



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Марина Јовановић

**Повезаност метаболичког синдрома и имунских параметара
са клиничким и патохистолошким карактеристикама
болесника са улцерозним колитисом**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор др сци. мед. Наташа Д. Здравковић, доцент

КРАГУЈЕВАЦ, 2018. године

Абстракт:

АБ

Улцерозни колитис (енгл. Ulcerative colitis- UC) је хронично обољење које карактерише запаљење слузнице дигестивног тракта, првенствено дебелог црева. Метаболички синдром је чест поремећај значајно повезан са UC. Велики број студија је показао значајан коморбидитет ових поремећаја и њихову генетску повезаност.

Циљ студије био је да се испита повезаност развојних фаза метаболичког синдрома са тежином болести, те локалним и системским имунским одговором код пацијената са улцерозним колитисом.

Код испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом забележена је клинички и патохистолошки блажа болест са системском и локалном преминацијом галектина 1, галектина 3 и имуносупресивног цитокина IL-10, уз снижену концентрацију проинфламацијских цитокина TNF- α , IL-6 и IL-17. Такође је регистрована већа заступљеност CD8⁺ Т лимфоцита, а мања заступљеност регулаторних CD4⁺Foxp3⁺ лимфоцита, као и већа експресија галектина-3 на лимфоцитима и већа продукција имуносупресивног IL-10 у *lamina propria*-и оболелих од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом. Код испитаника у терминалној фази метаболичког синдрома забележена је клинички и патохистолошки тежа форма улцерозног колитиса. У овој групи испитаника нађена је системска и локална преминација проинфламацијских цитокина TNF- α , IL-6 и IL-17 над галектином-1, галектина-3 над проинфламацијским медијаторима TNF- α и IL-17 као и повећана експресија галектина-3 на имунокомпетентним ћелијама које инфилтришу *lamina propria*-у.

Локална и системска преминација Gal-1 и Gal-3 над проинфламацијским цитокинима код оболелих са метаболичким синдромом може представљати механизам заустављања и ограничавања проинфламацијског процеса и спречити оштећење ткива, указујући на имуносупресивну улогу Gal-1 и Gal-3 у биологији улцерозног колитиса код болесника са метаболичким синдромом. Системска и локална преминација проинфламацијских цитокина TNF- α , IL-6 и IL-17 над Gal-1 и Gal-3 у терминалној фази метаболичког синдрома појачава запаљење и следствено оштећење ткива.

Abstract:

AB

Ulcerative colitis (UC) is a chronic disease characterized by inflammation of intestinal epithelium, primarily of the colon. Metabolic syndrome is a common disorder significantly associated with UC. A large number of studies have shown significant comorbidity of these disorders and their genetic linkage.

The aim of the study was to examine the relationship between the developmental stages of the metabolic syndrome with the severity of the disease, and the local and systemic immune response in patients with ulcerative colitis.

Clinical and pathohistologically mild disease with systemic and local prevalence of galectin 1, galectin 3 and immunosuppressive cytokine IL-10 was observed in subjects with ulcerative colitis and metabolic syndrome, with reduced concentration of proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and IL-17. Further, we detected enhanced accumulation of CD8⁺ T lymphocytes and a lower incidence of regulatory CD4⁺ Foxp3⁺ T cells, as well as increased expression of galectin-3 on lymphocytes and higher production of immunosuppressive IL-10 in *lamina propria* derived from UC patients with metabolic syndrome. Clinical and pathohistologically severe disease was observed in the patients with terminal phase of the metabolic syndrome. In this group of subjects, we found systemic and local prevalence of proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and IL-17 over galectin-1; galectin-3 over TNF- α and IL-17; as well as increased expression of galectin-3 on immunocompetent cells infiltrating the lamina propria.

Local and systemic dominance of Gal-1 and Gal-3 over proinflammatory cytokines in patients with metabolic syndrome may present a mechanism for stopping and limiting the proinflammatory process and preventing tissue damage, indicating the immunosuppressive role of Gal-1 and Gal-3 in the ulcerative colitis biology of patients with metabolic syndrome. Systemic and local prevalence of proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and IL-17 over Gal-1 and Gal-3 in the terminal phase of the metabolic syndrome enhances inflammation and consequent tissue damage.

САДРЖАЈ

1. УВОД	8
1.1. ЗАПАЉЕНСКЕ БОЛЕСТИ ЦРЕВА	8
1.2. УЛЦЕРОЗНИ КОЛИТИС	8
1.2.1. Опште карактеристике болести	8
1.2.2. Епидемиологија улцерозног колитиса	8
1.2.3. Етиологија улцерозног колитиса	9
1.2.4. Клиничка слика	10
1.2.5. Интестиналне компликације улцерозног колитиса	10
1.2.6. Екстраинтестиналне манифестације инфламацијских болести црева	11
1.2.7. Дијагностичке процедуре	13
1.2.8. Диференцијална дијагноза запаљенских болести црева	14
1.3. ИМУНОПАТОГЕНЕЗА УЛЦЕРОЗНОГ КОЛИТИСА	15
1.3.1. Имуност слузница ГИТ-а	15
1.3.2. Имунопатогенеза улцерозног колитиса	19
1.4. МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ	26
1.4.1. Дефиниција метаболичког синдрома	26
1.4.2. Критеријуми СЗО за постављање дијагнозе метаболичког синдрома:...	27
1.4.3. Критеријуми АСЕ (American College of Endocrinology) за постављање дијагнозе синдрома инсулинске резистанције	28
1.4.4. Критеријуми EGIR за постављање дијагнозе метаболичког синдрома ..	29
1.4.5. Етиологија метаболичког синдрома.....	30
1.4.6. Патогенеза метаболичког синдрома.....	33
1.4.7. Учесталост метаболичког синдрома	34
1.5. МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ И УЛЦЕРОЗНИ КОЛИТИС	36

1.5.1. Кортикостероидима индукован метаболички синдром код пацијената са улцерозним колитисом.....	38
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	40
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	41
3.1. ИСПИТИВАНИ УЗОРАК	41
3.2. ИСТРАЖИВАЧКИ ПОСТУПАК	43
3.3. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЕРЕ У СТУДИЈИ.....	45
3.4. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА	56
3.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	57
4. РЕЗУЛТАТИ	58
4.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ ИСПИТАНИКА.....	58
4.2. ФАЗЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА КОД БОЛЕСНИКА СА УЛЦЕРОЗНОМ КОЛИТИСОМ	58
4.3. УТИЦАЈ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА НА ТЕЖИНУ УЛЦЕРОЗНОГ КОЛИТИСА, ЛОКАЛНИ И СИСТЕМСКИ ИМУНСКИ ОДГОВОР	66
4.4. УТИЦАЈ ФАЗЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА НА ТЕЖИНУ УЛЦЕРОЗНОГ КОЛИТИСА, ЛОКАЛНИ И СИСТЕМСКИ ИМУНСКИ ОДГОВОР.....	85
5. ДИСКУСИЈА	102
5.1. БОЛЕСНИЦИ СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ ИМАЈУ БЛАЖУ ФОРМУ УЛЦЕРОЗНОГ КОЛИТИСА.....	103
5.2. МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ ИНДУКУЈЕ СЕЛЕКТИВНЕ ПРОМЕНЕ ЛОКАЛНОГ И СИСТЕМСКОГ ИМУНСКОГ ОДГОВОРА КОД ОБОЛЕЛИХ ОД УЛЦЕРОЗНОГ КОЛИТИСА	103
5.3. МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ И ИМУНОСУПРЕСИЈА	104

