



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



mr Irina Milovac

**IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA
GENETIČKIH POLIMORFIZAMA ASOCIRANIH SA
SINDROMOM IRITABILNOG KOLONA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2017.



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF NATURAL SCIENCES AND
MATHEMATICS



Irina Milovac, MSc

**IDENTIFIKATION AND CHARACTERIZATION OF
GENETIC VARIANTS ASSOCIATED WITH
IRRITABLE BOWEL SYNDROME**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2017.

Mentor:

Prof.dr. Lejla Pojskić, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu i naučni savjetnik, Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Univerzitet u Sarajevu

Mentor:

Prof.dr. Stojko Vidović, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

Naslov doktorske disertacije:

Identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama asociranih sa sindromom iritabilnog kolona

Rezime:

Ovom prospektivnom studijom obuhvaćeno je 29 ispitanika, od kojih je 20 pacijenata kojima je na osnovu Rim III kriterijuma dijagnostifikovan sindrom iritabilnog kolona i 9 kontrolnih zdravih ispitanika. Nakon potpisivanja informisanog pristanka, pristupljeno je popunjavanju standardizovanih kliničkih upitnika, a zatim i uzimanju bioloških uzoraka. Svim učesnicima je izvađena krv konvencionalnom metodom odakle je dalje izolovana DNK i RNK. Iz biopsija, koje su rađene samo u slučajevima kada je osoba morala da prođe endoskopiju, izolovana je RNK. U radu je primijenjena asocijativna analiza odabranih genetičkih polimorfizama kao mogućih rizikofaktora za sindrom iritabilnog kolona prema modelu studije “pacijent-kontrola”. Izvršena je genotipizacija za ukupno 4 genska polimorfizma kao mogućih rizikofaktora za sindrom iritabilnog kolona. Cilj je bio da se utvrdi da su odabrani genetički polimorfizmi udruženi sa dijagnozom i specifičnim kliničkim podtipovima sindroma iritabilnog kolona, te da postoji značajna razlika u distribuciji alelnih, genotipskih i haplotipskih frekvencija odabranih kandidat gena između grupe pacijenata i kontrolne grupe. Nakon ovog prvog dijela studije urađene su dodatne analize asocijacije varijacija u genskoj ekspresiji za šest odabranih gena. U analizama korelacije testirana je povezanost između genetičkih karakteristika sindroma iritabilnog kolona i kliničkih parametara dobijenih popunjavanjem harmoniziranih kliničkih upitnika, a dobijeni rezultati su pokazali da je varijacija u genskoj ekspresiji praćena specifičnom varijacijom u ukupnoj vrijednosti za svaki upitnik.

Ova studija predstavlja važan korak ne samo u identifikaciji odgovornih gena i njihovih alelnih varijanti za sindrom iritabilnog kolona, već i za potpunije razumijevanje ovog fenomenološki heterogenog, fenotipski nestabilnog i etiološki kompleksnog oboljenja.

Ključne riječi:

Sindrom iritabilnog kolona, genetički polimorfizmi, genska ekspresija, klinički podtipovi.

Naučna oblast:

Biološke nauke

Naučno polje:

Genetika

Klasifikaciona oznaka:

B 220

Tip odabrane licence Kreativne zajednice:

Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada

Mentor:

Prof.dr. Lejla Pojskić, PhD, Associate professor, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Sarajevo, and Institut for Genetic Engineering and Biotechnology, University of Sarajevo

Mentor:

Prof.dr. Stojko Vidović, PhD, Full Professor, Faculty of Medicine, Univerzity of Banja Luka

Title of the doctoral dissertation:

Identifikacija i karakterizacija genetskih varijanti povezanih sa iritabilnim sindromom

Summary:

This prospective study included 29 participants, 20 individuals diagnosed with irritable bowel syndrome (IBS) based on Roma III criteria and 9 healthy individuals. After confirming voluntary participation in the study by signing previously approved informed consent document, all participants completed standardized clinical questionnaires, and provided biological specimens for further stage. All participants provided blood samples by a conventional method as a source for DNA and RNA analyses. RNA was isolated from tissue biopsies, which were performed only in cases when the person had to pass the endoscopy. This study analyzed the selected genetic polymorphisms as possible risk factors for irritable bowel syndrome according to the model of the case-control study. Genotyping was performed for a total of 4 gene polymorphisms qualified as risk factors for irritable bowel syndrome in previous research studies. The aim was to assess relationship between the selected genetic polymorphisms with the diagnosis and specific clinical subtypes of the irritable bowel syndrome and if there is a significant difference in the distribution of allele, genotype and haplotype frequencies of selected loci between case and control group. Following the first part of the study, additional analysis of variations in gene expression of 6 selected genes was estimated. The correlation between the genetic characteristics of the irritable bowel syndrome and the clinical parameters obtained by harmonized clinical questionnaires was tested, and the obtained results showed that the variation in gene expression was followed by a specific variation in the total value for each questionnaire.

This study represents an important step not only in identifying responsible genes and their allele variants for irritable bowel syndrome, but also for a more complete understanding of this phenomenologically heterogeneous, phenotypically unstable and etiologically complex disease.

Key words:

Irritable bowel syndrome, clinical subtypes, genetic variants, gene expression

Scientific area:

Biological sciences

Scientific field:

Genetics

Classification Code:

B 220

Type the selected license Creative Communities:

CC BY-NC-ND

Zahvala

Hvala dr Lejli Pojskić, profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu i naučnom savjetniku Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu, na predloženoj temi istraživanja, kao i na ukazanom povjerenju, nesebičnoj pomoći, strpljenju i aktivnom učešću u svim fazama izrade i pisanja disertacije. Takođe joj se zahvaljujem na prijateljskim savjetima i podršci koju mi je pružala od samog početka naše saradnje, kao i spremnosti na rješavanje svih malih i velikih problema sa kojima smo se susretali, od administrativnih do istraživačkih.

Hvala dr Stojki Vidoviću, profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, na velikoj podršci, strpljenju i tolerantnosti tokom izrade eksperimentalnog dijela koji je vezan za odlaske u Sarajevo, kao i na korisnim sugestijama i savjetima tokom pisanja disertacije.

Hvala članu Komisije za pregled, ocjenu i odbranu doktorske disertacije, dr Nataši Golić, naučnom savjetniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, na ukazanoj časti za učešće u Komisiji, čitanju rukopisa i korisnim sugestijama.

Hvala dr Zoranu Maviji, profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, ljekaru specijalisti gastroenterologu i hepatologu na Klinici za unutrašnje bolesti Univerzitetsko kliničkog centra Republike Srpske i njegovom stručnom timu, na profesionalnom učešću tokom regrutacije i obrade pacijenata.

Hvala dr Narisu Pojskiću, profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Sarajevu, naučnom savjetniku i direktoru Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu na gostoprimstvu i ukazanom povjerenju tokom moga boravka i rada na Institutu, kao i na stručnoj pomoći.

Zahvalnost dugujem prijateljima i kolegama iz Laboratorije za humanu genetiku Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu, Naidi Lojo-Kadrić, Jasminu Ramiću i Maidi Hadžić, na pruženoj pomoći, podršci i savjetima prilikom savladavanja metodologije.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima iz Sarajeva koji su mi pružili nesebičnu pomoć i podršku.

Ogromnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima koji su uvijek bili tu za mene i uz mene, pa čak i onda kada su se stvari činile nemogućim.

Hvala mojim vilama, Ani i Tei, one su bile moj izvor snage.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Definicija oboljenja sindroma iritabilnog kolona.....	3
1.2. Epidemiologija IBS-a.....	4
1.3. Patofiziologija IBS-a.....	4
1.4. Klinička slika	6
1.5. Tradicionalni dijagnostički testovi za IBS	9
1.6. Socioekonomski značaj	10
1.7. Liječenje.....	11
1.8. IBS i druga oboljenja.....	14
1.9. Nasljedna osnova IBS-a	16
1.10. Endofenotipovi IBS-a.....	28
1.11. Epigenetika.....	31
1.12. Pristupni model u kolaborativnom evropskom istraživanju nasljedne osnove IBS-a	32
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	35
3. MATERIJAL I METODE.....	36
3.1. Formiranje grupe sa pacijentima i kontrolne grupe.....	36
3.2. Upitnici.....	37
3.2.1. CRF (<i>Case Report Form</i>).....	37
3.2.2. GSRS (<i>Gastrointestinal Symptom Rating Scale</i>)	37
3.2.3. PHQ-15 (<i>Patient Health Questionnaire</i>).....	37
3.2.4. HAD (<i>Hospital Anxiety and Depression Scale</i>)	37
3.2.5. VSI (<i>Visceral Sensitivity Index</i>)	38
3.3. Uzorci krvi	38
3.3.1. Izolacija DNK	39
3.3.2. Kvantitativno-kvalitativna analiza DNK.....	39
3.4. Gen FKBP5	40
3.4.1. <i>Allele-specific amplification (ASA PCR)</i>	42
3.5. Gen DRD2.....	44
3.5.1. <i>Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)</i> ... 46	
3.6. Gen DAT (SLC6A3)	47

3.7. SRin2.....	48
3.7.1. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	49
3.8. Izolacija RNK iz periferne krvi.....	53
3.9. Izolacija RNK iz tkiva (biopsija kolona).....	56
3.10. Određivanje koncentracije RNK.....	57
3.11. <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	58
3.12. <i>Real Time PCR</i>	61
3.12.1. Konstitutivni ili <i>Housekeeping</i> geni kao referentni geni u analizi relativne genske ekspresije.....	64
3.13. Izbor gena za analizu ekspresije, prajmeri i njihova optimizacija.....	65
3.13.1. TNFSF15 (Tumor necrosis factor ligand superfamily member 15).....	65
3.13.2. P2RY4 (Pyrimidinergic receptor P2Y4).....	66
3.13.3. VIP (Vasoactive intestinal peptide).....	67
3.13.4. GUCA2B (Guanilate cyclase activator 2B).....	68
3.13.5. PDZD3 (PDZ domain containing 3).....	69
3.13.6. NR1H4 (Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4).....	70
3.13.7. Prajmeri i optimizacija.....	71
3.14. Statističke metode.....	73
3.14.1. X^2 test.....	73
3.14.2. Fisher exact test.....	73
3.14.3. Hardi-Vajnbergov ekvilibrijum (HWE).....	73
3.14.4. REST-Relative expression software tool.....	74
3.14.5. Korelacije.....	74
4. REZULTATI.....	76
4.1. Formiranje grupa, sakupljanje podataka i uzoraka.....	76
4.2. Brojnost, polna i starosna struktura.....	77
4.3. Rezultati upitnika.....	79
4.3.1. GSRS.....	79
4.3.2. PHQ-15.....	81
4.3.3. VSI.....	83
4.3.4. HAD.....	84
4.4. Analiza asocijacije odabranih genskih polimorfizama sa sindromom iritabilnog kolona.....	86

4.4.1. Rezultati genotipizacije, analiza genotipske i alelne asocijacije i Hardy-Vajnbergov ekvilibrijum	87
FKBP5	87
DRD2	89
DAT	92
SRin2	95
4.4.2. Analiza haplotipskih asocijacija	97
4.5. Analiza asocijacije varijacija u genskoj ekspresiji sa sindromom iritabilnog kolona	98
4.5.1. Rezultati dobiveni izolacijom RNK, reverznom transkripcijom i lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu	98
4.5.2. Rezultati REST analize	102
4.6. Analiza korelacija između genetičkih karakteristika sindroma iritabilnog kolona i kliničkih parametara	104
5. DISKUSIJA	106
5.1. Upitnici	107
5.1.1. CRF	107
5.1.2. GSRS	108
5.1.3. PHQ-15	109
5.1.4. VSI	109
5.1.5. HAD	110
5.2. Asocijacije odabranih genetičkih polimorfizama sa sindromom iritabilnog kolona	111
5.3. Asocijacije varijacija u genskoj ekspresiji i sindroma iritabilnog kolona	115
5.4. Korelacije između ekspresija i kliničkih fenotipova	118
6. ZAKLJUČAK	120
7. LITERATURA	123

1. UVOD

Sindrom iritabilnog kolona (*Irritable Bowel Syndrome – IBS*) je funkcionalni poremećaj gastrointestinalnog trakta (GI) okarakterisan bolovima i nelagodnom u stomaku koji je povezan sa defekacijom i poremećajima u defekaciji, kao i sa distenzijom stomaka, a takođe su prisutna i različita psihološka stanja kao što su različiti strahovi, anksioznost, pa čak i depresije. Dijagnostifikuje se po sistemu isključivanja, a karakterišu ga hronični simptomi koji variraju tokom vremena i koji mogu biti zajednički sa drugim poremećajima gastrointestinalnog trakta. Kriterijumi za uspostavljanje dijagnoze su jasni, ali nisu lako primjenljivi u kliničkoj praksi o čemu govori podatak da više od 40% pacijenata mogu imati simptome i do 5 godina prije uspostavljanja same dijagnoze. U slučaju da ne postoji nikakva fizička, radiološka ili laboratorijska indikacija za neko organsko gastrointestinalno oboljenje, sumnja se na IBS. Sindrom iritabilnog kolona je okarakterisan kao „mozak-crijevo“ poremećaj (*brain-gut disorder*), a vezuje se sa izmijenjenim fiziološkim procesima kao što su peristaltika crijeva, visceralna preosjetljivost, promjene u imunom odgovoru u sluzokoži crijeva i promjene u crijevnoj mikroflori. Posljednje epidemiološke studije su pokazale da je u Sjevernoj Americi prevalenca za IBS 3-20% što na godišnjem nivou predstavlja oko 45 miliona oboljelih (Burbige, 2010).

Naziv oboljenja “sindrom iritabilnog kolona” pripisuje se Volteru Alvarezu (Walter C. Alvarez) koji je 1915. godine utvrdio i okarakterisao promjene u kontrakcijama i razdražljivosti crijeva koje utiču na varenje i prolazak hrane kroz crijeva. Od 1979. godine u medicinskoj terminologiji prisutan je pod različitim nazivima, kao sindrom iritabilnog crijeva, mukozni kolitis, spastični kolon ili nervozno crijevo, a u glavnom su se odnosili na poremećaje debelog crijeva. Naziv oboljenja se koristi za grupu različitih simptoma od nelagode i bolova u stomaku do različitih promjena i disfunkcija u varenju što ukazuje na vjerovatnoću pogrešnog dijagnostifikovanja. Uglavnom se koriste simptomi za dijagnostifikovanje ovog kompleksnog oboljenja pri čemu je neophodno voditi računa o tome da postoje značajna preklapanja u simptomima kod oboljelih od IBS-a i nekih drugih GI oboljenja. Tačan uzrok IBS-a još uvijek nije poznat. Pokretljivost crijeva je poremećena iako jasnih organskih uzroka nema, primijećeno je da se tegobe javljaju ili pojačavaju u vrijeme stresnih situacija, a oboljeli mogu biti anksiozni ili depresivni zbog čega ova bolest nije

klasično gastrointestinalno oboljenje i može se sa pravom svrstati u grupu psihosomatskih bolesti. Nakon stotinu godina od uvođenja koncepta iritabilnog kolona diskutuje se o tome da li je u potpunosti adekvatan naziv ove bolesti (Camilleri, 2012).

Proteklih tridesetak godina dijagnostifikovanje sindroma iritabilnog kolona zasnovano je na pozitivnoj dijagnostici kompatibilnih simptoma, kao i isključivanja organskih bolesti, prvenstveno karcinoma debelog crijeva i Kronove bolesti. Simptomi IBS-a su heterogeni, a mogu da se pojačavaju i/ili jenjavaju tokom vremena. Zabilježen je kormobiditet sa drugim GI oboljenjima i nekim psihološkim stanjima, kao i sa oboljenjima koja uopšte nisu gastrointestinalna. Simptomi IBS-a su veoma slični i često se preklapaju sa simptomima hronične konstipacije, funkcionalne dispepsije, želudačno-jednjačnom refluksu, bolesti zapaljenja crijeva (*IBD-Inflammatory Bowel Disease*), celijaki i poremećaju tolerancije na glukozu. IBS može da se javi i sa drugim poremećajima kao što su prije svega fibromigalija, sindrom hroničnog umora, poremećaj temporomandibularnog zgloba, hroničnog bola u karlici, te nekim psihološkim stanjima kao što su strahovi, anksioznost i somatizacija. Sindrom iritabilnog kolona negativno utiče na kvalitet života (*QOL – Quality of Life*) koji se ogleda u smanjenoj produktivnosti u radu i povećanim izostancima sa posla i iz škole, kao i učestalijim korištenjem zdravstvene zaštite, što ima značajne posljedice na društveno-ekonomski sistem (Henström, 2016).

Razvijeno je nekoliko kriterijuma za identifikaciju i standardizaciju prilikom dijagnostifikovanja IBS-a. Jedan od najstarijih kriterijuma nastao 1978. godine, Manning kriterijum, identifikuje šest simptoma koji povećavaju vjerovatnoću za IBS dijagnozu, ali se njime ne precizira broj ili dužina trajanja simptoma. Kruis sa saradnicima je 1984. godine razvio sistem koji uključuje simptome, fizičko stanje i laboratorijske nalaze. Internacionalna radna grupa (*International working group*) je 1990. godine razvila Rim I kriterijum sa namjerom da se redukuju nepotrebna testiranja i obezbijedi jednoobraznost kod dijagnostifikovanja i terapije IBS-a. Ovaj kriterijum je 1999. godine dopunjen u Rim II, a 2006. godine u Rim III kriterijum. Primjena ovakvih kriterijuma je jako teška u praksi i u prkos svim dopunama i revizijama, niti Rim II, niti Rim III nisu u potpunosti pouzdani (Burbige, 2010).

1.1. Definicija oboljenja sindroma iritabilnog kolona

Sindrom iritabilnog kolona je definisan na osnovu nedavno izmijenjenog Rim III kriterijuma kao periodična abdominalna bol ili nelagoda koja traje najmanje 3 dana u mjesecu u posljednja 3 mjeseca, ne može se objasniti strukturnom ili biohemijskom abnormalnošću, a u vezi je sa najmanje dva od sljedećih navoda: osjećaj poboljšanja nakon defekacije, promjena frekvencije stolice i promjena oblika (izgleda) stolice. Ostali simptomi koji podržavaju dijagnozu, a nisu dio kriterijuma, uključuju određene abnormalnosti u frekvenciji stolice (više od 3 dnevno ili manje od 3 sedmično) i obliku stolice (kugličasta, tvrda ili mekana, vodenasta), naprezanje pri defekaciji, osjećaj hitnog i/ili nepotpunog pražnjenja, sluz i nadutost. Prema Rim III kriterijumu može se izvršiti subkategorizacija sindroma iritabilnog kolona na IBS-D (dijareja tip), IBS-C (konstipacija tip), IBS-M (miješani tip kao kombinacija dijareje i konstipacije), kao i neimenovani tip IBS-a (IBS-unsubtyped) (Yao, 2012).

Rim III kriterijum:

Kontinuirani ili rekurentni simptomi u trajanju od najmanje 3 mjeseca:

1. Bol ili nelagoda u abdomenu koja:
 - Popušta sa defekacijom; i/ili
 - Povezana sa promjenama u frekvenciji stolice; i/ili
 - Povezana sa promjenama u konzistenciji stolice; i
2. Pozitivne dvije ili više od sljedećih tačaka u najmanje $\frac{1}{4}$ epizoda ili dana:
 - Promjene u frekvenciji stolice (više od 3 stolice dnevno ili manje od 3 stolice sedmično);
 - Promjene u obliku stolice (kugličasta/tvrda ili mekana/tečna);
 - Sluz u stolici; i/ili
 - Nadutost ili osjećaj distenzije abdomena.

1.2. Epidemiologija IBS-a

Funkcionalni gastrointestinalni poremećaji imaju visoku incidencu i prevalencu u opštoj populaciji. Sindrom iritabilnog kolona je jedno od najčešće dijagnostifikovanih gastrointestinalnih oboljenja u kliničkoj praksi. Procjena učestalosti IBS-a varira, uglavnom zbog razlika među epidemiološkim studijama kao što su upotreba različitih dijagnostičkih kriterijuma, formiranje uzorka i izvor podataka. Procjenjuje se da je prevalenca za IBS u zemljama zapadne populacije između 8 i 20%. Slična prevalenca je i u Kini, a nešto niža u Tajlandu. Ovo oboljenje češće pogađa žene srednje životne dobi nego muškarce, npr. u Indiji 20-30% žena oboli od IBS-a. U Sjedinjenim Američkim Državama IBS pogađa između 10 i 20% populacije, što ovu državu košta 1.6 biliona dolara direktno i 19.2 biliona dolara indirektno na godišnjem nivou. Većina bolesnika sa IBS-om i ne traži liječničku pomoć što navodi na činjenicu da prevalenca IBS-a može biti veća od one koja se navodi u literaturi. Na prevalencu IBS-a utiču socijalni i kulturološki faktori (Ladabaum, 2012).

Za sada ne postoje epidemiološki podaci za IBS u Bosni i Hercegovini i u regionu.

1.3. Patofiziologija IBS-a

Do danas nije identifikovan niti jedan patofiziološki mehanizam koji bi bio jedinstven za IBS. Za sindrom iritabilnog kolona se smatra da je izuzetno složen biopsihološki poremećaj koji proizilazi iz interakcije mnogobrojnih faktora: visceralne hiperalgezije (povećana senzitivnost na bol), genetičkih, psiholoških i ekoloških faktora, infekcija, upala, pokretljivosti crijeva, ishrane, kao i crijevne mikrobiote (Drossman, 1999). Kao mogući patološki mehanizmi za sindrom iritabilnog kolona prepoznati su poremećaji na nivou mozak-crijevo (*brain-gut*), kao i psihijatrijski i socijalni faktori. Veliki broj studija pokazuju da su poremećaji raspoloženja i različita psihijatrijska oboljenja kao što su depresija, panični poremećaji, somatizacija i agorafobija učestaliji kod pacijenata sa IBS-om (Song et al, 2012).

U patofiziologiji IBS-a je i dalje nejasno u kojoj je mjeri to motorički odnosno senzorni poremećaj gastrointestinalnog trakta. S obzirom na to da je u sklopu sindroma prisutan poremećaj defekacije, a da je sam čin defekacije motorički proces, može se zaključiti da je u pitanju motorički poremećaj. Međutim, urgencija za defekaciju koja je prisutna kod

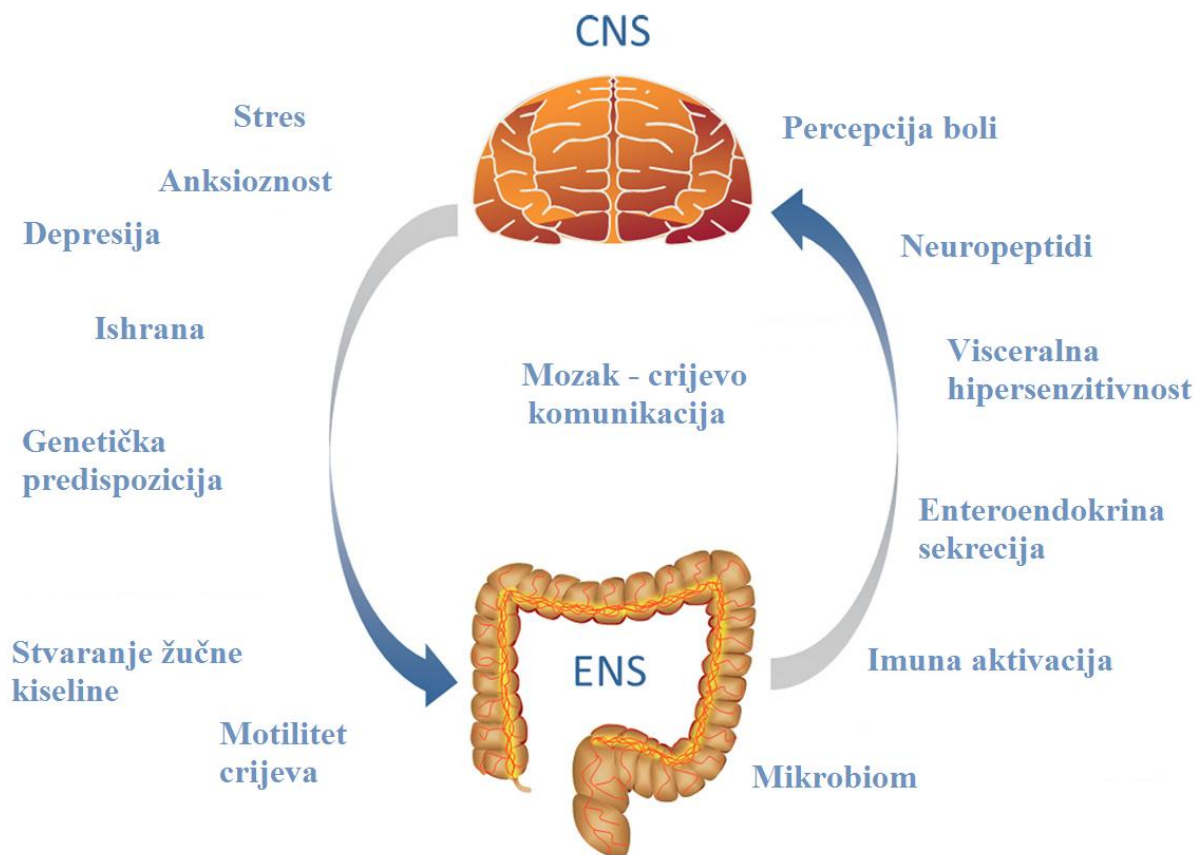
oboljelih od IBS-a može biti posljedica senzornog poremećaja na nivou detekcije ili senzorne interpretacije te informacije, gdje pogrešna interpretacija vodi urgenciji iako u rektumu nema dovoljno sadržaja za pražnjenje. Podražaji koji generišu osjećaj boli iniciraju neuronski prenos informacije koja prolazi crijevni nervni sistem, njegovu simpatičku i parasimpatičku vezu sa centralnim nervnim sistemom i uzlazne puteve kičmene moždine do centra u srednjem i zadnjem dijelu mozga prije nego što dopiju u cerebralni korteks. Na osnovu dosadašnjih saznanja, IBS je najbolje razumjeti kao rezultat i motoričke (afherentne) i senzorne (efherentne) disfunkcije (Bilić et al, 2006).

Enterički (crijevni) nervni sistem (ENS) je veoma kompleksan sistem u kojem je uključen veliki broj neuroreceptora, te kao takav je izložen centralnim i somatskim uticajima. On je glavni regulator funkcije epitelijalne barijere, a poremećaj crijevnog mikrobioma i funkcije inflamatornih ćelija može da aktivira senzorne neurotransmitere u crijevima te da pobudi visceralnu percepciju. Povećavanjem saznanja o ovom sistemu dolazi se i do odgovora koje supstance bi mogle imati pozitivno dejstvo na simptome IBS-a.

Sindrom iritabilnog kolona rezultat je kombinacije poremećenog crijevnog motiliteta, visceralne preosjetljivosti, poremećene regulacije mukoznog imunološkog odgovora, promjene crijevne mikrobiote, kao i poremećene regulacije centralnog (CNS) i enteričkog nervnog sistema (Slika 1). Svaki pojedini faktor može da varira kod različitih osoba ili unutar pojedinca tokom određenog vremena (Mertz, 2003; Drossman, 2006). Promjene motiliteta kod oboljelih od sindroma iritabilnog kolona opisuje veliki broj radova. Bol u abdomenu koja se javlja kod oboljelih češće je povezana sa nepravilnom motoričkom aktivnošću tankog crijeva u poređenju sa zdravim osobama, a pojava visceralne preosjetljivosti koja je karakteristična za IBS, odnosi se na povećanu osjetljivost kako perifernog, tako i centralnog nervnog sistema (Spiller et al, 2007).

Promjene u bakterijskom rastu i crijevnoj mikrobioti mogu biti povezane sa patogenezom IBS-a, iako postoji malo podataka o mehanizmima koji bi doveli do ovoga. Podgrupa IBS pacijenata kod kojih je IBS povezan sa imunološkim promjenama i upalom sluznice, poznata je kao pacijenti sa postinfektivnim sindromom (PI-IBS). Kod njih se IBS može razviti nakon infektivnog gastroenteritisa (Simren et al, 2013).

Epidemiološka ispitivanja su pokazala da se IBS javlja češće unutar nekih porodica sugerišući tako genetičku komponentu bolesti (Kalantar et al, 2003; Saito, 2011). Bolesnici sa IBS-om prilikom uzimanja anamneze često navode pozitivnu porodičnu istoriju, a studije su pokazale da osobe u čijim porodicama se javlja IBS imaju dva do tri puta veću vjerovatnoću da obole od sindroma iritabilnog kolona od osoba čije porodice nemaju IBS. I dalje je nejasno koji su to sve geni, uz sadejstvo spoljašnjih faktora sredine, asocirani sa sindromom iritabilnog kolona (Saito, 2011).



Slika 1: Faktori koji su uključeni u kompleksnu patofiziologiju IBS-a. CNS – centralni nervni sistem, ENS – enterički nervni sistem.

1.4. Klinička slika








Kod oko 50% oboljelih, simptomi se javljaju prije 35. godine života, a kod 40% se javljaju od 35 do 50 godina starosti. Početak simptoma u starijoj dobi je rijedak. Kod nekih pacijenata prvi simptomi su se javili već u djetinjstvu ili adolescenciji.

Za prepoznavanje sindroma iritabilnog kolona najvažnije je ustanoviti oblik, broj i konzistenciju stolice, način defekacije, kao i prisustvo boli u abdomenu. Ako je bol u abdomenu na bilo koji način povezana sa defekacijom, tada ima veliko dijagnostičko značenje. Bol je uglavnom oštra, grčevita ili tupa, ili je pacijenti ne mogu definisati. Može biti i blaga, te je tada bolesnici tolerišu ili zanemaruju. Suprotno tome, može biti toliko jaka da remeti svakodnevne aktivnosti oboljelog. Najčešće nije prisutna dok pacijent spava. Mnogi bolesnici navode pogoršanje bolesti u stresnim životnim situacijama. Uz gastrointestinalne tegobe, pacijenti se često javljaju sa simptomima kao što su umor, depresija i anksioznost (Creed et al, 1989).

Simptomi imaju veliki uticaj na rad, svakodnevnicu, socijalne aktivnosti i kvalitet života, kao i korištenje zdravstvene zaštite (Argarwal&Spiegel, 2011). Neke osobe koje imaju simptome IBS-a uopšte ne potraže liječničku pomoć. Većina osoba koje se jave ljekaru dobiju dijagnozu i terapiju na primarnom nivou zdravstvene zaštite, ali se oboljeli upućuju dalje, u gastroenterološke klinike. Na primarnom nivou, liječnik porodične medicine uzima detaljnu anamnezu pacijenta vezano za pitanja o gastrointestinalnom sistemu, te traži detaljan uvid u raniju istoriju bolesti kako bi se dokazala eventualna prisutnost alarmirajućih simptoma i na taj način otkrile moguće organske bolesti. Alarmirajući simptomi ili “*red flags*” uključuju krv u stolici, anemiju (IDA *Iron Deficiency Anemia*), gubitak težine, porodičnu istoriju karcinoma debelog crijeva, noćne simptome, kao i pojavu simptoma nakon 50. godine (Black et al, 2012).

Kao što je već navedeno, nema poznatih biomarkera za IBS, pa se dijagnoza temelji na izjavama bolesnika o njegovim simptomima, kompletnoj medicinskoj istoriji bolesti, te pregledu koji se najčešće upotpunjuje upotrebom laboratorijske i endoskopske dijagnostike. Vizuelno pomagalo kao što je Bristolska skala stolice može biti korisna u sakupljanju specifičnih informacija u promjenama stolice. Dizajnirana je u svrhu klasifikacije stolica u sedam kategorija. Prvi put je objavljena 1997. godine u *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Autor skale, doktor Heaton, došao je do zaključka da forma stolice predstavlja dobar pokazatelj prolaska materije kroz debelo crijevo. Tipovi 1 i 2 ukazuju na konstipaciju, 3 i 4 su “idealne stolice” jer se najlakše izbacuju iz organizma, a 5, 6 i 7 ukazuju na dijareju (Slika 2) (Heaton&Lewis, 1997).

Bristol stool chart

Type 1		Separate hard lumps, like nuts (hard to pass)
Type 2		Sausage-shaped but lumpy
Type 3		Like a sausage but with cracks on its surface
Type 4		Like a sausage or snake, smooth and soft
Type 5		Soft blobs with clear-cut edges (passed easily)
Type 6		Fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool
Type 7		Watery, no solid pieces, Entirely liquid

Slika 2. Bristolska skala stolice (Heaton & Lewis, 1997)

- Tip 1. Odvojene tvrde grudvice, veličine oraha (teško prolazi pri defekaciji)
- Tip 2. Kobasičastog oblika sa grudvicama
- Tip 3. Kobasičastog oblika sa pukotinama na površini
- Tip 4. Kobasičastog ili zmijolikog oblika, glatka i mekana
- Tip 5. Mekani komadi sa jasnim rubovima (lako prolazi pri defekaciji)
- Tip 6. Paperjasti komadi sa nejasnim rubovima, kašasta stolica
- Tip 7. Vodenasta bez čvrstih komada, potpuno tečna stolica.

Prema Roma III kriterijumu i na temelju karakteristika stolice pacijenta (Bristolska skala stolice), razlikujemo nekoliko podtipova IBS-a.

- Oblik sindroma iritabilnog kolona sa dominantnim proljevima **IBS-D** (*diarrhea*)

Ovaj oblik karakteriše stolica mekane konzistencije u $\geq 25\%$ i tvrda ili kugličasta stolica u $< 25\%$ slučajeva defekacije. Tip IBS-D je rijedak i javlja se u oko 1/3 slučajeva, a češći je kod muškaraca nego kod žena. Karakteriše ga bol i nadutost u abdomenu različitog inteziteta. Stolica može da bude češća od tri dnevno i/ili da bude kašaste ili tečne konzistencije. Ponekad

ne postoji niti jedan od navedenih znakova, te pacijenti opisuju stolicu normalne konzistencije i učestalosti, ali da imaju hitne potrebe pražnjenja kao i nelagodnost i osjećaj napinjanja tokom pražnjenja. U stolici je često prisutna sluz (mukus), te ako postoji više stolica dnevno, samo sluz može da čini sadržaj stolice i bez fecesa.

- Oblik sindroma iritabilnog kolona sa dominantnim zatvorom **IBS-C** (*constipation*)

Ovdje se radi o obliku IBS-a sa konstipacijom i sa poremećajem motiliteta crijeva. Za tip IBS-C karakteristična je čvrsta ili kugličasta stolica u $\geq 25\%$ i mekana ili kašasta stolica u $< 25\%$ slučajeva defekacije. Najjednostavniji parameter za opisivanje ovoga oblika sindroma je broj stolica u toku sedmice, mada se u velikom broju slučajeva radi o pacijentima sa normalnim brojem stolica, ali sa otežanom defekacijom. Neki pacijenti takođe navode da imaju neredovnu stolicu, manje količine i izrazito tvrde i suhe konzistencije što je posljedica resorpcije vode iz fecesa koji duži vremenski period stoji u završnom dijelu probavnog sistema. Takođe, kod ovog oblika IBS-a, pacijenti često opisuju i pojavu gasova. Češći je kod žena.

- Miješani oblik sindroma iritabilnog kolona **IBS-M** (*mixed*)

Miješani tip se definiše kao smjena čvrstih ili kugličastih stolica i tečnih ili kašastih stolica u $\geq 25\%$ koje odgovaraju obliku 1 ili 2 za zatvor i 6 ili 7 za tečni oblik stolice po bristolskoj skali.

- Nedefinisani tip **IBS-U** (*unsubtyped*)

Definiše se kao nedovoljno abnormalnosti kod konzistencije stolice da bi se ispunili kriterijumi za bilo koji od prethodno navedenih tipova IBS-a (Longstreth et al, 2006). U ovu nespecifičnu podgrupu spada oko 4% oboljelih (Spiller et al, 2007).

1.5. Tradicionalni dijagnostički testovi za IBS

Tradicionalna dijagnostička obrada IBS-a uključuje uobičajene testove koji mogu biti od pomoći u razlikovanju ovoga oboljenja od drugih bolesti organskog karaktera. Izbor testova se obično temelji na prirodi problema i jačini simptoma. Dijagnostički testovi koji se najčešće rade su kompletna krvna slika, endoskopija, kolonoskopija (kod sumnje na organska oboljenja, npr. kolorektalni kancer, IBD ili kolitis), test daha na vodonik (kod sumnje na nemogućnost razlaganja glukoze), fekalna analiza na krv i na parazite, antitijela na tkivne transglutaminaze i antigliadin antitijela (serologija kod sumnje na celijaku), snimanje

abdomena (za isključivanje mehaničkih opstrukcija). Prilikom endoskopije može se uzeti i biopsija tkiva za utvrđivanje diverziteta i sastava crijevne mikrobiote. Noviji dijagnostički testovi, kao što su pregled oblika stolice, test fekalnih upalnih markera kao i korištenje seruma biomarkera mogu biti korisni dodaci tradicionalnim dijagnostičkim testovima kod bolesnika sa sumnjom na IBS. Ovi jednostavni testovi daju mogućnost ljekarima da lakše razlikuju IBS od drugih oboljenja na što ekonomičniji način (Burbige, 2010).

Značajni ekonomski izdaci povezani sa sindromom iritabilnog kolona zahtijevaju razvoj efikasne dijagnostičke strategije. Iako je među najčešćim poremećajima u gastroenterologiji, IBS danas predstavlja značajan dijagnostički izazov.

1.6. Socioekonomski značaj

Zbog velike incidence u opštoj populaciji, IBS je u direktnoj vezi sa troškovima zdravstvene zaštite i indirektnoj vezi sa produktivnošću rada kako u razvijenim, tako i u manje razvijenim zemljama svijeta. Takođe ovo oboljenje ima ogroman uticaj i na kvalitet života samog pojedinca. Da bi se bolje razumjeli biopsihološki modeli kod funkcionalnih gastrointestinalnih oboljenja, koriste se različite procjene vezane za kvalitet života (QOL) kod pacijenata. Neophodno je napomenuti da koncept kvaliteta života ne treba miješati sa “životnim standardom” koji se prije svega zasniva na prihodima. IBS-QOL je izvještaj pacijenata oboljelih od iritabilnog kolona o svom kvalitetu života, a koristi se za procjenu uticaja oboljenja na svakodnevne životne aktivnosti oboljelog i njegovog liječenja. Ovaj koncept je razvio tim istraživača sa Univerziteta u Vašingtonu (*University of Washington, Seattle*) pod vodstvom ljekara Patrika i Drossmana (Dr. Donald L. Patrick, Dr. Douglas Drossman). IBS-QOL se sastoji os 34 stavke, od kojih svaka ima skalu od 5 odgovora: *nimalo, neznatno, umjereno, pomalo i izuzetno (mnogo)*. Pojedinačni odgovori za sve 34 stavke se sabiraju i računa se prosječna vrijednost koja se zatim, radi lakšeg tumačenja, prevodi u skalu od 0 do 100. Formula koja se koristi za prevođenje vrijednosti u skalu je:

$$QOL = \frac{(\text{zbir svih stavki} - \text{najmanji navedeni rezultat}) * 100}{\text{raspon ocjena}}$$

IBS-QOL upitnik je osmišljen i dizajniran tako da se može samostalno koristiti, a trajanje njegovog popunjavanja je oko 10 minuta. Takođe, ovaj upitnik može ispunjavati pacijent uz prisustvo i pomoć ispitivača ukoliko je to potrebno. Upitnik je preveden i dostupan na 35 jezika svijeta, ali niti na jednom od jezika u regionu (<http://depts.washington.edu/seaqol/IBSQOL>).

Postoje različite kontroverze u rezultatima prethodnih studija u kvalitetu života a u vezi sa različitim podtipovima IBS-a. Ovi nalazi mogu biti različiti zbog genetičkih, socio-demografskih i kulturoloških razlika, kao i zbog razlika u psihijatrijskom komorbiditetu. Rezultati o kvalitetu života jedne iranske studije su pokazali da nema signifikantne razlike u kvalitetu života kod različitih podtipova IBS-a. U drugim studijama Muscatello i saradnici (2010) su naveli da je QOL niži, a anksioznost i depresija viša kod IBS-M i IBS-C, u poređenju sa IBS-D. Si sa saradnicima (2004) je takođe izvijestio da je QOL kod IBS-C niži nego kod pacijenata sa IBS-D. Ono što je zajedničko za većinu studija je to da je anksioznost u obrnutoj korelaciji sa QOL, te pravilno vođenje i tretman anksioznosti svakako može da poveća kvalitet života pacijenata sa IBS-om (Jamali et al, 2012).

