije pediatrične KVČB z namenom raziskovanja značilnosti genetskih značilnosti kompleksnih pediatričnih oblik.

V nadaljevanju raziskave smo se želeli usmeriti na iskanje bioloških mehanizmov odzivnosti in neodzivnosti na zaviralce TNF z analizo genske ontologije že objavljenih bioloških označevalcev odziva v KVČB. Dodatno smo analizo še razširili tudi na biološke označevalce odziva na zaviralce TNF pri revmatoidnem artritisu. Kljub temu da sta žarišči KVČB in RA v različnih organih, zaviralci TNF delujejo predvsem na imunski sistem oziroma tudi na interakcije prizadetih organov z imunskim sistemom (npr. z vezanjem zaviralca TNF na transmembranski TNF). Analiza že objavljenih bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF pri KVČB in RA bi poglobila razumevanje bioloških procesov, ki pogojujejo neodzivnost na zaviralce TNF. Prav tako bi lahko ugotovili, kaj je skupnega pri neodzivnosti na zaviralce TNF v dveh boleznih, ki imata zelo različno patogenezo.

Analiza že objavljenih bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF pri KVČB je pokazala, da je z neodzivnostjo povezanih več statistično značilno obogatitih skupin GO, ki so neposredno ali posredno povezane z vnetjem, kot je kemotaksa imunskih celic in izražanje signalne poti NF- κ B. Prisotnost vnetja kljub zdravljenju z zaviralci TNF je pričakovan rezultat GO pri bioloških označevalcih neodzivnosti, saj je prisotnost vnetja kljub

terapiji definicija neodzivnosti. Dodatno so analize označevalcev odziva na zaviralce TNF pri KVČB pokazale tudi prisotnost procesov, povezanih z apoptozo, in celične procese, povezane z lipidi, natančneje s steroidi in maščobnimi kislinami. Iz tega razloga smo za oblikovanje napovednih modelov dodatno vključili obstoječe rezultate analiz profilov maščobnih kislin.

Podobno kot pri GO bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF v KVČB so tudi pri RA statistično značilno obogateni biološki procesi povezani z vnetjem, npr. signalna pot TNF, signalna pot receptorjev Toll in signalna pot NF- κ B. To je pričakovan rezultat analize GO, saj potrjuje samo definicijo odzivnosti oziroma neodzivnosti. Prav tako je tudi pri RA odzivnostjo na zaviralce TNF povezanih nekaj skupin pojmov GO, ki so povezani z lipidi. Statistično najbolj značilne so skupine GO s pojmi, povezanimi s krvnimi mikrodelci in lipoproteini. Med značilno obogatenimi pojmi GO se pojavi tudi pojem aktivacija komplementa, ki je lahko pogojena tudi z izražanjem lipoproteinov (267). Poglobljena analiza genskih mrež kaže na specifično statistično značilno obogaten pojem lipoprotein zelo nizke gostote pri podskupini označevalcev RNA z zmanjšanim izražanjem pri dobrem odzivu na zaviralce TNF.

Razširjena analiza genskih mrež pri RA je pokazala tudi statistično značilno obogaten pojem proteasom v podskupini označevalcev RNA z zmanjšanim izražanjem pri dobrem odzivu na zaviralce TNF. Sinoviociti, podobni fibroblastu (FLS), se na TNF odzovejo s povečanjem avtofagije za premagovanje stresa endoplazemskega retikuluma in s tem povečajo lastno celično viabilnost (268). V kolikor je izražanje avtofagije moteno ali ni zadostno, bodo zdravi FLS pričeli s procesi apoptoze, medtem ko bo v nekaterih primerih RA del FLS povečal izražanje proteasoma in se s tem izognil apoptozi ter nadaljeval s patogenim izražanjem vnetnih citokinov, ki vodijo do vnetja sklepov (268). Zmanjšano izražanje proteasoma pri odzivnikih na zaviralce TNF lahko razumemo kot podskupino RA, kjer FLS ne izražajo proteasoma. Kadar FLS ne izražajo proteasoma, je njihovo preživetje odvisno od avtofagije ob prisotnosti TNF, ki ga zaviralec TNF odstranjuje iz sistema. Iz tega lahko tudi sklepamo, da ima delež bolnikov slab odziv na zaviralce TNF zaradi izražanja proteasoma v FLS, na katerega pa zaviralci TNF nimajo vpliva. Pomen proteasoma v RA je pokazala *ex vivo* študija, kjer je uporaba zaviralca proteasoma bortezomib zmanjšala izražanje vnetnih citokinov v aktiviranih celicah T zdravih prostovoljcev in bolnikov z RA (269). Prav tako sta dva klinična primera pokazala remisijo revmatoidnega artritisa, povezanega z multiplim mielomom (270) ali sindromom TEMPI (271) (bolezen »sirota«, katere značilnost so

teleangiektazije, povišani erotropoetin in eritrocitoza, monoklonalna gamopatija, perinefrična tekočina in intrapulmonalni shunti), po uporabi zaviralca proteasoma bortezomib.

Primerjalna analiza bioloških označevalcev odziva na zaviralce TNF v KVČB in RA kaže na prekrivanje le dveh skupin pojmov GO, to so pojmi, povezani z vnetnimi procesi, in pojmi povezani z lipidi. Prekrivanje pojmov GO pri vnetnih procesov je pričakovan rezultat analize, saj se navezuje na definicije odzivnosti in neodzivnosti pri KVČB in RA. Spremembe profilov lipidov pri terapiji z zaviralci TNF so znane že dlje časa, njihova vloga pri odzivnosti na zaviralce TNF pa ni pojasnjena. Literatura opisuje povečanje trigliceridov in celokupnega holesterola (272) v krvi ter lipoproteina visoke gostote (273, 274) pri večini bolnikov, ne glede na odziv na zaviralce TNF. Nizko raven krvnih lipoproteinov zelo nizke gostote pred terapijo z zaviralci TNF so Cacciapaglia in sodelavci povezali z dobrim kratkoročnim odzivom (275). Z rezultati naše raziskave spodbujamo nove raziskave o vlogi in mehanizmu delovanja krvnih lipoproteinov pri odzivu na zaviralce TNF.

Celostna analiza genoma bolnikov z CD dobrim in nezadostnim odzivom na zaviralce TNF ni pokazala statistično značilnih rezultatov, le nekaj statističnih trendov. Izmed teh je najbolj statistično značilen SNP rs7018904 ($p = 5,84 \times 10^{-7}$), ki se nahaja v t.i. »genski puščavi«. Oddaljeni sosednji geni so psevdogeni, npr. *NPAP1P4*, ki je oddaljen 114 milijonov baznih parov. V literaturi rs7018904 še ni bil citiran in zanj ni na voljo podatkov eQTL. SNP-ja rs238031 in rs2836808 se prav tako nahajata v območjih dednega zapisa, ki so slabo raziskana. Vendar je rs7018904 v veznem ravnovesju s statistično značilnim SNP-jem rs12554086, ki je bil v literaturi povezan z daljšim intervalom RR v študiji kardioloških bolezni (276).

Naslednji statistično najbolj značilni SNP je rs13310169 ($p = 5,86 \times 10^{-7}$). Nahaja se v nekodirajočem transkriptu *LOC105375291* in je v tesnem veznem neravnovesju s SNP-ji, ki se nahajajo v psevdogenu *TRIM60P16*. Za rs13310169 so na voljo podatki eQTL, ki ga povezujejo z izražanjem genov *CHCHD2*, *GBAS*, *NUPR2*, *PHKG1* in *ZNF713*. Na večini sluznice tkiv prebavne cevi je povezan z izražanjem *CHCHD2* in *ZNF713*. Vloga *CHCHD2* in *ZNF713* v patogenezi KVČB ni znana. Gen *CHCHD2* je bil povezan s patologijo Parkinsonove bolezni in z amiotrofično lateralno sklerozo (277), *ZNF713* pa je možen vzročen gen za dedne oblike motnje avtističnega spektra (278).

Zadnji statistični trend s kandidatnimi geni je SNP rs16960373. SNP rs16960373 je namreč v tesnem veznem neravnovesju z različicami v genu *ST8SIA5*, ki ima vlogo pri delovanju regulatornih celic T in nastanku tumorjev debelega črevesa (279).

Potrditev izražanja petih genov v vzorcih biopsij črevesnega tkiva za objavljeni napovedni model Arijsa in sodelavcev(207) je pokazala statistično značilne razlike med vzorci vnetega črevesnega tkiva in perifernega črevesnega tkiva brez znakov vnetja. Največja razlika v izražanju izbranih genov je opazna za gen *SI00A8*, kjer je izražanje v vnetem tkivu 9,42-krat večje kot v tkivu brez znakov vnetja. Sledi izražanje gena *SI00A9*, kjer je izražanje v vnetem tkivu 6,81-krat večje. Izražanje gena *TNFAIP6* je v vnetem tkivu 4,34-krat večje, izražanje gena *G0S2* pa 3,85-krat večje. Gena *SI00A8* in *SI00A9* skupaj tvorita heterodimer kalprotektin, ki je v literaturi opisan kot eden od bioloških označevalcev v blatu za obseg vnetja črevesja (280). *G0S2* sodeluje pri uravnavanju lipoproteinov nizke in zelo nizke gostote ter ima vlogo tudi pri regulaciji drugih lipidov in lipidnih struktur (281). Izražanje gena *G0S2* bila lahko odražalo spremembe profila krvnih lipoproteinov med zdravljenjem z zaviralci TNF.

Arijs in sodelavci so poročali izražanje *IL11* v vzorcih neodzivnikov na zaviralce TNF, vendar kljub večkratnim poskusom izražanja gena *IL11* v vzorcih tega nismo zasledili (207). *IL11* se izraža predvsem v slepiču, endometriju in žolčniku ter žolčevodu, le v manjši meri pa v koži, sečnem mehurju, tankem in debelem črevesu (282). Trenutno razumevanje vloge *IL11* pri vnetnih procesih in nastanku raka poudarja vpliv *IL11* na *IL6ST*, ki sproži visoko raven aktivacije *STAT3*, kar povzroči izražanje vnetnih signalnih poti, ki vodijo do »začaranega kroga« vnetnih procesov v črevesju pri KVBC in vnetnega okolja, ki je ugoden za preživetje rakastih celic (283, 284). Možna razlaga je, da v vzorcih biopsij črevesnega tkiva izražanja *IL11* niso zasledili, ker bolezen preiskovancev poteka drugače na molekularni ravni ali pa bolezen še ni napredovala do patogenega izražanja *IL11*, ki je povezano z nastankom raka v prebavni cevi (284, 285).