5.4. УТИЦАЈ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА НА ЂЕЛИЈСКИ САСТАВ ЛЕУКОЦИТНОГ ИНФИЛТРАТА <i>LAMINA PROPRIA</i>-Е ОБОЛЕЛИХ ОД УС	106
5.5. МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ КОРЕЛИРА СА ПОВЕЋАНИМ ЛОКАЛНИМ ВРЕДНОСТИМА GAL-3.....	107
5.6. МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ КОРЕЛИРА СА ПОВЕЋАНИМ ЛОКАЛНИМ И СИСТЕМСКИХ ВРЕДНОСТИМА GAL-1.....	108
5.7. УЛОГА GAL-1 И GAL-3 У БИОЛОГИЈИ УЛЦЕРОЗНОГ КОЛИТИСА	109
5.8. ИМУНОСУПРЕСИВНА УЛОГА GAL-3	109
5.9. ИМУНОСУПРЕСИВНА УЛОГА GAL-1	110
5.10. ПОВЕЋАНЕ ЛОКАЛНЕ И СИСТЕМСКЕ ВРЕДНОСТИ SST2 КОД ОБОЛЕЛИХ ОД УЛЦЕРОЗНОГ КОЛИТИСА СА МЕТАБОЛИЧКИМ СИНДРОМОМ	111
5.11. ИСПИТАНИЦИ У ТЕРМИНАЛНОЈ ФАЗИ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДОМОМА ИМАЈУ ТЕЖУ ФОРМУ УЛЦЕРОЗНОГ КОЛИТИСА.	113
5.12. ПРЕДОМИНАЦИЈА ПРОИНФЛАМАЦИЈСКИХ ЦИТОКИНА НАД ГАЛЕКТИНИМА 1 И 3 У ТЕРМИНАЛНОЈ ФАЗИ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	113
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	115
7. СКРАЋЕНИЦЕ.....	117
8. РЕФЕРЕНЦЕ.....	119

1. УВОД

1.1. Запаљенске болести црева

Запаљенске болести црева (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*) су хроничне упалне болести гастроинтестиналног тракта непознате етиологије и патогенезе. Карактеришу се периодима ремисије и егзацербације. Два главна облика ових болести су Кророва болест (CD, engl. *Crohn's disease*) и улцерозни колитис (UC, engl. *ulcerative colitis*). Они су дефинисани својим клиничким, ендоскопским, радиолошким и хистолошким карактеристикама (1). Ипак, у око 10 % болесника, се не може поуздано утврдити на основу клиничких, ендоскопских, радиолошких и хистолошких карактеристика ком од наведених облика припадају и тада говоримо о неклассификованој упалној болести црева (IBDU, engl. *inflammatory bowel disease unclassified*).

1.2. Улцерозни колитис

1.2.1. Опште карактеристике болести

Улцерозни колитис се карактерише упалним процесом који обично почиње у ректуму, одакле се шири проксимално, те у континуитету захвата поједине делове дебелог црева или цело црево. За разлику од Кророве болести, где је процес трансмуралног карактера, у улцерозном колитису упала је ограничена на слузницу, и у мањој мери на субмукозу, уз инфилтрацију слузнице неутрофилима и формирање карактеристичних апсцеса уз деплецију муцина.

1.2.2. Епидемиологија улцерозног колитиса

Резултати бројних епидемиолошких студија указују на високу инциденцу улцерозног колитиса и Кророве болести у индустријским земљама Скандинавије, Велике Британије, северозападне Европе, северне Америке и Аустралије, а ниску инциденцу у Азији и Јужној Америци (2). Учесталост улцерозног колитиса варира од око 2 до 14 случајева на 100000 особа годишње и 3 до 14 случајева Кророве болести на 100000 особа годишње у Сједињеним Америчким Државама (3). Инциденца улцерозног колитиса стабилна је од педесетих година 20. века до данас, са десетоструком разликом учесталости у подручјима са високом и ниском инциденцом уз изузетак јужне Европе.

1.2.3. Етиологија улцерозног колитиса

Етиологија и патогенеза инфламацијске болести црева нису у потпуности разјашњене. Многобројни фактори утичу на развој инфламацијске болести црева, као што су фактори средине, генетска предиспозиција, коменсална микрофлора и имунски одговор.

Инфламацијску болест црева су први описали *Wilks* и *Moxon* 1875. године (4). Претпоставља се да је инфламацијска болест црева резултат неадекватног одговора имунског система домаћина на коменсалне бактерије у особа са генетском предиспозицијом (5-8). Генетски фактори играју важну улогу у патогенези инфламацијске болести црева. Око 5 до 10 % пацијената потврђује позитивну породичну анамнезу (9). Сматра се да утицај генетских фактора у настанку улцерозног колитиса износи око 40%, а код Кроне болести око 60%. Природа генетске предиспозиције само је делимично разјашњена. Потврђена је удруженост улцерозног колитиса и HLA (енгл. *Human leukocyte antigen*) локуса на кратком краку хромозома 6 (10). Примећено је да је Кроне болест у вези са генски детерминисаним болестима као што су тирозин-позитивни албинизам, анкилозирајући спондилитис, цистична фиброза и Turner-ов синдром (11). Сматра се да у Кроневој болести дисрегулисан имунски одговор на антигене у лумену црева индукује хроничну упалу код генетски осетљивог домаћина. У физиолошким условима имунски одговор на антигене у цревима је супримиран, али код Кроне болести постоји прекид у толеранцији на ове антигене што за последицу има поремећен имунски одговор на антигене у цревима. Ћелије интестиналног епитела могу да експримирају и HLA молекуле II класе (HLA-DR и HLA-DP) који презентују антигене Т лимфоцитима. Дистрибуција ових молекула у зиду гастроинтестиналног тракта (ГИТ) корелира са анатомском дистрибуцијом Кроне болести: готово их нема у једњаку и желуцу, расте им експресија према танком цреву, максимална је у завршном илеуму, а затим опада у дебелом цреву (11). Резултати студија заснованих на анализи генома указују на постојање гена осетљивости за развој Кроне болести, а који је смештен на хромозому 16 (IBD 1 локус). Новије студије су показале да број мутација тог гена има утицај на фенотип болести, тако да је више од две мутације повезано са настанком стриктура. Ген осетљивости за оба IBD фенотипа нађен је у 41 cM регији 12q13-14 на хромозому 12 (IBD 2 локус). Нађене су још непотврђене повезаности са локусима хромозома 1p (IBD локус), 4q (локус за улцерозни колитис) и др. Очито је да су потребне велике генетске

епидемиолошке студије које би довеле до потврде сигурне повезаности одређених гена и IBD (13). Фактори средине, као и навике особа могу да утичу на развој инфламацијске болести црева. Иако је попис инкриминишућих фактора дуг, пушење је једини јасно доказани фактор средине који повећава ризик од појаве Кроне болести, а смањује ризик од настанка улцерозног колитиса (14). Велики значај се придаје и психосоцијалним факторима који могу допринети клиничком погоршању болести (15). Подаци из литературе (15-18) указују да коменсална бактеријска флора утиче на развој инфламацијске болести црева. Запаљенска болест црева се не развија када се животиње гаје под **стерилним условима**.