1.7. Liječenje

Kod terapijskog pristupa pacijentu je veoma bitno objasniti prirodu njegovog oboljenja te ga razuvjeriti da nije riječ o karcinomu ili nekom drugom teškom oboljenju jer bi dodatni stres oko postavljanja same dijagnoze mogao imati uticaja na progresiju simptoma. Iako sindrom iritabilnog kolona nije životno ugroženo stanje, simptomi mogu biti veoma neugodni i onesposobljavajući, a pacijenti se moraju nositi doživotno sa ovim poremećajem.

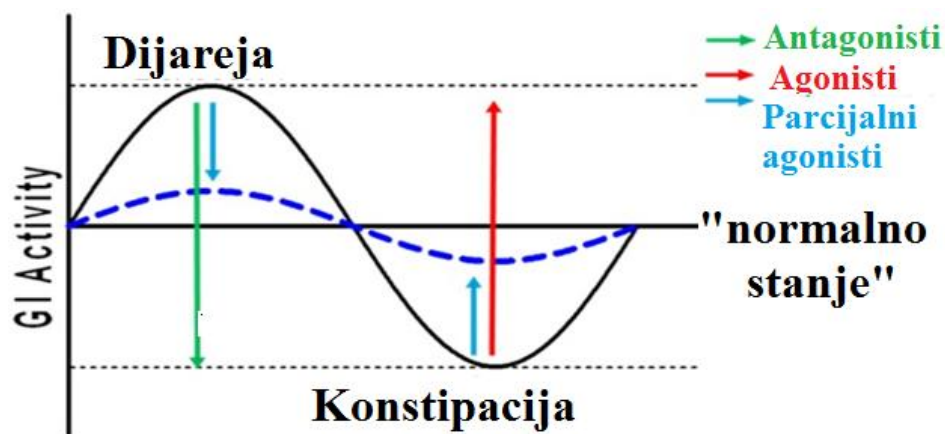
Budući da su patofiziološki procesi koji dovode do nastanka IBS-a veoma kompleksni i ne u potpunosti razjašnjeni, terapija, odnosno liječenje je simptomatsko. Veliki je broj lijekova na tržištu, ali farmaceutska industrija i dalje pokušava razviti nove kojima će se što uspješnije ublažiti simptomi IBS-a. Promjena načina života u smislu redovnih fizičkih aktivnosti pokazala se posebno djelotvornom kod smanjenja nadutosti i opstipacije (Johannesson et al, 2011) kao i kod smanjenja anksioznosti i depresije (Herring et al, 2010). Oblici farmakoterapije poprilično se razlikuju zbog različitosti simptoma i forme stolice.

Uglavnom je terapija određena predominantnom formom stolice i simptomima koji najviše remete kvalitet života pacijenata.

Pacijenti sa IBS-C se tretiraju laksativima i farmakoterapijski. Farmakoterapijsko liječenje danas najčešće podrazumijeva selektivne neresorbujuće antagoniste kalcijumovih kanala kao i selektivne agoniste serotoninskih receptora (5-HT₄) (Johanson&Kralstein, 2011). Cisaprid, agonist 5-HT₄, lijek koga je razvila kompanija *Janssen Pharmaceutica* osamdesetih godina prošlog vijeka, u mnogim zemljama je povučen sa tržišta ili je u prodaji za ograničen broj indikacija zbog nus pojava, posebno na srčani ritam. U liječenju pacijenata sa predominantnom konstipacijom takođe mogu da se koriste volumni laksativi, podraživači stolice i podražajni laksativi. Ove supstance, kao i hrana bogata vlaknima, mogu imati uspjeha kod tretmana IBS-C pacijenata, mada su i ovdje rezultati oprečni. Takođe, pacijente koji povećavaju unos vlakana treba upozoriti da njihova upotreba može dodatno izazvati nadutost i distenziju (Saad, 2011).

Pacijenti sa predominantnom dijarejom IBS-D imaju brže tranzitno vrijeme, odnosno brži prolaz sadržaja kroz crijeva, te se kod liječenja ovih pacijenata najčešće koriste antimotilitetni agensi. Antidijaroici i difenoksilat u kombinaciji sa atropinom usporavaju prolaz sadržaja kroz crijevo inhibirajući crijevnu peristaltiku. Antiholinergici (parasimpatolitici) pokazali su se efikasnim u pružanju kratkoročnog olakšanja kod abdominalne boli i nelagode, i najduže se primjenjuju u terapiji.

Antagonizam receptora pokazao se kao terapijska opcija veoma efikasnim. Kod IBS-D pacijenata hiperaktivnost serotoninskog receptora 5-HT dovodi do povećane GI aktivnosti sa napadima proljeva i gastrointestinalne nelagodnosti, dok kod IBS-C pacijenata hipoaktivnost 5-HT sistema dovodi do konstipacije. Kod IBS-D pacijenata antagonisti 5-HT će potpuno blokirati funkciju što dovodi do smanjenja i prestanka proljeva kod većine oboljelih, kod nekih do zatvora. Agonisti povećavaju aktivnost 5-HT sistema i mogu da dovedu čak i do epizoda sa dijarejom, zbog čega se uglavnom koriste parcijalni agonisti za liječenje pacijenata sa konstipacijom (Slika 3) (Moore et al, 2013).



Slika 3: Kod pacijenata sa predominantnom dijarejom antagonisti dovode do smanjenja i prestanka epizoda sa proljevom; Kod pacijenata sa predominantnom konstipacijom agonisti dovode do smanjenja i prestanka zatvora; Parcijalni agonisti dovode do "normalnog stanja" izbjegavajući na taj način ekstremne efekte agonista i antagonista (preuzeto i modificirano Moore et al, 2013).

Kako je u patofiziologiji IBS-a kao mogući etiološki faktor navedena promjena u mikrobioti crijeva, neki noviji dokazi ukazuju da nesistematski antibiotik rifaksimim može biti potencijalni tretman za nadutost, te da može biti djelotvoran u liječenju nekonstipiranih pacijenata sa IBS-om. Nus pojave povezane sa ovim lijekom su glavobolja, infekcija gornjih disajnih puteva, bol u stomaku, mučnina i proljev, a postoji opasnost i od razvijanja rezistencije na antibiotik (Pimentel et al, 2011).

Probiotici su živi mikroorganizmi sa velikim terapijskim potencijalom kod IBS pacijenata. Imaju blagotvorno dejstvo na sluznicu crijeva kroz nekoliko mehanizama koji uključuju supresiju rasta bakterija, vezivanje patogenih bakterija, poboljšanje epitelijalne barijere i imunološke funkcije. Studije koje su rađene na sojevima *Lactobacillus species*, *Bifidobacterium species* i *Propionibacterium species*, kao i na različitim kombinacijama sojeva kao što su VSL#3 i SCM-III, pokazale su pozitivno dejstvo probiotika na simptome IBS-a. Neka pitanja, kao npr. koji je najbolji bakterijski soj, pitanje doze i trajanja terapije, ostaju otvorena (Aragon et al, 2010).

Antidepresivi mogu biti potencijalno djelotvorni u terapiji kod oboljelih od IBS-a. Neki antidepresivi imaju inhibitorno motorno dejstvo na crijeva pa se najčešće propisuju

pacijentima sa predominantnom dijarejom. Cilj primjene ovih lijekova je povećati raspoloženje i produžiti tranzitni put sadržaja kroz crijeva. U nekim studijama se navodi poboljšanje kod pacijenata nakon kombinovane upotrebe tricikličnog antidepresiva sa nekim od inhibitora serotoninskog receptora (Bilić et al, 2006).

Prehrambene navike imaju veliku terapijsku važnost kod pacijenata sa IBS-om. Za pacijente je veoma bitno da iz prehrambenih navika izostave kafu, alkohol, povrće i voće sa mnogo vlakana, u nekim slučajevima i mlijeko (kod intolerancije na laktozu), te da izbjegavaju masnu hranu i upotrebu umjetnih zaslađivača. Studije su pokazale da kod oko dvije trećine pacijenata dolazi do smanjenja simptoma ukoliko modifikuju svoju ishranu (Ligaarden et al, 2012). Poznato je da se ugljeni hidrati sa kratkim lancem, poznati kao “*FODMAP’s*”, slabo apsorbuju u tankom crijevu. Termin “*FODMAP*” je akronim izveden iz *Fermentable Oligo- Di- Mono-saccharides and Polyols*. Iako su prirodno prisutni u hrani, dokazano je da ograničavanje unosa ugljenih hidrata ili “*low FODMAP’s diet*” utiče na smanjenje simptoma kod pacijenata sa IBS-om. Prije formiranja ovoga koncepta, hrana se rijetko koristila kao prva terapija kod GI oboljenja (Halmos et al, 2014).

Psihološki i bihevioristički terapijski pristupi se koriste kod pacijenata kod kojih se konvencionalnim terapijskim mjerama ne može postići adekvatno djelovanje na simptome. Ovdje se primjenjuju različite metode kao što su hipnoterapija i različiti relaksirajući programi (*stress menagment*) kao što je npr. *biofeedback* kompjuterska animacija dizajnirana za opuštanje pacijenata koji su pod uticajem velikog stresa gdje se procjenjuje da li opuštanje može smanjiti simptome oboljenja. Kod oko 50% pacijenata sa IBS-om, korištenje *biofeedback* kompjuterske animacije je pokazalo pozitivne rezultate (Leahy et al, 1998).

1.8. IBS i druga oboljenja

Tegobe gornjeg dijela (gorušica, rana sitost, bol u epigastrijumu) i donjeg dijela gastrointestinalnog trakta (konstipacija, dijareja) veoma se često javljaju zajedno. Među gastrointestinalnim poremećajima (GI), funkcionalna dispepsija (FD) i IBS su veoma važni u javnom zdravstvu širom svijeta jer se veoma često susreću u opštoj praksi. Epidemiološke studije su pokazale da se stopa preklapanja FD-IBS kreće između 11% i 27% (Tabela 1), a

samo preklapanje je povezano sa težim simptomima nego FD ili IBS pojedinačno (Suzuki&Hibi, 2011).

Tabela 1: Učestalost preklapanja između funkcionalne dispepsije (FD) i sindroma iritabilnog kolona (IBS) (preuzeto i modificirano Suzuki&Hibi, 2011).

	FD (%)	IBS (%)	Preklapanje FD-IBS (%)
Wang et al	48.2	28.0	23.8
Nakajima et al	34.0	41.0	24.0
Kaji et al	31.7	51.8	16.5
Lee et al	18.4	53.9	27.6
Park	43.1	45.5	11.4

Takođe, studije su pokazale da postoji preklapanje IBS-a i nekih drugih GI oboljenja. Osnovni simptom gorušice, gastroezofagalnog refluksa ili “osjećaja pečenja u grudima” je vraćanje želudčane kiseline u jednjak (*oesophagus*), a stanje koje nastaje zbog ponovljenih epizoda se naziva bolest ezofagealnog refluksa (*GERD-gastroesophageal reflux disease*) koje se javlja kod oko 7% pacijenata jednom dnevno, a kod oko 44% pacijenata jednom mjesečno. Zajedničke kliničke i patofiziološke karakteristike GERD-a i IBS-a ukazuju na to da između ovih oboljenja postoje određena preklapanja (Tabela 2) (Yarandi et al, 2010).

Tabela 2: Simptomi koji se javljaju pojedinačno, a koji su takođe i zajednički za GERD i IBS (Preuzeto i modifikovano iz Yarandi et al, 2010).

	GERD (%)	IBS (%)	Preklapanje GERD-IBS (%)
Mučnina	10.8	6.2	15.9
Povraćanje	11.6	3.3	18.8
Epigastična bol	18.9	14.9	22.9
Podrigivanje	4.1	6.4	10.2
Glavobolja	2.8	4.4	6.8
Bol u leđima	3.6	3.3	6.0

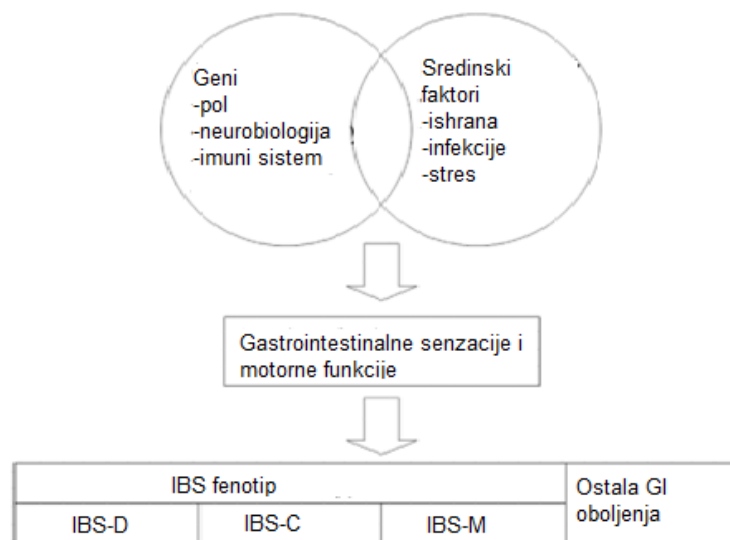
Do preklapanja simptoma dolazi i kod bolesti zapaljenja crijeva (*IBD-inflammatory bowel disease*) i IBS-a. Uprkos razlikama u morbiditetu i patofiziologiji ova dva oboljenja, kod nekih IBS pacijenata postoje određene zapaljenske promjene slične onim kod IBD-a. Populaciono-genetička studija je pokazala da je signifikantno 9 puta povećan rizik za IBD među pacijentima koji boluju od IBS-a u odnosu na zdrave kontrole. Takođe, sličnost u simptomima ova dva oboljenja može dovesti do pogrešnog dijagnostifikovanja kod lakšeg oblika IBD-a sa IBS-om. Novija istraživanja pokazuju da se rizik za oba oboljenja povećava nakon infektivnog gastroenteritisa. Genetičke studije su pokazale da osobe sa polimorfizmom na genima *TLR9*, *IL6*, i *CDHI* koji kodiraju proteine uključene u funkciju ćelijske barijere epitela i urođenog imunog odgovora na crijevne bakterije su nezavisno povezani sa razvojem IBS-a nakon akutnog gastroenteritisa, a nedavni klinički dokazi ukazuju na nenormalnu funkciju *CDHI* sa povećanim rizikom za IBD (Porter et al, 2012).

Jedna veoma zanimljiva studija je pokazala da se kod pacijenata sa IBS-om u 29% slučajeva javilo oboljenje “sindrom nemirnih nogu” (RLS, *restless leg syndrome*). Sindrom nemirnih nogu pogađa od 1% do 10% ljudi u opštoj populaciji, a manifestuje se kao jaka i nekontrolisana potreba za trzanjem nogama. Etiologija ovog oboljenja je nedovoljno istražena, međutim smatra se da dopaminergička disfunkcija i izmjenjena homeostaza željeza uzimaju učešće u patofiziologiji ove bolesti. Posljednje studije su povezale RLS sa nekim GI oboljenjima kao što je Kronova bolest, celijaka, bakterijska infekcija tankog crijeva (*SIBO-Small Intestine Bacterial Overgrowth*) i IBS (Basu et al, 2011).

1.9. Nasljedna osnova IBS-a

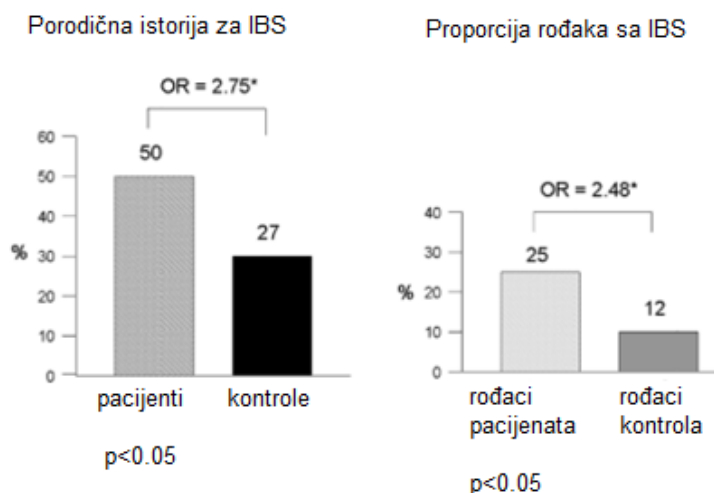
Genotipizacija genetičkih markera, sekvenciranje cjelokupnog ljudskog genoma kao i skladištenje i analiza ovih podataka dovelo je do otkrivanja velikog broja suspektnih genskih lokusa za različira GI oboljenja. Velika naučna otkrića dovela su do toga da se vjeruje da “gotovo svaka ljudska bolest, osim možda traume, ima osnovu u genima” (www.genome.gov). Ovo je privuklo mnoge da se istraže genski lokusi koji uzrokuju ili barem mogu doprinjeti razvoju IBS-a, iako ovakva istraživanja zahtijevaju mnogo truda, vremena i finansijskih sredstava.

Sindrom iritabilnog kolona je veoma često oboljenje sa neupitno genetičkom osnovom. Dokazano je da agregira u porodicama i utiče na višestruke generacije, te da osobe, u čijim porodicama se javlja bar jedan srodnik koji je obolio od IBS-a, imaju 2-3 puta veću vjerovatnoću (bez obzira na pol) da će i sami oboljeti od iritabilnog kolona. Distribucija ovog poremećaja ukazuje na to da se oboljenje ne nasljeđuje po klasičnim mendelovim pravilima i da je riječ o kompleksnom svojstvu sa nepredvidivim obrascem nasljeđivanja i veoma značajnim učešćem negenetičkih sredinskih faktora. Za mnoge bolesti “modernog čovjeka” kao što su hipertenzija, karcinomi, dijabetes, gojaznost, autizam i neke psihoze, se smatra da su kompleksna oboljenja te su predmet stalnog izučavanja genetičara i epidemiologa. U gastroenterologiji, Kronova bolest je najbolji primjer složenog multifaktorskog poremećaja sa veoma uspješnom identifikacijom lokusa asociranih sa ovom bolešću. Kombinacijom studija vezanih gena u porodicama gdje se kod članova porodice kod kojih se javlja oboljenje izoluju genetički markeri te prati njihova kosegregacija (pojava bolesti i genetičkog markera zajedno) i studija cijelokupnog genoma (*GWAS*), identifikovano je nekoliko gena za koje je ustanovljeno da su asocirani sa Kronovom bolešću: *NOD2*, *ATG16L1*, *IL23*, *IL12B*, *STAT3*, *NKX2-3*. I pored toga što je identifikovano nekoliko genskih lokusa koji se dovode u vezu sa Kronovim oboljenjem, jasno je da geni sami po sebi ne mogu dovesti do ispoljavanja same bolesti, te da su u uskoj vezi sa negenetičkim faktorima kao što su pušenje, ishrana, izloženost infekcijama i sastav bakterijske mikrobiote u gastrointestinalnom traktu. Slična paradigma “gen-sredina” svakako može biti predložena i za IBS gdje genetički i sredinski faktori zajedno rezultiraju promjenama u fenotipu. Genetička varijacija u genima koji kodiraju proteine za različite biološke procese, kontrolišu ili moduliraju senzacije i motilitet crijeva, ili čak regulišu odgovor mozga na stres, prvi su geni kandidati za IBS. Oni, u interakciji sa faktorima sredine kao što su ishrana, infekcije, trauma i stres, vjerovatno su odgovorni za kompletan IBS fenotip. Klinička heterogenost IBS-a može da se objasni različitim specifičnim kombinacijama gena uz sadejstvo pomenutih faktora sredine (Slika 4).



Slika 4: Paradigma “Gen-sredina” koja podržava jednako i genetičke i sredinske faktore u razvoju IBS-a (preuzeto i modificirano iz Saito et al, 2011).

Case-control studija koja je sprovedena na velikom broju pacijenata, zdravim kontrolama i njihovim porodicama pokazala je porodičnu agregaciju IBS-a gdje se može uočiti da se kod 50% oboljelih javlja barem još jedan, takođe obolio od IBS-a u njegovoj porodici. Generalno, rođaci oboljelih imaju 2-3 puta češće IBS od rođaka iz kontrolne grupe (Slika 5) (Saito et al, 2011).



Slika 5: Porodična agregacija za IBS (OR-Odds Ratio, omjer izgleda) (preuzeto i modificirano iz Saito et al, 2011).

Blizanačke studije takođe podržavaju koncept IBS-a kao složenog oboljenja na čije ispoljavanje utiču genetički i negenetički faktori zajedno. Do danas urađene studije blizanaca za IBS govore o tome da se genetički udio kreće 1-20%, a procjena heritabiliteta 0-57%. U četiri od pet studija rizik za oboljevanje od IBS-a kod monozigotnih blizanaca bio je veći u odnosu na dizigotne što ukazuje na značajan udio genetičke komponente u etiologiji IBS-a, ali nepotpuna podudarnost kod monozigotnih blizanaca takođe sugerise i na veoma značajnu ulogu negenetičkih faktora. Treba uzeti u obzir da u ovim studijama nedostaju podaci o okruženju i spoljašnjim uticajima kojima su bili izloženi blizanci (Saito et al, 2011).

Do danas je poznato oko 60 gena kandidata i njihovih specifičnih varijanti identifikovanih na osnovu genotipizacije, a koji se dovode u vezu sa sindromom iritabilnog kolona. Potencijalne lokacije-geni kandidati odabrani su na osnovu uloge proteina koje kodiraju. To su uglavnom oni geni koji stoje u osnovi serotoninskog i adrenergičkog puta, zatim geni odgovorni u inflamatornom procesu i intestinalnoj barijeri, kao i oni koji stoje u osnovi nekih psihotičnih poremećaja. Neki od gena kandidata zajedno sa lokusom, funkcijom i fenotipom kojeg uslovljavaju, prikazani su u Tabeli 3.

Pretpostavlja se da je kod većine IBS pacijenata genetička pozadina determinisana velikim brojem čestih genetičkih varijanti sa malim efektom. Istovremeno mogu postojati podgrupe pacijenata sa visoko penetrantnim varijantama gena što može i da objasni fenotip podgrupe. Tako je npr. nedavno rađena *case-control* studija na klinici Mayo gdje je vršeno sekvenciranje *SCN5A* gena. Studija je pokazala da je identifikovana štetna mutacija prisutna kod 2.2% IBS pacijenata i niti jedna kod zdravih kontrola. Ovaj gen kodira natrijumov kanal odgovoran za elektrostimulatornu funkciju ćelija srca, ali takođe i za sličnu “*pacemaker*” funkciju kod enterocita. Većina mutacija koje su identifikovane predstavljaju gubitak funkcije natrijumovog kanala, a fenotip koji se javljao u tim slučajevima bio je u glavnom sa dominantnom konstipacijom (IBS-C). Takođe, u četiri nezavisne *GWAS*-ove studije je utvrđeno da mononukleotidni polimorfizam (SNP) na *SCN5A* genu povećavaju rizik od IBS-a. Ova istraživanja su ojačala hipotezu da i rijetke mutacije, i populacijski česte varijante mogu biti uključene u genetiku IBS-a. Međutim, do sada su uspjesi u identifikaciji gena determinatora IBS bili rijetki. Imajući u vidu da je genetička podloga za IBS veoma

heterogena, od poligenije do rijetkih varijanti jednoga gena, potrebno je usvojiti različiti strategije za identifikaciju genetičkih faktora.

Dok većina do sada predloženih riziko-gena predstavlja više nevalorizovane nego zaista dokazane predisponirajuće faktore, za *TNFSF15* gen uključen u imuni odgovor i interakciju “domaćin-mikroorganizam”, to nije slučaj. Gen *TNFSF15* je pokazao visoku asocijaciju sa IBS-om (Zucchelli et al, 2011), koja je zatim i potvrđena u drugim studijama (Swan et al, 2013; Wouters et al, 2014; Czogalla et al, 2015). Ovaj gen kodira protein TL1A koji se nalazi kod imunih ćelija i utiče na zapaljenski odgovor u sluznici crijeva. Nosioци riziko-alela rezultiraju većom ekspresijom TL1A proteina, a samim tim i jačom aktivacijom T ćelija i jačim imunim odgovorom. Povezanost *TNFSF15* gena pokazuje da inflamatorni odgovor može biti važan mehanizam kod nastanka IBS-a (Henström&D’Amato, 2016).

Tabela 3: Geni kandidati za IBS, njihova lokacija, funkcija i fenotip koji uslovljavaju, na osnovu objavljenih dosadašnjih statističkih dokaza (Henström&D’Amato, 2016).

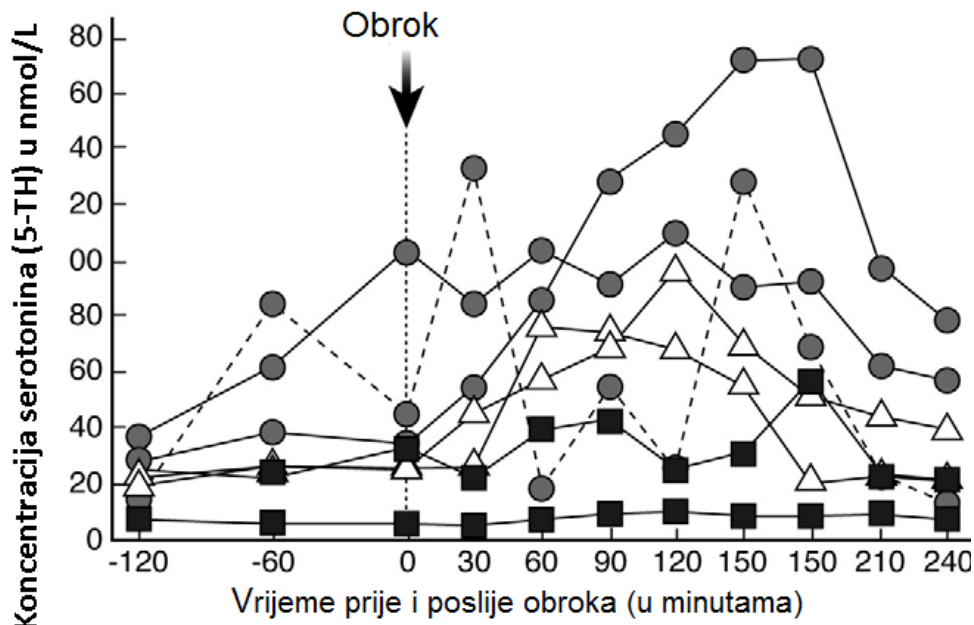
Gen	Hromozomska lokacija	Ime gena	Funkcija gena	Genska regija	Fenotip
<i>TNFSF15</i>	9q32	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	U zapaljenskom odgovoru	Intron	IBS, IBS-C
<i>TLR9</i>	3p21.3	Toll-like receptor 9	U aktivaciji imunog sistema	Intron i uzvodno	IBS-D
<i>HTR3E</i>	3q27.1	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3E, ionotropic	Serotoninski receptor	Uzvodno 3’UTR	IBS-D IBS-D
<i>NPSR1</i>	7p14.3	Neuropeptide S receptor 1	Receptor za neuropeptid S	Intron i kodirajući polimorfizam	Vrijeme prolaska kroz

				5' kraj blizu gena i početni dio gena	kolon, bol, hitnost, gasovi
					Rekurentna abdominalna bol
<i>KLB</i>	4p14	Klotho beta	Supresor u sintezi žučne kiseline u jetri	Kodirajući polimorfizam	Tranzit kroz kolon, IBS-D
<i>SCN5A</i>	3p21	Sodium channel, voltage gated, type V alpha subunit	Natrijumov kanal, važan za kontrakcije glatkih mišića	SNP u sredini gena	IBS, IBS-C
<i>CDC42</i>	1p36.1	Cell division cycle 42	U regulaciji ćelijskog ciklusa	Intron	IBS-C
<i>KDEL R2</i>	7p22.1	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	U transportu proteina do endoplazmatičkog retikuluma	Intron	IBS

Enterični nervni sistem (ENS) je semiautonomni nervni sistem koji se nalazi u crijevima, oblaže skoro čitav gastrointestinalni trakt gdje se stotine miliona nervnih završetaka protežu od jednjaka do analnog otvora. ENS može da funkcioniše nezavisno od mozga, a jedna od ključnih karakteristika autonomne regulacije enteričkog nervnog sistema je reakcija gastrointestinalnog trakta na okolni stres.

Serotonin (5-hidroksitriptamin ili 5-HT) je neurotransmiter ili “hemijski glasnik” (*chemical messenger*) koji kontroliše i stabilizuje raspoloženje i funkcije u mozgu, ali takođe je veoma bitan za funkcije u gastrointestinalnom traktu. Crijeva proizvode oko 90% serotonina u tijelu, te promjene u nivou serotonina utiču kako na mozak, tako i na sistem organa za varenje. U mozgu, većina serotonina se sintetizuje u jedrima neurona odakle se projekcije šalju u korteks i kičmenu moždinu. U GI traktu serotonin je sintetizovan u neuronima koji ulaze u sastav ENS-a, međutim većina ga se stvara u enterohromafinim ćelijama (*EC-enterochromaffin cells*) koje se nalaze u epitelu sluznice. Serotonin koji se oslobađa iz EC ćelija, djeluje na okolne ciljeve uključujući aferentna vlakna *lamina propriae*, a inicira peristaltičke, sekretorne, vazodilatatorne, vagalne i nociceptivne reflekse. Signalizacija serotonina iz neurona i EC ćelija završava se resorpcijom serotoninskog selektivnog resorpcionog transportera, SERT-a. U slučaju neurotransmisije, SERT se nalazi na serotonergičkim nervnim završecima, dok u epitelu crijeva sve epitelne ćelije imaju SERT (Linden et al, 2009).

Posljednje studije govore o nekoliko novih koncepata koje dovode u vezu IBS simptome i promjene nivoa serotonina u tkivu kao i njegove reapsorpcije preko SERT-a, o aspektima genetičkih determinanti, posebno 5-HTTLPR polimorfizma te njegov odnos sa motornim i senzornim funkcijama, kao i o novim serotonergičkim agensima koji se koriste u terapiji gastrointestinalnih oboljenja. Veoma bitni nalazi su povećanje serotonina u plazmi kod IBS pacijenata sa dominantnom dijarejom, i njegovo smanjenje kod onih sa konstipacijom (Slika 6). Meta-analize pokazuju da polimorfizam 5-HTTLPR nije signifikantno asociran sa IBS-om kod bijelaca i azijata. Novi antagonisti 5-HT₃ i agonisti 5-HT₄ pokazuju uspješnost u terapiji pacijenata sa IBS-om (Camilleri M, 2009).



Slika 6: Koncentracija serotonina (5-HT) prije i poslije obroka kod IBS pacijenata sa konstipacijom (■) i dijarejom (●) i kod zdravih kontrola (Δ) (Preuzeto i modificirano iz Gershon and Tack, 2007).

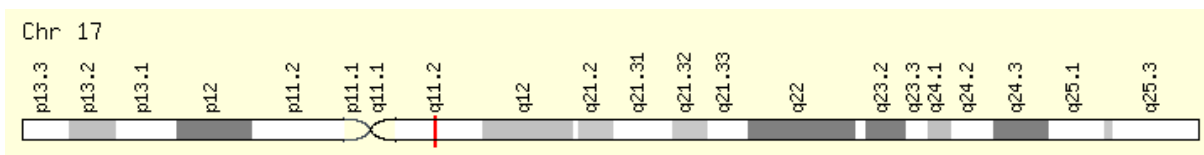
Mukoza crijeva ima ogroman kapacitet za preuzimanje serotonina iz intersticijalnog prostora jer sve epitelne ćelije koje se nalaze na luminalnoj površini crijeva vrše ekspresiju gena za SERT. SERT je dakle, integralni membranski protein koji sadrži 12 transmembranskih domena a sastoji se od 630 aminokiselina, a prenos serotonina vrši uz pomoć natrijum-hlor zavisne pumpe. Serotonin se sintetise u serotonergičkim neuronima pleksusa myentericus-a i submucosus-a, kao i u EC ćelijama. Kada se serotonin oslobodi, uz pomoć SERT-a se transportuje u ćelije epitela nakon čega ulazi u krvotok, odakle ga preuzimaju trombociti, kod kojih se takođe vrši ekspresija gena za SERT (Mawe et al, 2006).

SERT je *SLC6A4* (*solute carrier family 6, member 4*, NM_001045), međutim u literaturi se često koriste i drugi sinonimi za ovaj gen, kao što su: *5-HTT*, *5-HTTLPR*, *5HTT*, *hSERT*, *HTT*, *OCD1*, *SERT1* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6532>). Ranije studije su pokazale da se *SLC6A4* dovodi u vezu sa različitim psihičkim poremećajima i poremećajima u ponašanju, kao što su unipolarno oboljenje, depresija, opsesivno-kompulzivni poremećaj,

autizam, alkoholizam (<http://omim.org/entry/182138>), međutim posljednje studije govore da je upravo *SLC6A4* jedan od najperspektivnijih gena koji je uključen u etiologiju sindroma iritabilnog kolona (IBS).

Selektivni inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina (*SSRIs* - *Selective serotonin reuptake inhibitors*) pored toga što su jedni od najefikasnijih antidepresivnih terapija, pokazali su se kao agonisti i antagonisti sa pozitivnim efektom na IBS simptome, ubrzavajući i usporavajući tranzit kroz GI trakt (Saito, 2011).

Gen *SLC6A4* je veličine 37 kb lokalizovan na hromozomu 17q11.1-17q12 (Slika 7) i sastoji se od 14 egzona (Lesch et al, 1994). Startni kodon je lokalizovan na egzonu 2, a egzon 1 sadrži neke nekodirajuće sekvence za koje se smatra da imaju regulatornu ulogu u transkripciji.



Slika 7: Gen *SLC6A4* i njegova lokacija u genomu (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC6A4>)

Neke prethodne studije su pokazale da povišen serotonin u plazmi je asociran sa IBS-D, a smanjen sa IBS-C. Kada se serotonin izluči iz EC ćelija, aktivira se SERT koji ga ponovo preuzima čime se ublažava efekat serotonina u GI traktu. Ravnoteža između ova dva suprotna procesa održava normalan nivo serotonina u crijevima. Promjena u aktivnosti SERT-a remeti ovu ravnotežu te teoretski može biti uključena u razvoj IBS-a. Polimorfizam *SLC6A4* gena (5-HTTLPR), sa kratkom varijacijom od 14 ponavljanja (S) i dugom od 16 ponavljanja (L) dokazano utiče na aktivnost SERT-a, što znači da je polimorfizam 5-HTTLPR vrlo vjerovatno asociran sa IBS-om (Niesler et al, 2010; Zhang et al, 2014). Funkcionalne studije su pokazale da polimorfni homozigoti (S/S) i heterozigoti (L/S) na promotoru SERT gena imaju nižu transkripcionu aktivnost u poređenju sa homozigotima (L/L) što dovodi do smanjenog preuzimanja serotonina kod osoba koje imaju kratku varijaciju ponavljanja u svom genotipu. Kliničko-genetičke studije koje su sprovedene kako bi se ispitala ova hipoteza o povezanosti polimorfizma na promotoru SERT gena i IBS fenotipova, imale su kontradiktorne rezultate.

Jedna studija iz Turske je pokazala povezanost IBS-D i polimorfizma L/S u poređenju sa zdravim kontrolama. Nasuprot tome, američka studija pokazala je asociranost S/S polimorfizma i IBS-a kod žena sa predominantnom dijarejom. U drugoj američkoj studiji nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji polimorfizama na SERT-u i pacijenata sa gastrointestinalnim oboljenjima nižeg dijela trakta, uključujući i IBS (Park et al, 2006). Studija iz Kine je pokazala da je učestalost L/L genotipa bila znatno veća kod IBS-C pacijenata nego kod IBS-D pacijenata i kontrole, a S/S genotip je bio češći kod IBS-D nego kod IBS-C pacijenata. Transkripcijska efikasnost SERT-a je bila znatno veća kod L/L genotipa nego kod genotipova S/S i L/S. U ovoj studiji je pokazano da L varijanta povećava skoro 2.5 puta aktivnost SERT promotera u odnosu na varijantu S (Wang et al, 2012). Rasne i regionalne razlike, kao i mali uzorak mogu imati ograničen kapacitet za prepoznavanje razlike između pacijenata i kontrola, kao i između različitih podtipova IBS-a.

Studije su pokazale da su SERT kod pacova i ljudi veoma slični. Na SERT-u kod pacova mogu se razlikovati tri nekodirajuće forme egzona 1 označene kao 1a, 1b i 1c pri čemu je egzon 1c detektovan uglavnom u crijevu. Egzon 1c kod pacova dijeli veliku sličnost za određenim regionom humanog SERT-a koji se nalazi uzvodno od 1b što je sugerisalo postojanje 1c i kod čovjeka. Otkriven je novi transkript humanog SERT-a koji je sadržao isti startni kodon, a samim tim imao i isti proteinski produkt kao i prethodno prijavljeni SERT transkripti. Egzon 1c kod čovjeka leži uzvodno od 1b i koristi *splice* mjesto ovoga egzona. Takođe se pretpostavilo da je novi transkript pod kontrolom novog alternativnog promoterskog regiona što je i dokazano sa analizom alkilne fosfataze (*Secreted Alkaline Phosphatase Reporter Assay*). Promoter P1 koji se nalazi uzvodno od egzona 1a reguliše transkripciju egzona 1a i 1b, dok je transkripcija 1c egzona kontrolisana novim promoterom P2. Pretpostavka je da je gastrointestinalni SERT drugačije regulisan od onog u mozgu što se može objasniti time što je P1 uglavnom asociran sa afektivnim poremećajima ali ne i sa gastrointestinalnim disfunkcijama. Za SERT-P2 promotor pretpostavlja se da dominira u ekspresiji u mukozi GI trakta (Linden et al, 2009).

Analizom neravnoteže povezanosti (*Linguage disequilibrium-LD*) i zajedničkih haplotipova ustanovljeno je da postoji signifikantna alelska asocijacija između 6 polimorfizama od kojih je rs2020938 izabran kao najreprezentativniji tagSNP (Tabela 4).

Tabela 4: Podaci o SNP rs2020938, preuzeto sa
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs2020938>

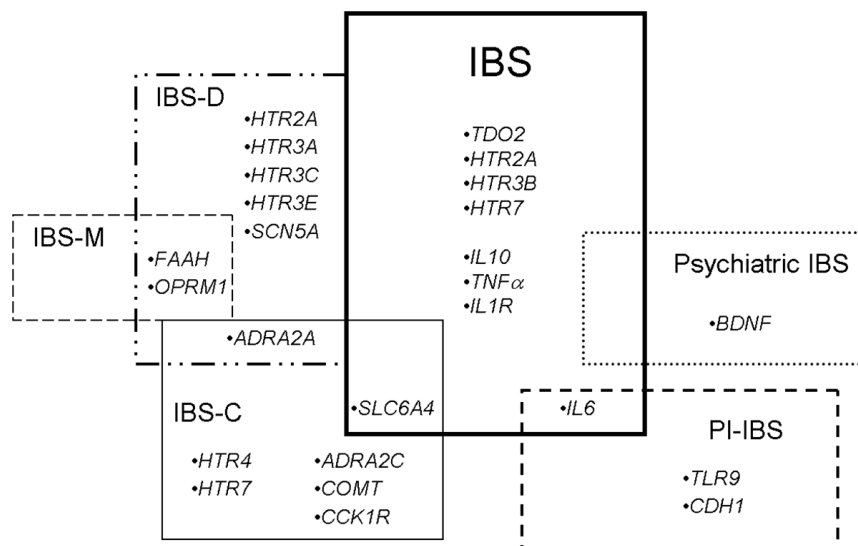
SNP ID	rs2020938
lokacija	17:30223732
Sekvenca	GCATTCTTGAGCCTGGGGTGGGTGG[C/T]GGAGGGCCCAA CAAGTGCGGTACAG
SNP tip	Intron variant
Global MAF	G=0.2920/635

Pored studija koje se odnose na genetičke varijante serotoninskog transportera SERT-a, nekoliko studija je proučavalo funkcionalne SNP na genima koji kodiraju serotoninski receptor. Geni koji kodiraju različite vrste receptora su *HTR2A*, *HTR3A*, *HTR3B*, *HTR3C* i *HTR3E*. Tri studije su imale pozitivne nalaze, a jedna od tih studija je pokazala da *HTR3A* -42C>T C/T je učestaliji kod IBS-D pacijenata. Ovaj nalaz, međutim, nije ponovljen u ostalim kohortama. U druge dvije studije tvrđeno je da je sa IBS-D udružen SNP G>A na *HTR3E* genu, što je zanimljiv nalaz jer je *HTR3E* receptor zastupljen u tankom i debelom crijevu, i želudcu, a studije *in vitro* su pokazale da postoji povećana ekspresija 5-HT_{3E} podjedinice što može da ima direktan efekat na funkciju serotoninskog receptora. Fukudo sa saradnicima (2009) je proučavao 386A>C polimorfizam na *HTR3B* genu i utvrdio da su se razlikovali regioni aktivacije mozga između osoba sa A/A, A/C i C/C genotipom. Saito sa saradnicima (2011) je sproveo sveobuhvatno istraživanje sa preko 20 gena koji su u vezi sa serotoninom kod 968 ispitanika (pacijenti i kontrole) gdje su utvrđene sljedeće asocijacije: 27 polimorfizama udruženih sa 9 gena za IBS, nekoliko asocijacija sa *TDO2*, *HTR2A* i *HTR7*; 32 snipa na 15 gena za IBS-C sa višestrukim asocijacijama na *HTR4* i *HTR7*; 26 polimorfizama na 7 gena za IBS-D sa višestrukom asocijacijom na *HTR2A*; 32 udruženja na 9 gena sa višestrukim asocijacijama na *TPH2*, *DDC*, *TDO2*, *HTR1E*, *HTR2A* i *HTR7*. Dakle, postoji nekoliko dokaza da geni koji su uključeni u obradu serotonina imaju važnu ulogu u patofiziologiji IBS-a (Saito et al, 2011).