Analiza izražanja izbranih genov v celicah LoVo, gojenih v kokulturi inducibilnega sistema TNF, ni pokazala statistično značilnih razlik med kontrolno skupino, skupino s simuliranim vnetjem (dodan LPS in PMA) in skupino s simuliranim vnetjem in terapijo z zaviralci TNF (dodan adalimumab). Možnih razlogov za negativne rezultate je več. Prvi precej verjeten razlog je razlika med vzorci biopsij črevesnega tkiva in čisto kulturo celic LoVo. V odvzetem vzorcu biopsij je namreč več vrst celic, ki so bile dlje časa izpostavljene sistemskim učinkom človeškega telesa in črevesnih mikroorganizmov, celična kultura LoVo

pa izvira iz adenokarcinoma, ki je bil več ciklov gojen v umetnih celičnih medijih. Prav tako celice LoVo ne izvirajo od bolnika s KVČB, tako da za njih ni značilno spremenjeno izražanje genov v prebavni cevi, povezano s KVČB, ampak spremenjeno izražanje genov, ugotovljeno v tumorjih.

Analiza 6 vzorcev z uporabo metode RNA-seq ni pokazala statistično značilnih razlik v izražanju med geni pri odzivnikih in neodzivnikih na zaviralce TNF. Če upoštevamo število analiziranih vzorcev, je pomanjkanje statistično značilnih rezultatov pričakovano, saj bi z uporabo najnovejših orodij za analizo podatkov RNA-seq pri tem številu vzorcev lahko odkrili le diferencialno izražene gene z izjemno visoko statistično značilnostjo. Tako pri pregledu statističnih trendov najdemo večje število genov z visoko razliko v izražanju genov, ki po korekciji *p*-vrednosti ne dosežejo statistične značilnosti. Med temi statističnimi trendi (zbranimi v tabeli 28) je več genov, ki spadajo v skupino genov HLA (*HLA-DQB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-F*, *HLA-DRB1*, *HLA-F-AS1*, *HLA-DRB5* in *HLA-A*) ali v skupino genov, povezanih z izražanjem imunoglobulinov (*IGLV10-54*, *IGHV3-73*, *IGKV2-28*, *IGKV1-27*, *IGLV3-10*, *IGLV7-46* in *IGKV1-13*). Navedeni skupini genov sta povezani z nastankom protiteles proti zaviralcem TNF (286, 287), vendar navedeni geni v literaturi še niso bili povezani z neodzivnostjo na KVČB. Število kopij gena *HLA-DRB1* je bilo povezano z odzivnostjo na adalimumab s souporabo metotreksata v študiji pri bolnikih z revmatoidnim artritisom (288). Guarene in sodelavci so gene skupine HLA povezali z odzivnostjo na zaviralce TNF pri luskavici (289), vendar so Talamonti in sodelavci leto prej pokazali, da ti geni nimajo bistvene napovedne moči za odziv na zaviralce TNF (290).

V objavljeni študiji genetike maščobnih kislin pri KVČB smo pokazali, da genetska arhitektura, značilna za KVČB vpliva na edinstvene spremembe profila maščobnih kislin pri KVČB (266), kar se sklada z opažanji v literaturi, da so profili maščobnih kislin pri KVČB spremenjeni ne glede na aktivnost bolezni in dieto (291-293). Odkrili smo asociacije desetih genskih lokusov s profili maščobnih kislin, ki so edinstvene le za bolnike s KVČB, niso pa prisotne v vzorcih zdravih prostovoljcev. Izmed teh desetih lokusov sta dva že bila povezana s patogenezo KVČB, to sta *LRRK2* in *FADS1*.

V intronu gena *LRRK2* smo SNP rs11175814 povezali z deležem lignocerinske kisline, a le pri bolnikih s KVČB. *LRRK2* je povezan s patogenezo CD, kot tudi Parkinsonove bolezni (294), najverjetneje zaradi svoje vloge pri avtofagiji, kot tudi eksocitozi in endocitozi (295). Lignocerinska kislina sodi med zelo dolge maščobne kisline, ki se vežejo na lipidne nosilce *LRRK2* (295). Prav tako je bila lignocerinska kislina povezana z aktivno KVČB (292, 293)

in ima vlogo pri preživetju nekaterih tipov imunskih celic z delovanjem na receptor PPAR γ (296).

Gen *FADS1* sodi med najbolj raziskane gene, ki ima neposreden vpliv na profile maščobnih kislin. *FADS1* namreč zapisuje Δ 5-desaturazo, ki sintetizira arahidonsko kislino (v nadaljevanju ARA) iz dihomo-gama-linolenske kisline (v nadaljevanju DGLA) ter eikozapentaenojsko kislino (v nadaljevanju EPA) iz eikozatetraenojske kisline. Iz ARA in EPA se nato lahko sintetizira več različnih signalnih molekul, kot so prostaglandini, ki imajo vlogo pri sprožanju in uravnavanju vnetnih procesov. *FADS1* spada tudi med prvotnih 163 genov, ki so bili povezani s patogenezo KVČB (2), vendar ima nizko razmerje obetov, ki znaša pribl. $OR = 1,05$ v večini populacij. V študiji smo odkrili statistično značilno povezavo med SNP-jem rs1535 v genu *FADS2* in zmanjšanim deležem maščobne kisline DGLA ($p = 6,91 \times 10^{-7}$). Vpliv rs1535 je numerično opazen tudi v zdravih vzorcih, a doseže statistično značilnost le za vzorce KVČB. Analiza okolja dednega zapisa SNP-ja rs1535 je nato pokazala, da je rs1535 del večjega bloka veznega neravnovesja v dednem zapisu, tako imenovanega »genskega grozda FADS«, ki obsega gene *FADS1*, *FADS2* in *FADS3*. Analize visoke globine dednega zapisa in molekularne simulacije kažejo na to, da je v genskem grozdu FADS ključen SNP rs174557, ki se nahaja v veznem mestu faktorja PATZ1 gena *FADS1* in s tem vpliva na povečano izražanje le-tega (297). Ker je rs1535 v popolnem veznem neravnovesju z rs174557, lahko sklepamo, da opisana statistična značilnost rs1535 neposredno izhaja iz delovanja gena *FADS1*. To opažanje se sklada s spremembami deležev maščobnih kislin DGLA in ARA, ki sta pod vplivom encima Δ 5-desaturaza, ki ga zapisuje *FADS1*. Iz tega bi sklepali, da pri KVČB prisotnost rs1535 oziroma rs174557 poveča izražanje *FADS1*, kar pomeni višjo raven sintetizirane ARA v telesu in večjo raven sintetiziranih prostaglandinov.

V študiji genetske arhitekture smo odkrili tudi statistično značilne povezave med patogenezo CD in deležem ARA ($8,58 \times 10^{-3}$) in adrensko kislino ($7,92 \times 10^{-2}$) ter trans-maščobnimi kislinami ($4,49 \times 10^{-3}$). Presenetljiva raven lignocerinske kisline ni povezana s patogenezo CD. Statistična značilnost ARA in adrenske kisline, ki je podaljšan produkt ARA, se sklada s kliničnimi opažanji profilov maščobnih kislin pri KVČB in s prisotnostjo gena *FADS1*. Raven trans-maščobnih kislin je bila do sedaj raziskana le v živalskih modelih KVČB, kjer so jo povezali s polarizacijo celic T pomagalk (298). Opazili smo tudi statistično značilno inverzno korelacijo med oleinsko kislino in ARA ($p = 4,23 \times 10^{-49}$) in s tem potrdili opaženo

inverzno korelacijo med ravnjo oleinske kisline in ARA v serumu in membranah eritrocitov (299).

Napovedno moč bioloških označevalcev smo preverili z oblikovanjem napovednih modelov. Prva skupina napovednih modelov je imela na voljo le en tip učne množice (genetski podatki, profili maščobnih kislin, analiza qPCR ali podatki RNA-seq). V tej prvi skupini ima napovedni model, učen na profilih maščobnih kislin, 50 % natančnost, kar pomeni, da nima napovedne moči. Natančnost napovednih modelov, učenih na genetskih podatkih (70,28 %) ali podatkih RNA-seq (69,97 %), kaže na nizko napovedno moč. Napovedni model usmerjene analize qPCR pa doseže natančnost do 100 %, kar kaže na skoraj popolno napovedno moč v množici vzorcev odzivnikov in neodzivnikov na zaviralce TNF. Izjemno natančnost tega modela smo dodatno potrdili z analizo pri suboptimalnih parametrih strojnega učenja z metodo podpornih vektorjev, kjer so bile vrednosti natančnosti med 90 in 99 %.

Napovedni modeli, učeni na kombinacijah dveh različnih tipov učnih podatkov, kažejo značilnosti napovednih modelov, učenih na enem tipu učne množice. Tisti napovedni modeli, ki so imeli v kombinaciji učnih množic na voljo profile maščobnih kislin, niso imeli napovedne moči, ne glede na drugo vključeno učno množico. Kombinacija genetskih podatkov in podatkov RNA-seq je imela natančnost 71,17 %, kar je več kot osnovna modela, učen na genetskih podatkih (70,28 %) ali podatkih RNA-seq (69,97 %). Najbolj natančen napovedni model v tej drugi skupini je bil učen na genetskih podatkih in rezultatih analize qPCR in dosega natančnost do 100 %, podobno kot prvotni model, učen na rezultatih analize qPCR. Iz analiz podatkov sledi, da šum, ki ga prispevajo genetski podatki, ni zadosten za znižanje napovedne moči rezultatov analize qPCR ali pa v tem primeru genetski podatki z interakcijami z množico rezultatov analize qPCR delujejo sinergično. Zaradi narave metode podpornih vektorjev teh opažanj ne moremo dobro pojasniti.

Kombinacija treh ali več učnih množic ni oblikovala napovednih modelov z napovedno močjo ali pa učenje zaradi pomanjkanja vzorcev preiskovancev ni bilo možno. Razlog za to je predvsem izključevanje vzorcev pri analizi kvalitete vzorcev izolirane RNA, analizi kvalitete rezultatov poskusa in izključevanje vzorcev z manjkajočimi vrednostmi. Metode strojnega učenja so zelo občutljive na manjkajoče vrednosti, zaradi česar je potrebno pripraviti množice, ki imajo popolne podatke.

Dodatno smo še preverili napovedno moč množice genetskih podatkov in profilov maščobnih kislin za določevanje prisotnosti CD. Napovedni model, učen na 63 genetskih

označevalcih, povezanih s patogenezo CD, doseže natančnost 83,84 %, model, učen na profilih maščobnih kislin, pa natančnost 92,31 %, medtem ko model kombinacije obeh množic doseže natančnost do 100 %. Napovedni modeli za potencialno diagnostično uporabo torej dosegajo zadostno natančnost za potencialne raziskave translacije napovednih modelov v klinično prakso. Pri tem je potrebno upoštevati, da je treba modele za določevanje pristranskosti dodatno izpostaviti večjemu številu vzorcev zdravih prostovoljcev in bolnikov s CD, ki se razlikujejo od prvotnih vzorcev učne množice.