1.2.4. Клиничка слика

УС и СВ могу имати врло сличну клиничку слику. Како је улцерозни колитис болест везана искључиво за дебело црево, симптоми УС-а, наравно, примарно зависе од проширености болести у дебелом цреву и интензитета упале слузнице дебелог црева. С обзиром на то да је УС болест која захвата дебело црево од самог почетка ректума, главни клинички симптом је ректално крварење односно појава крвавих столица. Обично су столице помешане са слузи и гнојем. Тегобе су врло често праћене тenezима и ургенцијом који много пута не резултирају столицом па их називамо “лажним позивима”. Зависно о проширености упале на оралније делове дебелог црева присутни су проливи и бол у трбуху.

1.2.5. Интестиналне компликације улцерозног колитиса

У интестиналне компликације улцерозног колитиса спадају: перианална болест, псеудополипи, стриктуре колона, токсични мегаколон и перфорација колона (19). **Перианална болест**, хемороиди, аналне фисуре, перианални и исхиоректални апсцеси, пролапс ректума су чешћа појава код панколитиса и одраз су учесталих столица код тог облика болести (19).

Псеудополипи (инфламаторни полипи), су резултат хиперпластичне регенерације денудираних слузница. Није реч ни о епителним, ни гландуларним формацијама, тако да се не сврставају у полипе и премалигне лезије (20).

Стриктуре колона, се појављују у 6-10% болесника. Имају предилекцију за ректум и трансверзални колон и могу бити мултипле (20).

Токсични мегаколон, се дефинише као фулминантни колитис са акутном дилатацијом

колона на више од 6-7 cm у промеру уз поремећену или одсутну хаустрацију колона, а узрокован је прогресијом запаљења кроз мишићне слојеве цревног зида до серозе уз парализу мускулатуре колона (19).

Перфорација колона, настаје најчешће као последица токсичног мегаколона. Највећи ризик од перфорације је при првом нападу тешког колитиса, због не сасвим јасних разлога (19).

1.2.6. Екстраинтестиналне манифестације инфламацијских болести црева

У екстраинтестиналне манифестације инфламацијских болести црева спадају: масна метаморфоза јетре, примарни склерозирајући холангитис, холелитијаза, коштанозглобне промене, хематопоезне промене, афтозни стоматитис, промене на уропоетском систему, очне промене и кожне промене. Екстраинтестиналне манифестације болести које корелирају с интензитетом упале црева јесу периферни артритис, нодозни еритем, гангренозна пиодерма и еписклеритис.

Екстраинтестиналне манифестације болести које су често асоциране уз промене HLA-система и нису објективно повезане са степеном упалне активности у дебелом цреву јесу примарни склерозирајући холангитис, увеитис, анкилозирајући спондилитис и сакроилеитис (21).

Масна метаморфоза јетре, настаје као резултат малнутриције и хроничног запаљења. Код 50-90% болесника са инфламацијским болестима црева, налазе се абнормалности у биоптичком материјалу, а сигнификантна болест јетре се дијагностикује код 1-3% болесника. Хронични активни хепатитис и постнекротична цироза јетре су ређе компликације (22-32).

Примарни склерозирајући холангитис, у 50% случајева је удружен с инфламацијским болестима црева и то најчешће са улцерозним колитисом. Као последица хроничног запаљења интрахепатичких и екстрахепатичких жучних путева долази до мултифокалне опструкције билијарног тракта, што доводи до опструктивног иктеруса, холангитиса и секундарне билијарне цирозе. Обзиром на висок проценат удружености примарног склерозирајућег холангитиса и улцерозног колитиса, препорука је све болеснике са примарним склерозирајућим холангитисом обрадити у смислу инфламацијских болести црева и без присуства цревних симптома (33).

Холелитијаза, настаје као последица поремећаја метаболизма жучних киселина и стварања литогене жучи код болесника са запаљењем танкога црева или код болесника

са ресекцијом терминалног илеума (33).

Коштано-зглобне промене: Болесници са активном болешћу углавном имају артралгије. Миграторни периферни серонегативни недеструктивни артритис се јавља код 10-15% болесника и корелира са активношћу основне болести (34). Сакроилеитис се дијагностикује код 12-15% болесника и већина болесника су негативни на HLA-B27. Анкилозирајући спондилитис се јавља код 1-2% болесника и 20 пута је чешћи код болесника са инфламацијским болестима. Болест се често јавља пре појаве цревних симптома и активност ове болести не корелира са активношћу цревне болести, а може перзистирати и након колектомије. Батичасти прсти се најчешће дијагностикују код болесника са екстензивном болешћу танког црева. Карлични остеомијелитис настаје као последица ширења фистула танког црева у карлицу и у кук. Остеомалација је ређа компликација инфламацијских болести црева и настаје као последица поремећаја минерализације костију услед малапсорпције. Остеопороза је присутна код 15% болесника са улцерозним колитисом и код 40% болесника са Кроновом болешћу. Код болесника са инфламацијским болестима црева додатни фактори ризика за настанак остеопорозе су кортикостероидна терапија и активно хронично запаљење, будући да инфламаторни цитокини инхибирају формирање коштаног ткива (IL-6 стимулише остеокласте) (35-39).

Хематопоезне компликације: Хемолитичка анемија је најчешће последица употребе сулфасалазина. Описана је и идиопатска Coombs позитивна аутоимуна хемолитичка анемија. Мегалобластна анемија се јавља у случају развоја цирозе. Леукоцитоза је честа, а може бити последица примене кортикостероидне терапије. Код тежих болести може се дијагностиковати хипопротромбинемија, најчешће код удружене болести јетре, ниског уноса протеина и витамина К, пролонгиране антибиотске терапије (40-43). Чест налаз су тромбоцитоза уз повишење фактора V и VII, фибриногена и снижење циркулишућег антитромбина III, што доводи до настанка тромбоза дубоких вена (44).

Афтозни стоматитис, се појављује код 80% болесника са инфламацијским болестима црева (44).