Geni koji kodiraju proteine crijevne barijere proučavani su kod pacijenata čiji su IBS simptomi počeli nakon akutnog gastroenteritisa (PI-IBS). Villani i saradnici (2009) su sproveli opsežnu studiju na populaciji koja je koristila kontaminiranu vodu iz gradskog vodovoda što je

rezultiralo velikim infekcijama *E. coli*0157:H7 i *C. jejuni* akutnim gastroenteritisom. U ovoj studiji odabrane su 79 funkcionalne varijante na 51 genu kandidatu koji kodiraju proteine čija je funkcija u crijevnoj barijeri epitela, imunom odgovoru, serotoninskim putevima, kao i neki drugi geni za koje se pretpostavlja da su potencijalno vezani za IBS. Studija je pokazala signifikantnu asocijaciju četiri snipa sa PI-IBS. Dvije varijante su bile na *TRL9* genu koji kodira receptor 9, jedna na *CDHI* genu koji kodira vezujući protein, kadherin, i jedna varijanta je bila na *IL6* koji kodira citokin, interleukin 6. Genetičke varijante *TRL9* i *CDHI* karakteristične su samo za PI-IBS, dok je za *IL6* u nekim studijama dokazano da može da bude jedan od riziko gena za ne infektivni IBS. Takođe je dokazana asocijacija dva snipa na *IL10* sa ne infektivnim IBS-om (Villani et al, 2009).

Budući da su depresija, anksioznost i neki drugi somatoformni poremećaji prijavljeni u 94% IBS pacijenata, Saito i saradnici su istražili odnos između polimorfizama koji su u vezi sa psihijatrijskim poremećajima i kliničkim osobinama kao što su poremećaji raspoloženja i osjetljivost na bol kod pacijenata sa IBS-om. Istraženo je 10 polimorfizama na 8 gena: *FKBP5*, *COMT*, *NPY*, *BDNF*, *ANKK1*, *DRD2*, *OPRM1*, *FAAH*. Za *COMT*, varijantu val158met, dokazano je da je asocirana sa IBS-C, *OPRM1* 118A>G sa IBS-M i IBS-D kod žena, a *BDNF* SNP varijanta Val166Met je asocirana sa IBS pacijentima koji imaju i neki psihijatrijski poremećaj. *COMT* varijanta je povezana sa anksioznošću, opsesivno-kompulzivnim poremećajem i napadima panike, a *OPRM1* sa osjetljivošću na bol i zavisnosti na opijate. *BDNF* varijanta je povezana sa post-traumatskim stresnim poremećajem, kao i poremećajem raspoloženja, te sa shizofrenijom (Slika 8) (Saito et al, 2011).



Slika 8: Shematski prikaz gena koji su u pozitivnoj asocijaciji sa IBS-om i njegovim podtipovima. Neke asocijacije su jedinstvene, a negdje dolazi do preklapanja gena za određene podtipove IBS-a (Saito et al, 2011).

1.10. Endofenotipovi IBS-a

Klinička bolest može biti posljedica jednog patofiziološkog puta, ali takođe može biti rezultat višestrukih abnormalnosti u biološkim putevima. U ovom drugom slučaju, otkrivanje i razumijevanje pojedinačnih patofizioloških mehanizama koje dovode do ispoljavanja bolesti može da bude veoma teško, a može da bude još i teže ukoliko je bolest heterogena i ima kliničke karakteristike koje se razlikuju od osobe do osobe.

Endofenotip je termin u genetičkoj epidemiologiji koji se koristi za odvajanje bihevioralnih simptoma u stabilne fenotipove sa jasnom genetičkom podlogom. Termin “endofenotip” najprije se počeo koristiti u psihijatrijskoj literaturi s ciljem da se na najbolji mogući način “izmjeri” odnosno opiše složeni klinički fenotip, te dovede u vezu sa poremećajima u fiziološkim procesima kod pacijenta. Endofenotip može biti biomarker, intermedijarni fenotip ili subklinička osobina. Biomarkeri su definisani kao “karakteristika koja se mjeri i ocjenjuje kao pokazatelj normalnih fizioloških procesa, patogenih procesa ili farmakoloških odgovora na terapijski agens” (Mayer, 2011). U genetičkim istraživanjima, endofenotip mora da ima sljedeće karakteristike: mora biti nasljedan i povezan sa bolešću u opštoj populaciji, kosegregirati u porodici, ispoljavati se bez obzira na to da li je bolest aktivna

i nalaziti se kod porodica oboljelih u višoj stopi nego u opštoj populaciji. Snaga jednog endofenotipa je u njegovoj sposobnosti da se napravi razlika između potencijalnih različitih dijagnoza koje su predstavljene sličnim simptomima.

Zbog kliničke heterogenosti funkcionalnih gastrointestinalnih poremećaja kakav je IBS i zbog nedostataka objektivnih nalaza u ispoljavanju ovog oboljenja, upotrebljava se strategija endofenotipova za detekciju gena asociranih sa iritabilnim kolonom. Predložena su dva modela endofenotipova za IBS: gastrointestinalni tranzit i snimanje mozga uz visceralne stimulacije. U nastavku je dat spisak gena evaluiranih u genetičkim studijama endofenotipova:

<u>Gastrointestinalni tranzit</u>	<u>Snimanje mozga</u>
Serotoninski geni	Serotonin
• SLC6A4	• SLC6A4
Adrenergički geni	• HTR3B
• ADRA2A	Dopamin
• ADRA2C	• COMT
Metabolizam žučne kiseline	
• NROB2	
• SC10A2	
• KLB	
• FGFR4	
• OST α	
• OST β	
• CYP7A1	
Kanabinoidni geni	
• FAAH	
Holecistokinin	
• CCK	
• CCKAR	
• CCKBR	
Neuropeptid S	
• NPSR1	
Drugi	
• GN $\beta 3$	

Opsežnu analizu endofenotipa “gastrointestinalni tranzit” analizirali su je Grudel i saradnici (2007). Oni su, zbog pretpostavke da adrenergički i serotoninski mehanizmi moduliraju motilitet crijeva, ispitivali četiri funkcionalne varijante *ADRA2A* -1291C>G, *ADRC2A* Del 332–325, *GNB3* 825C>T i 5-HTT LPR. Studije su pokazale da nije bilo direktne korelacije između ova četiri genotipa i gastrointestinalnog tranzita, ali je uočeno nekoliko specifičnih interakcija između pomenutih gena i IBS podtipova. Za genotip CC *GNβ3* uočeno je brže pražnjenje želudca kod IBS-D pacijenata, a CC *ADRA2A* kod IBS-M pacijenata. Utvrđeno je da je genotip *ADRA2C* heterozigot asociran sa sporijim pražnjenjem želudca kod IBS-M, a bržim pražnjenjem želudca kod IBS-C pacijenata (Grudel et al, 2007). U drugoj studiji ista grupa je proučavala vezu između četiri ista markera sa boli i nelagodom u rektumu, te je došla do zaključka da postoji povezanost između polimorfizma 5-HTTLPR nasljeđenog po dominantnom modelu i povećane boli (Camilleri et al, 2008). Osim ovih genetičkih markera, ova grupa objašnjava ulogu *FAAH* 385C>A kod IBS-a zbog pretpostavke da funkcionalne varijante kanabinoidnih receptora na neuronima koji se nalaze u moždanom stablu, želudcu i kolonu utiču na motilitet i/ili senzaciju u crijevima. Utvrdili su da je alel A asociran sa IBS-M i IBS-D (Camilleri et al, 2008).

Manji broj studija govori o ulozi genetičkih varijanti u aktivaciji mozga i obradi visceralnih stimulusa. Fukudo i saradnici govore o ulozi 5-HTT LPR polimorfizma u procesuiranju mozga kod stimulisanja rektuma barostatom (Fukudo et al, 2009). Budući da serotonin u mozgu ima ulogu u modulaciji raspoloženja i anksioznosti sličnom ponašanju, ovaj polimorfizam može potencijalno da predvidi aktivaciju prefrontalnog limbičkog dijela mozga. Autori su pretpostavili da S alel, čije prisustvo dovodi do niže transkripcije serotoninskog transportera, može uzrokovati veću aktivaciju prednjeg cingularnog korteksa (*ACC anterior cingulate cortex*) i amigdala. Emisionom tomografijom (*PET imaging*) otkriveno je da zdrave osobe (bez IBS-a) sa S/S genotipom češće aktiviraju lijevi ACC, desni parahipokampalni girus i lijevi orbitofrontalni korteks od osoba sa L alelom. Budući da su pomenuti regioni veoma važni u emocionalnoj obradi, nalazi sugerišu da ova varijanta može imati ulogu u aktiviranju mozga nakon kolorektalne distenzije kod pacijenata sa IBS-om (Labus et al, 2008).

1.11. Epigenetika

Prisustvo epigenetičkih promjena u studijama koje su sprovedene na monozigotnim blizancima ukazuje na potencijalnu ulogu kliničkih manifestacija IBS-a. Fenotip je, dakle, kombinacija DNK sekvence, epigenetičke modifikacije i faktora sredine. U najčešće epigenetičke mehanizme se ubrajaju DNK metilacija i modifikacija histona. DNK metilacija obično “utiša” ekspresiju gena dok kod metilacije ili acetilacije histona mogu se aktivirati geni sa kojih se regularno ne vrši transkripcija. IBS je povezan sa ranim traumama u životu ili zlostavljanjem u djetinjstvu što dovodi do negativnih zdravstvenih rezultata i ponašanja kod odraslih. Traume iz djetinjstva utiču na somatske simptome, neuralni razvoj i razvoj neuroendokrinog sistema. Epigenetički molekularni mehanizmi koji obuhvataju metilaciju DNK i acetilaciju histona su uključeni u disregulaciju vezanu za stres hipotalamus-hipofiza-adrenalnog puta (*HPA - hypothalamic-pituitary-adrenal axis*). Posljednje studije su pokazale pojačan odgovor kortizola na visceralni stres kod IBS pacijenata i da traume smanjuju ekspresiju gena za glukokortikoidni receptor hipermetilacijom. Izmijenjena ekspresija ovoga gena, koji inače učestvuje u negativnoj povratnoj sprezi, smanjuje sposobnost HPA da se efikasno bori sa stresom (Vaiopoulou et al. 2014).

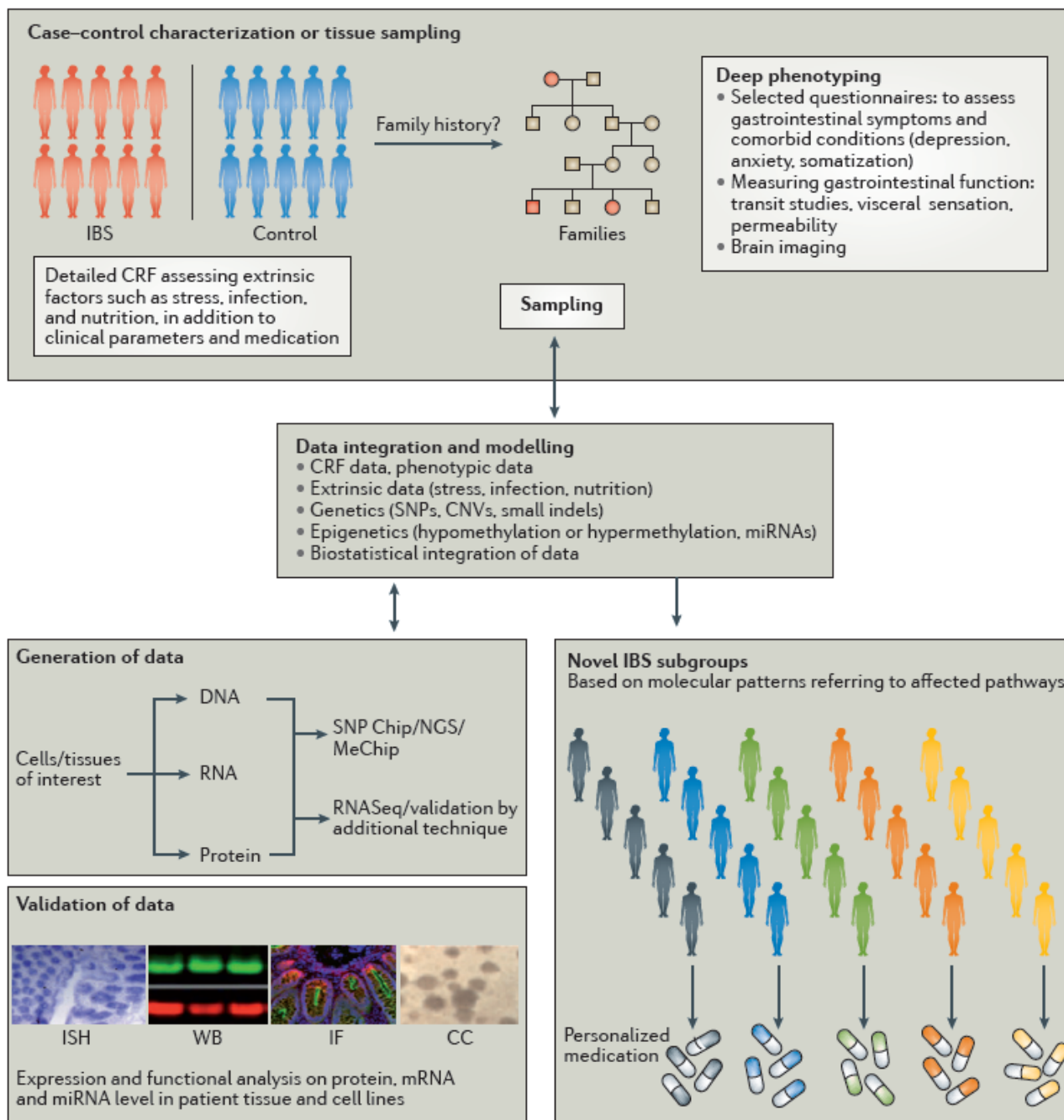
Rasvjetljavanje epigenetičkih promjena kod IBS-a je još u povoju iako je urađeno nekoliko studija na životinjama gdje se pokazalo da je smanjen nivo iRNK gena kandidata u korelaciji sa acetilacijom histona i metilacijom DNK na odgovarajućim promoterskim regionima. Još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene epigenetičke promjene kod IBS i drugih GI oboljenja, iako nekoliko studija na životinjama govore o smanjenom nivou iRNK gena kandidata što je u korelaciji sa acetilacijom histona i DNK metilacijom na relevantnom promoterskom regionu. U jednoj studiji na pacovima koji su bili izloženi stresu, identifikovana je diferencijalna metilacija gena za glukokortikoidni receptor (*Nr3c1*) i kortikotropni rilizing faktor (*Crhl*) koji je u obrnutom odnosu sa ekspresijom gena. Ova studija ukazuje na to da je centralni epigenetički mehanizam najvjerojatnije uključen u visceralnu preosjetljivost indukovanu stresom i daje podsticaj za dalje istraživanje epigenetičkih mehanizama koji mogu biti povezani sa simptomatologijom IBS-a. U pomenutoj studiji koja je rađena na pacovima, visceralna preosjetljivost aktivirana stresom prenešena je na naredne generacije (Gazuoli, 2016).

1.12. Pristupni model u kolaborativnom evropskom istraživanju nasljedne osnove IBS-a

Polje genetike se ubrzano razvija i tehnološki napredak se ogleda u povećanim mogućnostima za identifikaciju rijetkih varijanti genomske DNK. Aktuelni pristupi za otkrivanje gena kandidata su asocijacijske studije i studije cjelokupnog genoma, da bi se zatim tehnikama sekvenciranja identifikovale manje uobičajne varijante. Iako su rađene studije koje istražuju gene kandidate i kandidatske regione za IBS, novije metode još nisu primijenjivane zbog nekoliko ograničenja. Najveće ograničenje u otkrivanju IBS gena je svakako heterogeni IBS fenotip i multifaktorijalna priroda oboljenja koja je i dalje bez jasno definisanih patofizioloških puteva i utvrđenih biomarkera. Nejednakosti nalaza doprinosi i to što su pacijenti regrutovani na osnovu nejednoobraznih kriterijuma za identifikaciju i standardizaciju (Rim I, II i III) koji se baziraju na simptomima.

U skladu sa ograničenjima koje prate identifikaciju genetičkih faktora, stručnjaci i naučnici iz 19 zemalja Evrope udružili su snage kako bi se što jednostavnije prevazišli problemi u uspostavljanju “fenotip” strategije kojim bi se omogućila korelacija gena sa fenotipovima i patološkim promjenama kod IBS-a. Tim predvode istraživači Akademije Sahlgrenska, Univerziteta Gothenburg i Instituta Karolinska iz Švedske. Postavljeni cilj se može postići samo detaljnom fenotipskom karakterizacijom na osnovu kliničkog pregleda i uzimanjem porodične istorije, upitnicima kojima se vrše procjene gastrointestinalnih simptoma, psihijatrijskog komorbiditeta, osobine ličnosti, somatizacija, procjena fizioloških parametara, kao i uzimanjem bioloških uzoraka pacijenata sa dijagnostifikovanim IBS-om i kontrola za genetičku analizu. GENIEUR (*GENes in Irritable Bowel Syndrome Research Network EUROpe*) se sastoji od više od 70 istraživačkih grupa koje predvodi dr. Beate Niesler iz Instituta za Humanu genetiku Univerzitetske bolnice u Heidelbergu. Glavni cilj COST (*Cooperation in Science and Tehnology*) Action BM1106 GENIEUR je da se uspostavi usklađen kriterijum i standardizovani protokol, te da se regrutuje veliki broj dobro okarakterisanih IBS pacijenata i zdravih volontera. Dalji cilj GENIEUR-a je arhiviranje uzoraka krvi i biopsija crijeva za genetičke analize i fecesa za analize mikrobioma, što će svakako olakšati buduće multicentrične studije. Takođe, neophodna je i detaljnija analiza tandemskih ponovaka CNV (*copy number variation*), insercije i delecije nukleotida (*indel's*) i

rijetkih varijanti sekvenciranjem cijelih egzoma ili genoma. Rezultati bi trebali rasvijetliti funkcionalne posljedice genetičkih varijacija u oštećenim putevima uključenim u IBS, te dodatno unaprijediti dijagnostiku i terapiju pacijenata (Slika 9) (Gazuoli et al, 2016).



Slika 9: Budući pristup u genetičkim i epigenetičkom istraživanju IBS-a: Pacijenti i zdrave kontrole će biti okarakterisane koristeći isti CRF, procjenu spoljašnjih faktora, kroz upotrebu lijekova i uzimanjem porodične istorije. Uzorci krvi i biopsije tkiva biće sakupljeni od

Identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama asociranih sa sindromom iritabilnog kolona

pacijenata i zdravih kontrola. Fenotipizacija će biti izvedena korištenjem utvrđenih upitnika za procjenu gastrointestinalnih simptoma (Rome III, GSRS, VSI, Nepean), komorbiditeta i somatizacije (HADS, GAD7, PHQ). U specijalizovanim centrima mogu se izvršiti detaljnije analize (tranzit sadržaja kroz crijeva, visceralna senzacija, propustljivost crijeva, snimanje mozga). Biološki material će biti korišten za ispitivanje u (epi) genetičkim analizama, istraživanje gena kandidata ili u GWAS-ovim studijama koristeći SNP i NGS.

Gastrointestinalna tkiva mogu biti korištena za dodatne epigenetičke analize metilacije, acetilacije i analize miRNK. Ukoliko je to moguće, dodatne studije tkiva i ćelijskih linija mogu biti urađene za validaciju gena kandidata na nivou iRNK i DNK. Svi rezultati analiza će biti integrisani i pohranjeni u Centralnu bazu podataka za biostatističku analizu pri čemu će se moći identifikovati nove IBS podgrupe za personalizovan tretman i liječenje.

CC - ćelijska kultura (cell culture), CNV - tandemski ponovci (Copy Number Variation), CRF – upitnik za pacijente i kontrole (Case Report Form), IF – imunofluorescencija (Immunofluorescence), ISH – in situ hibridizacija (in situ hybridization), miRNA – mikro RNK, NGS – “next generation” sekvenciranje (next-generation sequencing). RNAseq – sekvenciranje RNK (RNA sequencing), SNP – polimorfizam jednog nukleotida (Single Nucleotide Polymorphism), WB – Western Blot (Gazuoli et al, 2016).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Sveukupni cilj ove doktorske disertacije je identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama, odnosno gena kandidata, udruženih sa dijagnozom i specifičnim kliničkim podtipovima IBS-a u grupi pacijenata koja je regrutovana na bazi harmoniziranog multicentričnog protokola, kao osnova za dalja istraživanja u ovoj oblasti.

Istraživanje koje je sprovedeno je prospektivno, pregledno, fundamentalno i neintervencijsko kliničko istraživanje u skladu sa međunarodnim etičkim kodeksima, a u cilju da se utvrdi:

- Da li postoji značajna razlika u distribuciji alelnih frekvencija odabranih kandidat gena između grupe pacijenata sa IBS-om i kontrolne grupe;
- Da li postoji značajna razlika u distribuciji genotipskih frekvencija odabranih kandidat gena između grupe pacijenata sa IBS-om i kontrolne grupe;
- Da li postoji značajna razlika u distribuciji haplotipskih frekvencija odabranih kandidat gena između grupe pacijenata sa IBS-om i kontrolne grupe.

Ova saznanja će rasvijetliti funkcionalne posljedice genetičkih varijacija u oštećenim putevima uključenih u IBS te predstavljati solidnu osnovu za nove dijagnostičke i terapijske pristupe, a samim tim i poboljšati kvalitet života oboljelih od sindroma iritabilnog kolona.

3. MATERIJAL I METODE

Predložena doktorska disertacija predstavlja kolaborativni naučnoistraživački projekat između Laboratorije za humanu genetiku Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu i Odjeljenja gastroenterologije i hepatologije na Klinici za unutrašnje bolesti Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske u Banjoj Luci.

3.1. Formiranje grupe sa pacijentima i kontrolne grupe

Na zasjedanju Svjetskog udruženja ljekara 1964. godine u Helsinkiju usvojen je etički dokument, poznat kao Helsinška deklaracija. Dokument je posljednji put dopunjen 2000. godine u Edinburgu. Po ovoj deklaraciji, sva biomedicinska ispitivanja na ljudima moraju biti usaglašena sa opšteprihvaćenim naučnim principima, zasnovana na pravilno izvedenim laboratorijskim eksperimentima i dobrom poznavanju literature. Izvođenje svakog eksperimentalnog postupka na ljudima treba da bude jasno formulisano u protokolu koji se treba prosljediti komisiji na razmatranje i ocjenu rada. Svaki ispitanik mora biti adekvatno informisan o ciljevima, metodama, očekivanoj koristi i mogućim rizicima. Pravo svakog ispitanika je da sačuva svoj integritet jer biološki uzorak predstavlja ne samo dio ljudskog tijela, već i podatak o čitavoj nasljednoj informaciji koju može da ima jedna individua.

Prije formiranja grupe sa pacijentima i kontrolne grupe, Etički komitet Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske (UKC) je bio upoznat sa metodologijom i ciljevima ove doktorske disertacije nakon čega je dokumentom i odobrio njegovu realizaciju. Svi učesnici, pacijenti i zdrave osobe, dobrovoljno su pristupile studiji, te potpisali informisani pristanak, odnosno izjavu o saglasnosti za učešće u studiji. Obrazac sadrži osnovne podatke o vrsti i cilju istraživanja, zaštiti diskrecionog prava učesnika i primjeni rezultata studije. Svaki učesnik je pročitao i svojeručno potpisao informisani pristanak. Obrada svih pacijenata i zdravih kontrola, te prikupljanje uzoraka realizovano je uz pomoć ljekara specijaliste gastroenterologa i hepatologa sa Klinike za unutrašnje bolesti UKC RS i tehničara. Nakon potpisivanja saglasnosti, pristupljeno je ispunjavanju upitnika, a zatim i uzimanju bioloških uzoraka pacijenata i kontrola. Pacijenti koji su zadovoljili Rim III kriterijum i zdrave osobe bez gastrointestinalnih simptoma birane su iz primarne i sekundarne zaštite.

3.2. Upitnici

3.2.1. CRF (Case Report Form)

CRF upitnik, verzija za pacijente i za kontrole, sastojao se od pitanja koja se odnose na osnovne identifikacione i demografske podatke, kao što su ime i prezime, pol, datum rođenja, edukacija i posao. Kako bi se sačuvao integritet pacijenata i kontrola, u ovom upitniku dodijeljen je jedinstveni identifikacioni broj pod kojim je nadalje vođen svaki učesnik u studiji. Pitanja CRF upitnika odnosila su se takođe i na kliničku, porodičnu i personalnu istoriju, navike u ishrani i terapiji koja je korištena u posljednja 3 mjeseca, a učesnik je na osnovu Bristolske karte trebao dati informaciju o promjeni stolice (Cost Action BM1106 GENIEUR).

3.2.2. GSRS (Gastrointestinal Symptom Rating Scale)

Skala procjene gastrointestinalnih simptoma (GSRS), verzija prilagođena za iritabilni kolon, sadrži 13 stavki za procjenu simptoma. Pacijenti i kontrole trebali su da odgovore na pitanja o tome kako su se oni osjećali u proteklih sedam dana, npr. da li su imali bolove u stomaku, nelagodu, nadutost, gasove, zatvor ili dijareju u pomenutom periodu. Među ponuđenim odgovorima: *uopšte ne*, *manju nelagodu*, *blagu nelagodu*, *umjerenu nelagodu*, *umjereno jaku nelagodu*, *jaku nelagodu* i *veoma jaku nelagodu* ispitanici su birali adekvatne odgovore koji se najviše odnosio na njihovo stanje (Svedland et al, 1988).

3.2.3. PHQ-15 (Patient Health Questionnaire)

Skala jačine somatskih simptoma (PHQ-15) je kratki upitnik koji može biti koristan za praćenje somatizacije i ozbiljnosti simptoma u kliničkoj praksi i istraživanju. Sastoji se od 15 tačaka na koje su pacijenti i kontrole mogli da daju jedan odgovor od ponuđena tri: *nikako*, *malo* ili *mnogo*. Cilj PHQ-15 upitnika je prikupljanje dodatnih informacija o kliničkoj slici i subjektivnoj procjeni pacijenata (Kroenke et al, 2002).

3.2.4. HAD (Hospital Anxiety and Depression Scale)

Ovaj upitnik prvobitno su razvili Zigmund i Snaith 1983. godine, a najčešće se koristi za procjenu anksioznosti i depresije koju pacijent proživljava. HAD skala ima 14 stavki od

kojih se sedam odnose na anksioznost i isto toliko na depresiju, a cilj je da se detektuju psihičke promjene kod pacijenata sa fizičkim zdravstvenim problemima (Snaith, 2003).

3.2.5. VSI (Visceral Sensitivity Index)

Anksioznost koja je u vezi sa gastrointestinalnim senzacijama ili simptomima igra značajnu ulogu u patofiziologiji, kao i u zdravstvenom ishodu kod pacijenata oboljelih od IBS-a. Indeks visceralne senzitivnosti je pouzdan i validan upitnik kojim se mjeri specifična anksioznost pacijenata sa gastrointestinalnim simptomima, a sastoji se od 15 tačaka na koje ispitanici trebaju da odgovore što vjerodostojnije sa jednim od 6 odgovora: *veoma se slažem, umjereno se slažem, blago se slažem, blago se ne slažem, umjereno se ne slažem* i *veoma se ne slažem* (Labus et al, 2004).

3.3. Uzorci krvi

Svi uzorci krvi su prikupljeni punkcijom kubitalne vene u vakutajner u kome se već nalazio antikoagulans K_3EDTA (*Vacurette*[®], *Greiner Bio-one*) (Sika 10). Na etiketu vakutajnera je upisana šifra pacijenta i datum venpunkcije. Uzorci krvi su transportovani pod optimalnim temperaturnim uslovima (na ledu) u Laboratoriju za humanu genetiku Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju u Sarajevu, gdje su urađene izolacije DNK i RNK, te izvršene i ostale analize iz uzorka krvi.



Slika 10: Vakutajner, Vacurette[®], Greiner Bio-one

3.3.1. Izolacija DNK

Izolacija genomske DNK je izvršena prema protokolu po Mileru (Miller et al, 1988). Za ovu izolaciju je karakteristično da se taloženje proteina postiže pomoću anorganskih soli. Genomska DNK je izolovana iz uzoraka krvi volumena 10 ml. Uzorci su tretirani hladnim (+4°C) RCLB (*Red Cells Lysis Buffer*) volumena 9 ml. Smjese su ostavljene na ledu (0°C) 15-20 minuta uz povremeno miješanje, nakon čega je došlo do liziranja eritrocita. Dobijeni su uzorci svijetlo crvene boje sa talogom bijelih krvnih ćelija u obliku prstena. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 1500 rpm. Nakon centrifugiranja je odstranjen supernatant, a epruvete su okrenute naopako na papir 2-3 minute da bi se talog sa leukocitima osušio. Na uzorak je zatim doliveno 5 ml PBS-a (*Phosphate Buffered Saline*) nakon čega su tube bile snažno promućkane, a zatim ponovo stavljene u centrifuge na 1500 rpm na 10 minuta. Nakon toga je odstranjen supernatant dodan *Kern-lysis* pufer u količini od 3 ml čemu je uslijedilo ponovno mućkanje tuba. Na kraju, u tube je stavljeno 100 µl 20% rastvora SDS-a (*Sodium Dodecyl Sulphate, SERVA Electrophoresis GmbH, Njemačka*) i 70 µl proteinaze K (*ThermoFisher Scientific*), te je smjesa inkubirana na 37°C i ostavljena preko noći.

Nakon inkubacije, protein i ostaci ćelija su uklonjeni izoliranjem i to dodavanjem 0.5 ml 6 M NaCl uz snažno miješanje i centrifugiranje u trajanju od 15 minuta na 2500 rpm na temperaturi od 20°C. Ako supernatant ne bi bio bistar, centrifugiranje bi bilo ponovljeno. Supernatantu je zatim dodat apsolutni etanol u količini 2 volumena. Blagim okretanjem epruvete, istaložena je DNK, a zatim i isprana u 70% etanolu. Isprana DNK je otopljena u vodi i pohranjena na +4°C.

3.3.2. Kvantitativno-kvalitativna analiza DNK

Analiza količine i kvaliteta izolovane DNK izvršena je pomoću elektroforeze na agaroznom gelu (Maniatis et al, 1982). Elektroforeza predstavlja grupu tehnika kojima se vrši razdvajanje molekula na osnovu njihovih fizičkih karakteristika, kao što su veličina, oblik ili izoelektične tačke. Gel-elektroforeza se uglavnom izvodi u analitičke svrhe, ali se takođe može koristiti i kao preparativna tehnika kojom se djelimično prečišćavaju molekule prije korištenja drugih metoda, kao što su spektrofotometrija, PCR, kloniranje, sekvenciranje ili *immuno-blotting*. Metoda se temelji na osnovu usmjerenog kretanja naelektrisanih čestica u

električnom polju, a brzina i način kretanja zavise od veličine i oblika migratornih molekula, koncentracije agaroznog gela i napona električne struje.

U ovom radu je korišten SB (natrijum-borat) pufer za elektroforezu genomske DNK na agaroznom gelu koncentracije 2%. Elektroforeza je vršena pod naponom struje 90-100 V uz konstantne uslove jačine struje. Za vizualizaciju DNK, kao alternativa etidijum bromidu, korištena je nekancerogena i manje mutagena boja *Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics Europe GmbH)*. Uporednom analizom sa komigrirajućim veličinskim DNK standardom (DNK fragmenti poznate veličine i koncentracije) od 50 baznih parova (*Fermentas*) na gelu određena je veličine i koncentracija ispitivanih fragmenata. Trake su detektovane nakon apsorpcije ultravioletnog zračenja i dokumentovane u digitalnoj formi softverom *Kodak ID ver 3.5 (Pizzonia, 2001)*.

3.4. Gen FKBP5

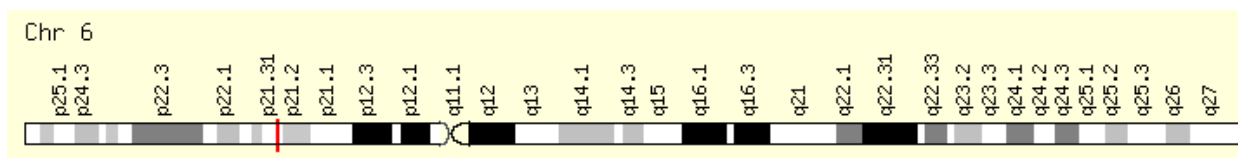
Pretpostavlja se da izloženost traumama u ranom djetinjstvu može povećati rizik za različita psihotična stanja kroz proces ponašanja i biološke senzibilizacije uključene u regulaciju hipotalamus-hipofiza-adrenalnog (HPA) puta što u konačnici dovodi do promjene dopaminskog puta u mezolimbičkom regionu. Disregulacija HPA puta podrazumijeva deregulaciju hipotalamičkih peptida kortikotropina (*corticotropin-releasing*) i arginina vazopresin hormona što rezultira povećanim otpuštanjem adrenokortikotropnog hormona u plazmi i glukokortikoida kortizola. Glukokortikoidi promovišu fiziološki odgovor na stres i od ključnog su značaja za prekidanje odgovora kroz negativnu povratnu spregu. Ovakvo regulisanje negativne povratne sprege preko receptora glukokortikoida je predloženo kao potencijalni faktor rizika za psihopatologiju vezanu za stres.

Protein koji je uključen u regulaciju aktivnosti glukokortikoida je FK506 vezujući protein veličine 51 kDa kodiran pomoću gena FKBP5 koji se nalazi na kratkom *p* kraku hromozoma 6 (Tabela 5, Slika 11).

Tabela 5: Opis FKBP5 gena

Simbol	FKBP5
Odobreno ime	FK506 binding protein 5
HGNC *ID	HGNC:3721
Simbol i ime koje se prije koristilo	"FK506-binding protein 5"
Sinonimi	FKBP51, FKBP54, P54, PPIase, Ptg-10
Tip lokusa	Gen sa proteinskim produktom
Lokacija na hromozomu	6p21.31
Genska familija	FKBP prolyl isomerases Tetratricopeptide repeat domain containing

* *HUGO Gene Nomenclature Committee*



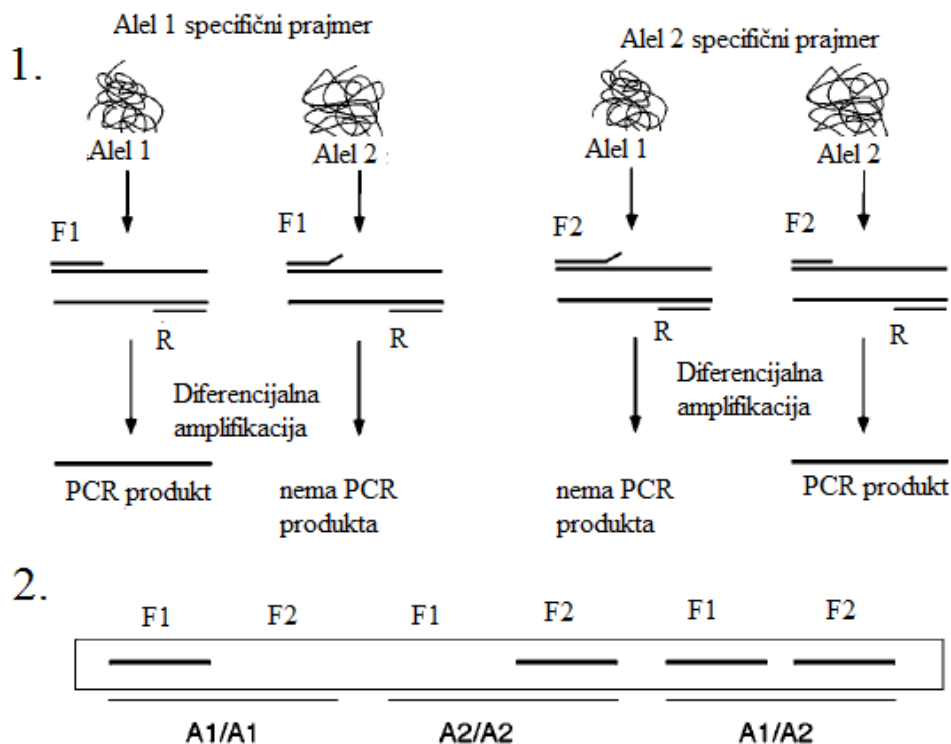
Slika 11: Genska lokacija FKBP5 gena

Funkcionalni haplotip koji sadrži 18 mononukleotidnih polimorfizama u FKBP5 genu je povezan sa njegovom povećanom ekspresijom, kao odgovor na aktivaciju glukokortikoida i varijacije na glukokortikoidnu osjetljivost. Ovaj haplotip je označen sa tri mononukleotidna (tačkasta) polimorfizma: rs3800373, rs9296158 i rs1360780 koja su najviše proučavana na FKBP5 genu. Nekoliko studija je istaklo da su riziko aleli C, A i T najvjerojatniji te da je rs1360780 polimorfizam najviše asociran (Cristóbal-Narváez et al, 2016).

Prema dosadašnjim saznanjima FKBP5 rs 1360780 (C/T) je tačkasti polimorfizam (SNP) za kojeg je dokazano da ima funkcionalne posljedice uprkos tome što se nalazi na intronu 2. Udruženost ovoga polimorfizma i nivoa ekspresije FKBP5 proteina je dobro istražena. Za T alel se smatra da uzrokuje stvaranje više kortizola nego C alel, a sekvenca koja sadrži T alel nalazi se u TATA bloku. Ove molekularne promjene mogu dovesti do promjene početnog mjesta transkripcije. Ovaj polimorfizam, odnosno riziko alel T, najčešće vezuju za bolesti posljedica traumatskog stresa, a u posljednje vrijeme i sa Alzheimerovom bolešću (Fujii et al, 2014).

3.4.1. Allele-specific amplification (ASA PCR)

Kao metod genotipizacije koji je primijenjen u ovom radu za FKBP5 gen je alel-specifična amplifikacija (*allele-specific amplification*) ili ASA-PCR. Ovaj metod genotipizacije upotrebljava se za detekciju rijetkih tačkastih mutacija i zahtijeva dvije odvojene PCR reakcije koristeći dva različita F (*forward*) prajmera i jedan R (*reverse*) isti za obe amplifikacije. F prajmeri na 3' kraju su različiti, jedan ima normalan (*wilde type*) nukleotid, drugi nosi mutaciju, a ova neusklađenost na 3' kraju F prajmera omogućava preferencijalnu amplifikaciju jednog alela u odnosu na drugi na mjestu DNK sekvence sa tačkastom varijacijom (Slika 12) (Drenkard et al, 2000).



Slika 12: Shematski prikaz alel-specifične PCR strategije: Oligonukleotidni F prajmeri na 3' kraju nose nukleotid koji korespondira SNP mjestu tačkastog polimorfizma u preferencijalnoj amplifikaciji specifičnog alela.

1. Prajmer F1 odgovara alelu 1, ali ne i alelu 2 zbog čega u diferencijalnoj amplifikaciji ne dolazi do stvaranja PCR

produkta u drugom slučaju. Prajmer F2 odgovara alelu 2, ali ne odgovara alelu 1 zbog nukleotida na 3' kraju koji se ne može upariti sa sekvencom gdje takođe izostaje PCR produkt.

2. Analiza na agaroznom gelu pokazuje očekivani ishod amplifikacije kod homozigota i heterozigota za oba alela koristeći prajmere F1 i F2 (preuzeto i modificirano iz Drenkard et al, 2000).

Prajmeri korišteni u ovom eksperimentu za gen FKBP5 su prikazani u Tabeli 8.

Tabela 8: Prajmeri za FKBP5 gen korišteni kao metod genotipizacije u ASA-PCR eksperimentu. F_C označava forward prajmer ($5' \rightarrow 3'$) koji na svom kraju nosi citozin C (wild type). F_T označava forward prajmer ($5' \rightarrow 3'$) koji na svom kraju nosi timin T (mutacija). R označava reverse prajmer ($3' \rightarrow 5'$).