4.1 Potrditev oziroma zavrnitev tez doktorske disertacije

Na ključne domneve, ki so usmerjale raziskovalno delo pri doktorski nalogi, je moč odgovoriti pritrdilno:

- prvo tezo, da variabilnost bioloških procesov pogojuje neodzivnost na zaviralce TNF pri bolnikih s CD, smo **POTRDILI**. Prvič, to potrjujejo rezultati genske ontologije, ki so potrdili značilne spremembe v imunskem sistemu in krvnih lipoproteinih neodzivnih bolnikov na zaviralce TNF. Drugič, to domnevo potrujemo tudi z opaženimi statističnimi trendi analize genetskih podatkov, kot tudi z rezultati analize RNA-seq. Tretjič, tezo potrujemo z rezultati usmerjene analize qPCR in z napovedno močjo modela, ki je bil učen na množici podatkov qPCR;
- drugo tezo, da so biološki označevalci povezani z odzivnostjo na zaviralce TNF pri bolnikih s CD in so koristni kot napovedni označevalci odziva, smo **POTRDILI**. Tezo potrjujejo predvsem rezultati usmerjene analize qPCR z napovedno močjo. Tezo podpira tudi sicer nizka, a ne nezanemarljiva napovedna moč genetskih podatkov in rezultatov analize RNA-seq;
- tretjo tezo o večji napovedni vrednosti ob kombiniranju več ravni bioloških označevalcev smo **POTRDILI**. Združevanje učnih množic genetskih podatkov in podatkov RNA-seq je pomenilo 0,89 % povečanje natančnosti v primerjavi z modelom na osnovi zgolj genetskih podatkov in 1,2 % povečanje natančnosti v primerjavi z modelom na osnovi zgolj podatkov RNA-seq. V kolikor je povečana natančnost posledica večjega števila atributov, ne moremo določiti;
- četrto in zadnjo tezo o pojasnjevanju rezultatov GO in bioloških označevalcev na celični ravni smo **OVRGLI**. Vzrok je najverjetneje visoka kompleksnost človeške prebavne cevi in raznolikost patogenih celičnih procesov pri KVČB, ki ju s celičnimi modeli na osnovi komercialno dostopnih celičnih kultur v sedanjem trenutku ne moremo doseči.

5 Sklep

Crohnova bolezen je pogosta kompleksna bolezen prebavil, ki prizadene številne bolnike. Razvoj bioloških zdravil, kot so zaviralci TNF, je bistveno prispeval k možnostim zdravljenja Crohnove bolezni, predvsem pri hudih vnetjih prebavne cevi. Žal pa del bolnikov s Crohnovo boleznijo ne doseže dobrega odziva na zaviralce TNF že ob uvedbi terapije ali pa sprva dober odziv na zaviralce TNF s časom izzveni. Neodzivnost na zaviralce TNF pomeni izgubo nadzora nad pogosto hudim bolezenskim stanjem bolnika s Crohnovo boleznijo, ki je po nepotrebnem izpostavljen potencialno hudim neželenim stranskim učinkom bioloških zdravil, in tudi precejšnje finančno breme za zdravstveno blagajno.. Ti razlogi utemeljujejo potrebo po napovedovanju odziva na biološka zdravila, po možnosti še pred uvedbo zdravljenja.

Naša študija genske ontologije je pokazala, da odzivnost oziroma neodzivnost na zaviralce TNF tako pri Crohnovi bolezni kot tudi revmatoidnem artritisu pogojuje spremembe v krvnih lipoproteinih, kar se sklada z opažanji v literaturi. Laboratorijski testi krvnih lipoproteinov tako predstavljajo potencial enostavnega, rutinskega in ekonomsko učinkovitega krvnega testa, na osnovi katerega bi lahko oblikovali napovedni model za pomoč pri odločanju za zdravljenje z zaviralci TNF pri različnih boleznih, za katere so ta zdravila indicirana. Dodatno smo pokazali tudi, da diagnostični napovedni model, oblikovan na profilih maščobnih kislin v membranah eritrocitov in genetskih označevalcih, povezanih s patogenezo Crohnove bolezni, dosega zadostno natančnost za prenos v klinično prakso.

V naši študiji smo pokazali, da napovedni model odziva na adalimumab na osnovi izražanja štirih genov v vzorcih biopsij vnetega in nevnetega črevesnega tkiva dosega napovedno moč za določevanje odziva na zaviralce TNF, ki je zadostna za potencialno uporabo v klinični praksi. S tem smo potrdili že objavljen napovedni model odziva na infliksimab in ga s tem razširili tudi na adalimumab. Naša analiza je pokazala tudi nizko napovedno moč genetskih podatkov in izražanja genov v mononuklearnih celicah periferne venske krvi (poskus RNA-seq), kar kaže na omejeno uporabno vrednost podatkov, ki jih lahko pridobimo z manj invazivnim odvzemom periferne venske krvi.

Rezultati naše študije spodbujajo k nadaljnim kliničnim raziskavam za pojasnitev vloge krvnih lipoproteinov pri odzivnosti na zaviralce TNF in potrditev napovednega modela odziva na zaviralce TNF ter diagnostičnega modela na osnovi profila maščobnih kislin.

6 Literatura in viri

1. Actis GC, Pellicano R, Fagoonee S, Ribaldone DG. History of Inflammatory Bowel Diseases. *J Clin Med*. 2019;8(11).
2. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012;491(7422):119-24.
3. Rawla P, Sunkara T, Raj JP. Role of biologics and biosimilars in inflammatory bowel disease: current trends and future perspectives. *J Inflamm Res*. 2018;11:215-26.
4. Roda G, Jharap B, Neeraj N, Colombel JF. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management. *Clin Transl Gastroenterol*. 2016;7:e135.
5. Gole B, Potočnik U. Pre-Treatment Biomarkers of Anti-Tumour Necrosis Factor Therapy Response in Crohn's Disease-A Systematic Review and Gene Ontology Analysis. *Cells*. 2019;8(6).
6. Baillie M, Soemmerring STv. The morbid anatomy of some of the most important parts of the human body. The 2d ed. London.; J. Johnson etc.; 1797. 4 , xxxvi, 460 p. p.
7. S. W. Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. *London Medical Times & Gazette*. 1859;2:264.
8. Atreya R, Bülte M, Gerlach GF, Goethe R, Hornef MW, Köhler H, et al. Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(7):858-67.
9. Naser SA, Sagrainsingh SR, Naser AS, Thanigachalam S. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7403-15.
10. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *Journal of the American Medical Association*. 1932;99(16):1323-9.
11. Broberger O, Perlmann P. Autoantibodies in human ulcerative colitis. *J Exp Med*. 1959;110:657-74.
12. Lee WI, Subramaniam K, Hawkins CA, Randall KL. The significance of ANCA positivity in patients with inflammatory bowel disease. *Pathology*. 2019;51(6):634-9.
13. Wüthrich B. Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1989;90 Suppl 1:3-10.
14. Hagy GW, Settipane GA. Bronchial asthma, allergic rhinitis, and allergy skin tests among college students. *J Allergy*. 1969;44(6):323-32.
15. Leong RW, Mitrev N, Ko Y. Hygiene Hypothesis: Is the Evidence the Same All Over the World? *Dig Dis*. 2016;34(1-2):35-42.
16. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet*. 2015;47(9):979-86.
17. Prenzel F, Uhlig HH. Frequency of indeterminate colitis in children and adults with IBD - a metaanalysis. *J Crohns Colitis*. 2009;3(4):277-81.
18. Van Limbergen J, Russell RK, Drummond HE, Aldhous MC, Round NK, Nimmo ER, et al. Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1114-22.
19. Lockhart-Mummery H, Morson B. Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. *Gut*. 1960;1:87-105.
20. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis*. 2000;6(1):8-15.

21. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005;19 Suppl A:5A-36A.
22. Dulai PS, Singh S, Vande Casteele N, Boland BS, Rivera-Nieves J, Ernst PB, et al. Should We Divide Crohn's Disease Into Ileum-Dominant and Isolated Colonic Diseases? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(13):2634-43.
23. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2018;390(10114):2769-78.
24. Mak WY, Zhao M, Ng SC, Burisch J. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *J Gastroenterol Hepatol*. 2019.
25. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*. 1996;39(5):690-7.
26. Ghione S, Sarter H, Fumery M, Armengol-Debeir L, Savoye G, Ley D, et al. Dramatic Increase in Incidence of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease (1988-2011): A Population-Based Study of French Adolescents. *Am J Gastroenterol*. 2018;113(2):265-72.
27. Lakatos L, Kiss LS, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Mester G, et al. Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in Western Hungary, 2002-2006. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(12):2558-65.
28. Leddin D, Tamim H, Levy AR. Decreasing incidence of inflammatory bowel disease in eastern Canada: a population database study. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:140.
29. Wójcik B, Loga K, Włodarczyk M, Sobolewska-Włodarczyk A, Padysz M, Wiśniewska-Jarosińska M. Extraintestinal manifestations of Crohn's disease. *Prz Gastroenterol*. 2016;11(3):218-21.
30. Ott C, Schölmerich J. Extraintestinal manifestations and complications in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(10):585-95.
31. Levine JS, Burakoff R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2011;7(4):235-41.
32. Olivieri I, Cantini F, Castiglione F, Felice C, Gionchetti P, Orlando A, et al. Italian Expert Panel on the management of patients with coexisting spondyloarthritis and inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*. 2014;13(8):822-30.
33. Bourikas LA, Papadakis KA. Musculoskeletal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(12):1915-24.
34. Veloso FT, Carvalho J, Magro F. Immune-related systemic manifestations of inflammatory bowel disease. A prospective study of 792 patients. *J Clin Gastroenterol*. 1996;23(1):29-34.
35. Naito T, Yokoyama N, Kakuta Y, Ueno K, Kawai Y, Onodera M, et al. Clinical and genetic risk factors for decreased bone mineral density in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018;33(11):1873-81.
36. Dumitrescu G, Mihai C, Dranga M, Prelipcean CC. Bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease from north-eastern Romania. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2013;117(1):23-8.
37. Sgambato D, Gimigliano F, De Musis C, Moretti A, Toro G, Ferrante E, et al. Bone alterations in inflammatory bowel diseases. *World J Clin Cases*. 2019;7(15):1908-25.
38. Roth N, Biedermann L, Fournier N, Butter M, Vavricka SR, Navarini AA, et al. Occurrence of skin manifestations in patients of the Swiss Inflammatory Bowel Disease Cohort Study. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210436.