Уропоетски тракт: Две најчешће компликације су пијелонефритис и уролитијаза. Малапсорпција, односно стеатореја код Кронове болести повећавају цревну апсорпцију оксалата, што доводи до настанка оксалатних каменаца код 5-10% болесника са Кроновом болешћу танког црева (44).

Очне болести: Код 5-10% болесника се јављају у форми иритиса (увеитиса). Патогенеза ових болести није јасна, али њихова честа удруженост са периферним

артритисом, нодозним еритемом и афтозним улцерацијама упућује на системски имунски феномен (45, 46).

Кожне промене: Код 2-4% болесника са акутном болешћу долази до појаве erythema nodosum, која корелира са активношћу цревне болести и рецидивантно се појављује код 20% болесника. Pyoderma gangrenosum се јавља код 2-5% болесника са улцерозним колитисом и представља гнојне улцерирајуће кожне лезије, најчешће код болесника са панколитисом, са предилекцијом на месту раније трауме. Корелира са активношћу цревне болести (47).

1.2.7. Дијагностичке процедуре

Претраге којима се служимо у рутинској дневној дијагностици ових болести јесу ове: лабораторијске, ендоскопске и радиолошке претраге, те патохистолошка анализа биоптичког или хируршког материјала.

Лабораторијске анализе. Нужно је учинити лабораторијске претраге за процену упалне активности. У активној болести налазимо убрзану седиментацију еритроцита, повишене вредности Ц-реактивног протеина, повишене вредности фибриногена. Хематолошке претраге у активној болести резултирају анемијом, леукоцитозом и тромбоцитозом. Уз то нужна је детаљна микробиолошка обрада столице којом је потребно искључити суперинфекцију у цреву. Биохемијским претрагама у акутној фази болести често потврђујемо хипоалбуминемију и повишене јетрине ензиме који могу бити последица деловања токсемије, сепсе или лоше ухрањености на јетру.

Ендоскопски преглед. У акутној фази улцерозног колитиса нативном ректоскопијом процењујемо степен упалне активности. Иначе, након смиривања акутне фазе потребно је при иницијалном дијагностиковању IBD-а евалуирати целу пробавну цев ради процјене проширености болести (колоноскопија, езофагогастроуденоскопија, а у случају негативне пасаже танког цријева и сумње на СВ ев. иентероскопија односно ендоскопија капсулом). Најраније проене слузнице дебелог црева које регистрирамо ендоскопски у улцерозном колитису јесу хиперемија, едем и губитак васкуларног цртежа, затим гранулираност, фријабилност и крварења на слузници, а у узнапредовалијој болести налазимо улцерације, псеудополипе и стриктуре.

Радиолошки налаз. У тешким облицима болести изузетно је важан нативни снимак абдомена којим се искључује или потврђује токсични мегаколон, илеус или перфорација црева. Иригографија је корисна за процену проширености болести у дебелом цреву и откривање компликација попут стриктура и карцинома. Нарочито је важна за евалуацију целог дебелог црева, ако то ендоскопски није могуће због сужења црева. Ради евалуације могућих компликација на билијарном тракту и уротракту користан је преглед ултразвуком. За искључивање упалних колекција у абдомену индикована је компјуторизирана томографија (СТ), а за евалуацију апсцеса и фистула у подручју мале карлице магнетна резонанца (MR).

Патохистолошка анализа. Промене у UC-у ограничене су на цревну слузницу, а у СВ-у су трансмуралне. Свакако, најранија лезија у IBD-у је криптална упала и формирање крипталног апсцеса. Лезија је слична у СВ-у и UC-у, али у СВ-у је више фокалног карактера. Треба нагласити да је слузница у UC-у између улкуса увек промењена за разлику од СВ-а где улкусе, односно афте окружује нормална слузница. Наведене претраге надопуњавају модерне сцинтиграфске методе нуклеарне медицине за процјену упалне активности болести или компликација типа абдоминалног апсцеса (сцинтиграфија црева обележеним леукоцитима или антислеукоцитним антителима; 48).

1.2.8. Диференцијална дијагноза запаљенских болести црева

Одабир појединог лека или одабир типа хируршке операције значајно се разликује за болеснике с Кроновом болешћу, улцерозним колитисом или индетерминираним обликом упалне болести црева. С обзиром на могуће значајно преклапање клиничких карактеристика између ова три облика упалне болести цријева, изузетно је важно што тачније одредити фенотип већ при иницијалној презентацији болести. Осим тога, велики број других патолошких поремећаја може имитирати упалну болест црева те их је стога важно разликовати и на време правилно дијагностиковати.

1.3. Имунопатогенеза улцерозног колитиса

1.3.1. Имуност слузница ГИТ-а

Урођена имуност. Слој епителних ћелија црева представљају део гастроинтестиналног урођеног имунског система, који игра улогу у одговору на патогене, толеранцију коменсала и преузимање антигена ради покретања стеченог имунског одговора. Постоји неколико различитих типова интестиналних епителних ћелија и сви потичу од заједничког прекурсора из крипти интестиналних жлезди. Између осталог то су пехарасте ћелије које секретују слуз, а налазе се на врху цревних ресица, апсорптивне епителне ћелије које секретују цитокине, М ћелије које преузимају антиген и налазе се у специјализованим куполастим структурама изнад лимфних ткива и Панетове ћелије које секретују антибактеријске пептиде и налазе се у дну крипти. Сви ови типови ћелија на различите начине доприносе функцији ткивне баријере на нивоу цревне слузокоже. Интестиналне епителне ћелије су међусобно спојене протеинима који формирају тесне везе (укључујући *zonula occludens 1* и клаудине) и они блокирају кретање бактерија и PAMPs (енгл. *pathogen-associated molecular patterns*) између ћелија у *lamina-у propria-у*. Додатно, епителне ћелије слузнице стварају антимикробне супстанце, а неколико врста ћелија које су смештене у слузници, укључујући епителне ћелије, DCs и макрофаге, су способни да покрену инфламацијски и антивирусни одговор.

Toll-like рецептори (TLR) и цитоплазматски *NOD-like* рецептори (NLR) које експримирају интестиналне епителне ћелије помажу имунски одговор на инвазију патогена, а такође ограничавају инфламацијски одговор на коменсале. TLR и NLR су ћелијски рецептори за PAMPs и стварају сигнале који покрећу инфламацијски и антивирусни одговор. Већина бактерија из лумена црева нису патогене уколико не продру кроз епителне баријере, али могу да експримују исте PAMPs као и патогене бактерије, као што су LPS, пептидогликан, CpG DNA и флагелин. Интестиналне епителне ћелије експримују велики број TLR, чија експресија зависи од региона црева. Активација TLR резултује фосфорилацијом и реорганизацијом *zona-e occludens 1* и повећањем снаге тесних веза између епителних ћелија, а TLR повећавају мотилитет и пролиферацију интестиналних епителних ћелија. Овај функционални одговор TLR

појачава баријерну улогу али не и инфламацију. Слично, NLR фамилија рецептора за флагелине (нпр. NAIP, IPAФ-1) се налазе у цитоплазми интестиналних епителних ћелија, које активирају производи патогених бактерија које доспеју у цитоплазму.