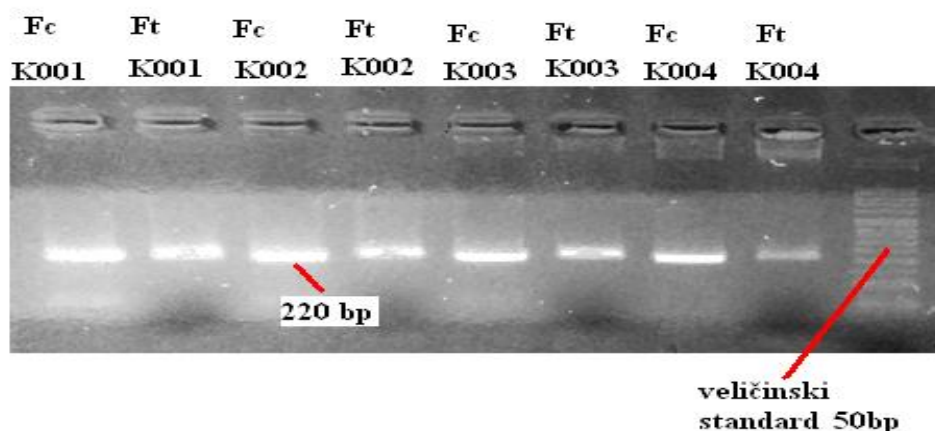
Gen	Prajmeri	Veličina produkta
FKBP5	F_C : GGC TTT CAC ATA AGC AAA GTT AC	220 bp
	F_T : GGC TTT CAC ATA AGC AAA GTT AT	
	R: TGA ATC TGA GAA AGG TTA AGT GG	

U Tabeli 6 prikazane su sintetske komponente za ASA-PCR diferencijalnu amplifikaciju FKBP5 gena. Napravljena su dva miksa, za razlikovanje u prvi miks je stavljen plavi *Red Taq*, forward prajmer sa C nukleotidom na 3' kraju (F_C) za prepoznavanje *wild type* varijante i reverse prajmer (R). U drugi miks je stavljen crveni *Red Taq*, forward ($5' \rightarrow 3'$) prajmer F sa T nukleotidom na 3' kraju (F_T) za prepoznavanje varijante gena sa mutacijom i reverse prajmer R ($3' \rightarrow 5'$). U oba miksa je dodana voda, kao i uzorci krvi pacijenata i kontrola prema količinama ispisanim u tabeli (Tabela 6).

Tabela 6: Sintetske komponente za PCR sa prajmerima F_C i F_T

Red Taq	5 μ l	Red Taq	5 μ l
Prim F_C	0.1 μ l	Prim F_T	0.1 μ l
Prim R	0.1 μ l	Prim R	0.1 μ l
H ₂ O	3.8 μ l	H ₂ O	3.8 μ l
DNK	1 μ l	DNK	1 μ l

Uspješnost PCR reakcija provjerena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu prema već opisanoj metodi (Slika 13).



Slika 13: Elektroforeza na agaroznom gelu za kontrolne uzorke krvi (K001-K004) za gen *FKBP5*. F_C – uzorci sa C nukleotidom na forward prajmeru za prepoznavanje wild type varijante; F_T – uzorci sa T nukleotidom na forward prajmeru za prepoznavanje mutirane varijante.

3.5. Gen DRD2

Gen DRD2 kodira dopaminski receptor podtipa D2, protein veličine 50619 Da koji se sastoji od 443 aminokiseline (Tabela 7, Slika 14). Ovaj G protein je kuplovani receptor koji inhibira aktivnost adenil ciklaze. Grandi sa saradnicima je 1989. godine utvrdio da su kodirajuće sekvence DRD2 gena prekinuti sa 6 introna. Dodatne aminokiseline koje su

prisutne u humanom dopaminskom receptoru, u odnosu na onaj kod štakora, kodirane su jednim egzonom od 87 baznih parova. Eubanks sa saradnicima je 1992. godine utvrdio da se DRD2 gen proteže preko 270 kb i uključuje intron od oko 250 kb koji odvaja prvi egzon od ostalih kodirajućih egzona za proteinski receptor (Eubanks et al. 1992).

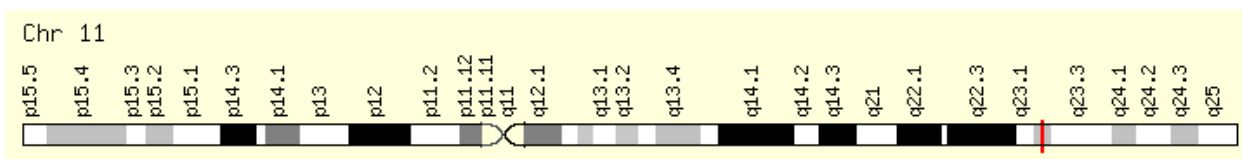
Somatostatin i dopamin su dva glavna neurotransmiterska sistema koji dijele niz strukturnih i funkcionalnih karakteristika. Zajedno su svrstani u neuronske podgrupe, a somatostatin je uključen u dopaminsku kontrolu motorne aktivnosti. Korištenjem FRET-a (*photobleaching fluorescence resonance energy transfer*) pokazano je da je SSTR5 i DRD2 zajedno reaguju, te da mogu stvoriti novi receptor sa poboljšanom aktivnošću što govori o tome da receptori iz različitih porodica G kuplovanih receptora mogu da vrše interakciju putem oligomerizacije.

Genetičke *missense* mutacije gena uzrokuju mioklonalnu distoniju, a druge mutacije su povezane sa shizofrenijom. Alternativna obrada primarnog transkripta (*splicing*) ovoga gena rezultuje u dvije transkript varijante koje kodiraju različite izoforme. Treća varijanta je opisana, ali nije utvrđeno da li je zaista u pitanju varijanta ili samo oblik nastao zbog pogrešnog isjecanja introna (<https://omim.org/entry/126450>).

Tabela 7: Opis DRD2 gena

Simbol	DRD2
Odobreno ime	Dopaminski receptor D2
HGNC *ID	HGNC:3023
Sinonimi	Dopamine Receptor D2, Dopamine D2 Receptor, Seven Transmembrane Helix Receptor, Dopamine Receptor D2 Isoform, D2DR, D2R
Tip lokusa	Gen koji kodira protein
Lokacija na hromozomu	11q23.2
Genska familija	Dopaminski receptori

* *HUGO Gene Nomenclature Committee*



Slika 14. Genska lokacija DRD2 gena (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DRD2>)

3.5.1. Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

Potruga za razumijevanjem genetičkih varijanti i mutacija rezultirala je u razvoju jednostavne laboratorijske tehnike poznate kao PCR-RFLP metoda za detekciju polimorfnih fragmenata. Ova metoda se zasniva na digestiji umnoženog DNK segmenta endonukleazama tipa II tako što enzimi prepoznaju i razlažu DNK na području karakterističnog slijeda nukleotida, te da na dvolančanoj DNK specifično cijepaju oba polulanca. Mjesta cijepanja DNK molekule nazivaju se restrikciona mjesta (*restriction site*), a nastali dijelovi molekule nazivaju se restrikcioni fragmenti. Polimorfizam je predstavljen varijacijama u broju i dužini restrikcionih fragmenata koje formira ista endonukleaza na uzorcima DNK. PCR-RFLP je jednostavan metod, te zahtijeva minimalne investicije u instrumentaciji. Pouzdan ne samo za genotipizaciju dužinskih fragmentata, već takođe i za tačkaste mutacije, insercione i delecione polimorfizme, kao i višestruke mutacije.

U Tabeli 8 su prikazani prajmeri za DRD2 gen.

Tabela 8: Prajmeri F (5'→3') i R (3'→5') DRD2 gena za određivanje polimorfnih fragmenata PCR-RPLF metodom.

Gen	Prajmeri	Veličina produkta
DRD2	F: AAA TTT CCA TCT CGG CTC CT	300 bp
	R: GAG GAG CAC CTT CCT GAG TG	

Kao metod genotipizacije primijenjen u ovom radu za DRD2 gen bio je PCR-RFLP, a kao prvi korak bilo je neophodno izvršiti izbor restrikcionih enzima koji će prepoznati mjesto

tačkaste mutacije i dizajnirati optimalne prajmere za PCR. Sintetske komponente za PCR-RFLP prikazane su u Tabeli 9.

Tabela 9: Sintetske komponente za PCR-RFLP DRD2 gena

Red Taq	6.25 µl
Prim F	0.25 µl
Prim R	0.25 µl
ddH ₂ O	5.25 µl
DNK	0.5 µl

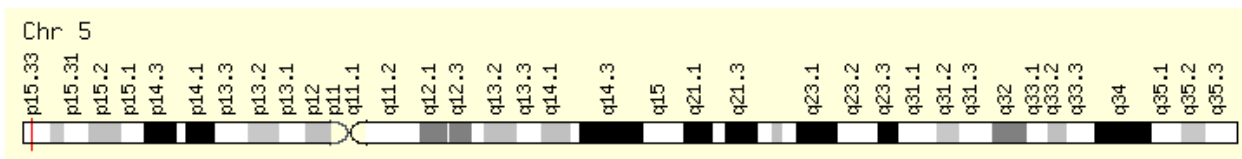
3.6. Gen DAT (SLC6A3)

Dopaminski transporter ili DAT gen ima ključnu ulogu u regulisanju dopaminske neurotransmisije. Gen koji kodira DAT, SLC6A3 (*solute carrier family 6, member 3*), lokalizovan je na hromozomu 5p15.3 (Slika 15, Tabela 10). Veoma važan paralog ovoga gena je SLC6A4 gen (SERT). Polimorfizam promjenljivog broja tandem ponavljanja (*VNTR Variable Number of Tandem Repeats*) opisan je na 3' nekodirajućem regionu na egzonu 15. U većini slučajeva, najčešći polimorfizmi su od 9 i 10 tandemskih ponovaka, a u nekim populacijama primijećeni su i polimorfizmi sa 3, 5, 7, 8 i 11 ponavljanja.

Tabela 10: Opis SLC6A3 gena

Simbol	SLC6A3
Odobreno ime	solute carrier family 6 member 3
HGNC *ID	HGNC:11049
Sinonimi	DAT; DAT1; PKDYS
Tip lokusa	Gen koji kodira protein
Lokacija na hromozomu	5p15.33
Genska familija	Hlor-zavisni neurotransmiterski transporter

* *HUGO Gene Nomenclature Committee*



Slika 15: Genska lokacija DAT gena (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC6A3>)

I pored toga što je lociran na nekodirajućem regionu gena, ovaj polimorfizam je udružen sa nekoliko kliničkih fenotipova koji su u vezi sa disregulacijom dopaminskog transporta. Neravnoteža povezanosti (*linguage disequilibrium*) između ADHD sindroma (*Attention Deficit Hyperactivity Disorder*) i polimorfizma od 10 tandemskih ponovaka prikazana je u četiri odvojene studije. Studije su pokazale da je polimorfizam od 9 ponavljanja sa kokain-indukovanom paranojom kod osoba zavisnih o kokainu, sa alkoholizmom i pušenjem. VNTR polimorfizam na 3' kraju nije povezan sa mutacijom u DAT proteinskoj sekvenci, što ukazuje na to da polimorfizam može biti u neravnoteži povezanosti sa mutacijom koja utiče na ekspresiju gena ili fiziološku funkciju proteina (<https://www.snpedia.com/index.php/SLC6A3>).

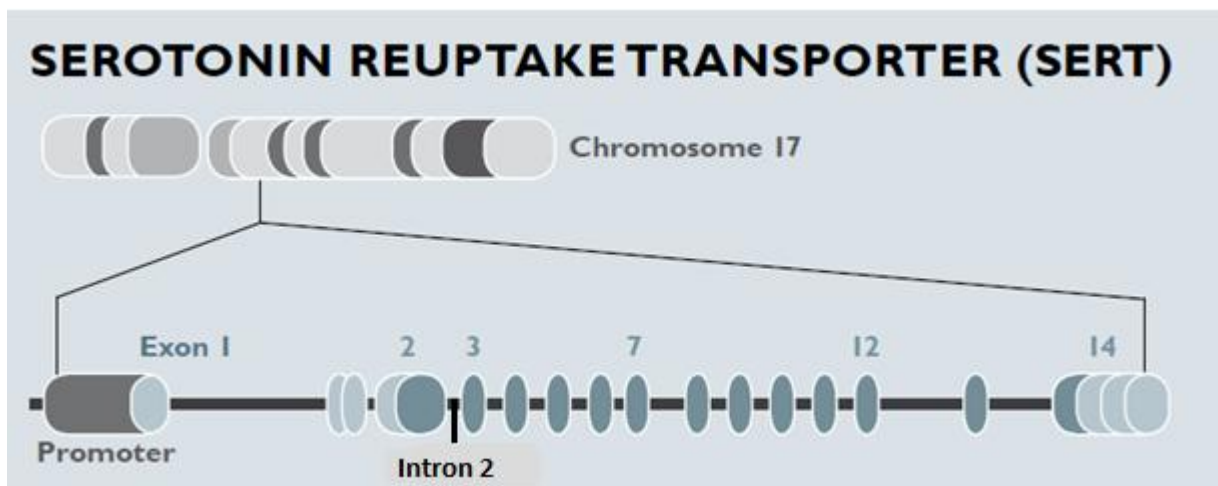
Studije su pokazale da je SNP rs464049 udružen sa poremećajima raspoloženja, a jedna populaciona studija iz Hrvatske je pokazala da je prisustvo T alela imalo povećan rizik za shizofreniju (<https://www.snpedia.com/index.php/Rs464049>).

3.7. SRin2

Gen koji kodira humani serotoninški transporter građen je od 14 egzona i obuhvata oko 31 kilobaze, a njegova citogenetička lokacija je 17q11 (Slika 16). Redosljed svih egzona uključujući i intronske sekvence kao i tandemska ponavljanja VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) sekvenci utvrđena su i pohranjena u bazi podataka *EMBL/GenBank data base* sa pristupnim brojevima od X76753 do X76762 (Lesch et al, 1994).

Ogilvie sa saradnicima 1996. godine je identifikovao jedan od prvih polimorfizama na SERT genu, a u pitanju je koji je promjenljivi broj tandemskih ponavljanja VNTR u intronu 2 koji je predstavljen ponavljanjima od 17 bp. Prvobitno su opisane tri varijante od 9, 10 i 12

ponavljanja, ali u literaturi se spominje i varijanta od 11 ponavljanja (<http://www.omim.org/entry/182138>). Do sada su rađene tri studije koje uključuju polimorfizam SRin2. U ovim studijama nije pronađena udruženost SRin2 polimorfizma sa IBS-om, iako su neke druge studije pokazale postojanje haplotipa u kombinaciji kratkog alela na 5-HTTLPR promoteru i alela od 12 ponavljanja u intronu 2 gena za serotoninški transporter (Niesler et al, 2010).



Slika 16: Shematski prikaz i organizacija SERT gena:

- SERT je serotoninški resorpcioni transporter (Serotonin Reuptake Transporter)
- Protein je kodiran jednim genom koji se nalazi na hromozomu 17q11
- Obuhvata više od 30 kilobaza i sastoji se od 14 egzona
- Startni kodon je lokalizovan na egzonu 2
- Egzon 1 sadrži nekodirajuće sekvence te se smatra da ima regulatornu funkciju u transkripciji.
- Intron 2 sadrži različit broj tandemskih ponavljanja VTNR

3.7.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Kao metod genotipizacije primijenjen u ovome radu za DAT gen i SRin2 korišten je konvencionalni PCR metod (lančana reakcija sa polimerazom) koji je formulisao Kary Mullis (Mullis et al, 1986). Metod omogućava stvaranje velikog broja kopija sekvence od interesa

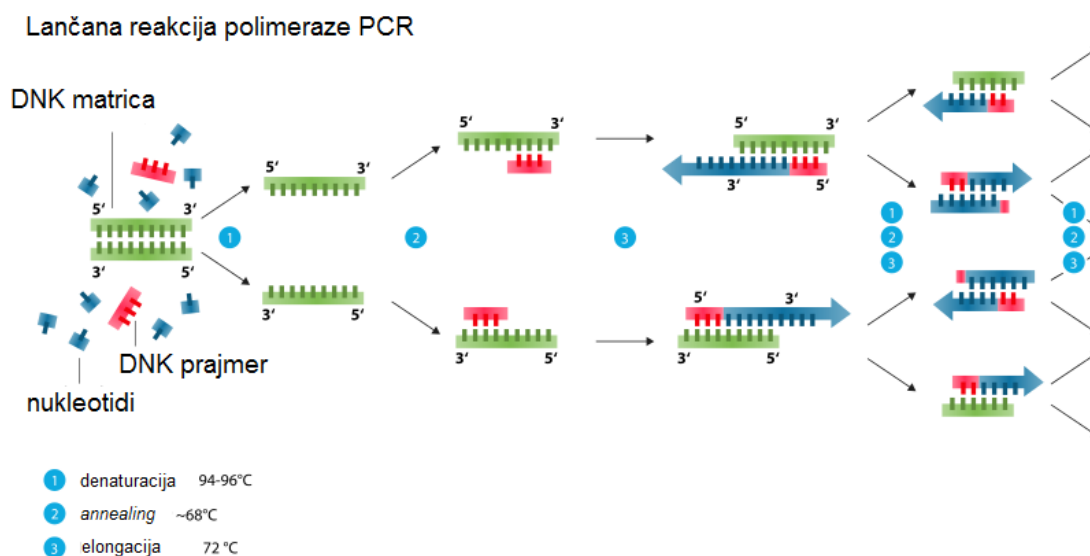
koristeći malu početnu količinu DNK uzorka. Za umnožavanje, odnosno, replikaciju DNK *in vitro*, neophodni su:

- DNK matrica - dvostruki lanac DNK koji se želi umnožiti, dužine od 100 do 35000 baznih parova,
- Jednolančani prajmeri dužine 20-30 nukleotida čije su sekvence komplementarne krajevima one DNK sekvence koja se želi umnožiti,
- Smjesa slobodnih dezoksiribonukleotida u zasićenim koncentracijama (200 mM za svaki dNTP),
- Enzim DNK polimeraza, nazvan *Taq* polimeraza izolovan iz bakterije *Thermus aquaticus* koja živi u termalnim izvorima na temperaturi od oko 70°C, te zbog toga i ima sposobnost da vrši replikaciju na višim temperaturama na kojima bi se drugi enzimi denaturisali,
- Magnezijumovi joni Mg^{2+} koji su neophodni za aktivnost enzima, a dodaju se u obliku vodene otopine $MgCl_2$,
- Standardni PCR pufer koji se sastoji od 50 mM KCl, 10 mM TRIS Cl, 1.5 mM $MgCl_2$, pH 8.3.

Napravljena smješa se stavlja u *Thermocycler* koji omogućava dalji tok reakcije, a u ovom radu je korišten *Mastercycler gradient, Eppendorf*. PCR se izvodi ponavljanjem 20 do 30 ciklusa, od kojih se svaki sastoji od tri osnovne faze:

- **Denaturacija -razdvajanje matrice:**
Zagrijavanje reakcione smješe na 94-96°C pri čemu dolazi do denaturacije, odnosno razdvajanja dvostrukih lanaca DNK. Ova faza traje oko jedne minute.
- **Annealing - hibridizacija prajmera:**
Hlađenje reakcione smješe na 40-60°C gdje dolazi do vezivanja prajmera. Ova faza traje oko 30 sekundi, u zavisnosti od dužine prajmera.
- **Elongacija - sinteza novog lanca:**
Zagrijavanje reakcione smješe na 72°C kada *Taq* polimeraza započinje polimerizaciju i dostiže maksimum aktivnosti. Trajanje ove faze zavisi od

dužine fragmenta koji se želi umnožiti i može da traje od jedne do dva minuta (Slika 17).



Slika 17: Shematski prikaz PCR reakcije

U ovome radu sekvenca od interesa za svaku genotipizaciju amplificirana je primjenom adekvatnog prajmerskog para (Tabela 11), a sintetske komponente za oba gena prikazane su u Tabeli 12 .

Tabela 11: Prajmeri F (5'→3') i R (3'→5') za DAT i SRin2 korišteni za genotipizaciju metodom lančane reakcije polimeraze i veličina očekivanih genskih produkata.

Geni	Prajmeri	Veličina produkta
DAT	F: 6-FAM-GGT GTA GGG AAC GGC CTG AGA G	471/433
	R: CTT CCT GGA GGT CAC GGC TCA AGG	
SRin2	F: 6-FAM-GTC AGT ATC ACA GGC TGC GAG	299/267
	R: TGT TCC TAG TCT TAC GCC AGT G	

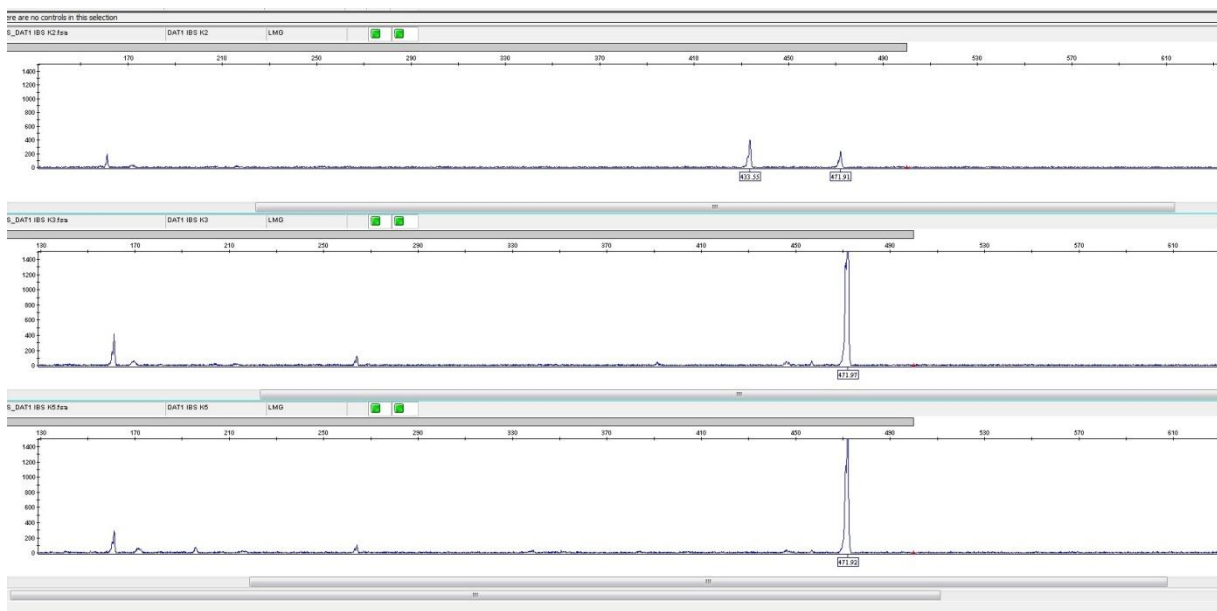
Uslovi PCR reakcije za oba prajmerska para bili su: inicijalna denaturacija 95°C, 5 min; denaturacija 95°C, 30 sec; annealing 50°C, 30 sec; elongacija 72°C, 45 sec, 40 ciklusa; finalna elongacija 72°C, 7 min.

Tabela 12: Sintetske komponente za PCR reakciju DAT i SRin2 gena

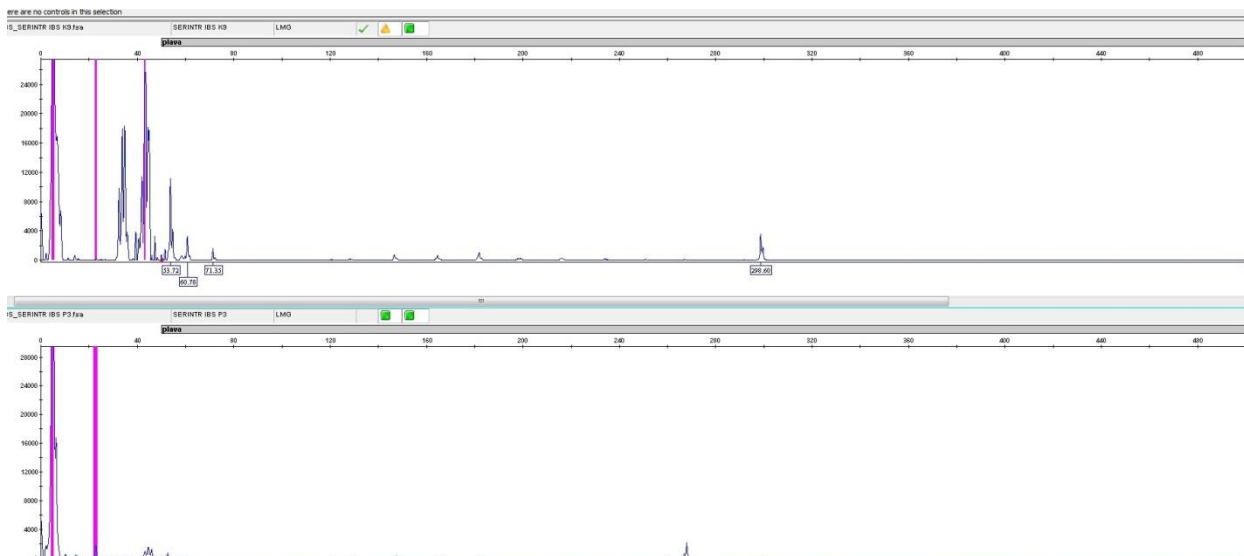
	DAT	SRin2
Pufer	1.25 µl	1 µl
MgCl ₂	0.75 µl	1.25 µl
dNTP's	0.25 µl	0.5 µl
Prim F	0.25 µl	0.2 µl
Prim R	0.25 µl	0.2 µl
TaqGold	0.05 µl	0.1 µl
ddH ₂ O	9.2 µl	3.75 µl
DNK	0.5 µl	3 µl

Vizualizacija i analiza PCR produkta (fragmenata DNK) je vršena na sekvenceru 3500 *Genetic Analyzer (Applied Biosystems™)* nakon završene PCR reakcije sa fluorescentno obilježenim *forward* prajmerom (Slika 18 i Slika 19). *Sekvencer* je aparat koji se koristi za analizu fluorescentno obilježene DNK, a bazira se na kapilarnoj elektroforezi. Prije samog sekvenciranja za svaki uzorak dodano je 9 µl formamida i µl 0.3 Rox-a (crvena boja, standard), uzorci su stavljeni 2 minute na 95°C u termoblok kako bi se izvršila denaturacija te dobile jednolančane DNK.

Identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama asociranih sa sindromom iritabilnog kolona



Slika 18: Elektroferogram DAT gena.



Slika 19: Elektroferogram SRin2 gena.

3.8. Izolacija RNK iz periferne krvi

Izolacija RNK iz krvi je vršena prema protokolu *The Quick-RNA™ MiniPrep* kita, koji je namjenjen i dizajniran za brzo, jednostavno i pouzdano izolovanje RNK. Procedura obuhvata jedinstveni sistem pufera kombinovan sa tehnologijom *Zymo-Spin* kolona sa

dotkom DNK/RNK Shield™ i proteinaze K za izolaciju RNK iz svih bioloških tkiva (sve ćelije i tkiva, krv i druge tjelesne tečnosti), a dobijena visoko kvalitetna RNK može se koristiti za RT-PCR, hibridizaciju i sekvenciranje.

Postupak

Kod izolacije RNK iz perviferne krvi najprije je izvršeno izdvajanje leukocita iz krvi po sljedećem protokolu:

- 6 ml krvi konzervisane sa EDTA-Na (vakutajner sa ljubičastim čepom) prenijeti u epruvete sa ravnim dnom od 50 ml i dodati 40 ml (ili 4V) 1 x RETIC otopine. Lagano promiješati.
- Centrifugirati na 25000 rpm na +4°C (Centrifuga *Niive NF 800*)
- Pažljivo odvojiti supernatant od taloga, a na talog dodati 40 ml svježe pripremljene otopine za liziranje ćelija *Lysis buffer*. Lagano promiješati i staviti na roler da se lagano okreće 10 minuta.
- Staviti u frižider na -20°C 10 minuta.
- Centrifugirati na 2500 rpm 10 minuta na +4°C.
- Pažljivo odvojiti supernatant.
- Ponoviti postupak liziranja ćelija još jednom (koraci 3-6).
- Na talog dodati 10 ml hladnog PBS pufera pH 7.4.
- Centrifugirati na 2500 rpm 10 minuta na +4°C.
- Dodati filterisanim tipovima 300 µl PBS pufera i dobro promiješati pipetom. Talog u PBS puferu pipetom prenijeti u DEPC tubice od 1.5 µl
- Za taloženje leukocita centrifugirati na 3000 g (3000 g je oko 6000 rpm) 5 minuta.
- Nakon centrifugiranja isprati i odbaciti sav supernatant, a u tubici ostaju samo istaloženi leukociti.

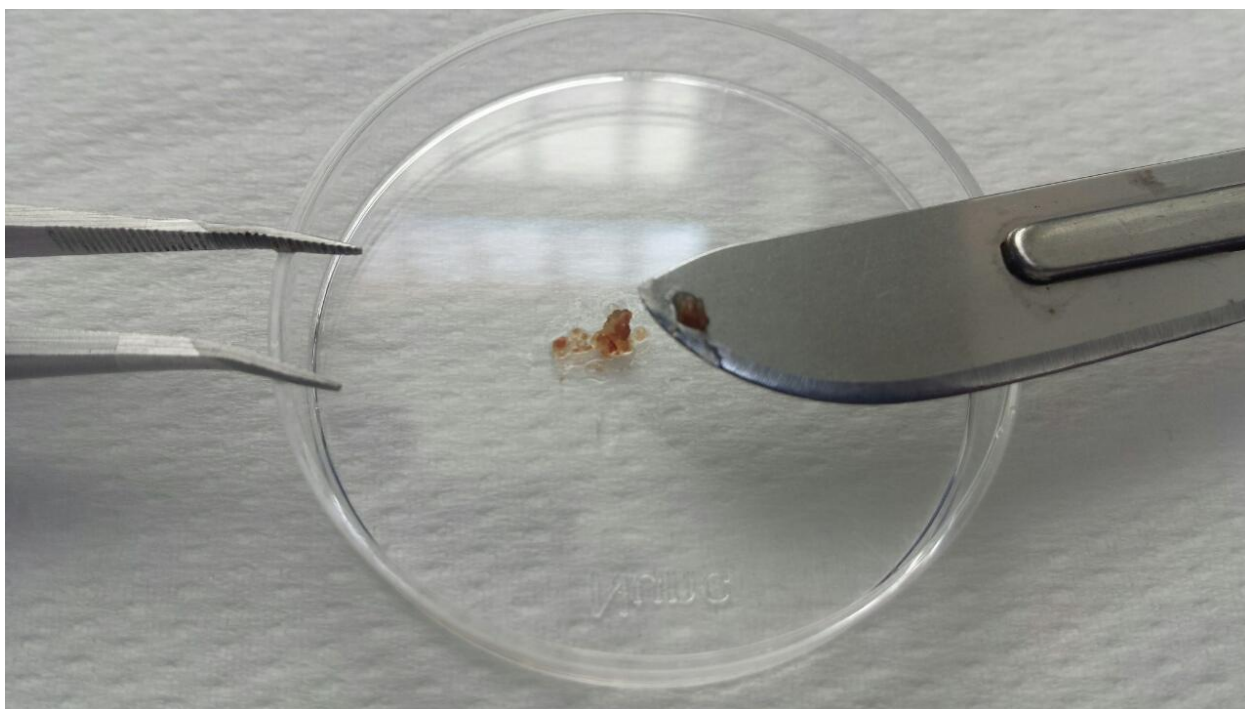
Nastavak izolacije RNK se vrši po *NucleoSpin®RNA* protokolu:

- Za liziranje ćelija dodati 350 µl RA1 pufera i 3.5 µl β-merkaptioetanol (β-ME) na prethodno istaložene leukocite i jako izvorteksirati.

- Redukovati viskoznost i pročistiti lizat filtriranjem kroz NucleoSpin® filtar sa ljubičastim prstenom. Staviti NucleoSpin® filtar u kolekcijsku tubicu (Collection Tube) od 2 ml, dodati smjesu i centrifugirati 1 minut na 11000 g (*Nüve NF 048*).
- Odbaciti NucleoSpin® filtar, dodati u kolekcijsku tubicu 350 µl 70% etanola za homogenizaciju lizata te pažljivo promiješati pipetom.
- Pipetom prenijeti lizat u NucleoSpin® kolonu sa plavim prstenom koja je smještena u kolekcijsku tubicu. Centrifugirati 30 sekundi na 11000 g. Nakon toga premjestiti kolonu u novu kolekcijsku tubicu (2 ml).
- Dodati 350 µl MDB (*Membrane Desalting Buffer*) i centrifugirati na 11000 g 1 minut da se membrana osuši.
- Pripremiti DNaza reakcijsku smjesu u sterilnu 1.5 ml tubicu koja nije predviđena NucleoSpin®RNA kitom. Za svaku izolaciju dodati 10 µl rekonstruisane rDNaze u 90 µl reakcijskog pufera za rDNazu. Promiješati.
- Dodati 95 µl reakcijske DNaza smjese direktno u centar silika membrane na koloni i inkubirati na sobnoj temperaturi 15 minuta.
- Oprati i osušiti silika membranu:
 1. Prvo pranje: dodati 200 µl RAW2 pufera na NucleoSpin® RNK kolonu. Centrifugirati 30 sekundi na 11000 g. Staviti kolonu u novu kolekcijsku tubicu (ml).
 2. Drugo pranje: dodati 600 µl RA3 pufera na NucleoSpin® RNK kolonu. Centrifugirati 30 sekundi na 11000 g. Odbaciti centrifugat i vratiti kolonu u istu kolekcijsku tubicu.
 3. Treće pranje: dodati 250 µl RA3 pufera NucleoSpin® RNK kolonu. Centrifugirati 2 minute na 11000 g da bi se membrana u potpunosti osušila. Staviti kolonu u *nuclease-free* kolekcijsku tubicu 1.5 ml.
- Izolovati RNK u 60 µl *Rnase-free* H₂O i centrifugirati na 11000 g 1 minut.
- Izolovanu RNK čuvati na -20°C.

3.9. Izolacija RNK iz tkiva (biopsija kolona)

U populacijsko-genetičkoj analizi IBS od velikog značaja je bilo analizirati polimorfizam genske ekspresije odabranih gena. S tim u vezi jedan od ciljeva je bilo prikupljanje tkiva za procjenu lokalno specifičnih tkivnih promjena asociranih sa IBS-om. Biopsija kolona izvršena je na Odjeljenju gastroenterologije i hepatologije Klinike za unutrašnje bolesti u Banjoj Luci. U ispitivanju je izvršeno 16 kolonoskopija pri čemu je uzet uzorak tkiva debelog crijeva. Od ukupno 16 biopsija, 9 je od pacijenata sa IBS-om, a 7 je kontrolnih. Kontrole su bile osobe bez ikakvih tegoba vezanih za IBS, a radile su kolonoskopiju zbog pozitivne porodične anamneze na karcinom debelog crijeva. Veličina bioptata je oko 3x3 mm, a tkivo se neposredno nakon uzimanja stavljalo u tubice sa *Allprotect Tissue Reagent* koji se koristi za brzu stabilizaciju DNK, RNK i proteina u tkivima. Biopsije su čuvane na -20°C do transporta u laboratoriju, gdje se zatim, iz smrznutog tkiva, nakon otapanja vršila najprije homogenizacija tkiva, a zatim i izolacija RNK (Slika 20).



Slika 20: Homogenizacija bioptata kolona veličine oko 3x3 mm prije izolacije RNK

Za postupak izolacije RNK iz tkiva (bioptata kolona), korišten je *Quick-RNA™* MiniPrep Plus kit. Izolacija je vršena po sljedećem protokolu:

- Dodati 300 µl DNK/RNK *Shield*TM na tkivo koje je prethodno blago homogenizovano za optimalnu ekstrakciju.
- Za svakih 300 µl uzorka dodati 30 µl PK *Digestion Buffer* i 15 µl *Proteinase K*.
- Promiješati i inkubirati na 55°C oko 5 sati dok se tkivo ne rastopi.
- Nakon inkubacije vorteksirati uzorak, a zatim centrifugirati na maksimalnoj brzini 2 minute (centrifuga *Nüve NF 048*). Prebaciti tečni supernatant u *RNase free* tube koje nisu predviđene ovim kitom.
- Dodati jednaku količinu RNA Lysis pufera i dobro promiješati.
- Prebaciti lizirani uzorak u *Spin-Away*TM filtere (žuti) u kolekcijske tube i centrifugirati kako bi se odstranila većina gDNK. Sačuvati ono što ostane u tubama nakon centrifugiranja.
- Dodati apsolutni etanol 1V u tube i dobro promiješati.
- Prebaciti smjesu u *Zymo-Spin*TM IIICG kolone smještene u kolekcijske tube i centrifugirati. Odbaciti centrifugat.
- Dodati 400 µl *RNA Prep* pufera na kolonu i centrifugirati 1 minutu. Odbaciti centrifugat.
- Dodati 700 µl *RNA Wash* pufera na kolonu i centrifugirati 1 minutu. Odbaciti centrifugat.
- Dodati 400 µl *RNA Wash* pufera na kolonu i centrifugirati 2 minute. Prebaciti kolonu u *Rnase-free* tubu koja nije predviđena ovim kitom.
- Dodati 100 µl *DNase/Rnase-free* vode direktno na kolonu i centrifugirati 1 minut.
- Izolovana RNK se može koristiti odmah ili čuvati na -70°C.

3.10. Određivanje koncentracije RNK

Određivanje koncentracije RNK je vršeno uz pomoć *Qubit 2.0 Fluorometer*, instrumenta za kvantifikaciju DNK, RNK i proteina u različite svrhe. Za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina i proteina koriste se boje fluorescencije, a princip se temelji na mjerenju prirodne apsorpcije svjetlosti na 260 nm za nukleinske kiseline i 280 nm za proteine. Što je više DNK, RNK ili proteina u uzorku, više će se svjetla apsorbovati.

Za određivanje koncentracije RNK korišteni su *Qubit Reagent 1* x n µl i *Qubit Buffer* 199 x n µl (n-broj uzoraka i broj standarda). Njihovim miješanjem dobijen je *Qubit Working Solution* koji se razlijeva u tubice:

- 10 µl standard I + 190 µl *Qubit Working Solution*
- 10 µl standard II + 190 µl *Qubit Working Solution*
- 1 µl uzorka RNK + 199 µl *Qubit Working Solution*

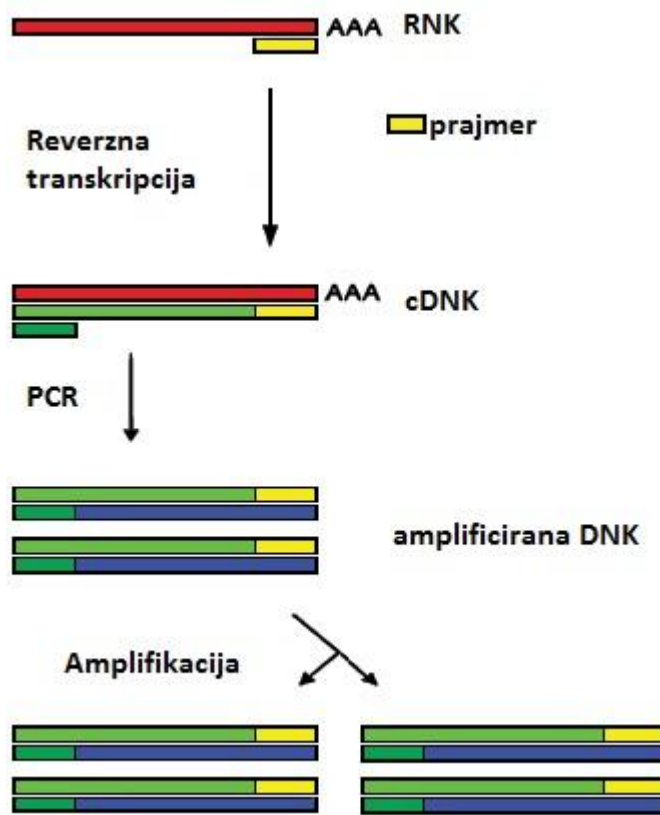
Nakon razlijevanja neophodno je snažno promućkati tubice (vorteksirati) 2-3 sekunde, a zatim inkubirati na sobnoj temperaturi 2 minute. Poslije inkubacije, koncentracija DNK, RNK ili proteina mogu se očitati uz pomoć *Qubit 2.0* fluorometra kroz nekoliko sekundi.

3.11. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction je reverzna transkripcija lančane reakcije polimeraze (RT-PCR) je veoma osjetljiva metoda za detekciju informacione RNK iz uzoraka ograničene količine tkiva. U pitanju je složena tehnika kod koje postoje određeni problemi vezani za njenu osjetljivost, reproducibilnost i specifičnost, a kao kvantitativna metoda nailazi na probleme svojstvene za PCR (optimalne temperature hibridizacije prajmera, dužine elongacije ili reakcije i sl.). Uspješna primjena zavisi od razumijevanja praktičnih problema i pažljivog dizajniranja eksperimenta što je neophodno za preciznu kvantifikaciju transkripcije gena.