39. Yang BR, Choi NK, Kim MS, Chun J, Joo SH, Kim H, et al. Prevalence of extraintestinal manifestations in Korean inflammatory bowel disease patients. *PLoS One*. 2018;13(7):e0200363.
40. Napolitano M, Testa A, Ferrillo M, Villani A, Balato N, Megna M, et al. Psoriasis Features in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(6):1001-3.
41. Lolli E, Saraceno R, Calabrese E, Ascolani M, Scarozza P, Chiricozzi A, et al. Psoriasis Phenotype in Inflammatory Bowel Disease: A Case-Control Prospective Study. *J Crohns Colitis*. 2015;9(9):699-707.
42. Kalla R, Venthram NT, Satsangi J, Arnott ID. Crohn's disease. *BMJ*. 2014;349:g6670.
43. Adamiak T, Walkiewicz-Jedrzejczak D, Fish D, Brown C, Tung J, Khan K, et al. Incidence, clinical characteristics, and natural history of pediatric IBD in Wisconsin: a population-based epidemiological study. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(6):1218-23.
44. Oliveira SB, Monteiro IM. Diagnosis and management of inflammatory bowel disease in children. *BMJ*. 2017;357:j2083.
45. Urlep D, Blagus R, Orel R. Incidence Trends and Geographical Variability of Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Slovenia: A Nationwide Study. *Biomed Res Int*. 2015;2015:921730.
46. Lovasz BD, Lakatos L, Horvath A, Szita I, Pandur T, Mandel M, et al. Evolution of disease phenotype in adult and pediatric onset Crohn's disease in a population-based cohort. *World J Gastroenterol*. 2013;19(14):2217-26.
47. Lega S, Pin A, Arrigo S, Cifaldi C, Girardelli M, Bianco AM, et al. Diagnostic Approach to Monogenic Inflammatory Bowel Disease in Clinical Practice: A Ten-Year Multicentric Experience. *Inflamm Bowel Dis*. 2019.
48. Hartono S, Ippoliti MR, Mastroianni M, Torres R, Rider NL. Gastrointestinal Disorders Associated with Primary Immunodeficiency Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018.
49. Socha P, Ryzko J, Koletzko B, Celinska-Cedro D, Woynarowski M, Czubkowski P, et al. Essential fatty acid depletion in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40(5):573-7.
50. Uhlig HH, Schwerdt T, Koletzko S, Shah N, Kammermeier J, Elkadri A, et al. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2014;147(5):990-1007.e3.
51. Davidovics ZH, Michail S, Nicholson MR, Kociolek LK, Pai N, Hansen R, et al. Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridium difficile* Infection and Other Conditions in Children: A Joint Position Paper From the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2019;68(1):130-43.
52. Oliva S, Thomson M, de Ridder L, Martín-de-Carpi J, Van Biervliet S, Braegger C, et al. Endoscopy in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Position Paper on Behalf of the Porto IBD Group of the Espghan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018.
53. Turner D, Ruemmele FM, Orlanski-Meyer E, Griffiths AM, Carpi JM, Bronsky J, et al. Management of Paediatric Ulcerative Colitis, Part 1: Ambulatory Care- an Evidence-Based Guideline from ECCO and ESPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018.
54. Turner D, Ruemmele FM, Orlanski-Meyer E, Griffiths AM, Carpi JM, Bronsky J, et al. Management of Paediatric Ulcerative Colitis, Part 2: Acute Severe Colitis; An Evidence-based Consensus Guideline from ECCO and ESPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018.

55. Thapar N, Saliakellis E, Benninga MA, Borrelli O, Curry J, Faure C, et al. Paediatric Intestinal Pseudo-obstruction: Evidence and Consensus-based Recommendations From an ESPGHAN-Led Expert Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;66(6):991-1019.
56. de Ridder L, Assa A, Bronsky J, Romano C, Russell RK, Afzal NA, et al. Use of Biosimilars in Paediatric Inflammatory Bowel Disease: An Updated Position Statement of the Paediatric IBD Porto Group of ESPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018.
57. Shim JO. Recent Advance in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2019;22(1):41-9.
58. Wehkamp J, Gotz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory Bowel Disease. *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113(5):72-82.
59. Wang SL, Shao BZ, Zhao SB, Fang J, Gu L, Miao CY, et al. Impact of Paneth Cell Autophagy on Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol.* 2018;9:693.
60. El-Khider F, McDonald C. Links of Autophagy Dysfunction to Inflammatory Bowel Disease Onset. *Dig Dis.* 2016;34(1-2):27-34.
61. Larabi A, Barnich N, Nguyen HTT. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy.* 2019:1-14.
62. Shi J. Defensins and Paneth cells in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(10):1284-92.
63. Wells JM, Loonen LM, Karczewski JM. The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(1):41-8.
64. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):131-44.
65. Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2004;126(4):1054-70.
66. Hershberg RM, Mayer LF. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today.* 2000;21(3):123-8.
67. Blumberg RS, Lencer WI, Zhu X, Kim HS, Claypool S, Balk SP, et al. Antigen presentation by intestinal epithelial cells. *Immunol Lett.* 1999;69(1):7-11.
68. Goethel A, Croitoru K, Philpott DJ. The interplay between microbes and the immune response in inflammatory bowel disease. *J Physiol.* 2018;596(17):3869-82.
69. McCole DF. IBD candidate genes and intestinal barrier regulation. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(10):1829-49.
70. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut.* 2007;56(1):61-72.
71. Goswami P, Das P, Verma AK, Prakash S, Das TK, Nag TC, et al. Are alterations of tight junctions at molecular and ultrastructural level different in duodenal biopsies of patients with celiac disease and Crohn's disease? *Virchows Arch.* 2014;465(5):521-30.
72. Lee SH, Kwon JE, Cho ML. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res.* 2018;16(1):26-42.
73. Kuhl AA, Erben U, Kredel LI, Siegmund B. Diversity of Intestinal Macrophages in Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol.* 2015;6:613.
74. Steinbach EC, Plevy SE. The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(1):166-75.
75. Bates J, Diehl L. Dendritic cells in IBD pathogenesis: an area of therapeutic opportunity? *J Pathol.* 2014;232(2):112-20.

76. Noronha AM, Liang Y, Hetzel JT, Hasturk H, Kantarci A, Stucchi A, et al. Hyperactivated B cells in human inflammatory bowel disease. *J Leukoc Biol.* 2009;86(4):1007-16.
77. Ueno A, Jeffery L, Kobayashi T, Hibi T, Ghosh S, Jijon H. Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease. *J Autoimmun.* 2018;87:38-49.
78. Ueno A, Ghosh A, Hung D, Li J, Jijon H. Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2015;21(43):12283-95.
79. Galvez J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflamm.* 2014;2014:928461.
80. Yamada A, Arakaki R, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2016;22(7):2195-205.
81. Di Sabatino A, Lenti MV, Giuffrida P, Vanoli A, Corazza GR. New insights into immune mechanisms underlying autoimmune diseases of the gastrointestinal tract. *Autoimmun Rev.* 2015;14(12):1161-9.
82. Kredel LI, Siegmund B. Adipose-tissue and intestinal inflammation - visceral obesity and creeping fat. *Front Immunol.* 2014;5:462.
83. Eder P, Adler M, Dobrowolska A, Kamhieh-Milz J, Witowski J. The Role of Adipose Tissue in the Pathogenesis and Therapeutic Outcomes of Inflammatory Bowel Disease. *Cells.* 2019;8(6).
84. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D457-62.
85. Orholm M, Fonager K, Sørensen HT. Risk of ulcerative colitis and Crohn's disease among offspring of patients with chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(11):3236-8.
86. Brant SR. Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(1):1-5.
87. Zuk O, Hechter E, Sunyaev SR, Lander ES. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(4):1193-8.
88. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461(7265):747-53.
89. Kim YK, Shin JS, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J.* 2016;57(1):5-14.
90. Chauhan S, Mandell MA, Deretic V. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol Cell.* 2015;58(3):507-21.
91. Bank S, Andersen PS, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, et al. Polymorphisms in the Toll-Like Receptor and the IL-23/IL-17 Pathways Were Associated with Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease in a Danish Cohort. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145302.
92. Bank S, Skytt Andersen P, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, et al. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. *PLoS One.* 2014;9(6):e98815.
93. Gallagher MD, Chen-Plotkin AS. The Post-GWAS Era: From Association to Function. *Am J Hum Genet.* 2018;102(5):717-30.
94. Momozawa Y, Dmitrieva J, Théâtre E, Deffontaine V, Rahmouni S, Charlotteaux B, et al. IBD risk loci are enriched in multigenic regulatory modules encompassing putative causative genes. *Nat Commun.* 2018;9(1):2427.

95. Huang H, Fang M, Jostins L, Umićević Mirkov M, Boucher G, Anderson CA, et al. Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single-variant resolution. *Nature*. 2017;547(7662):173-8.
96. Bianco AM, Girardelli M, Tommasini A. Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms. *World J Gastroenterol*. 2015;21(43):12296-310.
97. Okou DT, Kugathasan S. Role of genetics in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(10):1878-84.
98. Scherr R, Essers J, Hakonarson H, Kugathasan S. Genetic determinants of pediatric inflammatory bowel disease: is age of onset genetically determined? *Dig Dis*. 2009;27(3):236-9.
99. Ostrowski J, Paziewska A, Lazowska I, Ambrozkiwicz F, Goryca K, Kulecka M, et al. Genetic architecture differences between pediatric and adult-onset inflammatory bowel diseases in the Polish population. *Sci Rep*. 2016;6:39831.
100. Cleynen I, Boucher G, Jostins L, Schumm LP, Zeissig S, Ahmad T, et al. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet*. 2016;387(10014):156-67.
101. Venkateswaran S, Prince J, Cutler DJ, Marigorta UM, Okou DT, Prahalad S, et al. Enhanced Contribution of HLA in Pediatric Onset Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24(4):829-38.
102. Frolkis AD, de Bruyn J, Jette N, Lowerison M, Engbers J, Ghali W, et al. The Association of Smoking and Surgery in Inflammatory Bowel Disease is Modified by Age at Diagnosis. *Clin Transl Gastroenterol*. 2016;7:e165.
103. van der Heide F, Nolte IM, Kleibeuker JH, Wijmenga C, Dijkstra G, Weersma RK. Differences in genetic background between active smokers, passive smokers, and non-smokers with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(5):1165-72.
104. Dixon LJ, Kabi A, Nickerson KP, McDonald C. Combinatorial effects of diet and genetics on inflammatory bowel disease pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(4):912-22.
105. Fofanova TY, Petrosino JF, Kellermayer R. Microbiome-Epigenome Interactions and the Environmental Origins of Inflammatory Bowel Diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62(2):208-19.
106. Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhyaya I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol*. 2014;20(5):1192-210.
107. Legaki E, Gazouli M. Influence of environmental factors in the development of inflammatory bowel diseases. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2016;7(1):112-25.
108. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol*. 2007;13(46):6134-9.
109. Misra R, Faiz O, Munkholm P, Burisch J, Arebi N. Epidemiology of inflammatory bowel disease in racial and ethnic migrant groups. *World J Gastroenterol*. 2018;24(3):424-37.
110. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:573-621.
111. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75(2):263-74.
112. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*. 1998;66(11):5224-31.
113. Grigg JB, Sonnenberg GF. Host-Microbiota Interactions Shape Local and Systemic Inflammatory Diseases. *J Immunol*. 2017;198(2):564-71.

114. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006;7(7):688-93.
115. Wu X, He B, Liu J, Feng H, Ma Y, Li D, et al. Molecular Insight into Gut Microbiota and Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):431.
116. Lorenzo D, GianVincenzo Z, Carlo Luca R, Karan G, Jorge V, Roberto M, et al. Oral-Gut Microbiota and Arthritis: Is There an Evidence-Based Axis? *J Clin Med.* 2019;8(10).
117. Caputi V, Giron MC. Microbiome-Gut-Brain Axis and Toll-Like Receptors in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6).
118. Freedman SN, Shahi SK, Mangalam AK. The "Gut Feeling": Breaking Down the Role of Gut Microbiome in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2018;15(1):109-25.
119. Cheung SG, Goldenthal AR, Uhlemann AC, Mann JJ, Miller JM, Sublette ME. Systematic Review of Gut Microbiota and Major Depression. *Front Psychiatry.* 2019;10:34.
120. Ye Y, Pang Z, Chen W, Ju S, Zhou C. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(12):22529-42.
121. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012;13(9):R79.
122. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology.* 2014;146(6):1489-99.
123. Stappenbeck TS, Rioux JD, Mizoguchi A, Saitoh T, Huett A, Darfeuille-Michaud A, et al. Crohn disease: a current perspective on genetics, autophagy and immunity. *Autophagy.* 2011;7(4):355-74.
124. Niccolai E, Baldi S, Ricci F, Russo E, Nannini G, Menicatti M, et al. Evaluation and comparison of short chain fatty acids composition in gut diseases. *World J Gastroenterol.* 2019;25(36):5543-58.
125. Durchschein F, Petritsch W, Hammer HF. Diet therapy for inflammatory bowel diseases: The established and the new. *World J Gastroenterol.* 2016;22(7):2179-94.
126. Barbalho SM, Goulart Rde A, Quesada K, Bechara MD, de Carvalho Ade C. Inflammatory bowel disease: can omega-3 fatty acids really help? *Ann Gastroenterol.* 2016;29(1):37-43.
127. Patterson E, Wall R, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *J Nutr Metab.* 2012;2012:539426.
128. Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. *Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID).* *Gut.* 1989;30(7):983-9.
129. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc.* 2004;60(4):505-12.
130. Garros A, Siproudhis L, Tchoundjeu B, Rohou T, Brochard C, Wallenhorst T, et al. Magnetic resonance imaging and clinical assessments for perianal Crohn's disease: gain and limits. *Dig Liver Dis.* 2014;46(12):1072-6.
131. Takenaka K, Ohtsuka K, Kitazume Y, Nagahori M, Fujii T, Saito E, et al. Comparison of magnetic resonance and balloon enteroscopic examination of the small intestine in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2014;147(2):334-42.e3.
132. Ordás I, Rimola J, Rodríguez S, Paredes JM, Martínez-Pérez MJ, Blanc E, et al. Accuracy of magnetic resonance enterography in assessing response to therapy and mucosal healing in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2014;146(2):374-82.e1.

133. Maconi G, Nylund K, Ripolles T, Calabrese E, Dirks K, Dietrich CF, et al. EFSUMB Recommendations and Clinical Guidelines for Intestinal Ultrasound (GIUS) in Inflammatory Bowel Diseases. *Ultraschall Med.* 2018;39(3):304-17.
134. Norouzinia M, Chaleshi V, Alizadeh AHM, Zali MR. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: insight into diagnosis, prognosis and treatment. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2017;10(3):155-67.
135. Solem CA, Loftus EV, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11(8):707-12.
136. Nikolaus S, Waetzig GH, Butzin S, Ziolkiewicz M, Al-Massad N, Thieme F, et al. Evaluation of interleukin-6 and its soluble receptor components sIL-6R and sgp130 as markers of inflammation in inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis.* 2018;33(7):927-36.
137. Zholudev A, Zurakowski D, Young W, Leichtner A, Bousvaros A. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(11):2235-41.
138. Kohoutova D, Drahosova M, Moravkova P, Rejchrt S, Bures J. Anti-Outer membrane protein C and anti-glycoprotein 2 antibodies in inflammatory bowel disease and their association with complicated forms of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:190.
139. Jones J, Loftus EV, Panaccione R, Chen LS, Peterson S, McConnell J, et al. Relationships between disease activity and serum and fecal biomarkers in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6(11):1218-24.
140. Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(1):40-6.
141. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology.* 1976;70(3):439-44.
142. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet.* 1980;1(8167):514.
143. Guyatt G, Mitchell A, Irvine EJ, Singer J, Williams N, Goodacre R, et al. A new measure of health status for clinical trials in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1989;96(3):804-10.
144. Irvine EJ, Zhou Q, Thompson AK. The Short Inflammatory Bowel Disease Questionnaire: a quality of life instrument for community physicians managing inflammatory bowel disease. CCRPT Investigators. Canadian Crohn's Relapse Prevention Trial. *Am J Gastroenterol.* 1996;91(8):1571-8.
145. Irvine EJ, Feagan B, Rochon J, Archambault A, Fedorak RN, Groll A, et al. Quality of life: a valid and reliable measure of therapeutic efficacy in the treatment of inflammatory bowel disease. Canadian Crohn's Relapse Prevention Trial Study Group. *Gastroenterology.* 1994;106(2):287-96.
146. Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, Dubois C, Rutgeerts P. Correlation between the Crohn's disease activity and Harvey-Bradshaw indices in assessing Crohn's disease severity. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010;8(4):357-63.
147. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: medical treatment. *J Crohns Colitis.* 2019.

148. Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, Hendy PA, Smith PJ, Limdi JK, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2019;68(Suppl 3):s1-s106.
149. Soler D, Chapman T, Yang LL, Wyant T, Egan R, Fedyk ER. The binding specificity and selective antagonism of vedolizumab, an anti-alpha4beta7 integrin therapeutic antibody in development for inflammatory bowel diseases. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;330(3):864-75.
150. Gordon FH, Lai CW, Hamilton MI, Allison MC, Srivastava ED, Fouweather MG, et al. A randomized placebo-controlled trial of a humanized monoclonal antibody to alpha4 integrin in active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2001;121(2):268-74.
151. Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN, Scherl E, Fleisher MR, Katz S, et al. A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1130-41.
152. Frolkis AD, Dykeman J, Negrón ME, Debruyn J, Jette N, Fiest KM, et al. Risk of surgery for inflammatory bowel diseases has decreased over time: a systematic review and meta-analysis of population-based studies. *Gastroenterology*. 2013;145(5):996-1006.
153. Tsui JJ, Huynh HQ. Is top-down therapy a more effective alternative to conventional step-up therapy for Crohn's disease? *Ann Gastroenterol*. 2018;31(4):413-24.
154. Bischoff SC, Escher J, Hébuterne X, Kłęk S, Krznaric Z, Schneider S, et al. ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in inflammatory bowel disease. *Clin Nutr*. 2020;39(3):632-53.
155. Dziechciarz P, Horvath A, Shamir R, Szajewska H. Meta-analysis: enteral nutrition in active Crohn's disease in children. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(6):795-806.
156. Smith MA, Smith T, Trebble TM. Nutritional management of adults with inflammatory bowel disease: practical lessons from the available evidence. *Frontline Gastroenterol*. 2012;3(3):172-9.
157. Grogan JL, Casson DH, Terry A, Burdge GC, El-Matary W, Dalzell AM. Enteral feeding therapy for newly diagnosed pediatric Crohn's disease: a double-blind randomized controlled trial with two years follow-up. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(2):246-53.
158. Konno M, Kobayashi A, Tomomasa T, Kaneko H, Toyoda S, Nakazato Y, et al. Guidelines for the treatment of Crohn's disease in children. *Pediatr Int*. 2006;48(3):349-52.
159. Mihatsch WA, Braegger C, Bronsky J, Cai W, Campoy C, Carnielli V, et al. ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition. *Clin Nutr*. 2018;37(6 Pt B):2303-5.
160. van Rheenen PF, Aloï M, Assa A, Bronsky J, Escher JC, Fagerberg UL, et al. The Medical Management of Paediatric Crohn's Disease: an ECCO-ESPGHAN Guideline Update. *J Crohns Colitis*. 2020.
161. EU A. Biosimilars in the EU 2019 [Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/leaflet/biosimilars-eu-information-guide-healthcare-professionals_en.pdf].
162. Campillos M, Kuhn M, Gavin AC, Jensen LJ, Bork P. Drug target identification using side-effect similarity. *Science*. 2008;321(5886):263-6.
163. Brekke OH, Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(1):52-62.
164. Beall RF, Hwang TJ, Kesselheim AS. Pre-market development times for biologic versus small-molecule drugs. *Nat Biotechnol*. 2019;37(7):708-11.
165. Zhao S, Nair JR, Moots RJ. Biosimilars: From Extrapolation into Off Label Use. *Curr Pharm Des*. 2017;23(44):6746-51.

166. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(9):3666-70.
167. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med*. 1997;337(15):1029-35.
168. Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischmann RM, Weaver AL, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med*. 1997;337(3):141-7.
169. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum*. 2003;48(1):35-45.
170. Winter TA, Wright J, Ghosh S, Jahnsen J, Innes A, Round P. Intravenous CDP870, a PEGylated Fab' fragment of a humanized antitumor necrosis factor antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease: an exploratory study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20(11-12):1337-46.
171. Inman RD, Davis JC, Heijde D, Diekman L, Sieper J, Kim SI, et al. Efficacy and safety of golimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Arthritis Rheum*. 2008;58(11):3402-12.
172. Yoo DH, Hrycaj P, Miranda P, Ramiterre E, Piotrowski M, Shevchuk S, et al. A randomised, double-blind, parallel-group study to demonstrate equivalence in efficacy and safety of CT-P13 compared with innovator infliximab when coadministered with methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis: the PLANETRA study. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(10):1613-20.
173. Sandoz receives European Commission approval for biosimilar Hyrimoz® (adalimumab). *Rheumatology (Oxford)*. 2019;58(2):e43-e5.
174. O'Toole A, Lucci M, Korzenik J. Inflammatory Bowel Disease Provoked by Etanercept: Report of 443 Possible Cases Combined from an IBD Referral Center and the FDA. *Dig Dis Sci*. 2016;61(6):1772-4.
175. Weir N, Athwal D, Brown D, Foulkes R, Kollias G, Nesbitt A, et al. A new generation of high-affinity humanized PEGylated Fab'' fragment anti-tumor necrosis factor-[alpha][alpha] monoclonal antibodies. *Clinical Practice*. 2006;3(4):535.
176. Lopetuso LR, Gerardi V, Papa V, Scaldaferrri F, Rapaccini GL, Gasbarrini A, et al. Can We Predict the Efficacy of Anti-TNF- α Agents? *Int J Mol Sci*. 2017;18(9).
177. Ding NS, Hart A, De Cruz P. Systematic review: predicting and optimising response to anti-TNF therapy in Crohn's disease - algorithm for practical management. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(1):30-51.
178. Schmitt H, Billmeier U, Dieterich W, Rath T, Sonnwald S, Reid S, et al. Expansion of IL-23 receptor bearing TNFR2+ T cells is associated with molecular resistance to anti-TNF therapy in Crohn's disease. *Gut*. 2018.
179. Keizer RJ, Huitema AD, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49(8):493-507.
180. Tabrizi MA, Tseng CM, Roskos LK. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Discov Today*. 2006;11(1-2):81-8.
181. Ordás I, Feagan BG, Sandborn WJ. Therapeutic drug monitoring of tumor necrosis factor antagonists in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(10):1079-87; quiz e85-6.