Стечени имунски одговор. Наивни лимфоцити су изложени антигенима и диференцирају се у ефеторске ћелије. Лимфна ткива удружена са цревима (GALT, енгл. *Gut Associated Lymphoid Tissues*) су гастроинтестинална верзија MALT-а. Око 30% укупног броја лимфоцита налази се у GALT-у. Најважнија структура GALT-а су Пајерове плоче, које се налазе у дисталном илеуму и мали агрегати лимфних фоликула или изоловани фоликули у црвуљку или у дебелом цреву. Пајерове плоче имају структуре лимфних фоликула јер имају герминативне центре који садрже В лимфоците, T_HF лимфоците, фоликуларне дендритске ћелије и макрофаге. Герминативни центри фоликула су окружени наивним фоликуларним В лимфоцитима који експримују IgM и IgD.

Пренос антигена из лумена до GALT-а зависи од специјализованих ћелија које називамо М ћелије (енгл. *Microfold cells*). М ћелије се налазе у регионима епитела познатим као епител куполе, који је локализован преко Пајерових плоча и других структура GALT-а. Главна улога М ћелија је трансцелуларни транспорт различитих супстанци из лумена црева преко епителних баријера до APC. Оне преносе антигене путем ендоцитозних везикула кроз цитоплазму и егзоцитозом на базолатералној мембрани испоручују их DCs у региону купола или структурама GALT-а. М ћелије експримују специфичне лектине за које се ове бактерије везују и интернализују, а како су бактерије цитотоксичне за М ћелије настају прекиди епитела који потпомажу инвазију још већег броја микроорганизама. Лектини М ћелија, такође омогућавају инфекцију одређеним ентеричним вирусима.

Антигени микроорганизама из лумена црева могу бити преузети цитоплазматским продужецима DCs *laminae propriae* и помоћу рецептора за Fc фрагмент микроорганизама опсонизованих IgG. Продужецы DCs се умећу између епителних ћелија слузнице без раскидања тесних веза. DCs поготово има у терминалном илеуму. Ове DCs припадају подтипу DCs слузница које покрећу одговор ефеторских Т лимфоцита. Оне прерађују и презентују протеинске антигене Т лимфоцитима унутар GALT-а. Антигени опсонизовани антителима (IgG који је везао флагелин бактерија) се транспортују кроз епител помоћу Fc γ R (тј. FcRn) до DCs GALTa.

Мезентеријални лимфни чворови сакупљају антигене из лимфе пристигле из танког и дебелог црева и место су диференцијације ефекторских В и Т лимфоцита који се враћају у *lamina-у propria-у*. Ефекторски лимфоцити створени у GALT-у и мезентеријалним лимфним чворовима експримирају висок ниво интегрина и рецептора за хемокине који концентрацијским градијентом одлазе назад у *lamina-у propria-у* црева. Иmunски систем ГИТ-а највећим делом зависи од Т и В лимфоцита који су се вратили у *lamina-у propria-у*. Најважнији интегрин за *homing* В и Т лимфоцита је $\alpha_4\beta_7$ који се везује за MadCAM-1 протеине на ендотелу посткапиларних венула *laminae propriae*. Такође, В и Т лимфоцити имају рецептор за хемокине CCR9 који везује лиганд CCL25 кога стварају интестиналне епителне ћелије. Само у цревима постоји комбинација експресије MadCAM-1 и CCL25.

Ефекторски лимфоцити настали у Пајеровим плочама, другим структурама GALT-а и мезентеричним лимфним чворовима се враћају у *lamina-у propria-у*, одакле Т лимфоцити могу да одговоре на инвазију патогених микроорганизама, а В лимфоцити производе антитела која се транспортују у лумен црева где неутралишу микроорганизме.

Хуморални имунски одговор у ГИТ-у. Хуморални имунски систем у цревима доминантно производи секреторни IgA у GALT-у и транспортује га преко епитела слузнице у лумен. Мање количине IgM и IgG се секретују у лумен црева. Ова антитела у лумену црева везују микроорганизме и токсине и неутралишу их и спречавају њихово везивање за ћелије домаћина.

Целуларни имунски одговор у ГИТ-у. Т лимфоцити играју важну улогу у заштити од патогених микроорганизама у ГИТ-у и у регулацији одговора на антигене из хране и коменсале. Т лимфоцити су нађени у епителном слоју, расути у *lamina-и propria-и* и субмукози и у Пајеровим плочама и у другим организованим фоликуларним колекцијама. Код људи највећи број интраепителних Т лимфоцита су CD8⁺ лимфоцити. Код мишева, 50% интраепителних лимфоцита имају $\gamma\delta$ TCR слично интраепителним лимфоцитима коже. Код људи је тек 10% интраепителних $\gamma\delta$ Т лимфоцита, што је ипак више него на другим местима. И $\gamma\delta$ и $\alpha\beta$ TCR интраепителних Т лимфоцита имају ограничену разноврсност и специфичност, тако да препознају само антигене микроорганизама који су насељени на површини слузнице. Т лимфоцити *lamina-e propria-e* су углавном CD4⁺, ефекторски или меморијски Т лимфоцити. Ови ефекторски и меморијски Т лимфоцити су настали од наивних Т лимфоцита GALT-а и

мезентеријалних лимфних чворова, који су ушли у крв и након диференцијације враћени у *lamina-у propria-у*. Т лимфоцити Пајерових плоча и других фоликула придружених епителу црева су CD4⁺ *helper* Т лимфоцити и регулаторни Т лимфоцити. У ГИТ-у различите подтипове ефекторских CD4⁺ Т лимфоцита покрећу различити микроорганизми. У зависности од микроорганизма који је покренуо одговор развија се одређени подтип CD4⁺ Т лимфоцита. Микрофлора у лумену црева има значајан утицај на фенотип Т лимфоцита чак и у току хомеостазе.

T_H17 лимфоцити. Присуство T_H17 лимфоцита је неопходно у заштити од патогених бактерија (као што је нпр. *Citrobacter rodentium*). Други пример који показује како бактеријска микрофлора утиче на промену подтипова Т лимфоцита је да *Bacteroides fragilis* који не експримује или експримује полисахарид А индукује Т лимфоците који секретују IL-17, односно регулаторне Т лимфоците који секретују IL-10. T_H17 лимфоцити због секреције IL-17 и IL-22 играју важну улогу у одржавању епителних баријера црева. Рецептори за оба ова цитокина се налазе на епителним ћелијама, и оба индукују експресију протеина који штите слузницу од инвазије микроорганизма, као што су муцини и β-дефензини.

T_H2 лимфоцити. Интестиналне инфекције паразитима покрећу јак одговор T_H2 лимфоцита. Ефикасно уклањање хелмината посредовано је цитокинима IL-4 и IL-13 који појачавају секрецију слузи и течности и индукују контракције мишића и мотилитет црева. Овај тип имунитета називамо имуност баријера јер је активан на епителним баријерама.