Budući da se RNK ne može koristiti kao matrica za PCR, kao prvi korak je obrnuta transkripcija RNK u komplementarnu cDNK, nakon čega slijedi njena eksponencijalna amplifikacija u PCR reakciji. Obično ovo podrazumijeva upotrebu RNK i DNK zavisne polimeraze bilo u posebnim reakcijama (dva enzima/dvije tube) ili u jednoj reakciji (dva enzima/jedna tuba). Reverzna transkriptaza ili RNK zavisna DNK polimeraza je DNK polimerazni enzim koji sintetiše, odnosno transkribuje jednonlančanu RNK u jednonlančanu cDNK. Ona takođe resintetiše i drugi DNK lanac koji je komplementaran cDNK, a enzim se naziva reverznim zbog toga što normalna transkripcija obuhvata sintezu RNK iz DNK. U reakciji se koristi kratki prajmer komplementaran 3' kraju za sintezu prvog lanca cDNK koja

se dalje upotrebljava kao matrica za umnožavanje željenog fragmenta PCR metodom (Slika 21).



Slika 21: Shematski prikaz reverzne transkripcije lančane reakcije polimeraze

Nakon ekstrakcije RNK urađena je reakcija reverzne transkripcije, odnosno sinteza dvolančane DNK od jednolančane RNK. Komplementarna DNK ili cDNK koja nastaje ovim putem je pogodna za kvantitativno određivanje PCR produkta pomoću *Real-Time* PCR. Transkripcija je urađena pomoću *ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit* proizvođača *New England BioLabs_{Inc}* na *Mastercycler gradijent Eppendorf* PCR uređaju.

Protokol za sintezu prvog lanca cDNK:

Komponente	Volumen
Total RNK	1-6 μ l (10 pg-1 μ g)
D(T) ₂₃ VN(50 μ M)	2 μ l
H ₂ O bez nukleaza	različito
Ukupni volumen	8 μ l

1. Denaturisati RNK na 70°C 5 minuta. Kratko spinovati i staviti na led.
2. Dodati sljedeće komponente u tubice:
 - M-MuLV reakcijski miks 10 μ l
 - M-MuLV enzimski miks 2 μ lZa negativnu kontrolu dodati sljedeće komponente:
 - M-MuLV reakcijski miks 10 μ l
 - H₂O 2 μ l
3. Inkubirati 20 μ l cDNK jedan sat na 42°C.
4. Inaktivirati enzim 5 minuta na 80°C. Razrijediti sa vodom za PCR.
5. cDNK čuvati na -20°C.

Sastav reakcijske smjese za prevođenje RNK u cDNK prikazan je u Tabeli 13.

Tabela 13: Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju

10 x RT pufer	2.0 μ l
25 x dNTP	0.8 μ l
RT prajmeri ili dT	2.0 μ l
RT transkriptaza (<i>multiscribe reverse transcriptase</i>)	1.0 μ l
RNK inhibitor	1.0 μ l
H ₂ O	3.2 μ l
+ 10 μ l RNK	

3.12. Real Time PCR

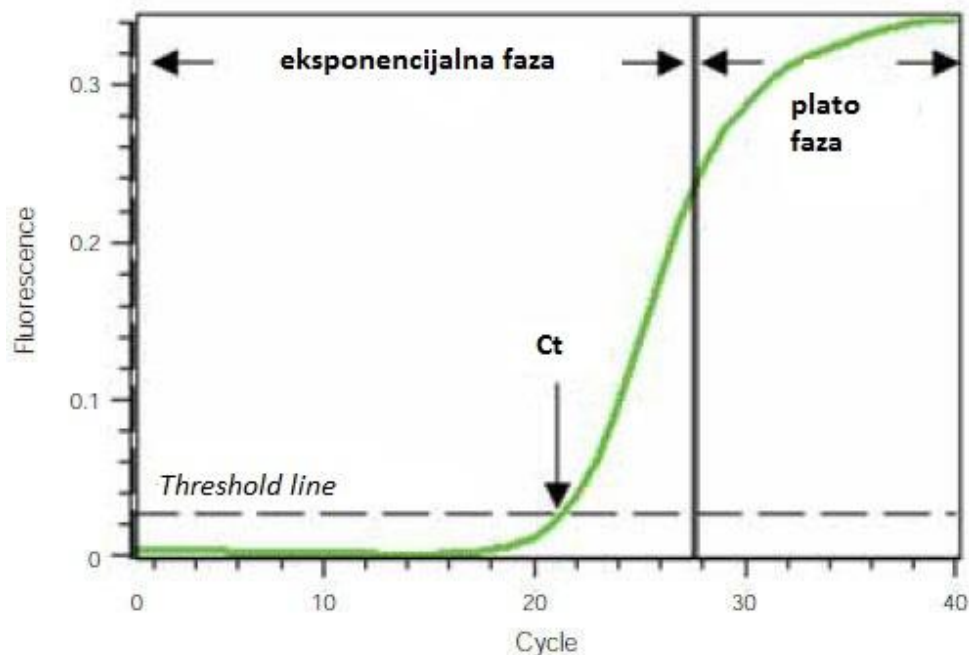
Klasična metoda reverzne transkripcije PCR (RT-PCR) je semikvantitativna, te je potreba za preciznijom kvantifikacijom iRNK dovela do razvoja nove tehnike nazvane lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (eng. *Real-Time Polymerase Chain Reaction, Real-Time PCR*). To je precizna i pouzdana metoda za kvantifikaciju specifičnih molekula DNK, a za reakciju su potrebne veoma male količine iRNK što omogućava upotrebu ove metode kod veoma malih količina uzoraka.

Real-Time PCR je metoda koja kombinuje konvencionalnu PCR metodu i fluorimetriju. Metoda je nastala devedesetih godina prošlog vijeka i omogućava praćenje PCR reakcije iz ciklusa u ciklus. Detekcija PCR produkata je moguća zahvaljujući fluorescentnim molekulima koji prate povećanje DNK tako što proporcionalno povećavaju fluorescentni signal. Fluorescentna hemija koja se koristi u ove svrhe podrazumijeva boje koje se specifično vezuju za dvolančanu DNK, kao i specifične probe i prajmere obilježene bojama koje imaju sposobnost fluorescencije. Takođe, za Real-Time PCR neophodni su specijalizovani aparati koji imaju detektore fluorescencije za praćenje amplifikacije kroz cikluse. Ova tehnologija je danas našla široku primjenu za kvantifikaciju genske ekspresije, kao i za detekciju mutacija i polimorfizama (<http://www.bio-rad.com/en-ba/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr>). U ovom radu korišten je *7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems* (Slika 22).



Slika 22: 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems)

Princip metode se zasniva na kontinuiranom praćenju porasta fluorescencije kroz cikluse, a koja je proporcionalna umnoženom PCR fragmentu. Kao rezultat umnožavanja dobija se grafikon (eng. *amplification plot*) sa amplifikacijskom krivom (Slika 23).



Slika 23: Grafikon amplifikacije, preuzeto i modifikovano sa <http://www.bio-rad.com/en-ba/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr>

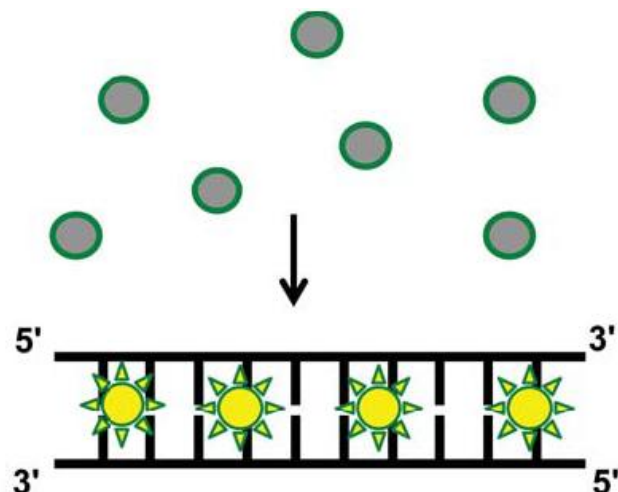
Na ovom grafikonu broj ciklusa je prikazan na x osi, a fluorescencija iz reakcije umnožavanja na y osi. Mogu se vidjeti dvije faze: eksponencijalna i plato faza. Tokom eksponencijalne faze količina PCR produkata se približno udvostručava u svakom ciklusu, međutim, kako reakcija napreduje, komponente u reakciji se troše i neke od njih postaju ograničavajuće. Tada reakcija usporava i ulazi u plato fazu (ciklus 28-40). U inicijalnim ciklusima (ciklusi 1-18), fluorescencija ostaje na bazalnom nivou (eng. *background*) i njeno povećanje se ne detektuje, iako se produkti reakcije eksponencijalno nakupljaju. Kada se dovoljno umnoženog produkta nakupi, proizvede se detektabilan fluorescentni signal. Ciklus u kome se ovo dešava se naziva granični ciklus (eng. *threshold line*) Ct. Vrijednost Ct je određena količinom početne matrice i ukoliko je njena količina mala, više ciklusa će biti potrebno da fluorescentni signal pređe bazalni nivo, te će i sama reakcija imati viši Ct. Dakle, ukoliko neke cDNK ima više u uzorku, ranije će se umnožiti i prije preći prag detekcije, te će

njena Ct vrijednost biti niža, dok će uzorak sa manje cDNK kasnije preći prag detekcije i njegova Ct vrijednost će biti viša. Ovaj odnos čini osnovu kvantitativnog aspekta *Real-Time* PCR.

Real-Time PCR se koristi za apsolutnu ili relativnu kvantifikaciju DNK/RNK. Apsolutnom kvantifikacijom možemo precizno odrediti broj kopija RNK u nekom uzorku upoređujući fluorescenciju sa standardnom krivuljom. Relativnom kvantifikacijom mogu se analizirati relativne promjene u količini transkripta. Ova metoda nalazi sve veću primjenu u SNP analizama u molekularnoj genetici u testiranju rizika za oboljevanje od određene bolesti, kao i kod testiranja mogućeg odgovora na terapiju kod pojedinaca.

Postoje dva tipa hemijskih komponenti koje se koriste za *Real-Time* PCR, a to su specifične i nespecifične. Specifična detekcija sekvenci razlikuje sekvencu od interesa od prajmer-dajmer ili nespecifične amplifikacije, dok nespecifična detekcija bilježi sve dvostruko povećane DNK proizvedene tokom reakcije.

Sybr green[®] predstavlja najjednostavniji i najekonomičniji izbor za *Real-Time* detekciju produkata. Ova fluorogenska interkalirajuća boja vezana je za prigušivač (*Q- quencher*), a emituje jak fluorescentni signal tek nakod odvajanja od njega, odnosno kada se veže za dvolančanu DNK, dok slobodna nevezana boja u smjesi pokazuje malo fluorescencije koja se ne može detektovati (Slika 24). Mjerenjem fluorescencije mjeri se DNK koja je nastala, jer je količina fluorescencije srazmjerna količini PCR proizvoda. Nakon završene reakcije, softver može da izračuna i krivu taljenja (eng. *melting-curve*), pri čemu se mjeri fluorescencija u odnosu na temperaturu. Tako *Real-Time* PCR mjeri i tačku taljenja (*melting point*) novonastalog proizvoda, kada se dva lanca odvoje i fluorescencija naglo prestaje. Ovim se provjerava specifičnost produkta jer svi produkti za specifičan par prajmera moraju imati istu krivu taljenja. *Sybr green*[®] se može koristiti za bilo koji cilj sa bilo kojim parom prajmera, bez potrebe za dodatnim fluorescentnim označavanjem oligonukleotida. Njegov glavni nedostatak je taj da se na ovaj način detektuju i specifični i nespecifični DNK proizvodi. Za razliku od *Real-Time* PCR metode koja koristi *Sybr green*[®], metoda koja koristi *Taqman*[®] hemiju zasniva se na korištenju neobilježenih specifičnih prajmera i specifične obilježene probe. Ova metoda se koristi za analizu ekspresije gena, ali i za SNP analizu u kojoj se koriste dvije specifične i različito obilježene probe.



Slika 24: Nespecifična detekcija uz pomoć Sybr green-a

Sybr green miks korišten u ovom radu sadrži pufer, dNTP, termostabilnu DNK polimerazu i *Sybr green* boju. U mastermiks, pored *Sybr green*-a, dodavani su još PCR prajmeri (*F* i *R*) i cDNK uzoraka.

3.12.1. Konstitutivni ili *Housekeeping* geni kao referentni geni u analizi relativne genske ekspresije

Postoji nekoliko alternativnih postupaka normalizacije ove procedure, ali najčešće je korištena normalizacija uz pomoć „gena domaćina“ ili *housekeeping* gena koji se regularno nalaze u svim ćelijama bez obzira na pol, dob ili zdravstveno stanje osobe. To su visoko konzervativni geni koji su stabilni, na njima se mutacije rijetko dešavaju a imaju i visoku ekspresiju u tkivima. Ovi „kontrolni“ geni se koriste kako bi se ispravile eventualne razlike u početnoj koncentraciji uzorka, a sve Ct vrijednosti se normaliziraju prema vrijednostima *housekeeping* gena jer je njihova karakteristika da im je ekspresija veoma stabilna u svim tkivima u bilo kojem trenutku ili stanju organizma.

Najčešće korišteni referentni geni su 18S RNK, β aktin (BA), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH), β -2-mikroglobulin (B2M), hipoksantin fosforibozil transferaza 1 (HPRT1), ubikvitin C i drugi. U ovom radu konkretno kao referentni konstitutivni gen korišten je gen za β -aktin (HGNC: [132](#) Ensembl: [ENSG00000075624](#) OMIM: [102630](#)).

3.13. Izbor gena za analizu ekspresije, prajmeri i njihova optimizacija

Izbor mogućih gena kandidata za analizu ekspresije gena kod sindroma iritabilnog kolona izvršeno je na osnovu detaljnog pregleda opsežne literature iz oblasti genetike gastrointestinalnih oboljenja. U ovom radu analizirani su geni: TNFSF15, P2RY4, VIP, GUCA2B, PDZD3 i NR1H4.

3.13.1. TNFSF15 (Tumor necrosis factor ligand superfamily member 15)

Alternativni nazivi i simboli: *TNF15*; *TNF ligand-related molecule 1*; *TL1*; *Vascular endothelial growth inhibitor*; *VEGI*. Gen se sastoji od 4 kodirajuća egzona, a detaljniji opis gena dat je u Tabeli 14.

Tabela 14: Opis TNFSF15 gena (http://www.proteinatlas.org/ENSG00000181634-TNFSF15/tissue#gene_information)

Naziv gena	TNFSF15, Tumor necrosis factor ligand superfamily, member 15 (HGNC Symbol)
Sinonimi	MGC129934, MGC129935, TL1, TL1A, VEGI, VEGI192A
Citogenetička lokacija	9q32
Hromozomska lokacija (bp)	114784635 - 114806126
Ensembl	ENSG00000181634 (version 83.38)

Povećana ekspresija ovoga gena pronađena je u različitim tkivima, a u gastrointestinalnom traktu nalazi se u pljuvačnim žlijezdama, jednjaku, želudcu, tankom i debelom crijevu i kolonu.

Protein koji je kodiran ovim genom je citokin koji pripada tumor nekroznim faktorima (TNF) ligand porodice. Ovaj protein se jako eksprimira u endotelijalnim ćelijama, ali ne i u ćelijama T i B limfocita. Ekspresija proteina indukovana je TNF i IL-1alfa. Ovaj citokin je ligand za TNFRSF25 receptor i lažni receptor TNFRSF21/DR6. Može aktivirati NF-kappaB i MAP kinaze, i djelovati kao autokrini faktor za indukovanu apoptozu u ćelijama endotelijuma. Za TNFSF15 je takođe utvrđeno da inhibira proliferaciju endotelijalnih ćelija, te na taj način

može da funkcioniše i kao inhibitor angiogeneze. Pronađene su dvije transkriptne varijante koje kodiraju različite izoforme ovoga gena (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9966>).

TNFSF15 je bio prvi identifikovan gen asociiran sa Kronovom bolesti u praćenju 72 738 tačkastih polimorfizama (SNP) u japanskoj populaciji. Ova asocijacija je potvrđena i u studiji korejske kohorte i kohorte sjedinjenih američkih država, kao i u meta-analizi GWAS-ove studije kod evropske populacije (Lee et al, 2015). Takođe je dokazana jaka asocijacija sedam tačkastih mutacija (rs10114470, rs3810936, rs6478108, rs4263839, rs6478109, rs7848647 i rs7869487) na ovom genu sa Kronovim oboljenjem i ulcerativnim kolitisom kod indijske populacije (Baskaran et al, 2014).

3.13.2. P2RY4 (Pyrimidinergetic receptor P2Y4)

Produkt ovog gena je protein koji pripada porodici receptora vezanih za G-protein. Ova porodica ima nekoliko podtipova receptora sa različitom farmakološkom aktivnošću koja se u nekim slučajevima preklapa za različite adenozin i uridin nukleotide. Taj receptor reaguje na uridin nukleotide, djelimično na ATP, a ne reaguje na ADP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=5030>). Gen se nalazi na X polnom hromozomu, a detaljniji opis gena dat je u Tabeli 15.

Tabela 15: Opis P2RY4 gena (http://www.proteinatlas.org/ENSG00000186912-P2RY4/tissue#gene_information)

Naziv gena	P2RY4, pyrimidinergetic receptor P2Y4 (HGNC Symbol)
Sinonimi	NRU, P2P, P2Y4, UNR
Citogenetička lokacija	Xq13.1
Hromozomska lokacija (bp)	70258170 - 70259764
Ensembl	ENSG00000186912 (version 83.38)

Funkcija gena takođe može biti vezana i za imunološki sistem P2Y receptora, u regulaciji matičnih ćelija i ulogu u neuroimunoj funkciji. Identifikovane su dvije varijante transkripta koje kodiraju isti protein. Povećana ekspresija ovoga gena pronađena je u tankom crijevu.

3.13.3. VIP (Vasoactive intestinal peptide)

Vazoaktivni intestinalni peptid je član glukagon-sekretin porodice koja uključuje glukagon, sekretin i gastrični intestinalni peptid. Pokazuje širok raspon bioloških djelovanja kao što je relaksacija glatke muskulature, stimulacija sekrecije vode i elektrolita u crijevima, te oslobađanje inzulina, glukagona i nekoliko hormona prednjeg režnja hipofize.

Kloniranjem DNK sekvence komplementarne sa iRNK koja kodira vazoaktivni intestinalni peptid, ustanovljeno je da VIP prekursor ne sadrži samo VIP, nego i novi peptid od 27 aminokiselina nazvan PHM27 koji ima N-terminalni histidin i C-terminalni metionin. Razlikuje se od PHI17 izolovanog iz intestinuma svinje u dvije aminokiseline. PHI17, kao što se može vidjeti iz naziva, ima C-terminalni izoleucin. Primarni transkript iRNK ima 20 kD, a iRNK koja kodira VIP ima molekulska masu 17.5 kD. Istraživanja ekspresije gena kod pacova vršena su specifičnom sondom u mozgu i duodenumu, a ekspresija kodirajuće iRNK otkrivena je u nekoliko područja u mozgu uključujući hipokampus, korteks, kolikulum, *bulbus olfactorius*, talamus i hipotalamus (<https://www.omim.org/entry/192320#text>).

In situ hibridizacijskim tehnikama Gozes i saradnici su 1987. godine locirali VIP gen na hromozomu 6. Detaljniji opis gena dat je u Tabeli 16.

Tabela 16: Opis VIP gena (http://www.proteinatlas.org/ENSG00000146469-VIP/tissue#gene_information)

Naziv gena	VIP, Vasoactive intestinal peptide (HGNC Symbol)
Sinonimi	
Citogenetička lokacija	6q25.2
Hromozomska lokacija (bp)	152750798 - 152759765
Ensembl	ENSG00000146469 (version 83.38)

Povećana ekspresija ovoga gena nalazi se u slijepom crijevu, kolonu, rektumu i glatkoj muskulaturi tankog crijeva.

Epidemiološke studije su pokazale da su pedijatrijski pacijenti sa sindromom iritabilnog kolona, kao i odrasli, bili prethodno izloženi psihološkom ili inflamatornom stresu. Li i

saradnici (2013) su istražili ćelijske mehanizme glatkih mišića kolona kod odraslih štakora podvrgnutih neonatalnoj upali dajući im 2,4,6-trinitrobenzin za indukovanje upale kolona. Pokazano je da je kod polovine jedinki značajno povećana ekspresija α_{1C} subjedinice kalcijumovih kanala, a to su bile iste jedinke kod kojih je VIP iRNK povećana u spoljašnjim mišićima debelog crijeva. Zaključeno je da neonatalna upala povećava VIP u debelom crijevu koji dalje moduliše epigenetičke događaje na promotoru za aktiviranje transkripcije α_{1C1b} gena. Upala u ranijem periodu života može da bude uzok disfunkcije glatkih mišića kod odraslih, što ide u prilog izmijenjenom crijevnom motilitetu kod dijareja predominantnih IBS pacijenata (Li et al, 2013).

Vazoaktivni intestinalni peptid nedavno je prepoznat kao obećavajuća terapijska meta obzirom na njegovu ulogu u motilitetu crijeva i varenju. VIP ima široku distribuciju u organizmu, te se nalazi u srcu, plućima i digestivnom traktu. Takođe, ima mnoge fiziološke efekte uključujući endokrinu i egzokrinu sekreciju, neuroprotektivnu ulogu, ulogu u diferencijaciji ćelija i imunom odgovoru. Zbog snažnog antiinflamatornog dejstva, mogući je kandidat u terapiji nekoliko hroničnih upalnih bolesti kao što su reumatozni artritis i astma. Takođe, veoma je snažan relaksant crijevne muskulature, a njegova disregulacija je prijavljena kod nekoliko gastrointestinalnih poremećaja (Del Valle-Pinero et al, 2015).

3.13.4. GUCA2B (Guanilate cyclase activator 2B)

GUCA2B je endogeni aktivator intestinalne gvanilat ciklaze i stimuliše enzim kroz istu regiju vezivanja receptora kao i enterotoksini stabilni na toplotu. Može biti potencijalni fiziološki regulator crijevne tečnosti i elektrolita. GUCA2B gen se sastoji od 3 egzona, a fluorescentnom *in situ* hibridizacijom je lociran na p kraku hromozoma 1 (Miyazato et al, 1997). Povećana ekspresija ovoga gena nalazi se u tankom crijevu i kolonu. Detaljniji opis gena dat je u Tabeli 17.

Tabela 17: Opis *GUCA2B* gena (http://www.proteinatlas.org/ENSG00000044012-GUCA2B/tissue#gene_information)

Naziv gena	GUCA2B Guanylate cyclase activator 2B (uroguanylin) (HGNC Symbol)
Sinonimi	
Citogenetička lokacija	1p34.2
Hromozomska lokacija (bp)	42153421 - 42155824
Ensembl	ENSG00000044012 (version 83.38)

3.13.5. PDZD3 (PDZ domain containing 3)

Guanilil ciklaza C (GCC ili GUCY2C) proizvodi cGMP nakon vezivanja bilo endogenih liganada ili toplotno stabilnih enterotoksina koje luče *E. coli* ili druge enteričke bakterije. Aktivacija GCC inicira signalnu kaskadu koja dovodi do fosforilacije regulatora transmembranske provodljivosti, nakon čega dolazi do ispuštanja jona i vode u crijevni lumen. GUCA2B je regulatorni protein koji veže GCC i reguliše količinu cGMP proizvedenog nakon stimulacije receptora. Detaljniji opis gena dat je u Tabeli 18.

Tabela 18: Opis *PDZD3* gena (http://www.proteinatlas.org/ENSG00000172367-PDZD3/tissue#gene_information)

Naziv gena	PDZD3 PDZ domain containing 3 (HGNC Symbol)
Sinonimi	FLJ22756, IKEPP, PDZK2
Citogenetička lokacija	11q23.3
Hromozomska lokacija (bp)	119185457 - 119190223
Ensembl	ENSG00000172367 (version 83.38)

Scott i saradnici su 2002. godine klonirali PDZD3 protein iz cDNK crijeva. Dobijen je polipeptid od 505 aminokiselina molekularne mase 54.2 kD koji sadrži 4 domena koji grade PDZ protein. PDZD3 je najbliži PDZK1, a sa mišijim natrijum anorganskim fosfatnim kotransporterom tipa IIa (SLC34A1) dijeli 77% identičnosti. *Northen blot* analiza otkrila je povećanu ekspresiju PDZD3 transkripata u bubrezima i nešto nižu u tankom i debelom crijevu. *Dot blot* analiza višestrukih gastrointestinalnih tkiva otkrila je ekspresiju gena cijelom dužinom gastrointestinalnog trakta. Imunolokalizacijske studije su pokazale da se PDZD3 nakuplja u subapikalnom odjeljku i apikalnoj membrani u ćelijama karcinoma debelog crijeva. U zdravim ćelijama ileuma i debelog crijeva kod čovjeka, protein se preferencijalno nakuplja na gornju površinu kripti i vilusa (<https://www.omim.org/entry/607146#description>).

3.13.6. NR1H4 (Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4)

Gen NR1H4 kodira receptor farnesoid X (FXR) koji može da detektuje nivo žučne kiseline. Povišeni nivo žučne kiseline aktivira FXR koji indukuje smanjivanje biosinteze žučne kiseline u hepatocitama. NR1H4 je član superfamilije nuklearnog receptora ligand-aktiviranog transkripcionog faktora (<https://www.omim.org/entry/603826#description>).

Gen NR1H4 se sastoji od 11 egzona, 5'UTR sadrži TATA box, a inicijalni kodon nalazi se unutar 3' regije egzona 3. Alternativni egzon 3a kodira FXR-beta varijantu koji ima N-terminalnu sekvencu. U nekim FXR transkriptima pronađena je insercija od 12 baznih parova kao rezultat alternativnog splajsinga u egzonu 5. Detaljniji opis gena dat je u Tabeli 19.

Tabela 19: Opis NR1H4 gena (http://www.proteinatlas.org/ENSG00000012504-NR1H4/tissue#gene_information)

Naziv gena	NR1H4 Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4 (HGNC Symbol)
Sinonimi	FXR, HRR-1, HRR1, RIP14
Citogenetička lokacija	12q23.1
Hromozomska lokacija (bp)	100473708 - 100564413
Ensembl	ENSG00000012504 (version 83.38)

3.13.7. Prajmeri i optimizacija

Visokoprečišćeni prajmeri za gene od interesa i za referentni gen proizvedeni su komercijalno od strane *BioTeZ Berlin-Buch GmbH*, Njemačka. Prajmeri korišteni u ovome radu su prikazani u Tabeli 20.

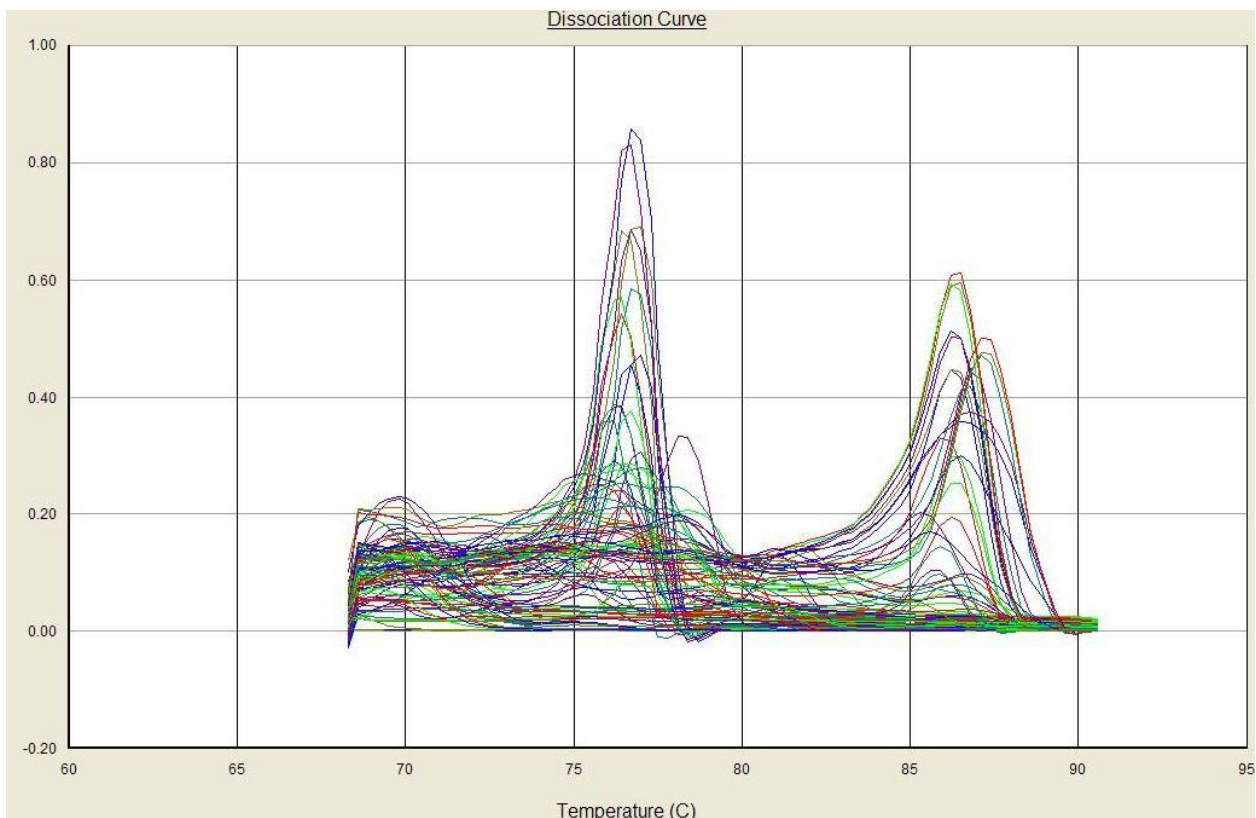
Tabela 20: Prajmeri korišteni u kvantitativnom Real-Time eksperimentu. Oznaka *F* označava „forward“, odnosno 5'→3' smjer sekvence gena, a oznaka *R* označava „reverse“, odnosno 3'→5' smjer sekvence gena.

Gen	Prajmeri	Veličina produkta
TNFSF15	F - AGAGCAGACGGAGATAAGCC R - CGGAATGTGACCTGGGAGTA	203 bp
P2RY4	F - GGAGCTGGACTGTTGGTTTG R - GAACATGTAGGTGGCCGTTG	157 bp
VIP	F - CTTGGGTCAACTTTCTGCCA R - CCTCACTGCTCCTCTTTCCA	197 bp
GUCA2B	F - AGAAGCTGAGTGACCTGGAG R - CAACGTTACACACAGCTCA	195 bp
PDZD3	F - CGTCTCTTCATCTCCCAGGT R - CTTCAGGCAGAGGGGTGG	162 bp
NR1H4	F - GCAGCCTGAAGAGTGGTACT R - ACACAGCTCATCCCCTTTGA	157 bp

Optimizacija temperature vezivanja prajmera izvedena je na *Mastercycler Gradient* aparatu. Prajmeri su testirani u rasponu temperatura 56-61°C, a kao optimalna temperatura za sve prajmerske parove bila je 57°C za VIP i 60°C za ostale gene.

Prije same kvantifikacije neophodno je izvesti eksperiment validacije prajmera u kojem se može vidjeti da li se odabrani i referentni geni mogu amplificirati u istim uslovima.

Validaciona kriva se dobija istovremenom amplifikacijom oba prajmerska para sa istom matricom od koje se pravi serija razblaženja 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01. Osim validacione krive, kao mjera kontrole funkcionalnosti i specifičnosti prajmera služi i kriva disocijacije prajmera. Kriva disocijacije predstavlja specifičnost vezivanja prajmera za gene od interesa. Na slici su prikazane dvije amplitude koje označavaju vezivanje dva prajmerska para gdje se može vidjeti da nema nikakvih odstupanja (Slika 25).



Slika 25: Krive disocijacije

Nakon provjere prajmera vršilo se mjerenje genske ekspresije za gene od interesa. U Tabeli 21. prikazane su sintetske komponente za TNFSF15, P2RY4, VIP, GUCA2B, PDZD3 i NR1H4 gene, kao i za β aktin. Za svaku reakciju pravljena su dva miksa, jedan za referentni gen, a drugi za gen od interesa, i to za sve pacijente i kontrole kako iz krvi, tako i iz bioptata. Takođe, treba napomenuti da su svi uzorci amplificirani u duplikatu radi reprezentativnosti rezultata.

Tabela 21: Sintetske komponente za TNFSF15, P2RY4, VIP, GUCA2B, PDZD3, NR1H4 i β aktin

Sybr green	5 μ l
Prajmer F	0.1 μ l
Prajmer R	0.1 μ l
H ₂ O	3.8 μ l
+ 1 μ l cDNK	

3.14. Statističke metode

3.14.1. χ^2 test

Hi kvadrat test (eng. *Chi-squared test*) se koristi u slučajevima kada se radi o kvalitetnim podacima ili ako podacima distribucija značajno odstupa od normalne. Ovaj test je veoma praktičan te se koristi kada želimo utvrditi da li neke dobivene frekvencije odstupaju od onih koje očekujemo pod određenom hipotezom.

3.14.2. Fisher exact test

Ispitivanje povezanosti odabranih genetičkih polimorfizama i pojave oboljenja IBS-a vršeno je Fišerovim egzaktnim testom (*Fisher exact test*) u sklopu programa MedCalc 17.4.4. Fišerov egzaktni test je test statističke značajnosti za male uzorke koji se koristi kada se slučaj ili situacija ne mogu predvidjeti, a značaj odstupanja od nulte hipoteze (P vrijednost) može tačno da se izračuna. Ovaj test je korišten za alelne, genotipske i haplotipske asocijacije, a kao nivo signifikantnosti uzet je $P=0,05$.

3.14.3. Hardi-Vajnbergov ekvilibrijum (HWE)

Hardi-Vajnbergov ekvilibrijum predstavlja zakonitost idealnih populacija u kojoj frekvencije gena i genotipova teže da zadrže ravnotežno stanje i da budu nepromijenjene iz generacije u generaciju. Ako postoji djelovanje nekih evolutivnih faktora, kao što su mutacije, genetički drift, selekcija i migracije, te ako nije prisutna panmiksija odnosno slučajno

sparivanje, tada dolazi do remećenja ravnoteže u genotipskoj i alelnoj frekvenciji. U statističkoj populaciji remećenje ravnoteže može da znači postojanje povezanosti određenih genetičkih markera sa ispitivanim svojstvom ili stanjem.

3.14.4. REST-Relative expression software tool

Reverzna transkripcija u realnom vremenu praćena lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR) nudi visoku osjetljivost i širok spektar kvantifikacije, te predstavlja najpogodniji metod za detekciju i kvantifikaciju iRNK. Danas se sve više koristi ovaj metod relativne ekspresije, gdje je ekspresija ciljnog gena standardizovana referentnim genom. Razvijeno je nekoliko matematičkih algoritama za izračunavanje odnosa ekspresije na osnovu efikasnosti Real-Time PCR i odstupanja uzorka u odnosu na kontrolu. Međutim, većina dostupnih modela za izračunavanje relativne ekspresije dozvoljavaju računanje transkripcijske razlike između jedne kontrole i jednog uzorka. Novi softverski alat nazvan REST[®] (*Relative Expression Software Tool*) mogu da upoređuju dvije ili više posmatranih grupa ili stanja (REST-MCS) sa do stotinu različitih podataka u kontrolnoj grupi (REST-XL), a takođe može se koristiti za više referentnih gena i do 15 gena od interesa (REST-384). Primijenjeni matematički model zasnovan je na korekciji efikasnosti PCR i srednje vrijednosti devijacije između grupe uzoraka i kontrolne grupe. Nakon toga se provjerava rezultat odnosa ekspresije ispitivanih transkripata sa *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*[©] i određuje pomoću procjene standarne greške složenim Taylor algoritmom (Pfaffl et al, 2002).

3.14.5. Korelacije

Korelacijama se analizira stepen povezanosti (zavisnosti, asocijacije ili odnosa) dvije ili više varijabli. Povezanost ili asocijacija među varijablama podrazumijeva da veličinu jedne varijable je moguće predvidjeti na temelju poznavanja druge. Slučajno promjenljive veličine su povezane ako su promjene u jednoj veličini praćene promjenama u drugoj veličini. Korelacija podrazumijeva analizu jačine i smijera te povezanosti. Koeficijent korelacije izražava veličinu povezanosti među varijablama, a najčešće se koriste Pearsonov i Spearmanov koeficijent korelacije. U ovom radu korišten je Pearsonov koeficijent, a njegove karakteristike su da je to bezdimenzionalna veličina te da se njegove vrijednosti linearne korelacije kreću u intervalu od -1 do 1. Ako je koeficijent korelacije veći ili jednak 0,7, u

pitanju je jaka povezanost; ako se kreće u intervalu 0,3-0,69, radi se o osrednjoj povezanosti; ako je manji od 0,3 riječ je o maloj povezanosti; sve vrijednosti ispod 0,3 govore da nema povezanosti, mada se ovim ne isključuje postojanje nelinearnog oblika povezanosti (interpretacija je ista i za negativne vrijednosti koeficijenta korelacije). Eksploracija odnosa između dvije varijable vrši se grafičkim prikazom, odnosno dijagramom rasipanja (*scatter plot*) čime je moguće sagledati karakteristike povezanosti: smijer (pozitivan ili negativan), jačina i oblik povezanosti. Korelacije između genotipiva i kliničkih parametara u ovoj disertaciji rađena je u sklopu programa MedCalc 17.4.4.

4. REZULTATI

4.1. Formiranje grupa, sakupljanje podataka i uzoraka

U periodu od aprila 2014. do marta 2016. godine prikupljeni su podaci i uzorci za ukupno 29 osoba: 20 pacijenata kod kojih je na osnovu Rim III kriterijuma dijagnostifikovan sindrom iritabilnog kolona i 9 zdravih kontrola bez bilo kakvih gastrointestinalnih tegoba. Dijagnostičku obradu i pacijenata i kontrola izvršio je stručni ljekarski tim pod vodstvom prof. dr. Zorana Mavije na Odjeljenju gastroenterologije i hepatologije Klinike za unutrašnje bolesti Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske u Banjoj Luci. U istraživanje su uključeni žene i muškarci koji su zadovoljili Rim III kriterijum za dijagnostifikovanje sindroma iritabilnog kolona, odnosno oni koji su imali kontinuirane ili rekurentne simptome u trajanju od najmanje tri mjeseca koji podrazumijevaju bol ili nelagodu u abdomenu, pri čemu bol popušta sa defekacijom i/ili, povezana je sa promjenama u frekvenciji stolice i/ili, povezana je sa promjenama u konzistenciji stolice. Takođe, ispitanici koji su formirali grupu pacijenata, imali su pozitivna dva ili više uslova, a to su više od 3 stolice dnevno ili manje od 3 stolice sedmično, sluz u stolici i nadutost ili osjećaj distenzije abdomena. U kontrolnu grupu su uključeni žene i muškarci koji nisu imali nikakvih simptoma koji bi se preklapali sa sindromom iritabilnog kolona, a uglavnom su se javljali na Odjeljenje gastroenterologije zbog sumnje i pozitivne porodične anamneze na karcinom, najčešće debelog crijeva.

Neophodno je naglasiti da je prije same realizacije ovoga projekta u planu bilo da se formiraju kontrolna grupa i grupa pacijenata od po 20 ispitanika, ali zbog složenosti disertacije, te same činjenice da se sakuplja biološki material, uz velike napore prikupljeni su uzorci za 20 pacijenata i 9 zdravih kontrola. Studija je izvršena prema lokalnim standardima u skladu sa evropskim pravom uz potpuno uvažavanje svih osoba koji su bili uključeni u studiju. Svi učesnici u ovoj studiji imali su postojeće odobrenje od Etičkog komiteta koje im je osiguralo da je istraživanje sigurno, značajno, dobro razmotreno i rezonovano. Učesnici su bili jasno informisani o ciljevima istraživanja, o trajanju studije, kao i o mogućim rizicima. Istraživački tim je izvršio studiju u potpunosti u skladu sa odredbama protokola, važećih nacionalnih zakona, kao i pravila i propisa donesenih Helsinškom deklaracijom. Takođe, istraživački tim se obavezao da će sve podatke i informacije koje se odnose na ovu studiju

tretirati kao povjerljive uz potpunu diskreciju učesnika, te da neće otkriti nikakve informacije trećim licima, niti da će se podaci i informacije koristiti za bilo koju drugu svrhu osim za izvođenje studije.