182. Fasanmade AA, Adedokun OJ, Ford J, Hernandez D, Johanns J, Hu C, et al. Population pharmacokinetic analysis of infliximab in patients with ulcerative colitis. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009;65(12):1211-28.
183. Fasanmade AA, Adedokun OJ, Blank M, Zhou H, Davis HM. Pharmacokinetic properties of infliximab in children and adults with Crohn's disease: a retrospective analysis of data from 2 phase III clinical trials. *Clin Ther.* 2011;33(7):946-64.
184. Brandse JF, van den Brink GR, Wildenberg ME, van der Kleij D, Rispens T, Jansen JM, et al. Loss of Infliximab Into Feces Is Associated With Lack of Response to Therapy in Patients With Severe Ulcerative Colitis. *Gastroenterology.* 2015;149(2):350-5.e2.
185. Nattiv R, Wojcicki JM, Garnett EA, Gupta N, Heyman MB. High-dose infliximab for treatment of pediatric ulcerative colitis: a survey of clinical practice. *World J Gastroenterol.* 2012;18(11):1229-34.
186. Moran GW, Dubeau MF, Kaplan GG, Yang H, Seow CH, Fedorak RN, et al. Phenotypic features of Crohn's disease associated with failure of medical treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12(3):434-42.e1.
187. Schreiber S, Colombel JF, Bloomfield R, Nikolaus S, Schölmerich J, Panés J, et al. Increased response and remission rates in short-duration Crohn's disease with subcutaneous certolizumab pegol: an analysis of PRECiSE 2 randomized maintenance trial data. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(7):1574-82.
188. Colombel JF, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rutgeerts P, Tang KL, et al. Randomised clinical trial: deep remission in biologic and immunomodulator naïve patients with Crohn's disease - a SONIC post hoc analysis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;41(8):734-46.
189. Baert F, Kondragunta V, Lockton S, Vande Casteele N, Hauenstein S, Singh S, et al. Antibodies to adalimumab are associated with future inflammation in Crohn's patients receiving maintenance adalimumab therapy: a post hoc analysis of the Karmiris trial. *Gut.* 2016;65(7):1126-31.
190. Grover Z, Biron R, Carman N, Lewindon P. Predictors of response to Infliximab in children with luminal Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 2014;8(8):739-46.
191. Bramuzzo M, Arrigo S, Romano C, Filardi MC, Lionetti P, Agrusti A, et al. Efficacy and safety of infliximab in very early onset inflammatory bowel disease: a national comparative retrospective study. *United European Gastroenterol J.* 2019;7(6):759-66.
192. Vermeire S, Louis E, Carbonez A, Van Assche G, Noman M, Belaiche J, et al. Demographic and clinical parameters influencing the short-term outcome of anti-tumor necrosis factor (infliximab) treatment in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(9):2357-63.
193. Papamichael K, Gils A, Rutgeerts P, Levesque BG, Vermeire S, Sandborn WJ, et al. Role for therapeutic drug monitoring during induction therapy with TNF antagonists in IBD: evolution in the definition and management of primary nonresponse. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(1):182-97.
194. Cornillie F, Hanauer SB, Diamond RH, Wang J, Tang KL, Xu Z, et al. Postinduction serum infliximab trough level and decrease of C-reactive protein level are associated with durable sustained response to infliximab: a retrospective analysis of the ACCENT I trial. *Gut.* 2014;63(11):1721-7.
195. Karmiris K, Paintaud G, Noman M, Magdelaine-Beuzelin C, Ferrante M, Degenne D, et al. Influence of trough serum levels and immunogenicity on long-term outcome of adalimumab therapy in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2009;137(5):1628-40.
196. Reinisch W, Wang Y, Oddens BJ, Link R. C-reactive protein, an indicator for maintained response or remission to infliximab in patients with Crohn's disease: a post-hoc analysis from ACCENT I. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;35(5):568-76.

197. Louis E, Vermeire S, Rutgeerts P, De Vos M, Van Gossum A, Pescatore P, et al. A positive response to infliximab in Crohn disease: association with a higher systemic inflammation before treatment but not with -308 TNF gene polymorphism. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37(7):818-24.
198. Buderus S, Boone J, Lysterly D, Lentze MJ. Fecal lactoferrin: a new parameter to monitor infliximab therapy. *Dig Dis Sci.* 2004;49(6):1036-9.
199. D'Haens GR, Panaccione R, Higgins PD, Vermeire S, Gassull M, Chowers Y, et al. 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? *Am J Gastroenterol.* 2011;106(2):199-212; quiz 3.
200. Esters N, Vermeire S, Joossens S, Noman M, Louis E, Belaiche J, et al. Serological markers for prediction of response to anti-tumor necrosis factor treatment in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(6):1458-62.
201. Kulma I, Boonprasert K, Na-Bangchang K. Polymorphisms of genes encoding drug transporters or cytochrome P450 enzymes and association with clinical response in cancer patients: a systematic review. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019;84(5):959-75.
202. Majumder B, Baraneedharan U, Thiyagarajan S, Radhakrishnan P, Narasimhan H, Dhandapani M, et al. Predicting clinical response to anticancer drugs using an ex vivo platform that captures tumour heterogeneity. *Nat Commun.* 2015;6:6169.
203. Messersmith WA, Ahnen DJ. Targeting EGFR in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(17):1834-6.
204. Wilson FR, Coombes ME, Wylie Q, Yurchenko M, Brezden-Masley C, Hutton B, et al. Herceptin® (trastuzumab) in HER2-positive early breast cancer: protocol for a systematic review and cumulative network meta-analysis. *Syst Rev.* 2017;6(1):196.
205. Bank S, Julsgaard M, Abed OK, Burisch J, Broder Brodersen J, Pedersen NK, et al. Polymorphisms in the NFkB, TNF-alpha, IL-1beta, and IL-18 pathways are associated with response to anti-TNF therapy in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;49(7):890-903.
206. Koder S, Repnik K, Ferkolj I, Pernat C, Skok P, Weersma RK, et al. Genetic polymorphism in ATG16L1 gene influences the response to adalimumab in Crohn's disease patients. *Pharmacogenomics.* 2015;16(3):191-204.
207. Arijs I, Quintens R, Van Lommel L, Van Steen K, De Hertogh G, Lemaire K, et al. Predictive value of epithelial gene expression profiles for response to infliximab in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(12):2090-8.
208. Gorenjak M, Repnik K, Jezernik G, Jurgec S, Skok P, Potočnik U. Genetic prediction profile for adalimumab response in Slovenian Crohn's disease patients. *Z Gastroenterol.* 2019;57(10):1218-25.
209. Grapov D, Fahrman J, Wanichthanarak K, Khoomrung S. Rise of Deep Learning for Genomic, Proteomic, and Metabolomic Data Integration in Precision Medicine. *OMICS.* 2018.
210. Misra BB, Langefeld CD, Olivier M, Cox LA. Integrated Omics: Tools, Advances, and Future Approaches. *J Mol Endocrinol.* 2018.
211. Aymé S, Schmidtke J. Networking for rare diseases: a necessity for Europe. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2007;50(12):1477-83.
212. Oughtred R, Stark C, Breitkreutz BJ, Rust J, Boucher L, Chang C, et al. The BioGRID interaction database: 2019 update. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D529-D41.
213. Stark C, Breitkreutz BJ, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D535-9.

214. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-504.
215. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics.* 2009;25(8):1091-3.
216. Bindea G, Galon J, Mlecnik B. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics.* 2013;29(5):661-3.
217. Reimand J, Arak T, Adler P, Kolberg L, Reisberg S, Peterson H, et al. g:Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W83-9.
218. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience.* 2015;4:7.
219. Guo Y, He J, Zhao S, Wu H, Zhong X, Sheng Q, et al. Illumina human exome genotyping array clustering and quality control. *Nat Protoc.* 2014;9(11):2643-62.
220. Xu C, Tachmazidou I, Walter K, Ciampi A, Zeggini E, Greenwood CM, et al. Estimating genome-wide significance for whole-genome sequencing studies. *Genet Epidemiol.* 2014;38(4):281-90.
221. Stephen T. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and Manhattan plots. *Journal of Open Source Software.* 2018(731).
222. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):e115.
223. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
224. S A. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data . 2010.
225. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(8):e47.
226. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(10):e108.
227. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010;26(1):139-40.
228. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 2010;11(3):R25.
229. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47.
230. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol.* 2014;15(2):R29.
231. M C. org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human. R package version 3.8.2. 2019.
232. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. *J Royal Statist Soc, Series B.* 1995;57:289-300.
233. C S. *plotly for R.* 2018.
234. Kodba ZC, Darinka Vončina B, Novič M, Potočnik U. Multivariate data analysis of erythrocyte membrane phospholipid Fatty Acid profiles in the discrimination between normal blood tissue and various disease States. *Acta Chim Slov.* 2010;57(3):571-80.