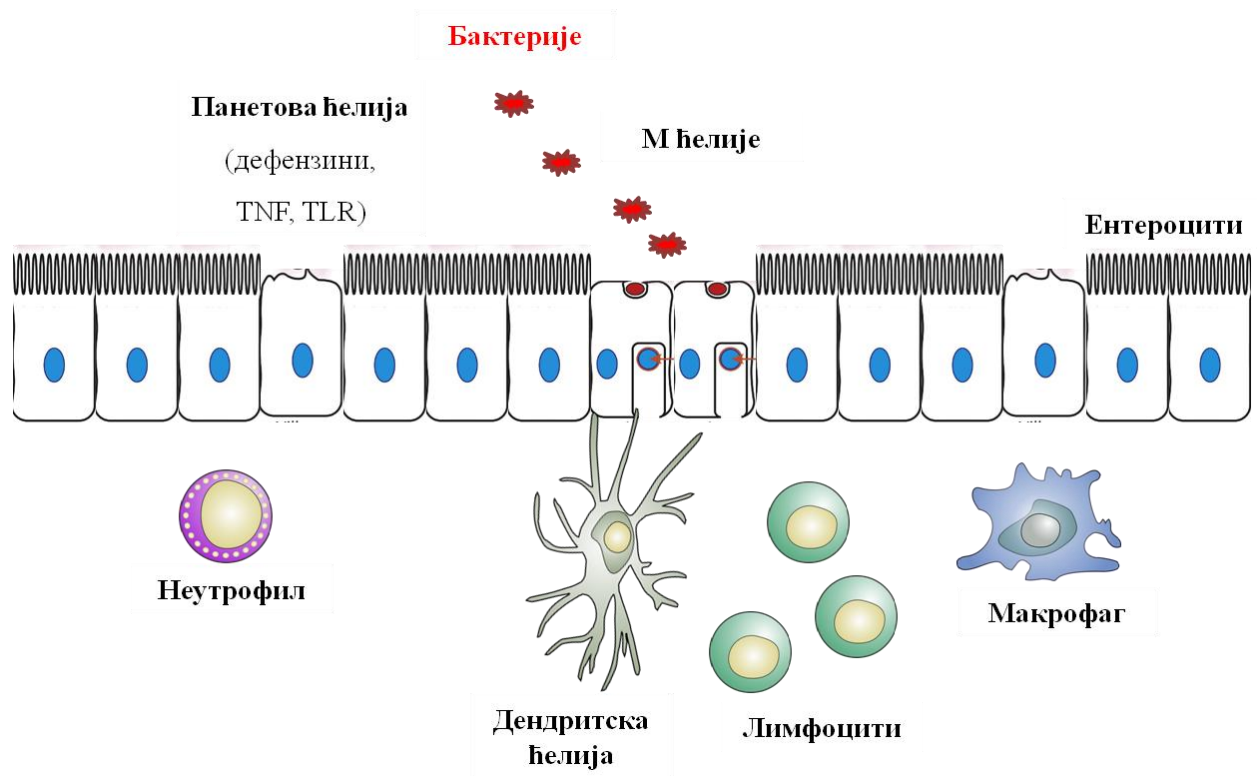
Регулаторни Т лимфоцити су присутни у GALT-у. Они спречавају инфламацијску реакцију усмерену према интестиналној микрофлори. Утврђено је да постоји два пута више FoxP3⁺ регулаторних Т лимфоцита (Treg) међу CD4⁺ Т лимфоцитима *lamina-е propria-е* у односу на друга периферна лимфна ткива. Многе Treg покрећу антигени који делују локално и ове ћелије припадају специфичним Treg. Фактори који доприносе стварању Treg су CD103⁺ DCs, локално стварање ретиноичне киселине (што појачава експресију FoxP3⁺) и локално стварање TGF-β (такође појачава експресију FoxP3⁺, а инхибира стварање T_H1 и T_H2 лимфоцита). Постоји неколико механизма који супримирају имунски одговор. Главни механизам у цревима је стварање имуносупресивног цитокина IL-10. Неколико цитокина (TGF-β, IL-10 и IL-2) играју важну улогу у одржавању хомеостазе у имунском систему црева, а дефицит ових цитокина или њихових рецептора узрокује патолошку инфламацију црева. Код деце са урођеним мутацијама гена за IL-10 и његовог рецептора јавља се тешка инфламацијска

болест црева. Неконтролисана инфламација се виђа код сојева мишева којима недостају ови цитокини или њихови рецептори а највероватније је изазивају урођени и стечени имунски одговор на коменсалне бактерије из цревне флоре, јер се инфламација не дешава код сојева који су узгајани у стерилним условима. Макрофаги и Treg су главни извори TGF- β и IL-10.

1.3.2. Имунопатогенеза улцерозног колитиса

Разне компоненте имунског система слузница су укључене у патогенезу улцерозног колитиса. Ове компоненте укључују луминалне антигене, цревне епителне ћелије (енгл. Intestinal Epithelial Cells- IECs), ћелије урођеног и стеченог имунског система, и њихове секреторне продукте (51).

Повећана „осетљивост“ слузнице или дефект у преузимању антигена из лумена црева воде активацији урођеног имунског одговора, највероватније посредовано повећаном активношћу рецептора сличних Toll-у (енгл. *Toll-like receptors*- TLR). Активиране дендритске ћелије (енгл. *Dendritic cell*- DC) затим посредују у диференцијацији наивних Т-лимфоцита у ефекторске (Фигура 1). Улцерозни колитис (UC) претежно посредован преко Th2 лимфоцита и NK Т- ћелија.



Фигура 1. Имунопатогенеза улцерозног колитиса. Бактеријску инвазију слузнице црева спречава физичка баријера (ентероцити) и специјализоване ћелије (Панетове ћелије и М ћелије). Молекулске структуре микроорганизама препознају ћелије урођене имуности (дендритске ћелије, макрофаги, неутрофили) преко рецептора за молекулске обрасце. Окидач запаљенске реакције је активација ћелија имунског система (мононуклеарни леукоцити, лимфоцити).

Микрофлора. Код оболелих од инфламацијских болести црева, постоји смањена биоразноликост у дигестивном тракту у поређењу са здравим особама, за 30 до 50% (2). Смањење разноликости је на рачун нормалних анаеробних бактерија као што су врсте *Bacteroides*, *Eubacterium* и *Lactobacillus* (52). Значај микрофлоре у индукцији и одржавању болести је потврђен у експерименталним моделима колитиса. Тако, мишеви дефицијентни у цитокинима IL-2 или IL-10 или трансгени пацови који садрже HLA-B27 развијају инфламацијску болест црева у присуству нормалне микрофлоре, али не у стерилном *germ-free* окружењу (53-55).

Такође, експериментални модел колитиса је ослабљен када се животиње третирају антибиотицима широког спектра (65).