Svi učesnici su najprije prošli informativni razgovor sa ljekarom specijalistom prilikom čega su dobili i pismeno objašnjenje kao i vrijeme za razmatranje o saradnji. Svaki učesnik u studiji je dao pismenu saglasnost potpisivanjem informativnog pristanka, a ljekar specijalista je bio na raspolaganju za bilo kakve dodatne informacije. Nakon potpisivanja informativnog pristanka, pristupilo se popunjavanju standardizovanih upitnika HAD, PHQ 15, GSRS-IBS i VSI. Učesnici u studiji su imali dodatno vremena da pažljivo odgovore na pitanja vezana za podatke o kliničkoj slici, psihološkim aspektima kao i subjektivnoj procjeni bolesti i simptoma. Takođe, ljekar specijalista je zajedno sa učesnicima popunio CRF upitnik koji se odnosio na osnovne identifikacione i demografske podatke, te na pitanja koja su se odnosila na personalnu i porodičnu istoriju. Po ispunjavanju upitnika, svim učesnicima je izvađena krv konvencionalnom metodom. Biopsija je rađena samo u slučajevima kada je osoba morala da prođe endoskopiju, bilo kao dio standardne prakse, ili kao dobrovoljni pristanak u istraživanju (Tabela 22). Svi uzorci koji su prikupljeni, skladišteni su prema specifičnim zahtjevima za svaki uzorak. Svaki uzorak je označen jedinstvenim brojem, a samo je ljekar u mogućnosti da prati broj kroz podatke učesnika u studiji.

Tabela 22: Količina i vrsta bioloških uzoraka u odnosu na ispitivane grupe

	Krv	Biopsije
Pacijenti	20	9
Kontrole	9	7

4.2. Brojnost, polna i starosna struktura

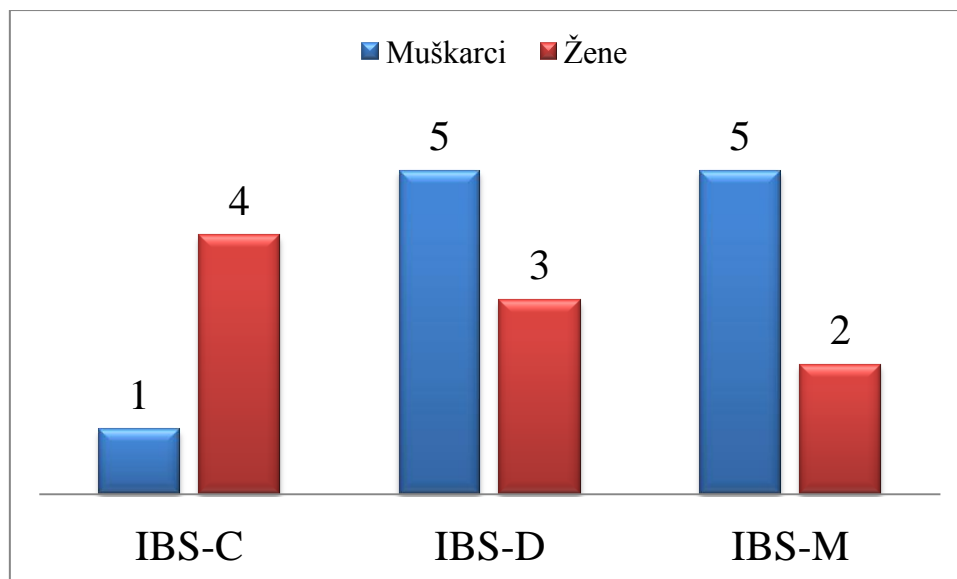
Na osnovu CRF upitnika dobijeni su osnovni podaci o pacijentima i kontrolama. Od 20 pacijenata, koliko je učestvovalo u studiji, 11 je bilo muškaraca, a 9 žena. Od ukupno 9 kontrola, bilo je 7 muškaraca i 2 žene. Prosječna starost u grupi pacijenata je bila 46.5 godina, a u kontrolnoj grupi 48.7 godina. Najmlađi pacijent imao je 25, a najstariji 83 godine (Tabela

23). Na osnovu prosječnih starosti može se zaključiti da nije bilo statistički signifikantne razlike u starosti među grupama.

Tabela 23: Distribucija učesnika u studiji prema aspektu ispitivanja (pacijenti i kontrole), polu i starosti.

Starost ispitanika				
Grupa	Pol	Broj	Srednja vrijednost	Interval od najmlađe do najstarije osobe
Pacijenti	Muški	11	49.6	25-83
	Ženski	9	42.5	
	Ukupno	20	46.5	
Kontrola	Muški	7	48.6	31-66
	Ženski	2	49.5	
	Ukupno	9	48.7	

Na osnovu CRF upitnika kao i prethodno uzete anamneze, u grupi pacijenata može se vidjeti ukupna zastupljenost podtipova IBS-a, kao i zastupljenost IBS-a u odnosu na pol. Najviše je pacijenata sa IBS-D (8), zatim sa IBS-M (7), a najmanje je pacijenata sa IBS-C (5). Ako se posmatra zastupljenost podtipova u odnosu na pol, može se vidjeti da je jednak broj muškaraca obolio od IBS-D i IBS-M (po 5 za svaki podtip), a samo jedan od IBS-C. Kod ženskog pola, najviše je osoba sa IBS-C (4), zatim sa IBS-D (3), a najmanje sa IBS-M. Takođe možemo vidjeti da je više žena oboljelo od IBS-C u odnosu na muškarce, a da je više muškaraca oboljelo od IBS-D i IBS-M u odnosu na žene (Grafikon 1) U grupi pacijenata nije dijagnostifikovan niti jedan nedefinisan IBS pacijent (IBS-*Unsubtyped*).



Grafikon 1: Distribucija podtipova IBS-a u odnosu na pol

4.3. Rezultati upitnika

4.3.1. GSRS

Skala procjene gastrointestinalnih simptoma (verzija prilagođena za IBS) ili GSRS upitnik je ispunjen od strane svih učesnika ove studije, sastoji se od 13 pitanja, a pacijenti i zdravi ispitanici su dali subjektivnu procjenu o jačini gastrointestinalnih tegoba u proteklih 7 dana. Ispitanici su odgovorili na pitanja sa jednim od ponuđenih odgovora: “uopšte ne”, “manju nelagodu”, “blagu nelagodu”, “umjerenu nelagodu”, “umjereno jaku nelagodu”, “jaku nelagodu” i “veoma jaku nelagodu”. Svakom odgovoru je dodijeljena vrijednost od 1 do 7 na način da je prvi odgovor imao najmanju, a posljednji najveću vrijednost. Izračunate su srednje vrijednosti za obje ispitivane grupe, a na osnovu njih i vrijednosti T-testa (Tabela 25). Na osnovu sumiranih rezultata GSRS upitnika prikazanih u Tabeli 24. može se vidjeti da postoji statistički signifikantna razlika između grupe sa pacijentima i kontrolne grupe za pitanja 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 12 i 13. Takođe, postoji statistički signifikantna razlika između ove dvije posmatrane grupe za sva pitanja zajedno ($P= 0.0000019$).

U analizi poređenja specifičnih podtipova za IBS i zdravih ispitanika, dobijeni su sljedeći rezultati: Uočena je statistički signifikantna razlika u poređenju pacijenata IBS-D i zdravih ispitanika za pitanja 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 13. Kada se poredila grupa pacijenata IBS-C i zdravih kontrola, uočeno je da se njihovi odgovori 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12 i 13 statistički značajno razlikuju. U poređenju grupe IMS-M pacijenata i zdravih kontrola, uočena je signifikantna razlika za pitanja 1, 3, 4, 6, 7, 8 i 13.

Tabela 24: Srednje vrijednosti za svako pitanje GSRS upitnika za obje ispitivane grupe i P vrijednost

Pitanje	Srednja vrijednost za pacijente	Srednja vrijednost za kontrole	T test (P<0.05)
1. Da li su vam bolovi u stomaku stvarali nelagodu?	3,05	1,33	0,0005
2. Da li ste osjećali bol ili nelagodu u stomaku koja je nastala nakon pražnjenja crijeva?	2,1	1,22	0,0055
3. Da li vam je stvarao nelagodu osjećaj nadutosti?	2,75	1,44	0,0095
4. Da li su vam stvarali nelagodu gasovi?	3,15	1,55	0,0006
5. Da li vam je zatvor stvarao nelagodu?	2,3	1,44	0,1079
6. Da li vam je proljev stvarao nelagodu?	2,9	1,22	0,0073
7. Da li vam je česta stolica stvarala nelagodu?	2,4	1,11	0,0379
8. Da li vam je tvrda stolica stvarala nelagodu?	2,1	1	0,0141
9. Da li vam je hitna potreba za pražnjenjem crijeva stvarala nelagodu?	2,2	1,22	0,0580
10. Da li vam je nakon pražnjenja crijeva osjećaj i dalje potrebe stvarao nelagodu?	2,4	1,55	0,0650
11. Da li vam je osjećaj sitosti ubrzo nakon početka jela stvarao nelagodu?	1,3	1,22	0,3602
12. Da li vam je osjećaj sitosti duže vremena nakon	1,9	1,11	0,0248

jela stvarao nelagodu?			
13. Da li vam je vidljiva nadutost stomaka stvarala nelagodu?	2,85	1,22	0,0105

4.3.2. PHQ-15

Na upinik koji se odnosi na skalu jačine somatskih simptoma odgovorili su svi ispitanici u obje grupe. Ovim upitnikom su se prikupile dodatne informacije o kliničkoj slici ispitanika i njegovoj subjektivnoj procjeni simptoma. Ispitanici su odgovorili na 15 tačaka odgovorima sa “*nikako*”, “*malo*” i “*mного*”. Ponuđenim odgovorima su dodijeljene ocjene:

- Nikako = 0
- Malo = 1
- Mnogo = 2

Konačni rezultat se očitao na sljedeći način:

0-4	Nema somatizacijskih poremećaja
5-9	Blagi somatizacijski poremećaj
10-14	Umjereni somatizacijski poremećaj
+15	Teži somatizacijski poremećaj

U Tabeli 25 može se vidjeti da postoji statistički signifikantna razlika između grupe pacijenata i kontrolne grupe za simptome koji se tiču stomačnih bolova; zatvora, česte stolice, proljeva, mučnine, gasova ili slabe probave; osjećaja umora ili gubitka energije i problema sa spavanjem. Potrebno je napomenuti da svi ispitanici nisu dali odgovor na simptome vezane za menstrualne tegobe, te bolove i probleme tokom polnog odnosa. Takođe, postoji statistički signifikantna razlika između ove dvije posmatrane grupe za sve simptome zajedno ($P=0,00000000936$).

Kada su poređeni specifični podtipovi IBS-a sa zdravim kontrolama dobijeni su sljedeći rezultati: Uočena je statistički signifikantna razlika između pacijenata podtipa IBS-D i

zdravih kontrola za 12, 13, 14 i 15 tačku. Za podtip IBS-C javila se statistički značajna razlika u odnosu na kontrole za 1, 2, 3, 4, 12, 13, 14 i 15 tačku, dok se kod IBS-M u poređenju sa kontrolama javila samo jedna statistički signifikantna razlika, i to kod odgovora na tačku 1.

Tabela 25: Srednje vrijednosti za svaku tačku PHQ upitnika za obje ispitivane grupe i P vrijednost

Opišite u kojoj mjeri su vam se javljali simptomi u protekle 4 sedmice	Srednja vrijednost za pacijente	Srednja vrijednost za kontrole	T test (P<0.05)
• Stomačni bolovi	1,3	0,33	0,0000
• Bolovi u leđima	0,7	0,33	0,1092
• Bolovi u rukama, nogama ili zglobovima	0,45	0,22	0,1288
• Menstrualni grčevi ili druge tegobe vezane za menstruaciju	0,88	0,5	0,2192
• Glavobolja	0,25	0,11	0,2055
• Bolovi u grudima	0,15	0	0,1172
• Vrtoglavica	0,25	0	0,0531
• Nesvjestica	0,15	0	0,1172
• Osjećaj jakog udaranja ili bržeg kucanja srca	0,25	0	0,0531
• Kratkoća daha	0,3	0	0,0652
• Bolovi tokom ili problema tokom polnog odnosa	0,105263	0	0,1959
• Zatvor, česta stolica, proljev, mučnina, gasovi ili slaba probava	1,6	0	0,0000
• Osjećaj umora ili gubitak energije	1,1	0,11	0,0012
• Problem sa spavanjem	0,95	0,111111	0,0003

4.3.3. VSI

Upitnik vezan za indeks visceralne senzitivnosti su ispunili svi učesnici studije tako što su odgovorili na svih 15 tačaka. Zahvaljujući ovom upitniku izmjerena je specifična anksioznost pacijenta sa simptomima koji su u vezi sa gastrointestinalnim senzacijama ili simptomima koji igraju značajnu ulogu kod oboljelih od IBS-a. Ispitanici su odgovorili na postavljene izjave sa jednim od 6 odgovora: “*veoma se slažem*”, “*umjereno se slažem*”, “*blago se slažem*”, “*blago se ne slažem*”, “*umjereno se ne slažem*” i “*veoma se ne slažem*”. Svakom odgovoru je dodijeljena vrijednost od 1 do 6 na način da je prvi odgovor imao najmanju, a posljednji najveću vrijednost. Izračunate su srednje vrijednosti za obje ispitivane grupe, a na osnovu njih i vrijednosti T-testa (Tabela 26). Na osnovu sumiranih rezultata VSI upitnika u Tabeli 31 može se vidjeti da postoji statistička signifikantnost između grupe sa pacijentima i kontrolne grupe kod svih 15 tačaka. Takođe, postoji statistički signifikantna razlika između ove dvije posmatrane grupe za sve tačke zajedno ($P=0,0000000252$).

U poređenju podtipova IBS-a sa grupom zdravih kontrola, dobijeni su sljedeći rezultati: Uočena je statistički signifikantna razlika između IBS-D i IBS-C u poređenju sa zdravim kontrolama za svaku tačku posebno VSI upitnika. Uočena je statistički signifikantna razlika podtipa IBS-M za tačke 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13 i 14, dok za tačke 8, 10 i 15 nije bilo statistički signifikantne razlike između pacijenata podtipa IBS-M i zdravih ispitanika.

Tabela 26: Srednje vrijednosti za svaku tačku VSI upitnika za obje ispitivane grupe i P vrijednost

	Srednja vrijednost za pacijente	Srednja vrijednost za kontrolu	T test ($P<0.05$)
1. Brinem se da će se kad god jedem, nadimanje i napetost u stomaku pogoršati.	3,2	5,11	0,0008
2. Obuzima me tjeskoba kad jedem na nekom novom mjestu.	3,7	5,66	0,0007

3. Često brinem o problemima sa stomakom.	3,1	5,77	0,0000
4. Ne mogu uživati jer stalno razmišljam o svojim stomačnim tegobama.	3,35	5,88	0,0000
5. Često se pribojavam da neću imati normalnu stolicu.	2,7	5,44	0,0000
6. Zbog straha od stomačnih tegoba rijetko probavam novu vrstu hrane.	3,15	5,44	0,0001
7. Bez obzira šta jedem, najvjerojatnije će mi naškoditi.	3,95	5,55	0,0019
8. Čim se jave stomačne tegobe, zabrinem se i unervozim.	3,1	5,77	0,0000
9. Kad dođem na neko novo mjesto prvo potražim toalet.	4,2	5,77	0,0110
10. Konstantno osjećam neku senzaciju u stomaku.	3,1	5,77	0,0000
11. Često mislim da su tegobe u stomaku vezane za neku tešku bolest.	4,45	5,66	0,0102
12. Čim se probudim počnem brinuti da ću imati stomačne tegobe taj dan.	4	5,88	0,0000
13. Čim osjetim nelagodu u stomaku uplašim se.	3,8	5,77	0,0002
14. Kad sam pod stresom imam veće stomačne tegobe.	2,35	5,77	0,0000
15. Stalno razmišljam o tome šta se dešava u mom stomaku.	3,8	5,88	0,0002

4.3.4. HAD

Na HAD upitnik odgovorili su svi učesnici studije na osnovu čega je dobijena procjena anksioznosti i depresije koju pacijent proživljava. Svi pacijenti i zdrave kontrole odgovorili su na 14 tačaka od kojih se 7 odnosi na anksioznost i isto toliko na depresiju sa jednim od ponuđenih četiri odgovora pri čemu je prvi odgovor uvijek imao najmanju, a četvrti odgovor najveću vrijednost. Ispitanici su odgovorili najpribližnije onome šta su osjećali u posljednjih

sedam dana. Nakon sumiranja rezultata detektovane su psihičke promjene kod pacijenata sa fizičkim zdravstvenim problemima. Uočena je statistički signifikantna razlika između grupe pacijenata i kontrolne grupe za svaku tačku (Tabela 27). Takođe, postoji statistički signifikantna razlika između ove dvije posmatrane grupe za sve tačke zajedno ($P=0,006353$).

Kada su se testirale razlike za podtipove IBS-a u odnosu na zdrave kontrole, dobijeni su sljedeći rezultati: uočena je statistički signifikantna razlika između grupe pacijenata IBS-C podtipa i zdravih kontrola za svaku tačku HAD kliničkog upitnika. Kod IBS-D pacijenata nema statistički značajne razlike za tačke 2, 9 i 14 između njih i zdravih kontrola. Kod IBS-M pacijenata nema statistički značajne razlike za tačke 2, 4, 8, 10, 12 i 14 u poređenju sa zdravim kontrolama. Postoji statistički signifikantna razlika između IBS-C i zdravih kontrola, te IBS-D i zdravih kontrola za ukupne odgovore, odnosno za sve tačke zajedno. Ovakva razlika za ukupne odgovore nije uočena između IBS-M pacijenata i zdravih ispitanika.

Tabela 27: Srednje vrijednosti za svaku tačku HAD upitnika za grupu pacijenata sa IBS-om i zdravih kontrola i P vrijednosti

	Srednja vrijednost za pacijente	Srednja vrijednost za kontrole	T test ($P<0.05$)
• Osjećam napetost	2,65	3,77	0,0001
• I dalje uživam u stvarima u kojima sam uvijek uživao/la	2,15	1,33	0,0015
• Imam osjećaj straha da će se nešto loše dogoditi	2,55	3,77	0,0000
• Mogu se smijati i doživjeti smiješnu stranu nekih stvari	2	1	0,0001
• Osjećaj zabrinutosti me prožima	2,45	3,77	0,0000
• Osjećam se veselo	3,1	4	0,0004
• Mogu sjediti na miru i opustiti se	2,75	1,33	0,0000
• Osjećam se usporeno	2,8	3,66	0,0011

• Obuzme me osjećaj usplahirenosti kao “leptirići u stomaku”	2,5	1,55	0,0000
• Ne zanima me kako izgledam	2,6	3,55	0,0059
• Osjećam se uznemireno, kao u stanju pripravnosti	2,65	3,77	0,0000
• Radujem se stvarima sa uživanjem	2,2	1,11	0,0000
• Dobijam iznenadne napade panike	2,9	4	0,0000
• Uživam u dobroj knjizi ili TV programu	2,2	1,33	0,0011

4.4. Analiza asocijacije odabranih genskih polimorfizama sa sindromom iritabilnog kolona

U ovome radu je primijenjena asocijativna analiza odabranih genetičkih polimorfizama kao mogućih rizikofaktora za sindrom iritabilnog kolona prema modelu studije “pacijent-kontrola” (*case-control study*). Izvršena je genotipizacija za ukupno 4 genska polimorfizma kao mogućih rizikofaktora za sindrom iritabilnog kolona. Rezultati su izraženi ili numerički u baznim parovima (bp) po utvrđenoj veličini ciljnog fragmenta ili kao razlika u nukleotidu (tačkasta mutacija), te su prikazani tabelarno. Kod uzoraka za obje ispitivane grupe kod kojih je bilo moguće izvršiti genotipizaciju izračunate su frekvencije alela (A_f), frekvencija genotipova (G_f) i Hardi-Vajnbergov ekvilibrijum (HWE) za FKBP5, DRD2, DAT i SRin2, a rezultati su prikazani tabelarno. Takođe, primjenom asocijativne analize ispitivanih gena sa pojavom sindroma iritabilnog kolona (*Fisher Exact Test*) dobijene su P vrijednosti na genotipskom i alelnom nivou, a u analizi haplotipske asocijacije metodom regresivne analize haplotipova, analizirano je nekoliko kombinacija odabranih polimorfizama.

4.4.1. Rezultati genotipizacije, analiza genotipske i alelne asocijacije i Hardy-Vajnbergov ekvilibrijum

FKBP5

Rezultat genotipizacije FKBP5 gena metodom ASA-PCR za FKBP5 gen predstavljen je u tabelama 28 i 29. Genotipizacija je izvršena za 19 uzoraka iz grupe pacijenata i 9 kontrolnih uzoraka, a za jedan uzorak nije bilo moguće izvršiti genotipizaciju iako je više puta ponavljana. Moguće alelne varijante su C i T (rs1360780) u genu koji kodira protein uključen u regulaciju glukokortikoida kao potencijalnog rizikofaktora u psihopatologiji stresa. Za T alel se smatra da uzrokuje stvaranje više kortizola (*mutant*) od C alela (*wild type*) (Cristóbal-Narváez et al, 2016). Učestalost genotipova u ispitivanom uzorku prikazana je u Tabeli 30, a učestalost alela predstavljena je Grafikonom 2. Frekvencija genotipa CC bila je 0 u obje ispitivane grupe, frekvencija genotipa CT iznosila je 0,9 u grupi pacijenata i 1 u grupi kontrola, a frekvencija genotipa TT 0,005 u grupi pacijenata i 0 u grupi zdravih ispitanika. Učestalost alela C iznosila je 0,45, a alela T 0,5 u grupi pacijenata, a u grupi kontrola frekvencija oba alela iznosila je po 0,5. Analiza udruženosti nije pokazala statistički značajnu asocijaciju ovoga SNP-a sa pojavom sindroma iritabilnog kolona niti na nivou alelne ($P=0,761$), niti na nivou genotipske asocijacije ($P=0,548$), a genotipske frekvencije analiziranog polimorfizma su se nalazile u Hardy-Vajnbergovj ravnoteži (HWE 0,0000) (Tabela 40).

Tabela 28: Genotipovi za FKBP5 gen dobijeni sekvenciranjem kod grupe pacijenata

Uzorak	Genotip za uzorke pacijenata
P001	C/T
P002	C/T
P003	C/T
P004	C/T
P005	C/T

Tabela 29: Genotipovi za FKBP5 gen dobijeni sekvenciranjem kod kontrolne grupe

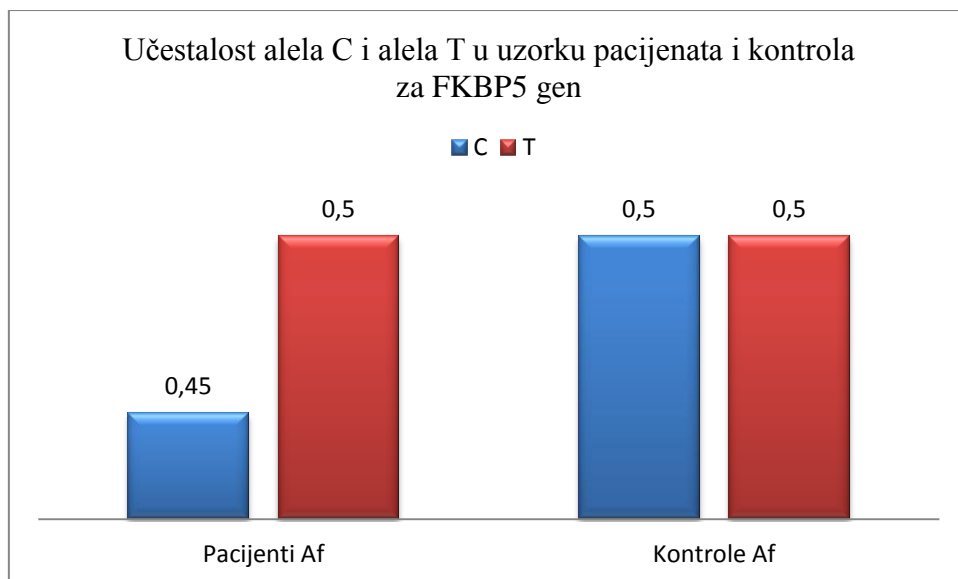
Uzorak	Genotip za kontrolne uzorke
K001	C/T
K002	C/T
K003	C/T
K004	C/T
K005	C/T

Identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama asociranih sa sindromom iritabilnog kolona

P006	C/T	K006	C/T
P007	C/T	K007	C/T
P008	C/T	K008	C/T
P009	C/T	K009	C/T
P010	C/T		
P011	C/T		
P012	C/T		
P013	C/T		
P014	C/T		
P015	C/T		
P016	C/T		
P017	C/T		
P018	C/T		
P019	T/T		
P020	?		

Tabela 30: Učestalost genotipova (G_f) u uzorku pacijenata i kontrolnom uzorku za gen $FKBP5$

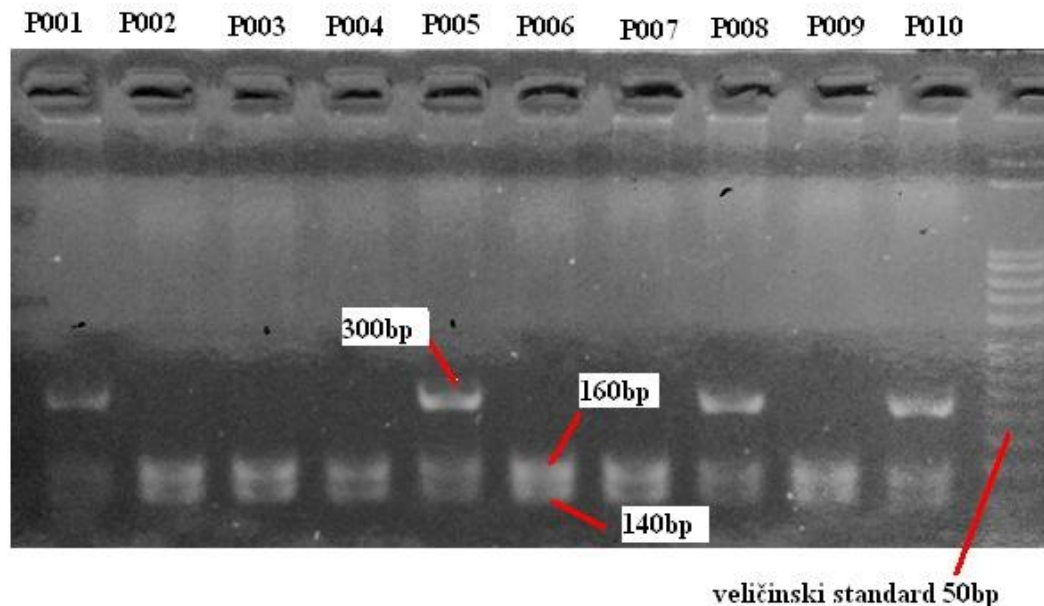
Genotip	Pacijenti G_f	Kontrole G_f
C/C	0	0
C/T	0,9	1
T/T	0,005	0



Grafikon 2: Učestalost alela (A_f) u uzorku pacijenata i kontrolnom uzorku za gen FKBP5

DRD2

Rezultat genotipizacije DRD2 gena metodom PCR-RFLP za detekciju polimorfnih fragmenata kod grupe pacijenata oboljelih od IBS-a i kontrolne grupe prikazani su Tabelama 31 i 32. Kao metod genotipizacije primijenjen u ovom radu za DRD2 gen bio je PCR-RFLP. Nakon PCR reakcije, produkt je nanošen na gel, te se nakon elektroforeze očitavao rezultat (Slika 26).



Slika 26: Provjera uspješnosti PCR-RFLP gel elektroforezom za uzorke pacijenata (P001-P010) za DRD2 gen.

Genotipizacija je uspješno izvršena za sve uzorke, a očekivane veličine fragmenta bile su od 300 bp i 160/140 bp. Učestalost genotipova prikazana je u Tabeli 33, a učestalost alela predstavljena je Grafikonom 3. Učestalost genotipa 300/300 bio je 0,05 u grupi pacijenata, a u grupi kontrola nije se pojavio niti jednom. Frekvencija genotipa 300/160/140 iznosila je 0,3 u grupi pacijenata, a 0,11 u grupi kontrola, a frekvencija genotipa 160-140/160-140 iznosila je 0,65 u grupi pacijenata, a u grupi kontrola 0,88. Frekvencija alela 300 bila je 0,2 u grupi pacijenata, 0,05 u kontrolnoj grupi, dok je frekvencija alela 160/140 iznosila 0,8 u grupi pacijenata i 0,94 u grupi kontrolnih ispitanika. Genotipske frekvencije analiziranog polimorfizma se nisu nalazile u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži (HWE 0,5120). Analizom asocijacija na nivou alela ($P=0,251$) i genotipova ($P=0,568$) je utvrđeno da nije bilo statistički značajne povezanosti ovog polimorfizma sa pojavom sindroma iritabilnog kolona (Tabela 40).

Tabela 31: Genotipovi za DRD2 gen dobijeni sekvenciranjem kod grupe pacijenata

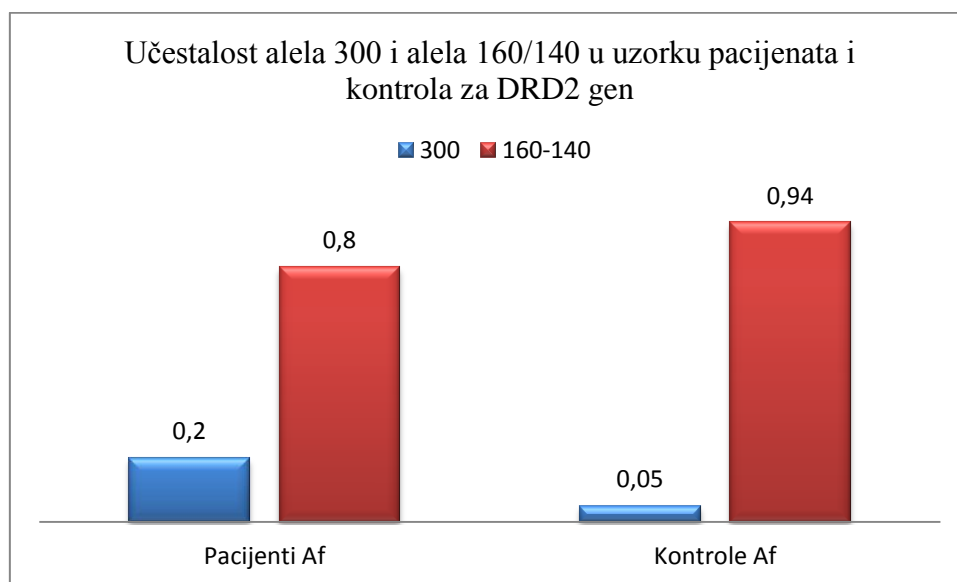
Uzorak	Genotip za uzorke pacijenata (bp)	
P001	300	160/140
P002	160/140	160/140
P003	160/140	160/140
P004	160/140	160/140
P005	300	160/140
P006	160/140	160/140
P007	160/140	160/140
P008	300	160/140
P009	160/140	160/140
P010	300	160/140
P011	160/140	160/140
P012	160/140	160/140
P013	160/140	160/140
P014	160/140	160/140
P015	300	160/140
P016	160/140	160/140
P017	300	300
P018	160/140	160/140
P019	300	160/140
P020	160/140	160/140

Tabela 32: Genotipovi za DRD2 gen dobijeni sekvenciranjem kod kontrolne grupe

Uzorak	Genotip za kontrolne uzorke (bp)	
K001	160/140	160/140
K002	160/140	160/140
K003	160/140	160/140
K004	300	160/140
K005	160/140	160/140
K006	160/140	160/140
K007	160/140	160/140
K008	160/140	160/140
K009	160/140	160/140

Tabela 33: Učestalost genotipova u uzorku pacijenata i kontrolnom uzorku za gen DRD2

Genotip	Pacijenti	Kontrole
	G _f	G _f
300/300	0,05	0
300/160-140	0,3	0,11
160-140/160-140	0,65	0,88



Grafikon 3: Učestalost alela (A_f) u uzorku pacijenata i kontrolnom uzorku za gen DRD2

DAT

Rezultat genotipizacije DAT gena PCR metodom kod grupe pacijenata oboljelih od IBS-a i kontrolne grupe prikazani su tabelama 34 i 35. Dopaminski transporter je polimorfizam promjenljivog broja tandemskih ponovaka, a analize sekvenci u prethodnim studijama pokazale su da se radi o ponavljanjima od 40 bp na 3' kraju gena (Doucette-Stamm et al, 1995). Ovaj polimorfizam može da ima od 3 do 11 ponavljanja, ali najčešći su polimorfizmi od 9 (oko 440 bp) i od 10 (oko 480 bp) ponavljanja koji su detektovani i u ovom radu. Učestalost genotipova prikazana je u Tabeli 36, a učestalost alela predstavljena je Grafikonom 4. Učestalost genotipa 472/472 iznosila je 0,3 u grupi pacijenata i 0,66 u grupi

kontrola. Učestalost genotipa 472/434 iznosila je 0,25 u grupi pacijenata i 0,33 u grupi kontrola, a učestalost genotipa 434/434 iznosila je 0,45 u grupi pacijenata dok se isti genotip nije javio niti jednom u grupi sa zdravim ispitanicima. Frekvencija alela 472 iznosila je 0,425 u grupi pacijenata i 0,833 u kontrolnoj grupi, a alela 434 0,575 u grupi pacijenata i 0,166 u grupi zdravih kontrola. Genotipske frekvencije analiziranog polimorfizma pokazale su odstupanje od ravnotežnog stanja ($HWE=0,023$). Kada je u pitanju asocijativna analiza, pokazalo se da DAT ima jaku statistički signifikantnu udruženost sa sindromom iritabilnog kolona, kako na nivou alela ($P=0,006$), tako i na nivou genotipova ($P=0,031$) (Tabela 40). Osobe koje imaju 434 alel u svom genotipu imaju 6 puta veću vjerovatnoću da će oboljeti od sindroma iritabilnog kolona od osoba koje nemaju ovu alelnu varijantu u svom genotipu.

Tabela 34: Genotipovi za DAT gen dobijeni sekvenciranjem kod grupe pacijenata

Uzorak	Genotip za uzorke pacijenata (bp)
P001	472/472
P002	472/472
P003	472/472
P004	434/434
P005	434/434
P006	434/434
P007	434/434
P008	434/472
P009	472/472
P010	434/434
P011	434/472
P012	434/472
P013	434/472
P014	434/472

Tabela 35: Genotipovi za DAT gen dobijeni sekvenciranjem kod kontrolne grupe

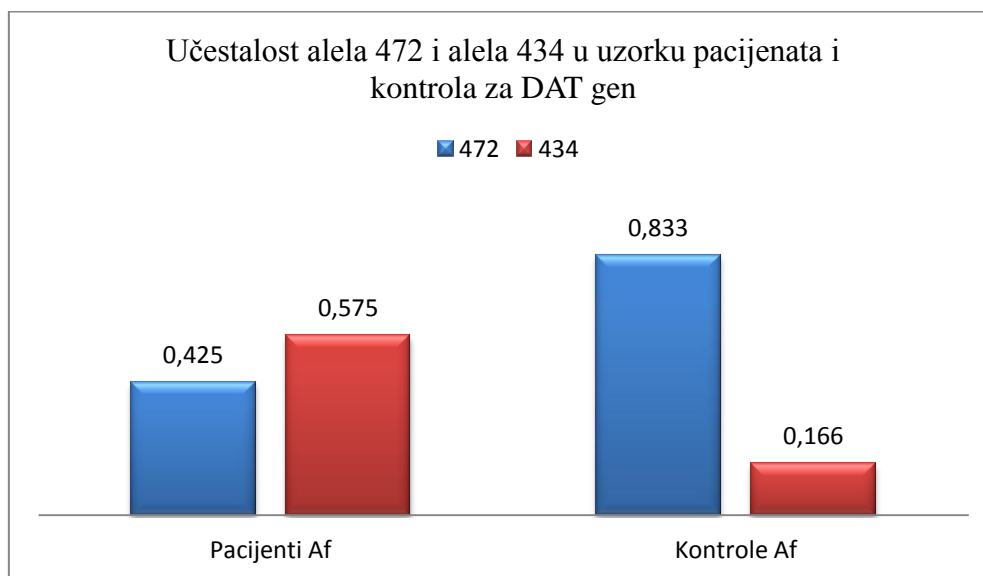
Uzorak	Genotip za kontrolne uzorke (bp)
K001	434/472
K002	434/472
K003	472/472
K004	472/472
K005	472/472
K006	434/472
K007	472/472
K008	472/472
K009	472/472

P015	472/472
P016	434/434
P017	472/472
P018	434/434
P019	434/434
P020	434/434

Tabela 36: Učestalost genotipova u uzorku pacijenata i kontrolnom uzorku za gen

DAT

Genotip	Pacijenti G_f	Kontrole G_f
472/472	0,3	0,66
472/434	0,25	0,33
434/434	0,45	0



Grafikon 4: Učestalost alela (A_f) u uzorku pacijenata i kontrolnom uzorku za gen DAT

SRin2

Rezultat genotipizacije SERT SRin2 gena PCR metodom kod grupe pacijenata oboljelih od IBS-a i kontrolne grupe prikazani su tabelama 37 i 38. Očekivani fragmenti su mikrosatelitne varijante sa razlikom u dužini od 17 bp (Kaiser et al, 2002). U našem uzorku uočene su tri alelne varijante: 251 bp, 268 bp i 299 bp koje odgovaraju alelnim varijantama od 9, 10 i 12 ponavljanja. Alelna varijanta sa 11 tandemskih ponovaka se najrjeđe sreće u humanoj populaciji i nije uočena u našem uzorku. Za jednog ispitanika nije bilo moguće izvršiti genotipizaciju za ovaj lokus i pored nekoliko ponavljanja što je najvjerojatnije uslovljeno polimorfizmom u regionu hibridizacije prajmera. Frekvencija alela u grupi pacijenata je bila 0,053 za alel 9, 0,632 za alel 10 i 0,315 za alel 12. U grupi zdravih ispitanika frekvencija alela je bila 0 za alel 9, 0,667 za alel 10 i 0,333 za alel 12 (Grafikon 5). Nije uočena asocijacija alela ($P=1$) i genotipova ($P=1$) sa pojavom IBS-a. Frekvencije genotipova (Tabela 39) su pokazale da se nalaze u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži (HWE 0,0000) što se može vidjeti u Tabeli 40.

Tabela 37: Genotipovi za SRin2 gen
dobijeni sekvenciranjem kod grupe pacijenata

Uzorak	Genotip za uzorke pacijenata (bp)
P001	299/299
P002	nedet.
P003	268/268
P004	268/268
P005	299/299
P006	268/268
P007	299/299
P008	268/268
P009	268/268
P010	299/299

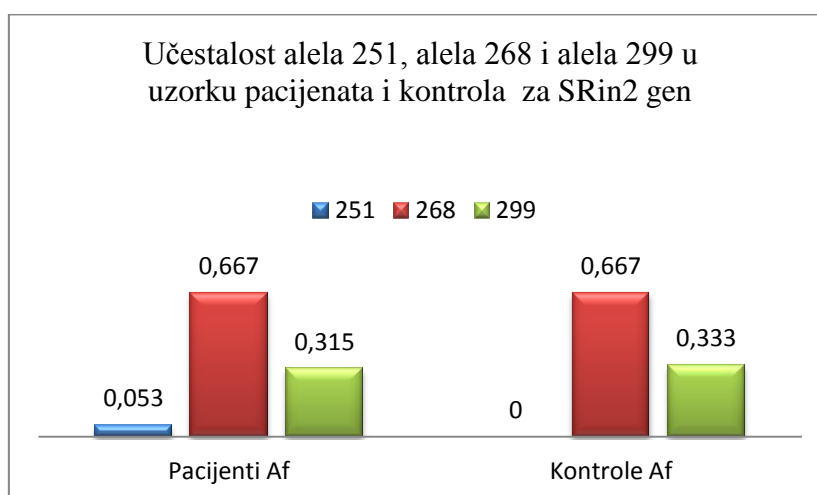
Tabela 38: Genotipovi za SRin2 gen
dobijeni sekvenciranjem kod kontrolne grupe

Uzorak	Genotip za kontrolne uzorke (bp)
K001	268/268
K002	299/299
K003	268/268
K004	268/268
K005	268/268
K006	268/268
K007	268/268
K008	299/299
K009	299/299

P011	268/268
P012	299/299
P013	268/268
P014	268/268
P015	268/299
P016	268/268
P017	268/299
P018	268/268
P019	251/251
P020	268/268

Tabela 39: Učestalost genotipova G_f u uzorku pacijenata i kontrolnom uzorku za gen $SRin2$

Genotip	Pacijenti G_f	Kontrole G_f
299/299	0,263	0,333
268/268	0,579	0,666
268/299	0,105	0
251/251	0,052	0



Grafikon 5: Učestalost alela (A_f) u uzorku pacijenata i kontrolnom uzorku za gen $SRin2$

Tabela 40: P vrijednosti dobijene primjenom Fisher Exact testa posmatrane na nivou alela i genotipova i HWE za odabrane polimorfizme

Polimorfizam	Alelna Exact P vrijednost	Genotipska Exact P vrijednost	HWE
FKBP5	0,761	0,548	0,0000
DRD2	0,251	0,568	0,5120
DAT	0,006	0,031	0,0230
SRin2	1	1	0,0000

4.4.2. Analiza haplotipskih asocijacija

U analizi haplotipskih asocijacija za analizirane polimorfizme napravljeno je nekoliko mogućnosti gdje je *Powermarker* softver automatski kreirao nekoliko kombinacija. U kombinacijama od dva, tri i četiri polimorfizma nisu identifikovani oni koji pokazuju statistički signifikantnu asocijaciju ($P < 0.05$) sa sindromom iritabilnog kolona. U Tabeli 41 se može vidjeti da je kombinacija dva polimorfizma FKBP5 i DAT1 na granici značajnosti ($P = 0,0535$) što može da ukazuje na to da ukoliko bi smo imali veći broj ispitanika, možda bi se pokazala signifikantnost (Tabela 41).