235. Meyer D, Dimitriadou E, Hornik K, Weingessel A, Leisch F. e1071: Misc Functions of the Department of Statistics, Probability Theory Group (Formerly: E1071), TU Wien. 2017.
236. Xiao Y, Wang XQ, Yu Y, Guo Y, Xu X, Gong L, et al. Comprehensive mutation screening for 10 genes in Chinese patients suffering very early onset inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2016;22(24):5578-88.
237. Li Q, Lee CH, Peters LA, Mastropaolo LA, Thoeni C, Elkadri A, et al. Variants in TRIM22 That Affect NOD2 Signaling Are Associated With Very-Early-Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2016;150(5):1196-207.
238. Bianco AM, Zanin V, Girardelli M, Magnolato A, Martellosi S, Martellosi S, et al. A common genetic background could explain early-onset Crohn's disease. *Med Hypotheses*. 2012;78(4):520-2.
239. Avitzur Y, Guo C, Mastropaolo LA, Bahrami E, Chen H, Zhao Z, et al. Mutations in tetratricopeptide repeat domain 7A result in a severe form of very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2014;146(4):1028-39.
240. Kammermeier J, Drury S, James CT, Dziubak R, Ocaka L, Elawad M, et al. Targeted gene panel sequencing in children with very early onset inflammatory bowel disease--evaluation and prospective analysis. *J Med Genet*. 2014;51(11):748-55.
241. Salzer E, Kansu A, Sic H, Májek P, Ikinciogullari A, Dogu FE, et al. Early-onset inflammatory bowel disease and common variable immunodeficiency-like disease caused by IL-21 deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(6):1651-9.e12.
242. Muise AM, Xu W, Guo CH, Walters TD, Wolters VM, Fattouh R, et al. NADPH oxidase complex and IBD candidate gene studies: identification of a rare variant in NCF2 that results in reduced binding to RAC2. *Gut*. 2012;61(7):1028-35.
243. Wang XC. [Clinical features of X-linked agammaglobulinemia: analysis of 8 cases]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2004;42(8):564-7.
244. Conley ME, Dobbs AK, Quintana AM, Bosompem A, Wang YD, Coustan-Smith E, et al. Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the p85 α subunit of PI3K. *J Exp Med*. 2012;209(3):463-70.
245. Ferrari S, Lougaris V, Caraffi S, Zuntini R, Yang J, Soresina A, et al. Mutations of the Igbeta gene cause agammaglobulinemia in man. *J Exp Med*. 2007;204(9):2047-51.
246. Betterle C, Greggio NA, Volpato M. Clinical review 93: Autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(4):1049-55.
247. Kelsen JR, Baldassano RN, Artis D, Sonnenberg GF. Maintaining intestinal health: the genetics and immunology of very early onset inflammatory bowel disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;1(5):462-76.
248. Lübbehusen J, Thiel C, Rind N, Ungar D, Prinsen BH, de Koning TJ, et al. Fatal outcome due to deficiency of subunit 6 of the conserved oligomeric Golgi complex leading to a new type of congenital disorders of glycosylation. *Hum Mol Genet*. 2010;19(18):3623-33.
249. Huybrechts S, De Laet C, Bontems P, Rooze S, Souayah H, Sznajer Y, et al. Deficiency of Subunit 6 of the Conserved Oligomeric Golgi Complex (COG6-CDG): Second Patient, Different Phenotype. *JIMD Rep*. 2012;4:103-8.
250. van Zelm MC, Smet J, van der Burg M, Ferster A, Le PQ, Schandené L, et al. Antibody deficiency due to a missense mutation in CD19 demonstrates the importance of the conserved tryptophan 41 in immunoglobulin superfamily domain formation. *Hum Mol Genet*. 2011;20(9):1854-63.
251. Kanegane H, Agematsu K, Futatani T, Sira MM, Suga K, Sekiguchi T, et al. Novel mutations in a Japanese patient with CD19 deficiency. *Genes Immun*. 2007;8(8):663-70.

252. Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IA, Dolman KM, et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest.* 2010;120(1):214-22.
253. van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandené L, Janssen F, et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1265-74.
254. Trotta L, Hautala T, Hämäläinen S, Syrjänen J, Viskari H, Almusa H, et al. Enrichment of rare variants in population isolates: single AICDA mutation responsible for hyper-IgM syndrome type 2 in Finland. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(10):1473-8.
255. Lohr NJ, Molleston JP, Strauss KA, Torres-Martinez W, Sherman EA, Squires RH, et al. Human ITCH E3 ubiquitin ligase deficiency causes syndromic multisystem autoimmune disease. *Am J Hum Genet.* 2010;86(3):447-53.
256. Christiano AM, McGrath JA, Tan KC, Uitto J. Glycine substitutions in the triple-helical region of type VII collagen result in a spectrum of dystrophic epidermolysis bullosa phenotypes and patterns of inheritance. *Am J Hum Genet.* 1996;58(4):671-81.
257. Kelsen JR, Dawany N, Moran CJ, Petersen BS, Sarmady M, Sasson A, et al. Exome sequencing analysis reveals variants in primary immunodeficiency genes in patients with very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2015;149(6):1415-24.
258. Kobayashi K, Fujita K, Okino F, Kajii T. An abnormality of neutrophil adhesion: autosomal recessive inheritance associated with missing neutrophil glycoproteins. *Pediatrics.* 1984;73(5):606-10.
259. Kelsen JR, Dawany N, Martinez A, Grochowski CM, Maurer K, Rappaport E, et al. A de novo whole gene deletion of XIAP detected by exome sequencing analysis in very early onset inflammatory bowel disease: a case report. *BMC Gastroenterol.* 2015;15:160.
260. Weinstein EJ, Bourner M, Head R, Zakeri H, Bauer C, Mazzarella R. URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-associated proteins is significantly over-expressed in lung and colon carcinomas. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1637(3):207-16.
261. Sunseri WM, Kugathasan S, Keljo DJ, Greer JB, Ranganathan S, Cross RK, et al. IBD LIVE Case Series--Case 3: Very Early-Onset Inflammatory Bowel Disease: When Genetic Testing Proves Beneficial. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(12):2958-68.
262. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med.* 2014;20(12):1410-6.
263. Consortium G. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet.* 2013;45(6):580-5.
264. Lequerré T, Gauthier-Jauneau AC, Bansard C, Derambure C, Hiron M, Vittecoq O, et al. Gene profiling in white blood cells predicts infliximab responsiveness in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(4):R105.
265. Toonen EJ, Gilissen C, Franke B, Kievit W, Eijssbouts AM, den Broeder AA, et al. Validation study of existing gene expression signatures for anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2012;7(3):e33199.
266. Jezernik G, Potočnik U. Comprehensive genetic study of fatty acids helps explain the role of noncoding inflammatory bowel disease associated SNPs and fatty acid metabolism in disease pathogenesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2018;130:1-10.
267. Shah AS, Tan L, Long JL, Davidson WS. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *J Lipid Res.* 2013;54(10):2575-85.

268. Connor AM, Mahomed N, Gandhi R, Keystone EC, Berger SA. TNF α modulates protein degradation pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(2):R62.
269. van der Heijden JW, Oerlemans R, Lems WF, Scheper RJ, Dijkmans BA, Jansen G. The proteasome inhibitor bortezomib inhibits the release of NF κ B-inducible cytokines and induces apoptosis of activated T cells from rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27(1):92-8.
270. Liu J, Li J, Chen M, Kuang L. Bortezomib followed by autologous stem cell transplantation in a patient with rheumatoid arthritis: A case report and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(52):e5760.
271. Pascart T, Herbaux C, Lemaire A, Soncin F, Hachulla E, Hatron PY, et al. Coexistence of rheumatoid arthritis and TEMPI syndrome: New insight in microangiogenic-related diseases. *Joint Bone Spine.* 2016;83(5):587-8.
272. Hassan S, Milman U, Feld J, Eder L, Lavi I, Cohen S, et al. Effects of anti-TNF- α treatment on lipid profile in rheumatic diseases: an analytical cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2016;18(1):261.
273. Sandoo A, van Zanten JJ, Toms TE, Carroll D, Kitas GD. Anti-TNF α therapy transiently improves high density lipoprotein cholesterol levels and microvascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012;13:127.
274. Seriola B, Paolino S, Sulli A, Fasciolo D, Cutolo M. Effects of anti-TNF-alpha treatment on lipid profile in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1069:414-9.
275. Cacciapaglia F, Anelli MG, Rinaldi A, Serafino L, Covelli M, Scioscia C, et al. Lipid profile of rheumatoid arthritis patients treated with anti-tumor necrosis factor-alpha drugs changes according to disease activity and predicts clinical response. *Drug Dev Res.* 2014;75 Suppl 1:S77-80.
276. Marroni F, Pfeufer A, Aulchenko YS, Franklin CS, Isaacs A, Pichler I, et al. A genome-wide association scan of RR and QT interval duration in 3 European genetically isolated populations: the EUROSPAN project. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2(4):322-8.
277. Huang X, Wu BP, Nguyen D, Liu YT, Marani M, Hench J, et al. CHCHD2 accumulates in distressed mitochondria and facilitates oligomerization of CHCHD10. *Hum Mol Genet.* 2018;27(22):3881-900.
278. Metsu S, Rainger JK, Debacker K, Bernhard B, Rooms L, Grafodatskaya D, et al. A CGG-repeat expansion mutation in ZNF713 causes FRA7A: association with autistic spectrum disorder in two families. *Hum Mutat.* 2014;35(11):1295-300.
279. Penrose HM, Cable C, Heller S, Ungerleider N, Nakhoul H, Baddoo M, et al. Loss of Forkhead Box O3 Facilitates Inflammatory Colon Cancer: Transcriptome Profiling of the Immune Landscape and Novel Targets. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;7(2):391-408.
280. Tibble JA, Sighthorsson G, Bridger S, Fagerhol MK, Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2000;119(1):15-22.
281. Wang Y, Zhang Y, Qian H, Lu J, Zhang Z, Min X, et al. The g0/g1 switch gene 2 is an important regulator of hepatic triglyceride metabolism. *PLoS One.* 2013;8(8):e72315.
282. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(2):397-406.
283. Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(12):773-89.

284. Balic JJ, Garbers C, Rose-John S, Yu L, Jenkins BJ. Interleukin-11-driven gastric tumourigenesis is independent of trans-signalling. *Cytokine*. 2017;92:118-23.
285. Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, Jenkins B, Waring P, Clay FJ, et al. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat Med*. 2002;8(10):1089-97.
286. Liu M, Degner J, Davis JW, Idler KB, Nader A, Mostafa NM, et al. Identification of HLA-DRB1 association to adalimumab immunogenicity. *PLoS One*. 2018;13(4):e0195325.
287. Ungar B, Kopylov U, Engel T, Yavzori M, Fudim E, Picard O, et al. Addition of an immunomodulator can reverse antibody formation and loss of response in patients treated with adalimumab. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;45(2):276-82.
288. Skapenko A, Smolen JS, Kavanaugh A, Arora V, Kupper H, Schulze-Koops H. Genetic markers associated with clinical and radiographic response in adalimumab plus methotrexate- or methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients in OPTIMA. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37(5):783-90.
289. Guarene M, Pasi A, Bolcato V, Cananzi R, Piccolo A, Sbarsi I, et al. The Presence of HLA-A Bw4-80I KIR Ligands Could Predict "Difficult-to-Treat" Psoriasis and Poor Response to Etanercept. *Mol Diagn Ther*. 2018;22(4):471-4.
290. Talamonti M, Galluzzo M, Zangrilli A, Papoutsaki M, Egan CG, Bavetta M, et al. HLA-C*06:02 Does Not Predispose to Clinical Response Following Long-Term Adalimumab Treatment in Psoriatic Patients: A Retrospective Cohort Study. *Mol Diagn Ther*. 2017;21(3):295-301.
291. Ueda Y, Kawakami Y, Kunii D, Okada H, Azuma M, Le DS, et al. Elevated concentrations of linoleic acid in erythrocyte membrane phospholipids in patients with inflammatory bowel disease. *Nutr Res*. 2008;28(4):239-44.
292. Uchiyama K, Odahara S, Nakamura M, Koido S, Katahira K, Shiraiishi H, et al. The fatty acid profile of the erythrocyte membrane in initial-onset inflammatory bowel disease patients. *Dig Dis Sci*. 2013;58(5):1235-43.
293. Hengstermann S, Valentini L, Schaper L, Buning C, Koernicke T, Maritschnegg M, et al. Altered status of antioxidant vitamins and fatty acids in patients with inactive inflammatory bowel disease. *Clin Nutr*. 2008;27(4):571-8.
294. Trabzuni D, Ryten M, Emmett W, Ramasamy A, Lackner KJ, Zeller T, et al. Fine-mapping, gene expression and splicing analysis of the disease associated LRRK2 locus. *PLoS One*. 2013;8(8):e70724.
295. Hatano T, Kubo S, Imai S, Maeda M, Ishikawa K, Mizuno Y, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Hum Mol Genet*. 2007;16(6):678-90.
296. Angela M, Endo Y, Asou HK, Yamamoto T, Tumes DJ, Tokuyama H, et al. Fatty acid metabolic reprogramming via mTOR-mediated inductions of PPAR γ directs early activation of T cells. *Nat Commun*. 2016;7:13683.
297. Pan G, Ameer A, Enroth S, Bysani M, Nord H, Cavalli M, et al. PATZ1 down-regulates FADS1 by binding to rs174557 and is opposed by SP1/SREBP1c. *Nucleic Acids Res*. 2016.
298. Okada Y, Tsuzuki Y, Sato H, Narimatsu K, Hokari R, Kurihara C, et al. Trans fatty acids exacerbate dextran sodium sulphate-induced colitis by promoting the up-regulation of macrophage-derived proinflammatory cytokines involved in T helper 17 cell polarization. *Clin Exp Immunol*. 2013;174(3):459-71.
299. Høstmark AT, Haug A. Percentages of oleic acid and arachidonic acid are inversely related in phospholipids of human sera. *Lipids Health Dis*. 2013;12:106.