Површине микроорганизама обично имају понављајући образац молекулских структура као и њихови нуклеотиди. Ови мотиви су означени као патоген-асоцирани молекулски обрасци (енгл. *Pathogen Associated Molecular Patterns- PAMP*). Неки од ових образаца укључују сложене макромолекуле као што су липополисахарид (енгл.

Lipopolysaccharide- LPS), пептидогликан (енгл. *Peptidoglycan- PGN*), полипептиди (флагелин) и нуклеинска киселина (CpG богата DNA). Рецептори који препознају PAMP се зову рецептори за молекулске образце (енгл. *Pattern recognition receptors- PRR*). Рецептори слични Toll-у (TLR) су пример PRR рецептора. Препознавање молекулских образаца преко TLR обично покреће урођени имунски систем и следствени запаљенски одговор (51).

Урођени имунски одговор. Молекулске структуре микроорганизама могу изазвати запаљење слузокоже црева индукцијом урођеног имунског одговора. Повећавају експресију адхезивних мелекула, као што је интраћелијски адхезивни молекул 1 (енгл. *Intracellular cell adhesion molecule 1- ICAM1*), који су важни за везивање и миграцију циркулишућих мононуклеарних и полиморфонуклеарних ћелија у инфламирану слузницу црева (56).

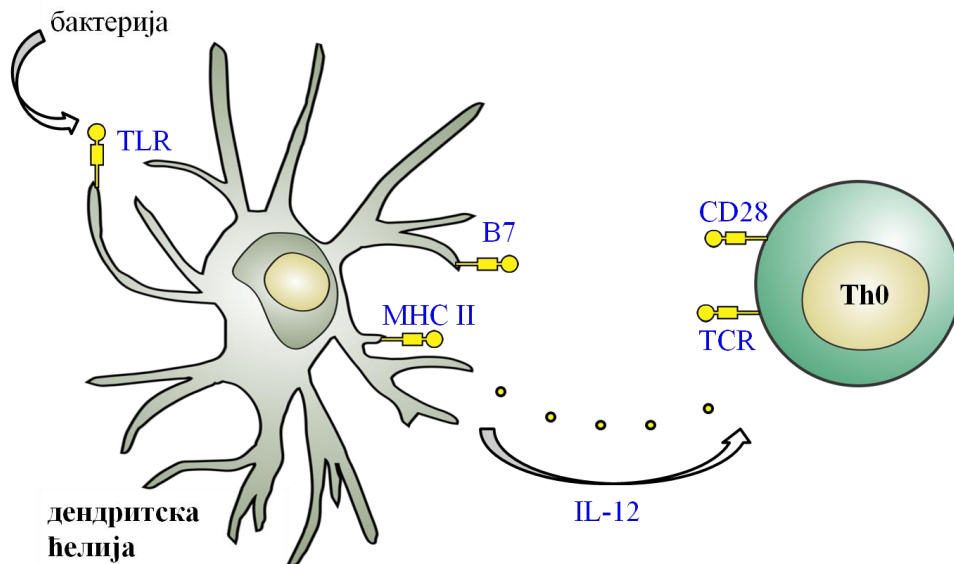
Проинфламацијске молекуле превасходно производе ћелије урођене имуност, које су мигрирале у запаљенску слузницу због повећане експресије PRR као што је TLR (57). Антиген-презентујуће ћелије као што су дендритске ћелије (DCs) и макрофаги поседују TLR са различитим специфичностима за молекулске образце микроорганизама и, након активације, индукују урођени имунски одговор.

Рецептори слични Toll-у у патогенези UC. Идентификовано је једанаест TLR-а које карактеришу три заједничке структурне особине: (51) различит лиганд везујући екстрацелуларни домен са понављајућим сегментима богатим леуцином; (52) краткак трансмембрански регијон; (53) високо хомологни цитоплазматски Toll/интерлеукин 1 рецептор (TIR) домен. Иако сваки од различитих TLR ангажује везује молекулске образце, главни нисходни сигнални пут је преко протеина MyD88 који активира транскрипциони фактор NF-κB. Након активације, TLR формирају хомодимере који мењају конформацију у TIR домену и покрећу регрутацију MyD88 (58). Домен смрти MyD88 тада нисходно регрутује IL-1 рецептор- асоцирану киназу (енгл. *IL-1 receptor associated kinase- IRAK*) у рецепторски комплекс (58). Након аутофосфорилације IRAK, регрутује фактор 6 везан за TNF рецептор (енгл. *TNF receptor associated factor 6- TRAF6*). TRAF6 затим активира киназе укључујући и NF-κB- индукујућу киназу (NIK) и протеин-киназу активiranу митогеном/ЕРК-киназу-1 (енгл. *MEKK1*) (59). Инхибитор деградације NF-κB (IκB) се следствено фосфорилише и разлаже, што резултује транслокацијом NF-κB у једро (8). NF-κB припада Rel фамили DNA везујућих

транскрипционих фактора који везују карактеристичне секвенце и активирају гене укључене у имунски и запаљенски одговор (58). Активација NF-κB покреће експресију бројних молекула укључених у патогенезу улцерозног колитиса, укључујући медијаторе запаљења (IL-1b, TNF, IL-6, IL-8, ICAM1 и други хемокини и адхезивни молекули), ко-стимулаторне молекуле (CD40, CD80, CD86) (60). Поред тога, инхибиција NF-κB може да „ублажи“ експериментални колитис, што потврђује његов проинфламацијски ефекат (61).

Дендритске ћелије. Дендритске ћелије (енгл. *Dendritic cells- DCs*) су антиген презентујуће ћелије који играју улогу чувара, преузимају антигене и транспортују их до лимфног ткива где имају јединствену способност да активирају наивне Т лимфоците. Са ове кључне позиције на раскршћу урођене и стечене имуности, дендритске ћелије обликују многе аспекте имунског одговора.

Структурне компоненте микроорганизама играју централну улогу у модулацији функције дендритских ћелија. Помоћу молекула као што су TLRs, DC препознају и одговарају на специфичне молекуларне структуре микроба, то јест молекулске образце. DCs могу разликовати и иницирати другачији имунски одговори на блиско повезане организме. Дендритске ћелије у слузокожи црева играју кључну улогу у регулацији локалног имунског одговора и успостављању равнотеже између толеранције и активног одговора на коменсалне микроорганизме који су фундаментални за генезу улцерозног колитиса (66) (Фигура 2).