Tabela 41: Haplotipske asocijacije sa dva, tri i četiri polimorfizma i njihove P vrijednosti

Haplotipovi	P vrijednost
DRD-FKBP5	0,2678
FKBP5-DAT1	0,0535
DAT1-SRint2	0,2176
DRD2-FKBP5-DAT1	0,1945
FKBP5-DAT1-SRint2	0,0944
DRD2-FKBP5-DAT1-SRint2	0,4297

4.5. Analiza asocijacije varijacija u genskoj ekspresiji sa sindromom iritabilnog kolona

4.5.1. Rezultati dobiveni izolacijom RNK, reverznom transkripcijom i lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu

Nakon prikupljenih uzoraka pacijenata i kontrola, izolovana je RNK iz oba tipa biološkog tkiva (krv i biopsije). Količina izolovane RNK iz krvi je od 1,53 do 52,7 ng/ μ l sa prosječnom koncentracijom od 17,5 ng/ μ l, a za četiri uzorka (P012, P013, P014 i P020) koncentracija RNK je bila preniska za dalju analizu. Nakon isparavanja vode, za P013 i P014 se i dalje nije mogla postići odgovarajuća koncentracija, te su ova dva uzorka eliminisana iz analize ekspresije gena lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu. Razlog tome leži u činjenici da je sama RNK kao jednolančana molekula veoma nestabilna i osjetljiva na djelovanje bakterijskih endonukleaza, te lako degradira što otežava proces izolacije. Količina izolovane RNK iz biopsija kretala se od 15,9 do 40 ng/ μ l sa prosječnom koncentracijom od 28,4 ng/ μ l, a za 5 uzoraka imala je vrijednost više od 1000 ng/ μ l.

Dobijene vrijednosti za uzorke pacijenata i kontrola iz oba biološka uzorka (krv i biopsije) prikazane su tabelarno (Tabela 42). Za uzorke koji su imali nižu koncentraciju RNK, kao i one kod kojih je koncentracija bila toliko niska da se nije mogla detektovati (TL), za reakciju reverzne transkripcije je dodavano po 6 μ l RNK, dok kod ostalih uzoraka koncentracija je bila razblažena sa ddH₂O.

Tabela 42: Koncentracije RNK u ng/ μ l iz krvi i biopsija kod pacijenata (P001-P020) i kontrola (K001-K009); TL-too low.

Uzorci	Krv (ng/ μ l)	Biopsija (ng/ μ l)
P001	52.7	24.8
P002	21.2	>1000
P003	22.1	20.4
P004	4.16	>1000
P005	2.65	>1000
P006	4.83	25.6

P007	31.6	>1000
P008	22.8	40.0
P009	23.8	37.2
P010	1.53	-
P011	4.23	-
P012	TL	-
P013	TL	-
P014	TL	-
P015	7.07	-
P016	4.7	-
P017	1.33	-
P018	7.33	-
P019	6.67	-
P020	TL	-
K001	23.2	15.9
K002	20.0	34.4
K003	28.5	28.4
K004	6.05	32.0
K005	40.7	22.0
K006	27.2	>1000
K007	3.81	31.6
K008	2.6	-
K009	2.93	-

Nakon izolacije, iz svih uzoraka RNK je u prevedena u cDNK procesom reverzne transkripcije. Uspješno je optimizirana reakcija za *Real-Time* PCR za 6 odabranih gena: TNFSF15, P2RY4, VIP, GUCA2B, PDZD3 i NR1H4 (generisana validaciona kriva, te provjerene amplifikabilnosti prajmera disocijacionom krivom). Svi uzorci su amplificirani u duplikatu za svaki gen od interesa. Prije *Real-Time* amplifikacije izvršen je eksperiment validacije u kojem se moglo vidjeti da odabrani geni i referentni gen se mogu amplificirati u istim uslovima (Slika 23 i 24).

Tabela 43: Minimalne, maksimalne i srednje vrijednosti ΔCT uzoraka iz grupe pacijenata i kontrolne grupe za krv i biopsije

	Pacijenti			Kontrole		
	Min ΔCt	Max ΔCt	Srednja v. ΔCt	Min ΔCt	Max ΔCt	Srednja v. ΔCt
TNFSF15 krv	1,435	10,04	6,178	7,445	10,09	8,84
TNFSF15 biopsija	4,075	7,945	5,4	1,635	5,85	4,523
P2RY4 krv	0,595	14,185	7,029	1,41	13,91	7,254
P2RY4 biopsija	6,925	11,24	9,697	6,56	10,83	7,8643
VIP krv	-6,16	9,905	2,942	0,055	6,52	4,74
VIP biopsija	2,41	5,13	3,313	-0,715	3,815	1,764
GUCA2B krv	1,455	19,15	10,848	7,8	15,725	12,192
GUCA2B biopsija	0,955	5,755	3,228	1,3	3,125	2,228
PDZD3 krv	-4,235	12,635	6,258	4,17	10,87	7,733
PDZD3 biopsija	-5,13	9,89	4,121	1,25	5,445	3,806
NR1H4 krv	-0,715	13,345	6,26	4,885	17,09	10,813
NR1H4 biopsija	1,625	9,85	6,822	4,22	7,755	6,064

Nakon sumiranja svih rezultata dobijenih *Real-Time* PCR-om, urađena je statistička obrada podataka uz pomoć REST programa (*Relative expression software*).

4.5.2. Rezultati REST analize

REST analiza se temelji na testovima randomizacije ili permutacije. Ovi testovi predstavljaju veoma korisnu alternativu za neke standardne parametrijske testove za analizu eksperimentalnih podataka kod kojih je uslov između ostalog i normalna distribucija. Test randomizacije ne pretpostavlja normalnu distribuciju i uzorci se nasumice raspoređuju. Na osnovu određenog matematičkog modela (Pfaffl MW et al, 2002). REST izračunava relativne ekspresije odnosa određene grupe uzoraka za gen od interesa nasuprot referentnom genu, te testira statističku značajnost rezultata, a takođe ima i mogućnost kreiranja vještačkog broja ponavljanja kao mjeru sigurnosti da rezultati dobijeni REST-om nisu slučajni.

Izračunate su razlike u ekspresiji gena između grupa kontrola i pacijenata za krv i za biopsije (Tabela 44). U poređenju razlike u ekspresiji gena u krvi pacijenata i kontrola moglo se vidjeti da nije zabilježena statistički značajna razlika u ekspresiji gena između posmatranih grupa. Kod gena je bila primijećena povećana (up) regulacija, ali ne na nivou signifikantnosti. U analizi razlike u ekspresiji gena između pacijenata i kontrola u biopsijama, primijećena je smanjena (down) ekspresija VIP gena na signifikantnom nivou (**P=0,045**) za 3,102 puta u grupi pacijenata u odnosu na zdrave kontrole.

Tabela 44: Razlika u ekspresiji analiziranih gena između grupe pacijenata i kontrolne grupe u uzorcima krvi i biopsijama.

Gen	U krvi			U biopsijama		
	Up/down	Faktor	P vrijednost	Up/down	Faktor	P vrijednost
TNFSF15	Up	3,706	0,0990	Down	1,814	0,3095
P2RY4	Up	2,548	0,4210	Down	2,48	0,1235
VIP	Up	3,399	0,2085	Down	3,102	0,0450
GUCA2B	Up	1,991	0,6460	Down	1,881	0,2445
PDZD3	Up	1,842	0,6131	Down	1,184	0,8705
NR1H4	Up	61,792	0,1170	Down	2,7	0,5580

Kada se poredila razlika u ekspresiji odabranih gena u grupi pacijenata između dva tipa bioloških uzoraka, mogla se uočiti statistički značajna razlika za četiri analizirana gena: PDZD3 (**P=0,021**), P2RY4 (**P=0,043**), GUCA2B (**P=0,002**) i TNFSF15 (**P=0,001**). Za sva četiri gena bila je povećana ekspresija u biopsijama u odnosu na krv (up regulacija). Takođe je zabilježena povećana ekspresija za NR1H4, a smanjena za VIP, ali ne na signifikantnom nivou. U poređenju razlike u ekspresiji kod grupe zdravih ispitanika između krvi i tkiva, takođe se mogla uočiti povećana ekspresija gena na statistički značajnom nivou za tri gena TNFSF15 (**P=0,001**), VIP (**P=0,018**) i GUCA2B (**P=0,001**). Za P2RY4 je uočena smanjena, a PDZD3 i NR1H4 povećana ekspresija gena u biopsijama u odnosu na krv kod grupe pacijenata, ali ne na signifikantnom nivou (Tabela 45).

Tabela 45: Razlika u ekspresiji analiziranih gena između krvi i biopsija u grupi pacijenata i u grupi zdravih ispitanika.

Gen	U grupi pacijenata			U grupi kontrola		
	Up/down	Factor	P	Up/down	Factor	P
TNFSF15	Up	10,643	0,001	Up	25,69	0,001
P2RY4	Up	3,382	0,043	Down	1,212	0,888
VIP	Down	2,471	0,5615	Up	9,348	0,018
GUCA2B	Up	188,64	0,002	Up	2093,163	0,001
PDZD3	Up	6,068	0,021	Up	3,491	0,1005
NR1H4	Up	1,301	0,9025	Up	15,608	0,3835

Kod analize podtipova za IBS, u poređenju oboljelih dijareja podtip (IBS-D) sa zdravim kontrolama, nije bilo statistički značajne razlike između grupa ni za jedan od analiziranih gena, niti u krvi, niti u biopsijama. U poređenju razlike u ekspresiji gena kod oboljelih podtip konstipacija (IBS-C) u biopsijama uočena je povećana ekspresija NR1H4 gena kod pacijenata za oko 28,8 puta u odnosu na zdrave kontrole na signifikantnom nivou (**P=0,002**). U poređenju miješanog podtipa (IBS-M) sa grupom zdravih kontrola uočene su statistički značajne povećane ekspresije gena u krvi za TNFSF15 (**P=0,005**) i VIP (**P=0,025**).

4.6. Analiza korelacija između genetičkih karakteristika sindroma iritabilnog kolona i kliničkih parametara

U analizi korelacije testirana je povezanost između dvije varijable: genetičkih karakteristika sindroma iritabilnog kolona i kliničkih parametara prikupljenih anketiranjem pacijenata pomoću operacionalizovanih kliničkih upitnika. Dobijeni su rezultati koji pokazuju da varijacija u genskoj ekspresiji praćena specifičnom varijacijom u ukupnoj vrijednosti (score) za upitnik (Tabela 46).

Tabela 46: Rezultati korelacija između ekspresije gena i kliničkih upitnika za grupu pacijenata i grupu kontrola; *r*-koeficijent korelacije; *P*<0,05.

Klinički upitnici	Grupa kontrola			Grupa pacijenata		
	Ekspresija gena	r	P	Ekspresija gena	r	P
Sum				PDZD krv	-0,548	0,018
VSI	P2RY4 krv	-0,731	0,025	PDZD biopsija	-0,708	0,033
Sum				PDZD krv	0,472	0,045
GSRS	-	-	-			
Sum						
PHQ	GUCA2B krv	0,734	0,024	-	-	-
Sum						
HAD	-	-	-	-	-	-

U grupi pacijenata za ekspresiju gena PDZD u krvi postoji negativna korelacija srednje jačine (**r= 0,548**) sa ukupnim skorom VSI upitnika na statistički značajnom nivou (**P=0,018**). Takođe za ekspresiju gena PDZD u biopsijama utvrđeno je postoji negativna i snažna povezanost (**r= - 0,708**) sa ukupnim skorom VSI upitnika na statistički značajnom nivou (**P=0,033**). U grupi pacijenata utvrđena je takođe i pozitivna korelacija srednje jačine i između ekspresije gena PDZD u krvi (**r = 0,472**) i ukupnog skora GSRS upitnika (**P=0,045**).

U ispitivanoj grupi utvrđena je negativna korelacija srednje jačine između ekspresije PDZD gena u krvi sa tačkom 10 VSI upitnika (**r= -0,490, P=0,039**) i tačkom 13 VSI upitnika

(**r= -0,513, P=0,03**), kao i između ekspresije PDZD gena u biopsiji kolona i tačke 11 VSI kliničkog upitnika (**r= -0,680, P=0,44**). Takođe, utvrđena je i pozitivna korelacija između ekspresije PDZD gena iz krvi i pitanja broj 7 (**r=0,514, P=0,029**), pitanja 9 (**r=0,568, P=0,014**) i pitanja 11 GSRS kliničkog upitnika (**r=0,699, P=0,001**).

U kontrolnoj grupi ekspresija gena P2RY4 iz krvi nalazi se u jakoj negativnoj korelaciji (**r= -0,731, P = 0,025**) sa ukupnim skorom VSI upitnika, a ekspresija gena GUCA2B iz krvi u jakoj pozitivnoj korelaciji (**r=0,734, P=0,024**) sa ukupnim skorom PHQ upitnika.

5. DISKUSIJA

Sindrom iritabilnog kolona smatra se biopsihosocijalnim poremećajem čija je pojava najčešće posljedica interakcija između više faktora koji uključuju poremećaje motiliteta crijeva, abnormalnosti gastrointestinalne senzacije, različite upale i infekcije crijeva, promjene u aferentnim senzornim informacijama, psihičkih i afektivnih poremećaja. Predloženo je nekoliko modela da se opiše i objasni sindrom iritabilnog kolona, ali svaki od tih modela se fokusira na određene i konkretne aspekte ili mehanizme ovoga poremećaja. U ovoj doktorskoj disertaciji se nastojalo da se predstave i razmotre različite determinante IBS-a i njegovih simptoma kroz individualni pristup pacijenata i procjenu njegovog psiho-fizičkog statusa, kroz odgovore na kliničke upitnike gdje su ispitanici mogli da daju svoju subjektivnu ocjenu, a zatim i kroz različite genetičke analize, analize udruženosti prema modelu *case-control* studije, analize genske ekspresije u različitim tkivima, i na kraju kroz analize korelacije gdje se nastojalo ispitati da li postoji eventualna povezanost između analiziranih gena i kliničkog fenotipa.

Predložena doktorska disertacija predstavlja kolaborativni naučnoistraživački projekat između Odjeljenja gastroenterologije i hepatologije Klinike za unutrašnje bolesti Univerzitetsko kliničkog centra Republike Srpske u Banjoj Luci i Laboratorije za humanu genetiku Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu. U studiji je učestvovalo 29 osoba, 20 pacijenata i 9 kontrola. Iako je na početku realizacije projekta bilo predviđeno prikupljanje većeg uzorka, i to po 20 ispitanika i u ispitivanoj i u kontrolnoj grupi, naišli smo na objektivne poteškoće prilikom sakupljanja uzoraka. Stoga je timski odlučeno da se faza prikupljanja okonča nakon dvije godine. Na najveći problem smo nailazili kod sakupljanja uzoraka od zdravih ispitanika, što se moglo i vidjeti po ukupnom broju kontrolnih uzoraka. Neki od njih su željeli učestvovati u studiji, ali nisu željeli dati uzorak biopsije jer bi to značilo da moraju proći kroz endoskopiju. Svi učesnici u kontrolnoj grupi su pristali dati uzorak krvi smatrajući da je to manje bolno i više prihvatljivo. Jednostavnije je bilo prikupiti uzorke od pacijenata jer su svakako prolazili procedure vađenja krvi, a neki i endoskopije. Uzorci koji su prikupljeni na odjeljenju gastroenterologije i hepatologije Klinike za unutrašnje bolesti u Banjoj Luci transportovani su u hladnom režimu u Laboratoriju za humanu genetiku u Sarajevu gdje je izvršena dalja laboratorijska analiza uzoraka. Svi učesnici u studiji su bili

jasno informisani o ciljevima istraživanja, o trajanju studije, kao i o mogućim rizicima, a svojeručnim potpisom informisanog pristanka su dali saglasnost o dobrovoljnom učešću u studiji. Prije samog izvođenja ove studije Etički komitet Univerzitetsko-kliničkog centra Republike Srpske je bio upoznat sa metodologijom i radom te je aktom odobrio njegovu realizaciju. Studija je izvršena u potpunosti u skladu sa odredbama protokola, važećih nacionalnih zakona i propisa Helsinške deklaracije.

5.1. Upitnici

U ovoj studiji pacijenti, kod kojih je dijagnostifikovan IBS i zdrave kontrole samostalno su ispunile sva četiri predviđena klinička upitnika kako bi se postigla što veća subjektivnost i iskrenost u odgovorima. Svi upitnici su bili anonimni i obje grupe ispitanika imale su dovoljno vremena da razmisle o odgovorima. Pored toga, zajedno sa ljekarom specijalistom dali su podatke za CRF koji je bio pripremljen u dvije varijante, za pacijente i za zdrave ispitanike.

5.1.1. CRF

Ovaj upitnik sadrži osnovne identifikacione i demografske podatke i šifrovan je, odnosno dodijeljen mu je jedinstveni identifikacioni broj, kako bi se sačuvao integritet učesnika studije. Neka pitanja iz CRF upitnika su se odnosila i na kliničku, personalnu i porodičnu istoriju, a učesnici su na osnovu Bristolske karte dali informacije o promjenama stolice. Ovim upitnikom moglo se saznati više o navikama učesnika u studiji, da li je pušač, da li konzumira alkohol, da li ima alergiju na neku hranu i slično.

Na osnovu CRF upitnika dobijene su informacije o brojnoj, polnoj i starosnoj strukturi grupe pacijenata i kontrolne grupe. Što se tiče brojnosti i polne strukture od 20 pacijenata, koliko je učestvovalo u studiji, 11 je bilo muškaraca, a 9 žena, a od ukupno 9 kontrola, bilo je 7 muškaraca i 2 žene. Može se zaključiti da je uzorak izjednačen po distribuciji polova u grupi pacijenata, dok je u kontrolnoj grupi očigledna razlika u distribuciji polova što se djelimično može objasniti procedurama kroz koje su zdravi učesnici trebali na dobrovoljnoj osnovi da prođu (vađenje krvi, kolonoskopija).

Kada je u pitanju starosna struktura, prosječna starost u grupi pacijenata je bila 46,5 godina (prosječna starost muškaraca 49,6; prosječna starost žena 42,5), a u kontrolnoj grupi 48,7 godina (prosječna starost muškaraca 48,6; prosječna starost žena 49,5), te se na osnovu prosječnih starosti može zaključiti da nije bilo statistički signifikantne razlike između ove dvije grupe ($P > 0,05$).

5.1.2. GSRS

Skala procjene gastrointestinalnih simptoma (GSRS), verzija prilagođena za IBS je skala koja sadži 13 tačaka na osnovu kojih su pacijenti i zdravi ispitanici dali subjektivnu procjenu o gastrointestinalnim tegobama u proteklih sedam dana. Na osnovu sumiranih rezultata moglo se vidjeti da postoji statistički signifikantna razlika kod grupe pacijenata u odnosu na kontrolu za pitanja koja se tiču nelagode u stomaku, boli i nelagode nakon pražnjenja crijeva, osjećaja nadutosti, gasova, proljeva, česte stolice, tvrde stolice, osjećaja sitosti nakon jela i vidljive nadutosti stomaka. Ovaj nalaz je potpuno u skladu sa kliničkom slikom pacijenata oboljelih od IBS-a.

U analizi poređenja specifičnih podtipova IBS-a moglo se vidjeti da postoji statistički signifikantna razlika između IBS-D pacijenata i zdravih kontrola kada su u pitanju većina simptoma. Kod IBS-D pacijenata za razliku od kontrola bolovi u stomaku su stvarali nelagodu u proteklih sedam dana, javljala se nelagoda i nakon pražnjenja crijeva, imali su osjećaj nadutosti, gasove i proljev. IBS-D pacijenti takođe su imali čestu stolicu, hitnu potrebu za pražnjenjem crijeva i nadutost stomaka.

IBS-C pacijenti u odnosu na kontrole imali su bolove i nelagodu u stomaku, nelagodu nakon pražnjenja crijeva, osjećaj nadutosti, gasove, zatvor i tvrdu stolicu, osjećaj sitosti duže vremena nakon jela te osjećaj nadutosti.

IBS-M pacijenti u odnosu na kontrolu imali su bol i nelagodu, osjećaj nadutosti, te gasove. Na osnovu odgovora dobijenih GSRS upitnikom za IBS-M po pitanju konzistencije stolice, pacijenti u odnosu na kontrolnu grupu su češće imali proljev, čestu i tvrdu stolicu, odnosno ono što je i karakteristično za miješani tip sindroma iritabilnog kolona, a to je da se smjenjuju epizode sa konstipacijom i dijarejom. Takođe IBS-M pacijenti su imali i vidljivu nadutost stomaka u poređenju sa kontrolama.

Sve navedene subjektivne procjene pacijenata su u potpunoj saglasnosti sa njihovom kliničkom slikom i Rim III kriterijumom na osnovu koga je i dijagnostifikovano oboljenje kao i specifični podtip za svakog pacijenta.

5.1.3. PHQ-15

Zahvaljujući upitniku koji se tiče skale jačine somatskih simptoma došlo se do podataka o subjektivnoj procjeni somatizacije i ozbiljnosti simptoma kod pacijenata oboljelih od sindroma iritabilnog kolona, kao i njegovih podtipova. Na osnovu rezultata ovoga kliničkog upitnika moglo se zaključiti da postoji evidentna razlika na signifikantnom nivou između pacijenata i kontrolne grupe za simptome koji se tiču stomačnih bolova, zatvora, česte stolice, proljeva, mučnine, gasova ili slabe probave, osjećaja umora ili gubitka energije i problema sa spavanjem.

Na osnovu analize subjektivnih procjena somatskih simptoma kod specifičnih podtipova, IBS-D i IBS-C su imali u odnosu na kontrolnu grupu simptome kao što su kratkoća daha, problem i bolovi tokom polnog odnosa, zatvor, čestu stolicu, proljev, mučninu, gasove ili slabu probavu, osećaj umora ili gubitak energije. IBS-C pacijenti su dodatno imali stomačne bolove, bolove u leđima, bolove u rukama, nogama ili zglobovima, a kod ženskih pacijenata registrovani su menstrualni grčevi. Pacijenti podtipa IBS-M imali su samo jedan simptom u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika, a to je stomačna bol što može da sugerise na to da su ovi pacijenti prema njihovoj subjektivnoj procjeni sa najmanjim stepenom somatizacije, odnosno da su najslabiji kontrolnim ispitanicima. Pacijenti sa najvišim stepenom somatizacije, odnosno oni pacijenti kod kojih se psihičke i emocionalne promjene najviše odražavaju na tjelesnom planu su pacijenti sa IBS-C.

5.1.4. VSI

Poremećaj centralne kontrole mozga za mehanizame koji moduliraju pokretljivost crijeva mogu biti važniji od disfunkcije samih crijeva. Već je rečeno da anksioznost, koja je u vezi sa gastrointestinalnim senzacijama ili simptomima, igra značajnu ulogu u patofiziologiji IBS pacijenata, a VSI se pokazao kao pouzdan i validan upitnik pomoću kojeg je izvedena subjektivna ocjena tjeskobnog stanja pacijenta u vezi sa gastrointestinalnim simptomima.

Na osnovu rezultata moglo se vidjeti da postoji statistički signifikantna razlika između pacijenata i kontrola po pitanju svih tačaka VSI upitnika što znači da su svi pacijenti imali osjećaj tjeskobe, prestrašenosti, pojave straha čak i do panike, unutrašnji nemir i strepnju pri čemu dominira iščekivanje nekog lošeg i nepovoljnog ishoda. Pacijenti IBS-D podtipa takođe su imali razliku u odgovorima na sve tačke u odnosu na zdrave ispitanike na signifikantnom nivou, a IBS-C na sve osim na drugu tačku što pokazuje da IBS-C pacijenti ipak ne moraju imati osjećaj tjeskobe vezan za jelo na nekom novom mjestu kao što ga imaju pacijenti IBS-D. Pacijenti IBS-M se ne razlikuju od kontrolnih ispitanika na osnovu tačaka 9, 10 i 15, a to je da ne moraju prvo potražiti toalet kada se nađu na novom mjestu, ne osjećaju konstantnu senzaciju u stomaku i ne razmišljaju stalno o tome šta im se dešava u stomaku što navodi na zaključak da IBS-M pacijenti u najmanjoj mjeri osjećaju tjeskobu, napetost i strah vezane za gastrointestinalne simptome.

5.1.5. HAD

Istraživanja u nekoliko zemalja su pokazala da IBS pacijenti imaju veći nivo neuroticizma od zdravih osoba. Neuroticizam se odnosi na široki spektar individualnih razlika u tendenciji doživljavanja negativnih emocija, udruženosti ponašanja i kognitivnih osobina. Neke od osobina koje definišu neuroticizam su strah, anksioznost, bespomoćnost, razdražljivost. Kod IBS pacijenata povezan je visok stepen neuroticizma sa pojačanim bolom (Tanum&Malt, 2001) i slabim odgovorom na liječenje sa antidepresivima (Tanum&Malt, 2000).

Upitnik HAD prvobitno su razvili Zigmond i Snaith 1983. godine i koristi se u kliničkoj praksi za procjenu anksioznosti i depresije koju pacijent proživljava. HAD skala ima 14 stavki od kojih se sedam odnose na anksioznost i isto toliko na depresiju, a osmišljena je sa ciljem da se registruju psihičke promjene kod pacijenata sa fizičkim zdravstvenim problemima. Oko $\frac{3}{4}$ IBS pacijenata tvrde da stres uzrokuje bol u abdomenu i promjenu u motilitetu crijeva. Pacijenti oboljeli od IBS-a prijavljuju znatno veći broj stresnih doživljaja i ranih neželjenih iskustava u odnosu na druge pacijente (Zigmond&Snaith, 1983).

Prema rezultatima ovog upitnika pokazalo se da postoji statistički značajna razlika između grupe pacijenata i zdravih ispitanika kada je riječ o svim tačkama HAD kliničkog

upitnika. Takođe, to isto važi i kada je riječ o IBS-C pacijentima što znači da oni prema subjektivnim procjenama, proživljavaju najveći stepen anksioznosti i depresije. Pacijenti IBS-D prema subjektivnoj procjeni mogu i dalje uživati u stvarima u kojima su ranije uživali, ne obuzima ih osjećaj usplahirenosti, raduju se stvarima sa uživanjem te se po pitanju tih odgovora ne razlikuju od kontrola na osnovu čega se može zaključiti da su pacijenti IBS-D manje anksiozni i depresivni u odnosu na IBS-C. Pacijenti IBS-M imaju najmanje izražen stepen anksioznosti i depresije, odnosno najviše su slični kontrolama od ostala dva podtipa IBS-a, te oni i dalje mogu da uživaju u stvarima kao i prije, mogu da se smiju i doživljavaju smiješnu stranu stvari, raduju se stvarima sa uživanjem te mogu da uživaju čitajući knjigu ili gledaju televizijski program.

Na osnovu analiziranih kliničkih upitnika možemo zaključiti da je IBS biopsihosocijalni poremećaj koji očito nastaje pod stresom, te da biološke, društvene i psihološke komponente igraju ulogu u percepciji bolesti i stvaranju simptoma. Ovo su dakle, subjektivne procjene svakog ispitanika što objektivno ne mora da predstavlja njegovo pravo stanje. To se prvenstveno odnosi na pacijente koji ispoljavaju veći stepen neuroticizma i koji mogu blage somatske simptome interpretirati kao ozbiljne. Kako bi se što efikasnije pristupilo obradi i liječenju pacijenta sa IBS-om, svi ovi faktori bi se svakako trebali uzeti u obzir.

5.2. Asocijacije odabranih genetičkih polimorfizama sa sindromom iritabilnog kolona

Visceralna preosjetljivost je glavna patofiziološka karakteristika IBS-a, ali molekularni mehanizmi koji je izazivaju su veoma slabo razjašnjeni. Pored visceralne preosjetljivosti, ono što karakteriše sindrom iritabilnog kolona su i disfunkcija CNS-a, promjene u motilitetu crijeva, te različite abnormalnosti u neurotransmiterskim sistemima. Najčešće ispitivan neurotransmiterski sistem, na osnovu pregleda dosadašnje literature, je serotoninski. Međutim, različite studije su pokazale važnost i drugih neurotransmiterskih sistema, kao što je norepinefrinski (Zhang et al, 2011) i dopaminski (Shan Li et al, 2006). Takođe, poznato je da su glukokortikoidi odgovorni u fiziološkom odgovoru na stres kroz mehanizam negativne povratne sprege te je njihovo regulisanje predloženo kao potencijalni rizikofaktor vezan za

psihopatologiju stresa (Cristóbal-Narváez et al, 2016). Na osnovu prethodno navedenoga izvršen je i odabir polimorfizama u našoj asocijacijskoj studiji prema *case-control* modelu.

U analizi koja je sprovedena, od 4456 polimorfizama njih 12 je bilo u okviru gena FKBP5. Studija je pokazala da su 2 od 12 bili značajni nakon Bonferroni korekcije. Dalja analiza je pokazala da ne postoji udruženost ovih polimorfizama sa subtipovima IBS-a, međutim nalazi pokazuju da FKBP5 gen ipak može igrati važnu ulogu u etiologiji IBS-a (Camileri et al, 2012). U našoj studiji FKBP5 gen (rs1360780) analizom udruženosti (*Fisher Exact*) nije pokazao statistički značajnu asocijaciju sa pojavom IBS-a niti na nivou alelne, niti na nivou genotipske asocijacije. Genotipske frekvencije su se nalazile u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži što znači da je dobijen nalaz validan. Za T alel (rs1360780) se smatra da uzrokuje više kortizola (*mutant*) od C alela, a genotipizacijom naših uzoraka utvrđeno je da je samo jedan uzorak (P019) bio homozigot TT dok su ostali pacijenti bili heterozigoti (CT). Kod kontrola je utvrđeno da su svi bili heterozigoti, samo je K009 bila homozigot CC. Uzorak P019 je pacijent podtipa IBS-D, iako je homozigot TT usamljeni slučaj u ovoj studiji, dalja istraživanja bi mogla da idu u pravcu analiziranja ovog polimorfizma sa specifičnim dijareja predominantnim podtipom kako bi se utvrdila njihova eventualna povezanost. Gen FKBP5 kodira FK506 vezujući protein za koga se smatra da ima ulogu u imunološkoj reakciji i reakciji sa glukokortikoidnim receptorima koji doprinose posttraumatskom poremećaju. Potrebno je dalje ispitivati ovaj gen i njegove polimorfizme kroz studije asocijacija i neravnoteže povezanosti, kako bi se potvrdilo da FKBP5 pridonosi stvaranju IBS-a, te da se utvrdi kroz koje puteve sve može da djeluje.

Kateholamini učestvuju u modulaciji gastrointestinalnog motiliteta. Simpatički nervni sistem otpušta norepinefrin (NE) koji inhibira acetilholine (Ach) iz motornih neurona (preko α_2 adrenoceptora) što pobuđuje submukozalne neurone i opušta glatku muskulaturu. U crijevima, se međutim, nalazi i dopamin (DA) u mnogo većoj količini nego norepinefrin, a crijeva sadrže visoku koncentraciju specifičnih dopaminskih metabolita 3, 4-dihidroksifenilacetilne kiseline. Za dopamin se smatra da opušta glatku muskulaturu gastrointestinalnog trakta. Postoji 5 podtipova DA receptora koji se mogu grupisati u dvije porodice: D1 porodica (uključuje D1, i D5 receptore) i D2 porodica (uključuje D2, D3 i D4 receptore). Studije na miševima su pokazale da D2 receptori fiziološki inhibiraju intestinalnu pokretljivost. Transkripti koji kodiraju D2 i njegov imunoreaktivni protein su ograničeni na

neurone pa se smatra da je D2 važan posrednik neuronskog dopaminskog odgovora. U eksperimentu sa transgenim miševima, kod kojih nedostaje D2, povećan je broj transkripata koji kodiraju tirozin hidroksilazu (TH) i dopaminski transporter (DAT). Stimulacija receptora D2 čini se važnom u regulaciji biosinteze dopamina i njegovog ponovnog preuzimanja (preko DAT-a) (Shan li et al, 2006). U našoj studiji rađena su dva polimorfizma vezana za dopaminski neurotransmitterski sistem, a to su dopaminski receptor DRD2 i dopaminski transporter DAT. Analizom asocijacija na nivou alela i genotipova utvrđeno je da nije bilo statistički značajne povezanosti između polimorfizma na DRD2 genu i pojave IBS-a. Genotipske frekvencije za DRD2 polimorfizam se nisu nalazile u HWE ravnoteži. Takođe bilo je određenog odstupanja od ravnotežnog stanja i kod genotipskih frekvencija za DAT polimorfizam. Mogući uzroci odstupanja genotipskih frekvencija posmatranih markera od HWE mogu biti različiti kod statističkih populacija u eksperimentalnim uslovima. Odstupanja se mogu javiti kao rezultat stvarne asocijacije polimorfizma (markera) sa osobinom koja se analizira, ali takođe i zbog male veličine uzorka ili ako je uzorak pristrasan. Razlog takođe može biti i nedovoljna informativnost markera ili određene greške u tipizaciji. Kod analize udruženosti DAT polimorfizma pronađena je jaka alelska (0,006) i genotipska (0,023) asocijacija sa pojavom IBS-a što znači da je analizirani DAT polimorfizam udružen sa sindromom iritabilnog kolona u našoj grupi pacijenata. Radi se o polimorfizmu promjenljivog broja tandemskih ponavljanja (*VNTR*) koji je opisan je na 3' nekodirajućem regionu na egzonu 15. U većini slučajeva, najčešći polimorfizmi su od 9 i 10 tandemskih ponovaka koji su detektovani i u ovom radu, a u nekim populacijama primijećeni su i polimorfizmi sa 3, 5, 7, 8 i 11 ponavljanja. Do sada je prijavljeno nekoliko studija koje govore o udruženosti nekih kliničkih fenotipova sa disregulacijom dopaminskog transporta (ADHD, kokainska zavisnost, alkoholizam, pušenje), ali ovo je prva koja pokazuje udruženosti DAT-a sa IBS-om.

Na SERT genu je još 1996. godine identifikovan jedan od prvih polimorfizama, a riječ je o promjenljivom broju tandemskih ponavljanja veličine 17 bp u intronu 2. Prvobitno su opisane tri varijante od 9, 10 i 12 ponavljanja. U našem uzorku su takođe uočene tri alelne varijante: 251 bp, 268 bp i 299 bp koje odgovaraju alelnim varijantama od 9, 10 i 12 ponavljanja. Alelna varijanta sa 11 tandemskih ponovaka se najrjeđe pronalazi u humanoj populaciji i nije uočena u našem uzorku. Do sada su rađene tri studije udruženosti ovog polimorfizma sa IBS-om i niti u jednoj nije pronađena njihova asocijacija. U drugim studijama

potvrđena je asocijacija haplotipa u kombinaciji kratkog alela na 5-HTTLPR promoteru i alela od 12 ponavljanja u intronu 2 gena za serotonininski transporter (Niesler et al 2009). U našem radu, takođe, nije potvrđena asocijacija SRin2 polimorfizma sa pojavom IBS-a, a u analizi haplotipskih asocijacija SRin2 nije pokazao udruženost sa pojavom oboljenja niti u jednoj od kombinacija. Genotipske frekvencije su se nalazile u HWE ravnoteži što potvrđuje validnost rezultata.

U analizi haplotipskih asocijacija za analizirane polimorfizme napravljeno je nekoliko mogućnosti gdje je softver automatski kreirao nekoliko kombinacija. U kombinacijama od dva, tri i četiri polimorfizma nisu identifikovani oni koji pokazuju statistički signifikantnu asocijaciju sa sindromom iritabilnog kolona. Takođe, treba napomenuti da ovi haplotipovi i nisu toliko informativni budući da se svi analizirani polimorfizmi nalaze na različitim hromozomima.

Na samom početku istraživanja prilikom definisanja ovoga rada postavljeni cijevi bili su da se utvrdi da li postoji značajna razlika u distribuciji alelnih, genotipskih i haplotipskih frekvencija odabranih polimorfizama između grupe pacijenata sa IBS-om i zdravih ispitanika. Ovim prospektivnim istraživanjem utvrđeno je da postoji alelna i genotipska asocijacija DAT polimorfizma sa IBS-om, te da osobe koje imaju 434 alel u svom genotipu, imaju 6 puta veću vjerovatnoću da će oboljeti od IBS-a u odnosu na osobe koje nemaju ovu varijantu gena. Sama činjenica da je ovaj nalaz u dosadašnjim istraživanjima jedini koji je udružen sa ovim kliničkim fenotipom, javljaju se moguće ideje u kojem pravcu se treba ići u budućim ispitivanjima. Iako je većina dosadašnjih istraživanja bila usmjerena na serotonin, ovim radom je potvrđeno da dopaminski neurotransmiterski sistem evidentno ima nezanemarljivu ulogu u etiopatologiji IBS-a. Ova studija predstavlja važan korak ne samo u identifikaciji odgovornih gena i njihovih alelnih varijanti za IBS, već i za potpunije razumijevanje ovog fenomenološki heterogenog, fenotipski nestabilnog i etiološki kompleksnog oboljenja.

5.3. Asocijacije varijacija u genskoj ekspresiji i sindroma iritabilnog kolona

Već je rečeno da je etiopatogeneza IBS-a slabo poznata, a brojne studije koje su rađene ukazuju da različite upale i imunološke promjene mogu biti relevantne. Gen TNFSF15 kodira za sintezu citokina koji pripada tumor nekroznim faktorima (TNF) ligand porodice. Ovaj se protein eksprimira u endotelijalnim ćelijama u velikoj količini. Bolesti udružene sa ovim genom uključuju divertikulus i primarni žučni holangitis. Među njegovim povezanim putevima su interakcije ligand-receptor i sa imunološkim funkcijama sluznice. U studiji koja je rađena na pacijentima IBS-D podtipa pronađena je smanjena ekspresija TNFSF15 gena ($P=0,01$) (Camilleri et al, 2014). U drugoj studiji ispitivanja su pokazala da G alel polimorfizma rs4263839 na TNFSF15 genu uzrokuje veću ekspresiju ovoga gena u krvi i intestinalnoj mukozi kod IBS-C pacijenata (Zucchelli et al, 2011). U našoj studiji kada je rađeno poređenje za TNFSF15 gen između grupe pacijenata i zdravih ispitanika, nije bilo statistički značajne razlike niti u uzorcima krvi, niti u biopsijama kontrola. Kada je analizirana njegova ekspresija u grupi pacijenata, pri čemu je poređena količina ekspresije u krvi i tkivu, nalaz je pokazao da postoji povećana ekspresija ovoga gena u biopsijama u odnosu na krv ($P=0,001$). Poređena je ekspresija TNFSF15 u krvi i tkivu i kod zdravih ispitanika, gdje je, takođe, zabilježena povećana ekspresija ovoga gena ($P=0,01$). Ovaj nalaz navodi na zaključak da njegova up regulacija nije povezana sa pojavom IBS-a što ide u prilog činjenici da se protein regularno eksprimira u organizmu u velikim količinama. Prethodne studije su pokazale da rizikoalel G u SNP rs4263839 za koga je dokazano da je asociran sa Kronovom bolešću, takođe udružen i sa IBS-om. Korelacija između genotipa ovoga tačkastog polimorfizma i ekspresije TNFSF15 otkrivena je kako u perifernoj krvi, tako i u rektalnim biopsijama zdravih osoba (Zucchelli et al, 2011) što se u potpunosti podudara i sa našim nalazom. Izvršeno je takođe i poređenje ekspresije TNFSF15 gena između specifičnih podtipova IBS pacijenata i grupe zdravih ispitanika. U ovim analizama asocijacija ekspresije gena pronađena je povećana regulacija kod IBS-M pacijenata ($P=0,005$) u krvi. Uzimajući u obzir nalaze iz prethodnih studija (Camilleri et al, 2014) gdje je ekspresija ovog gena smanjena kod IBS-D pacijenata, možemo zaključiti da su pacijenti IBS-M više slični kontrolnim ispitanicima od pacijenata sa dijarejom, i to ne samo na nivou kliničkog fenotipa.