7 Priloge

7.1 Članek kot sestavni del doktorske disertacije

7.1.1 Izvirni znanstveni članek 1

JEZERNIK, Gregor, POTOČNIK, Uroš. Comprehensive genetic study of fatty acids helps explain the role of noncoding inflammatory bowel disease associated SNPs and fatty acid metabolism in disease pathogenesis. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, ISSN 1532-2823. [Online ed.], 2018, vol. 130, str. 1-10, ilustr. [http://www.plefa.com/article/S0952-3278\(17\)30210-7/pdf](http://www.plefa.com/article/S0952-3278(17)30210-7/pdf), <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.02.002>, doi: 10.1016/j.plefa.2018.02.002. [COBISS.SI-ID 6249791]

7.1.2 Izvirni znanstveni članek 2

GORENJAK, Mario, REPNIK, Katja, JEZERNIK, Gregor, JURGEC, Staša, SKOK, Pavel, POTOČNIK, Uroš. Genetic prediction profile for adalimumab response in Slovenian Crohn's disease patients = Genetisches Vorhersageprofil für die Adalimumab-Antwort bei den slowenischen Morbus-Crohn-Patienten. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, ISSN 0044-2771, Okt. 2019, jahrg. 57, hft. 10, str. 1218-1225, ilustr. <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/a-0981-6516>, doi: 10.1055/a-0981-6516. [COBISS.SI-ID 6817599]

7.1.3 Izvirni znanstveni članek 3

JEZERNIK, Gregor, MIČETIĆ-TURK, Dušanka, POTOČNIK, Uroš. Molecular Genetic Architecture of Monogenic Pediatric IBD Differs from Complex Pediatric and Adult IBD. *Journal of personalized medicine*. 2020, vol. 10, iss. 4, str. 1-18, ilustr. ISSN 2075-4426. <https://www.mdpi.com/2075-4426/10/4/243>, DOI: 10.3390/jpm10040243. [COBISS.SI-ID 39713283]

7.2 Izjava Komisije RS za medicinsko etiko



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA ZDRAVJE

Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko

Red. prof. dr. Uroš Potočnik, univ. dipl. inž. kem.

Medicinska fakulteta
Univerza v Mariboru
Taborska ulica 8
2000 Maribor

uros.potocnik@um.si
boris.gole@um.si
gregor.jezernik1@um.si

Številka: 0120-194/2019/4

Datum: 23. maj 2019

Zadeva: Ocena etičnosti predložene raziskave

Spoštovani gospod red. prof. dr. Uroš Potočnik, univ. dipl. inž. kem.

Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (KME) je dne 27. 3. 2019 (datirano z datumom 26. 3. 2019) od vas prejela vlogo za oceno etičnosti raziskave z naslovom »Molekularno genetski bioznačevalci in mehanizmi neodzivnosti na biološko zdravljenje z anti-TNF bolnikov s kroničnimi imunskimi boleznimi«.

V okviru zgoraj omenjene raziskave bo pod vašim mentorstvom ter somentorstvom red. prof. dr. Pavla Skoka kandidat Gregor Jezernik opravil doktorsko delo z naslovom »Molekularni mehanizmi in napovedovanje neodzivnosti na inhibitorje TNF pri Crohnovi bolezni z integracijo genomskih in kliničnih podatkov«.

KME je na seji 16. aprila 2019¹ obravnavala vašo vlogo za raziskavo in ugotovila, da je vloga popolna ter ocenila, da je raziskava etično sprejemljiva. S tem vam za njeno izvedbo izdaja svoje soglasje.

P.S.: Pri morebitnih nadaljnjih dopisih v zvezi z raziskavo se obvezno sklicujte na številko tega dopisa.

S spoštovanjem,

Pripravila:
Maja Žejn

dr. Božidar Voljč, dr. med.,
predsednik KME

¹ Seznam članov KME, ki so odločali o vlogi, in izjava, da KME deluje v skladu z zadevnimi zakoni in priporočili, sta na voljo na spletni strani KME (zavihek "Meni", rubrika "Seje").

Zahvale

Iskreno se zahvaljujem mentorju red. prof. dr. Urošu Potočniku, da mi je omogočil delo mladega raziskovalca in vpis na doktorski študij. Mentorju red. prof. dr. Urošu Potočniku se prav tako zahvaljujem za podporo z nasveti in napotki pri znanstvenoraziskovalnem delu in izdelovanju doktorske disertacije.

Prav tako se iskreno zahvaljujem red. prof. dr. Pavlu Skoku za vse nasvete in napotke pri znanstvenoraziskovalnem delu in izdelovanju doktorske disertacije.

Zahvaljujem se doc. dr. Mariu Gorenjaku za sodelovanje pri oblikovanju protokola za strojno učenje in za nasvete pri izdelovanju doktorske disertacije.

Doc. dr. Katji Repnik se iskreno zahvaljujem za nasvete in napotke pri delu z biološkimi vzorci, genetskimi podatki in sekvenciranju naslednje generacije.

Zahvala velja tudi dr. Borisu Goletu, ki je oblikoval in izdelal celične kokulture, za vse napotke pri delu s celičnimi kulturami.

Staši Jurgec se zahvaljujem za vso podporo in pomoč pri delu z biološkimi vzorci preiskovancev ter testi qPCR.

Bolnikom in njihovim svojcem se iskreno zahvaljujem za sodelovanje v farmogenetski študiji.

Zahvaljujem se tudi dr. Heleni Sabini Čelešnik, dr. Cvetki Pernat Drobež, dr. Silvu Kodru, dr. Zdenki Cencič-Kodbi in Jovanu Krsteskemu. Posebej se zahvaljujem mami Aleksandri, babici Vidi in preminulemu dedku Alojzu ter vsem, ki so na kakršen koli način pripomogli k mojemu delu.

Delovni življenjepis

OSEBNI PODATKI **Jezernik Gregor**

✉ gregor.jezernik1@um.si

PRIJAVA NA IZOBRAŽEVANJE **Biomedicinska tehnologija 2016/17**

IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE

| | | |
|-------------|---|-------------|
| 2011–2014 | Diplomirani inženir kemijske tehnologije (UN) Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru, Maribor (Slovenija) | Raven 6 EOK |
| 2014–2016 | Magister inženir kemijske tehnike Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru, Maribor (Slovenija) | Raven 7 EOK |
| 2016–v teku | Doktor znanosti s področja biomedicinske tehnologije Medicinska Fakulteta, Univerza v Mariboru, Maribor (Slovenija) | Raven 8 EOK |

KOMPETENCE

Materni jezik slovenščina

| Drugi jeziki | RAZUMEVANJE | | GOVORJENJE | | PISNO SPOROČANJE |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------|
| | Slušno razumevanje | Bralno razumevanje | Govorno sporazumevanje | Govorno sporočanje | |
| nemščina | C1 | C1 | C1 | C1 | C1 |
| DSD - Deutsches Sprachdiplom Stufe II | | | | | |
| angleščina | C1 | C1 | C1 | C1 | C1 |

Stopnja: A1 in A2: Osnovni uporabnik - B1 in B2: Samostojni uporabnik - C1 in C2: Usposobljeni uporabnik
Skupni evropski jezikovni okvir

Digitalna pismenost

| SAMOVREDNOTENJE | | | | |
|------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Obdelava informacij | Komunikacija | Ustvarjanje vsebin | Varnost | Reševanje problemov |
| Usposobljeni uporabnik | Samostojni uporabnik | Usposobljeni uporabnik | Usposobljeni uporabnik | Usposobljeni uporabnik |

Digitalne kompetence - Samoocenjevalna lestvica

PRILOGA 4: IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE DOKTORSKE DISERTACIJE

UNIVERZA V MARIBORU

Medicinska fakulteta

IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE DOKTORSKE DISERTACIJE

Ime in priimek študenta/-ke: Gregor Jezernik

Študijski program: BIOMEDICINSKA TEHNOLOGIJA

Naslov doktorske disertacije: Biološki procesi in napovedovanje neodzivnosti na zaviralce dejavnika tumorske nekroze pri Crohnovi bolezni z integracijo genomskih podatkov

Mentor/-ica: Uroš Potočnik

Somentor/-ica: Pavel Skok

Podpisani/-a študent/-ka Gregor Jezernik

- izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega znanstvenoraziskovalnega dela;
- izjavljam, da sem pridobil/-a vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v zaključnem delu in jih v zaključnem delu jasno in ustrezno označil/-a;
- na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM in drugih informacijskih zbirk in ponudnikov; sem seznanjen/-a, da bodo dela deponirana/objavljena v DKUM dostopna široki javnosti pod pogoji licence **Creative Commons BY-NC-ND**, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo;
- dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, vezanih na zaključek študija (ime, priimek, leto zaključka študija, naslov zaključnega dela) na spletnih straneh Univerze v Mariboru in v publikacijah Univerze v Mariboru;
- izjavljam, da je tiskana oblika zaključnega dela istovetna elektronski obliki zaključnega dela, ki sem jo oddal/-a za objavo v DKUM;
- izjavljam, da sem seznanjen s pogoji Proquest-a za oddajo in javno objavo doktorske disertacije v podatkovno zbirko ProQuest Dissertations & Theses Global (<http://contentz.mkt5049.com/lp/43888/382619/PQDTauthoragreement.pdf>).

Uveljavljam permissivnejšo obliko licence Creative Commons: CC BY-NC-SA 4.0 (navedite obliko)

Kraj in datum: Maribor, 06.01.2021 Podpis študenta/-ke: 