Za P2RY4 gen je poznato da kodira protein čija je funkcija transport jona u gastrointestinalnom traktu. U prethodnim studijama je pronađeno da postoji povećana ekspresija ovog gena u biopsijama kod IBS pacijenata sa dijarejom u odnosu na zdrave kontrole (Camilleri et al, 2014). U našoj studiji kada su poređene grupe IBS pacijenata i zdravih ispitanika, nije bilo razlike u ekspresiji za P2RY4 gen. U poređenju ekspresije u krvi i biopsije unutar grupe pacijenata pronađena je povećana ekspresija ovoga gena u biopsijama u odnosu na krv ($P=0,043$). Za istu analizu u grupi zdravih ispitanika nije pronađena povećana ekspresija ovoga gena u biopsijama što nas navodi na zaključak da je povećana ekspresija u tkivu pacijenata svakako povezana sa pojavom IBS-a. Isti nalaz je pronađen i za PDZD3 gen. U studijama (Camilleri et al, 2014) u biopsijama kolona IBS-D pacijenata je utvrđena povećana ekspresija PDZD3 gena u odnosu na zdrave kontrole. U našem slučaju nije bilo statistički značajne razlike između IBS pacijenata i kontrola, što se može objasniti malim uzorkom i relativno malim brojem IBS pacijenata sa dijareja podtipom u ukupnom broju oboljelih (8 IBS-D od ukupno 20 pacijenata). Kada se poredila ekspresija u biopsijama u poređenju sa krvi, u grupi pacijenata je pronađena povećana ekspresija u biopsijama u odnosu na krv ($P=0,021$), dok u grupi zdravih ispitanika nije pronađena, što bi se svakako moglo povezati sa pojavom IBS-a.

Gen GUCA2B kodira uroguanilin, endogeni ligand za GC-C receptor, povećavajući ciklični GMP, sekreciju hlora i vode, te ima ulogu u transpotu jona u crijevima. U prethodnim studijama je identifikovan još jedan pozitivno dereguliran jonski transportni mehanizam GUCA2B gena (Camilleri et al, 2014). Kod IBS-D pacijenata je zabilježena povećana ekspresija ovoga gena u tkivu biopsije kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. U našoj studiji nije zabilježena statistički značajna razlika u grupama pacijenata i kontrola. U poređenju ekspresije u krvi i biopsije kod grupe pacijenata pronađena je povećana ekspresija ovoga gena u biopsijama u odnosu na krv, ali takođe isti nalaz je pronađen i u grupi zdravih ispitanika, tako da se može zaključiti da u našem slučaju povećana ekspresija GUCA2B gena u biopsiji najvjerojatnije nije povezana sa pojavom IBS-a. Takođe, u analizi povezanosti ekspresije gena sa specifičnim podtipovima IBS-a, nije bilo značajne razlike u regulaciji GUCA2B u poređenju sa kontrolnim ispitanicima. Među intestinalnim sekretornim mehanizmima, povećana ekspresija GUCA2B i P2RY4 gena je povezana sa povećanom sekrecijom elektrolita i tekućine u enterocitima i submukoznim neuronima, a povećana

ekspresija PDZD3 je povezana sa povećanom sekrecijom natrijumovih jona i apsorpcijom tečnosti, ili povećanjem hlora i sekrecijom tečnosti (Camilleri et al, 2014).

Gen NR1H4 kodira receptor farnesoid X (FXR) koji je vezan za detekciju nivoa žučne kiseline. Povišeni nivo žučne kiseline aktivira FXR koji indukuje smanjenje biosinteze žučne kiseline u hepatocitama. U prethodnim studijama vezanim za ekspresiju gena uočena je granična povećana ekspresija NR1H4 gena kod pacijenata sa IBS-D (Camilleri et al, 2014). U našoj studiji, ovaj gen u grupi pacijenata sa IBS-C je bio povećano eksprimiran ($P=0,002$). Aktivacija ovoga gena sprečava hemijski indukovano zapaljenje crijeva sa pojačanim simptomima kolitisa, inhibicije epitelijalne permeabilnosti i gubitkom peharastih ćelija na modelu miša. Ekspresija ovoga gena se smanjuje kod bolesnika u sluznici kolona sa primarnim sklerozirajućim holangitisom. Ovo su podaci koji ukazuju na moguću protektivnu ulogu NR1H4 gena i njegovoj ekspresiji u kolonu (<https://www.omim.org/entry/603826>).

Sami počeci u ispitivanju vazoaktivnog intestinalnog polipeptida vezuje se za davnu 1980. godinu kada je histohemijskim metodama dokazan povećan sadržaj VIP-a u mukozu i submukozu pacijenata oboljelih od Kronove bolesti. Promjena u inervaciji VIP-a može biti prisutna i u susjednim histološki normalnim dijelovima crijeva kod pacijenata oboljelih od Kronove bolesti kao odgovor na iritirajući podsticaj upalnog procesa ili kao izliječen dio prethodno upaljenog crijeva (Bishop et al, 1980). Korištenjem specifičnih radioimunoloških testova istraživanja su pokazala da postoji značajano smanjenje VIP-a u rektalnoj sluznici i sluznici kolona kod pacijenata sa ulceroznim kolitisom u poređenju sa zdravim ispitanicima, a promjena VIP-a je u korelaciji sa stepenom upale sluznice (Surrenti et al, 1993). Dalja istraživanja su išla u smjeru ispitivanja stresa kao glavnog uzroka Kronove bolesti i ulcerativnog kolitisa, a glavni geni kandidati trebali su da odgovore na dva uslova: da imaju ulogu u regulaciji imuniteta i ćelijske odbrane od oštećenja tkiva i da imaju ulogu u odgovoru na stres (Maunder, 1999). *Medline* pretraživanjem, među šest kandidata našao se i VIP gen. Neuroni submukoznog plexusa (ENS) otpuštaju VIP u *lamina propria*-u, ali ga takođe mogu oslobađati i peritonealni mastociti, trombociti, eozinofili, bazofili i neutrofilni. VIP ima mješovitu regulatornu ulogu koja je pretežno inhibitorna, a nalazi su sugerisali da može da bude smanjena ekspresija ovoga gena kao odgovor na stres (Maunder, 1999). Izazivanje kolitisa trinitrobenzin-sulfidnom kiselinom (TNBS) na modelu miša pokazao je viscelarnu i

somatsku preosjetljivost, a zabilježeno je da ovaj intezivni kolitis oponaša post infekcijski PI-IBS. VIP je od nedavno prepoznat i kao obećavajuća farmakoterapijska meta zbog njegove uloge u olakšavanju ukupne pokretljivosti crijeva i snažan je relaksant mišića crijeva. Ima široku distribuciju u tijelu i mnoge fiziološke efekte uključujući egzokrinu i endokrinu sekreciju, neuroprotektivnu ulogu, ulogu u ćelijskoj diferencijaciji i ulogu u regulaciji imunog odgovora (Del Valle-Pinero et al, 2015). U studijama ekspresije gena kod IBS pacijenata sa dijarejom zabilježena je smanjena ekspresija VIP gena u biopsijama u odnosu na zdrave ispitanike (Camilleri et al, 2014). U našoj studiji je takođe zabilježena smanjena ekspresija VIP gena (negativna deregulacija) u biopsijama pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike. U poređenju ekspresije gena u istoj grupi ali različitim tkivima, zabilježena je povećana ekspresija ovoga gena u biopsijama kod zdravih ispitanika što sugerise na protektivnu ulogu VIP-a u eliminaciji pro-IBS faktora rizika. Ono što je takođe zanimljivo je to da je zabilježena njegova povećana ekspresija u krvi kod IBS-M pacijenata, a to se može povezati sa činjenicom da su IBS-M pacijenti na osnovu kliničkog fenotipa sličniji zdravim ispitanicima nego IBS-D pacijentima.

5.4. Korelacije između ekspresija i kliničkih fenotipova

Jedna od najvećih poteškoća prilikom dijagnostifikovanja i liječenja IBS-a je svakako njegov izrazito heterogeni fenotip kao i sama multifaktorska priroda oboljenja. Analizama korelacije smo ispitali da li postoji eventualna povezanost između varijacije u ekspresiji gena u različitim tkivima i determinisanih kliničkih fenotipova sa dijagnozom IBS-a.

U grupi pacijenata najinformativnijim genom se pokazao PDZD3 čija je funkcija prvenstveno u regulaciji jonskog transporta. Analizama je pokazano da stoji u negativnoj korelaciji sa ukupnom sumom odgovora VSI kliničkog upitnika koji se odnosi na specifičnu anksioznost pacijenata u vezi sa njihovim gastrointestinalnim simptomima. Ovo znači da što je manji rezultati u skorju VSI upitnika, veća je ekspresija ovoga gena u tkivu i krvi. Takođe je ustanovljeno da se određena pitanja VSI upitnika nalaze u negativnoj korelaciji sa ekspresijom istoga gena, odnosno da je kod pacijenata koji konstantno osjećaju senzaciju u stomaku, čim osjećaju nelagodu uplaše se, te kod pacijenata koji često misle da su tegobe koje imaju vezane

za neku tešku bolest, povećana ekspresija PDZD3 gena. Analizama je utvrđeno da ekspresija PDZD3 gena stoji u pozitivnoj korelaciji sa GSRS upitnikom koji je prilagođen za pacijente sa IBS-om, a odnosi se na subjektivnu procjenu jačine gastrointestinalnih simptoma. Dakle, pozitivna korelacija ukazuje na to da veći ukupan skor pitanja GSRS upitnika korelira sa povećanom ekspresijom u krvi PDZD3 gena kod pacijenata. Takođe, neka pitanja GSRS upitnika pokazuju srednje jaku korelaciju sa ekspresijom ovoga gena, a odnose se na čestu stolicu, hitnu potrebu za pražnjenjem crijeva, te na osjećaj sitosti ubrzo nakon početka jela. Ovi rezultati korelacija PDZD3 gena sa VSI i GSRS kliničkim upitnicima, te sa nekim njihovim specifičnim odgovorima, podudaraju se sa nalazima prethodnih studija da je kod pacijenata sa predominantnom dijarejom utvrđena povećana ekspresija ovoga gena u tkivu pacijenata. Studije su pokazale da je inače povećana ekspresija ovoga gena u tkivu pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike (Camilleri et al, 2014), a naša studija je pokazala da je veća ekspresija ovoga gena u tkivu nego u krvi kod pacijenata oboljelih od IBS-a.

Urađena je korelacija i za grupu sa zdravim ispitanicima da bi se utvrdilo da pronađena korelacija kod pacijenata je svojstvena samo za tu grupu. Kod zdravih ispitanika PDZD3 gen nije korelirao niti sa jednim kliničkim upitnikom što potvrđuje validnost korelacije. U grupi zdravih kontrola je pronađena negativna korelacija ekspresije P2RY4 gena u krvi i VSI upitnika, kao i ekspresije GUCA2B u krvi i PHQ15 skale. Ovaj nalaz sugerira moguću korelaciju ispitanika sa njihovom procjenom anksioznosti i jačine nekih somatskih simptoma u kontrolnoj grupi, a kako je grupa kontrola formirana na osnovu osoba koji su se javljali gastroenterologu zbog sumnje i pozitivne porodične anamneze na kolorektalni kancer, onda se ova korelacija najprije može dovesti u vezu sa tim stanjem, a nikako sa IBS-om. Kontrolna grupa ispitanika je grupa zdravih osoba što možemo sa sigurnošću tvrditi samo kad je u pitanju sindrom iritabilnog kolona, a nikako za njihovo opšte psiho-fizičko stanje.

6. ZAKLJUČAK

U ovu studiju je uključeno ukupno 29 ispitanika, 20 pacijenata kojima je na osnovu Roma III kriterijuma dijagnostifikovan IBS i 9 kontrolnih ispitanika koji nisu imali nikakvih simptoma vezanih za IBS.

Obrada svih pacijenata i zdravih kontrola, kao i prikupljanje uzoraka realizovano je uz pomoć ljekara specijaliste gastroenterologa i hepatologa sa Klinike za unutrašnje bolesti UKC RS i tehničara. Etički komitet UKC RS je dao odobrenje za izvođenje studije, svi ispitanici su dali saglasnost za učestvovanje u studiji te potpisali informativni pristanak. Studija je u potpunosti sprovedena u skladu sa odredbama protokola, važećih nacionalnih zakona, kao i pravila i propisa donesenih Helsinškom deklaracijom.

Svi učesnici studije su samostalno ispunili četiri klinička upitnika HAD, PHQ15, GSRs-IBS i VSI čime se postigla veća objektivnost i iskrenost u odgovorima, a dobila subjektivna procjena njihove kliničke slike, simptoma i psiholoških aspekata.

Imajući u vidu dobijene rezultate možemo zaključiti da standardna metoda izolacije DNK izolovanjem (Miller et al, 1988) se pokazala pouzdanom gdje je dobijena DNK odgovarajućeg kvaliteta koja je zadovoljila potrebe eksperimenta ovoga tipa, a vizualizacija na horizontalnoj gel elektroforezi i razdvajanje fragmenata na sekvenceru *Genetic Analyzer* pokazala se zadovoljavajućima.

Razvijene su originalne metode amplifikacije za polimorfizme FKBP5, DRD2, DAT i SRin2 koji su se pokazali validnim i pouzdanim za genotipizaciju potencijalno suspektnih gena odnosno polimorfizama vezanih za IBS.

Nakon genotipizacije izračunate su frekvencije gena i genotipova, kao i HWE. Genotipske frekvencije za DAT i DRD2 polimorfizam se nisu nalazile u ravnoteži. Odstupanja od HWE mogu da ukažu na stvarnu asocijaciju polimorfizma sa IBS-om, ali i na nedovoljnu informativnost polimorfizma, neku grešku u genotipizaciji ili na mali broj uzoraka.

Kada je u pitanju analiza genske asocijacije sa dijagnozom IBS, naša studija je pokazala da DAT ima jaku statistički signifikantnu udruženost sa sindromom iritabilnog

kolona, kako na nivou alela (**P=0,006**), tako i na nivou genotipova (**P=0,031**), te se procjenjuje da osobe sa 434 alelom (9 ponavljanja) imaju 6 puta veću vjerovatnoću da obole od IBS-a.

U analizi haplotipskih asocijacija za analizirane polimorfizme od dva, tri i četiri polimorfizma nisu identifikovani oni koji pokazuju statistički signifikantnu asocijaciju ($P < 0.05$) sa sindromom iritabilnog kolona.

U dosadašnjim istraživanjima ovo je jedini nalaz da je DAT polimorfizam udružen sa IBS kliničkim fenotipom, te se javljaju moguće ideje u kojem pravcu se treba ići u budućim ispitivanjima. Iako je većina dosadašnjih istraživanja bila usmjerena na serotonin, ovim radom je potvrđeno da dopaminski neurotransmiterski sistem evidentno ima ključnu ulogu u etiopatologiji IBS-a.

Ekstrakcija RNK iz krvi i biopsija kolona izvršena je veoma uspješno i jednostavno uz pomoć *Quick RNA Mini Prep* kita što se pouzdano potvrdilo određivanjem njene koncentracije uz pomoć *Qubit 2.0* fluorimetra. *Allprotect Tissue Reagent* se pokazao veoma pouzdanim za brzu stabilizaciju RNK u tkivima, a posebno je pogodan kod uzoraka koji se moraju transportovati.

Reakcija reverzne transkripcije pomoću *ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis* kita je uspješna pri čemu se stvorila dovoljna količina kvalitetne cDNK za dalje analize pomoću *Real-Time* PCR.

Metoda mjerenja genske ekspresije vizualizacijom sa *Sybr green* i pomoću *Real-Time* PCR-a, dala je validne rezultate za TNFSF15, P2RY4, VIP, GUCA2B, PDZD3 i NR1H4 gene.

U analizi razlike u ekspresiji gena između pacijenata i kontrola u biopsijama, u našoj studiji je uočena smanjena ekspresija VIP gena na nivou statističke značajnosti (**P=0,045**) ili za 3,102 puta u grupi pacijenata u odnosu na zdrave kontrole.

U analizi razlika u ekspresiji odabranih gena u grupi pacijenata između krvi i biopsija, u našoj studiji je uočena statistički značajna razlika za četiri analizirana gena: PDZD3 (**P=0,021**), P2RY4 (**P=0,043**), GUCA2B (**P=0,002**) i TNFSF15 (**P=0,001**). U poređenju razlike u ekspresiji kod grupe zdravih ispitanika između krvi i tkiva, takođe se mogla uočiti

povećana ekspresija na statistički značajnom nivou za tri gena: TNFSF15 (**P=0,001**), VIP (**P=0,018**) i GUCA2B (**P=0,001**).

U poređenju razlike u ekspresiji gena kod oboljelih IBS-C u biopsijama je uočena povećana ekspresija NR1H4 gena kod pacijenata za oko 28,8 puta u odnosu na zdrave kontrole na signifikantnom nivou (**P=0,002**). U poređenju IBS-M pacijenata sa grupom zdravih kontrola uočena je statistički značajna povećana ekspresija gena u krvi za TNFSF15 (**P=0,005**) i VIP (**P=0,025**).

U analizi korelacija utvrđeno je da postoji negativna korelacija ekspresije PDZD3 gena u krvi i ukupnog skora VSI upitnika (**r= -0,548; P=0,018**), te takođe negativna korelacija ekspresije PDZD3 gena u biopsiji i ukupnog skora VSI upitnika (**r= - 0,708; P=0,033**). U grupi pacijenata utvrđena je i pozitivna korelacija srednje jačine između ekspresije gena PDZD u krvi i ukupnog skora GSRS upitnika (**r = 0,472; P=0,045**). Ovi rezultati korelacija PDZD3 gena sa VSI i GSRS kliničkim upitnicima, te sa nekim njihovim specifičnim odgovorima, podudaraju se sa nalazima prethodnih studija gdje je utvrđena povećana ekspresija ovoga gena u tkivu pacijenata, kako kod pacijenata sa predominantnom dijarejom, tako i kod svih pacijenata oboljelih od IBS-a.

Tokom izrade ove studije postojao je veliki broj ograničenja, od limitiranog broja uzoraka do limitiranog broja gena za analizu, jer ovakve studije koje uključuju sekvenciranja i analize ekspresije podrazumijevaju veće izdatke koji moraju biti ekonomski i naučno opravdani. Kao što se do sada iz svega moglo zaključiti, klinički fenotip IBS-a nije stabilan, a genotipsko-fenotipsku asocijaciju je veoma teško dokazati.

Naša namjera je bila da se što bolje rasvijetle mehanizmi i putevi koji dovode do pojave IBS-a kao jednog multifaktorskog, složenog, heterogenog, nestabilnog i veoma čestog oboljenja, te da se izdiferencira solidna osnova za buduće studije IBS. Studije kao što je ova su važne, jer zahvaljujući boljem razumijevanju genetičkih i negenetičkih determinanti IBS, možemo doprinijeti boljoj tehnologiji dijagnostike i liječenja IBS-a sa širim socioekonomskim značajem.

7. LITERATURA

- Agarwal N., Spiegel B.M. (2011). The effect of irritable bowel syndrome on health-related quality of life and health care expenditures. *Gastroenterol Clin North Am*, 40(1):11-19.
- Aragon G., Graham D.B., Borum M., Doman D.B. (2010). Probiotic therapy for irritable bowel syndrome. *Gastroenterology and Hepatology*, Vol 6, Issue 1.
- Basu P.P., Shah N.J., Krishnaswamy N., Pacana T. (2011). Prevalence of restless legs syndrome in patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*, 17(39): 4404-4407.
- Bilić A., Jurčić D., Mihanović M. (2006). Functional disorders of the gastrointestinal tract: Irritable bowel syndrome. *Medicus*, Vol.15, No 1, 63-71.
- Bishop A.E., Polak J.M., Bryant M.G., Bloom S.R., Hamilton S. (1980). Abnormalities of Vasoactive Intestinal Polypeptide-Containing Nerves in Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 79:853-860.
- Black T.P., Manolakis C.S., Di Palma J.A. (2012). "Red Flag" Evaluation Yield in Irritable Bowel Syndrome. *J Gastrointestin Liver Dis*, 21(2): 153-6.
- Burbige E.J. (2010). Irritable bowel syndrome: diagnostic approaches in clinical practice. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 127-137.
- Camilleri M. (2009). Serotonin in the Gastrointestinal Tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 16(1): 53-59.
- Camilleri M. (2012). Irritable bowel syndrome: how useful is the term and the diagnosis? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 5(6)381-386.
- Camilleri M., Busciglio I., Carlson P., McKinzie S., Burton D., Baxter K., Ryks M., Zinsmeister A.R. (2008). Candidate genes and sensory functions in health and irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295(2):G219-225.

- Camilleri M., Carlson P., McKinzie S., Grudell A., Busciglio I., Burton D., Baxter K., Ryks M., Zinsmeister A.R. (2008). Genetic variation in endocannabinoid metabolism, gastrointestinal motility, and sensation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294(1): G13-9.
- Cammileri M., Carlson P., Acosta A., Busciglio I., Nair A.A., Gibbons S.J., Farrugia G., Klee E.W. (2014). RNA sequencing shows transcriptomic changes in rectosigmoid mucosa in patients with irritable bowel syndrome-diarrhea: a pilot case-control study. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 306(12): G1089-G1098.
- Creed F., Craig T., Farmer R. (1989). Functional abdominal pain, psychiatric illness, and life events. *Gut*, 29: 235-42.
- Cristóbal-Narváez P., Sheinbaum T., Rosa A., Ballespí S., Castro-Catala M., Peña E., Kwapil T.R., Barrantes-Vidal N. (2016). The Interaction between Childhood Bullying and the FKBP5 Gene on Psychotic-Like Experiences and Stress Reactivity in Real Life. *Plos One*, 11(7).
- Czogalla B., Schmitteckert S., Houghton L.A., Sayuk G.S., Camilleri M., Olivo-Diaz A., Spiller R., Wouters M.M., Boeckxstaens G., Bermejo J.L., Niesler B. (2015). A meta-analysis of immunogenetic case-control association studies in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*, 27:717–27.
- Del Valle-Pinero A.Y., Sherwin L.B., Anderson E.M., Caudle R.M., Henderson W.A. (2015). Altered vasoactive intestinal peptides expression in irritable bowel syndrome patients and rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *World J Gastroenterol*, 21(1): 155-163.
- Doucette-Stamm L.A., Blakely D.J., Tian J., Mockus S., Mao J.I. (1995). Population genetic study of the human dopamine transporter gene (DAT1). *Genet Epidemiol*, 12(3):303-8.
- Drenkard E., Richter B.G., Rozen S., Stutius L.M., Angell N.A., Mindrinos M., Cho R.J., Oefner P.J., Davis R.W., Ausubel F.M. (2000). A Simple Procedure for the Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms Facilitates Map-Based Cloning in Arabidopsis. *Plant Physiol*, Vol. 124: 1483-92.

- Drossman D.A. (1999). Review article: an integrated approach to the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharm Therap*, 13: 3–14.
- Drossman D.A. (2006). The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology*, 130: 1377-1390.
- Eubanks J.H., Djabali M., Selleri L., Grandy D.K., Civelli O., McElligott D.L., Evans G.A. (1992). Structure and linkage of the D2 dopamine receptor and neural cell adhesion molecule genes on human chromosome 11q23. *Genomics*, Vol 14,1010-1018.
- Fujii T., Ota M., Hori H., Hattori K., Teraishi T., Matsuo J., Kinoshita Y., Ishida I., Nagashima A., Kunugi H. (2014). The common functional FKBP5 variant rs1360780 is associated with altered cognitive function in aged individuals. *Scientific reports*, 4: 6696.
- Fukudo S., Kanazawa M., Mizuno T., Hamaguchi T., Kano M., Watanabe S., Sagami Y., Shoji T., Endo Y., Hongo M., Itoyama Y., Yanai K., Tashiro M., Aoki M. (2009). Impact of serotonin transporter gene polymorphism on brain activation by colorectal distention. *NeuroImage*, 47(3):946–951.
- Gazouli M., Wouters M.M., Kapur-Pojškić L., Bengtson M., Friedman E., Nikčević G., Demetriou C.A., Mulak A., Santos J., Niesler B. (2016). Lessons learned — resolving the enigma of genetic factors in IBS. *Gastroenterology and hepatology*. 206.
- Gershon M.D., Tack J. (2007). The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*, 132(1):397-414.
- Grudell A.B., Camilleri M., Carlson P., Gorman H., Ryks M., Burton D., Baxter K., Zinsmeister A.R. (2007). An exploratory study of the association of adrenergic and serotonergic genotype and gastrointestinal motor functions. *Neurogastroenterol Motil*, 20(3):213-9.
- Halmos E.P., Power V.A., Shepherd S.J., Gibson P.R., Muir J.G. (2014). A Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 146:67-75.
- Heaton K.W., Lewis S.J. (1997). Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol.32, no.9, 920 – 924.

- Henström M., D'Amato M. (2016). Genetics of irritable bowel syndrome. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3:7.
- Herring M.P., O'Connor P.J., Dishman R.K. (2010). The effect of exercise training on anxiety symptoms among patients: a systematic review. *Arch Intern Med*, 170(4):321-331.
- Jamali R., Jamali A., Poorrahnama M., Omidi A., Jamali B., Moslemi N., Ansari R., Dolatshahi S., Daryani N.E. (2012). Evaluation of health related quality of life in irritable bowel syndrome patients. *Quality of Life Outcomes*, 10:12.
- Johannesson E., Simren M., Strid H., Bajor A., Sadik R. (2011). Physical activity improves symptoms in irritable bowel syndrome: a randomized controlled trial. *Am Gastroenterol*, 106(5):915-922.
- Johanson J.F., Kralstein J. (2011). Chronic constipation: a survey of the patient perspective. *Aliment Pharmacol Ther*, 23: 697-710.
- Kaiser R., Muller-Oerlinghausen B., Filler D., Tremblay P.B., Berghofer A., Roots I., Brockmoller J. (2002). Correlation between serotonin uptake in human blood platelets with the 44-bp polymorphism and the 17-bp variable number of tandem repeat of the serotonin transporter. *Am. J. Med. Genet*, 114:323–328.
- Kalantar J.S., Locke G.R.3rd, Zinsmeister A.R., Beighley C.M., Talley N.J. (2003). Familial aggregation of irritable bowel syndrome: a prospective study. *Gut*, 52(12):1703-1707.
- Kroenke K., Spitzer R.L., Williams J.B. (2002). The PHQ-15: validity of a new measure for evaluating the severity of somatic symptoms. *Psychosom Med*, 64(22): 258-66.
- Labus J.S., Bolus R., Chang L., Wiklend I., Naesdal J., Mayer E.A., Naliboff B.D. (2004). The visceral sensitivity index: development and validation of gastrointestinal symptom- specific anxiety scale. *Aliment Pharmacol Ther*, 20(1): 89-97.
- Labus J.S., Mayer E.A., Hamaguchi T., Mizuno T., Kano M., Fukudo S. (2008). 5-HTTLPR gene polymorphism modulates activity and connectivity within an emotional arousal network of healthy control subjects during visceral pain. *Gastroenterology*, 134:A121.

- Ladabaum U., Boyd E., Zhao WK., Mannalithara A., Sharabidze A., Singh G., Chung E., Levin T.R. (2012). Diagnosis, Comorbidity and Management of Irritable Bowel Syndrome in Patients in Large Health Maintenance Organization. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10(1):37-45.
- Leahy A., Clayman C., Mason I., Loyd G., Epstein O. (1998). Computerised biofeedback games: a new method for teaching stress management and its use in irritable bowel syndrome. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, 32(6):552-556.
- Lesch K.P., Balling U., Gross J., Strauss K., Wolozin B.L., Murphy D.L., Riederer P. (1994). Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen Sect*, 95(2):157-62.
- Li Q., Winston JH, Sarna S.K. (2013). Developmental origins of colon smooth muscle dysfunction in IBS-like rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305: G503–G512.
- Linden D.R., Sheryl L.W., Elice M.B., Gary M.M. (2009). Novel Promoter and Alternate Transcription Start Site of the Human Serotonin Reuptake Transporter (SERT) in Intestinal Mucosa. *Neurogastroenterol Motil*, 21(5): 534-e11.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982). Molecular Cloning - a laboratory manual. USA: pp. 157-162.
- Maunder R. (2000). Mediators of stress effects in inflammatory bowel disease: Not the usual suspects. *Journal of Psychosomatic Research* 48, 569±577.
- Mawe G.M., Coates M.D., Moses P.L. (2006). Review article: Intestinal serotonin signaling in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 23, 1067-1076.
- Mayer E.A. (2011). The Search for Biomarkers and Endophenotypes in Functional Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology*, 140(5).
- Mertz H.R. (2003). Irritable bowel syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 349: 2136-2146.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky HF, 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, p. 16(3):1215.

- Miyazato M., Nakazato M., Matsukura S., Kangawa K., Matsuo H. (1997). Genomic structure and chromosomal localization of human uroguanylin. *Genomics*, 43(3):359-65.
- Moore N.A., Bruce J.S., Manning D.D., Guzzo P.R. (2013). Partial Agonism of 5-HT₃ Receptors: A Novel Approach to the Symptomatic Treatment of IBS- D. *ACS Neurosci*, 4, 43-37.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Bio*, 51: 263-273.
- Muscatello M.R., Bruno A., Pandolfo G., Micò U., Stilo S., Scaffidi M., Consolo P., Tortora A., Paallio S., Giacobbe G., Familiari L., Zoccali R. (2010). Depression, anxiety and anger in subtypes of irritable bowel syndrome patients. *J Clin Psychol Med Settings*, 17(1):64-70.
- Niesler B., Kapeller J., Fell C., Atkinson W., Möller D., Fischer C., Whorwell P., Houghton L.A. (2010). 5-HTTLPR and STin2 polymorphisms in the serotonin transporter gene and irritable bowel syndrome: effect of bowel habit and sex. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22:856-861.
- Park J.M., Choi M.G., Park J.A., Oh J.H., Cho Y.K., Lee S.I., Kim S.I., Choi K.Y., Chung I.S. (2006). Serotonin transporter gene polymorphism and irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*, 18, 995–1000.
- Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30(9):e36.
- Tanum L., Malt U.F. (2001). Personality and physical symptoms in nonpsychiatric patients with functional gastrointestinal disorder. *Journal of Psychosomatic Research*, 50: 139–14.
- Pimentel M., Lembo A., Chey W.D., Zakko S., Ringel Y., Yu J., Mareya S.M., Shaw A.L., Bortey E., Forbes W.P. (2011). Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *N Engl J Med*, 364:22-32.

- Pizzonia J. (2001). Electrophoresis gel image processing and analysis using the KODAK 1D software. *BioTechniques*, 30: 1316-1320.
- Porter C.K., Cash B.D., Pimentel M., Akinseye A., Riddle M.S. (2012). Risk of inflammatory bowel disease following a diagnosis of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 12:55.
- Saad R.J. (2011). Peripherally acting therapies for the treatment of irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Clin North Am*, 40(1):163-182.
- Saito Y.A. (2011). The role of genetics in IBS. *Gastroenterol Clin North Am*, 40(1):45-67.
- ShanLi Z., Schmauss C., Cuenca A., Ratcliffe E., Gershon M.D. (2006). Physiological Modulation of Intestinal Motility by Enteric Dopaminergic Neurons and the D2 Receptor: Analysis of Dopamine Receptor Expression, Location, Development, and Function in Wild-Type and Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience*, 26(10):2798–2807.
- Si J.M., Wang L.J., Chen S.J., Sun L.M., Dai N. (2004). Irritable bowel syndrome consultants in Zhejiang province: The symptoms pattern, predominant bowel habit subgroups and quality of life. *World J Gastroenterol*, 10(7): 1059-1064.
- Simren M., Giovanni B., Flint H.J., Spiegel B.M.R., Spiller R.C., Vanner S., Verdu E.F., Whorwell P.J., Zoetendal E.G. (2013). Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut*, 62(1):159-176.
- Snaith R.P. (2003). The hospital anxiety and depression scale. *Health and Quality of Life Outcomes*, 1:29.
- Song S.W., Park S.J., Kim S.H., Kang S.G. (2012). Relationship between irritable bowel syndrome, worry and stress in adolescent girls. *J Korean Med Sci*, 27: 1398-1404.
- Spiller R., Aziz Q., Creed F., Emmanuel A., Houghton L., Hungin P., Jones R., Kumar D., Rubin G., Trudgill N., Whorwell P. (2007). Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management. *Gut*, 56: 1770-1798.

- Surrenti C., Renzi D., Garcea M.R., Surrenti E., Salvadori G. (1993). Colonic vasoactive intestinal polypeptide in ulcerative colitis. *J Physiology*, 87,307-311.
- Suzuki H., Hibi T. (2011). Overlap Syndrome of Functional Dyspepsia and Irritable Bowel Syndrome - Are Both Diseases Mutually Exclusive? *J Neurogastroenterol Motil*, Vol. 17 No. 4.
- Svedland J., Sjödin I., Dotevall G. (1988). GSRS a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. *Dig Dis Sci*, 33(2): 129-34.
- Swan C., Duroudier N.P., Campbell E., Zaitoun A., Hastings M., Dukes G.E., Cox J., Kelly F.M., Wilde J., Lennon M.G., Neal K.R., Whorwell P.J., Hall I.P., Spiller R.C. (2013). Identifying and testing candidate genetic polymorphisms in the irritable bowel syndrome (IBS): association with TNFSF15 and TNF α . *Gut*, 62:985–94.
- Tanum L., Malt U.F. (2000). Personality traits predict treatment outcome with an antidepressant in patients with functional gastrointestinal disorder. *Scand J Gastroenterol*, 35(9):935-41.
- Vaiopoulou A., Karamanolis G., Psaltopoulou T., Karatzias G., Gazouli M. (2014). Molecular basis of the irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 20(2): 376-383.
- Villani A., Saito Y., Lemire M. (2009). Validation of genetic risk factors for post-infectious irritable bowel syndrome (IBS) in patients with sporadic IBS. *Gastroenterology*, 136:289.
- Wang Y.M., Chang Y., Chang Y.Y., Cheng J., Li J., Wang T., Zhang Q.Y., Liang D.C., Sunn B., Wang B.M. (2012). Serotonin transporter gene promoter region polymorphisms and serotonin transporter expression in the colonic mucosa of irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol Motil* 24, 560–e255.
- Wouters M.M., Lambrechts D., Knapp M., Cleynen I., Whorwell P., Agréus L., Dlugosz A., Schmidt P.T., Halfvarson J., Simrén M., Ohlsson B., Karling P., Van Wanrooy S., Mondelaers S., Vermeire S., Lindberg G., Spiller R., Dukes G., D'Amato M., Boeckxstaens G. (2014). Genetic variants in CDC42 and NXP1 as susceptibility factors for constipation and diarrhoea predominant irritable bowel syndrome. *Gut*, 63:1103–11.

- Yao X., Yang Y.S., Cui L.H., Zhao K.B., Zhang Z.H., Peng L.H., Guo X., Sun G., Shang J., Wang W.F., Feng J., Huang Q. (2012). Subtypes of irritable bowel syndrome on Rome III criteria: A multicenter study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 20(4):760-765.
- Yarandi S.S., Nasser-Moghaddam S., Mostajabi P., Malekzadeh R. (2010). Overlapping gastroesophageal reflux disease and irritable bowel syndrome: Increased dysfunctional symptoms. *World J Gastroenterol*, 16(10): 1232-1238.
- Zhang R., Zou N., Li J., Lv H., Wei J., Fang X.C., Qian J.M. (2011). Elevated expression of c-fos in central nervous system correlates with visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome (IBS): a new target for IBS treatment. *Int J Colorectal Dis*, 26:1035–1044.
- Zhang Z.F., Duan Z.J., Wang L.X., Yang D., Zhao G., Zhang L. (2014). The serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and irritable bowel syndrome: a meta-analysis of 25 studies. *Gastroenterol*, 14:23.
- Zigmond A.S., Snaith R.P. (1983). The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand*, 67(6):361-70.
- Zucchelli M., Camilleri M., Andreasson A.N., Bresso F., Dlugosz A., Halfvarson J., Törkvist L., Schmidt P.T., Karling P., Ohlsson B., Duerr R.H., Simren M., Lindberg G., Agreus L., Carlson P., Zinsmeister A.R., D'Amato M. (2011). Association of TNFSF15 polymorphism with irritable bowel syndrome, *Gut*, 60(12):1671-7.

Internetski navodi:

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DRD>

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC6A3>

<https://www.snpedia.com/index.php/SLC6A3>

<https://www.snpedia.com/index.php/Rs464049>

<http://www.omim.org/entry/182138>

<http://www.bio-rad.com/en-ba/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr>

http://www.proteinatlas.org/ENSG00000181634-TNFSF15/tissue#gene_information

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9966>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=5030>

http://www.proteinatlas.org/ENSG00000186912-P2RY4/tissue#gene_information

<https://www.omim.org/entry/192320#text>

http://www.proteinatlas.org/ENSG00000146469-VIP/tissue#gene_information

http://www.proteinatlas.org/ENSG00000044012-GUCA2B/tissue#gene_information

http://www.proteinatlas.org/ENSG00000172367-PDZD3/tissue#gene_information

<https://www.omim.org/entry/607146#description>

<https://www.omim.org/entry/603826#description>

http://www.proteinatlas.org/ENSG00000012504-NR1H4/tissue#gene_informatio

<https://www.omim.org/entry/603826>

<http://depts.washington.edu/seaqol/IBSQOL>

www.genome.gov

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6532>

<http://omim.org/entry/182138>

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC6A4>

Identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama asociranih sa sindromom iritabilnog kolona

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs2020938>

<https://omim.org/entry/126450>

Biografija autora

Irina Milovac je rođena 17.06.1978. godine u Banjoj Luci gdje je završila osnovnu školu. Gimnaziju je završila u Brnu, Republika Češka. Godine 2002. upisala je Prirodno-matematički fakultet u Banjoj Luci, odsjek za biologiju, opšti smjer. Diplomirala je u martu 2008. godine sa prosječnom ocjenom 8.75 i stekla stručno zvanje Diplomirani biolog.

Od juna do decembra 2008. godine učestvovala je u izvođenju vježbi na predmetima Humana genetika i Biologija sa genetikom, a 11.12.2008. godine izabrana je za asistenta na istim predmetima na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci. Školske 2008/09 kao i 2009/10 godine bila je angažovana kao saradnik u izvođenju vježbi na predmetu Humana genetika na Studijskom programu psihologije, Filozofskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci.

Postdiplomski studij upisala je školske 2009/10. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Sarajevu, odsjek za biologiju, smjer genetika. Eksperimentalni dio magistarskog rada je radila na Institutu za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju u Sarajevu. Magistarski rad pod nazivom „*Analiza uloge hondoitin sulfat proteoglikana tipa 3 (CSPG 3) u biologiji shizofrenije*“ odbranila je 17.12.2012. sa prosječnom ocjenom 10.00 i time stekla akademsko zvanje Magistar bioloških nauka. U februaru 2013. godine izabrana je u zvanje višeg asistenta za užu naučnu oblast Humana genetika na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci.

U martu 2014. godine, Odlukom Senata dobila je saglasnost o podobnosti teme za doktorsku disertaciju na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci pod nazivom „*Identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama asociranih sa sindromom iritabilnog kolona*“.

U avgustu 2014. godine, u okviru STSM programa (short term scientific mission) COST projekta stekla je iskustvo u radu u laboratoriji Instituta za humanu genetiku, odjeljenja za molekularnu humanu genetiku, Univerziteta u Hajdelbergu.

Član je Udruženja genetičara u BiH i Antropološkog društva Srbije.

Strani jezici kojima se koristi su engleski i češki.

Izjava 1

IZJAVA O AUTORSTVU

**Izjavljujem
da je doktorska disertacija**

Naslov rada Identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama asociranih sa sindromom iritabilnog kolona

Naslov rada na engleskom jeziku Identifikation and characterization of genetic variants associated with irritable bowel syndrome

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cjelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci 25.07.2017. godine

Potpis doktoranta



Izjava 2

Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom Identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama asociranih sa sindromom iritabilnog kolona, koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (*Creative Commons*) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
- ③ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Banjoj Luci 25.07.2017. godine

Potpis doktoranta



Izjava 3

Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora Irina Milovac

Naslov rada Identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama asociranih sa sindromom iritabilnog kolona

Mentori:

Prof.dr. Lejla Pojskić, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu i naučni savjetnik, Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Univerzitet u Sarajevu

Prof.dr. Stojko Vidović, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predala za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci 25.07.2017. godine

Potpis doktoranta