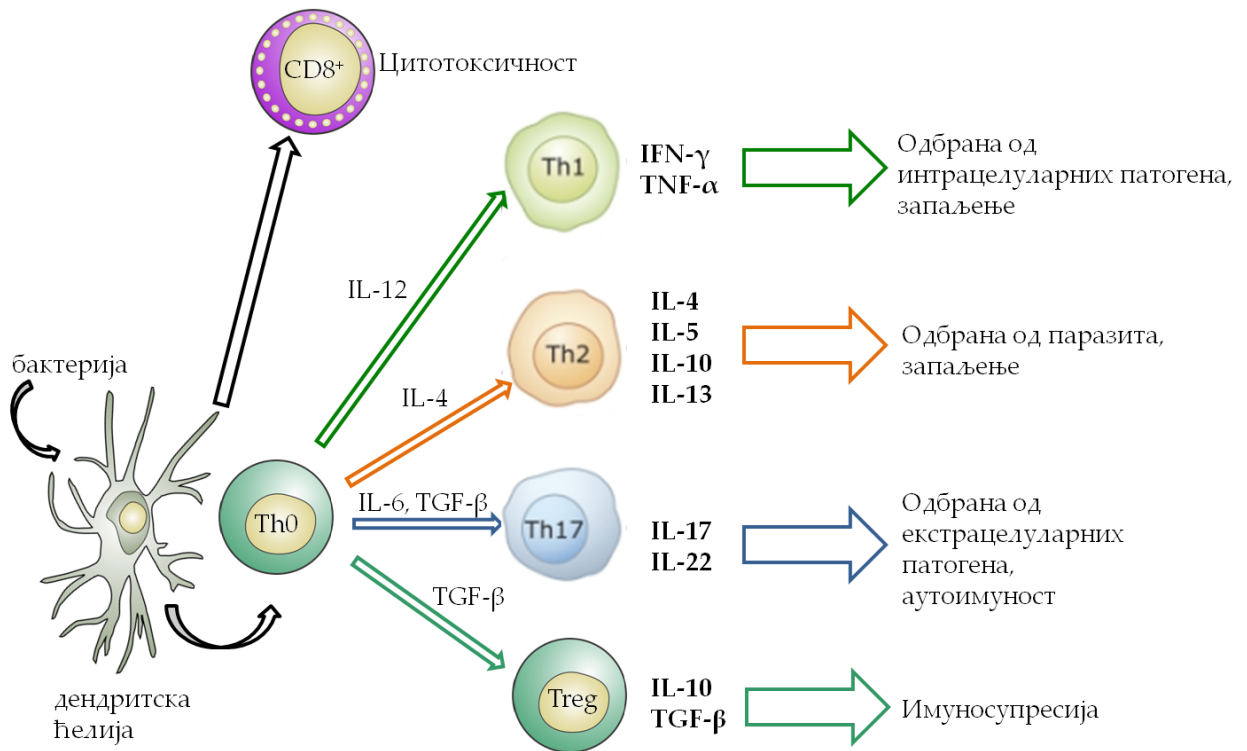
Фигура 2. Улога дендритских ћелија у патогенези УС. Када се оштети интактна цревна слузокожа, многи цревни антигени ће ући у *lamina propria*-у где се сусрећу са незрелим DCs и активирају их. Активирани DCs индукују урођени и стечени имунски одговор. Везивање молекулских образаца за TLR активира DC и регулише експресију B7 костимулатора и MHC молекула II класе. TLR активира и NF-κB транскрипциони фактор. Активирана DC секретује IL-12 и активира незрели Th0 лимфоцит.

Ћелијски имунски одговор. Сматра се да адаптивни имунски систем даје главни допринос патогенези болести, било кроз повећану продукцију проинфламацијских цитокина које секретују помагачки (Th) лимфоцити или неефикасном активношћу антиинфламацијских регулаторних Т-лимфоцита (Tregs) (70).

У улцерозном колитису, доминира Th2 стечени имунски одговор (IL-4, IL-13) и посредован је специјализованим ћелијама као што су NKT ћелије. Анализа цитокинског профила мононуклеарних ћелија из *lamina propria*-е (енгл. *Lamina propria mononuclear cells*- LPMC) изолованих из ткива који се опоравља од ресекције колона код пацијената са УС и CD, показала је да LPMC из пацијената са УС секретују велику количину Th2 цитокина IL-13 и IL-5 (62). Ове ћелије имају NK специфичне маркере CD161 и препознају CD1d, што указује на профил NK Т-ћелија (62). Ове NKT ћелије нису „класичне“ јер не експримирају инваријантне рецепторе карактеристичне за већину „класичних“ NKT ћелија. Експримирају неинваријантне (разноврсне) TCR који препознају антигене у склопу са CD1d, молекулом сличном MHC молекулима I класе, који је присутан на површини дендритских ћелија и на непрофесионалним антиген презентујућим ћелијама (APC) као што су интестиналне епителне ћелије (63).

„Нескласичне“ NKT ћелије изоловане из пацијената са УС показале су цитотоксичност према епителној ћелијској линији (HT-29) (62), што објашњава узрок цитотоксичности епителних ћелија (64). Улцерозни колитис карактерише атипичан Th-2 одговор посредован различитим цубпопулацијама NKT ћелија које производе IL-13 и које су цитотоксичне за епителне ћелије.

Дендритске ћелије су између епителних ћелија и Т лимфоцита. Они презентују антигене наивним CD4⁺ помагачким Т лимфоцитима (Th0) и осигуравају толеранцију на флору коменса промовишући њихову диференцијацију у регулаторне Т лимфоците (Treg) (69). У случају инфекције, DC активирани преко TLR рецептора секретују проинфламацијске цитокине и промовишу диференцијацију ефекторских Т лимфоцита Th1, Th2 и Th17 (Фигура 3). Када је болест активна, постоји неуравнотеженост броја Th и Treg лимфоцита (67). У слузници оболелих од улцерозног колитиса доминира инфилтрација атипичних Th2 лимфоцита, које карактерише секреција IL5, IL13 и TGF- β (68).



Фигура 3. Индукција стеченог имунског одговора. Диференцијација наивног Т лимфоцита.






Th1 лимфоцити су индуковани IL-12 и карактеристично секретују велике количине IFN- γ , TNF- α и IL-12, док су цитокини карактеристични за Th2 лимфоците IL-4, IL-5 и IL-13 (71). Сматра се да је UC посредован Th2 одговором (72). Доказано је да пацијенти са UC продукују повећану количину IL-5 и имају атипичне NKT ћелије које секретују велике количине IL-13, у поређењу са оболелим од Кронове болести (73-75). Међутим, најновији подаци сугеришу да парадигме CD-Th1 и UC-Th2 нису више тако утемељене. Биопсије пацијента показују висок ниво *ex vivo* продукције IFN- γ и нижи ниво IL-13 код пацијената са UC у односу на CD пацијенте (76, 77). Надаље, анализе показују да продукција IL-17 и IL-23 у Th17 лимфоцитима игра важну улогу у патогенези инфламацијских болести црева (28). Th17 лимфоцити су субпопулација помагачких Т-лимфоцита чију диференцијацију индукују IL-6 и TGF- β . Додатно их активира IL-23 и продукују велике количине IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22 (79-81).

1.4.Метаболички синдром

1.4.1. Дефиниција метаболичког синдрома

Италијански лекар Ђовани Батиста Моргагни је још пре око 250 година установио повезаност између висцералне гојазности односно интраабдоминалног масног ткива и повишеног крвног притиска, атеросклерозе, повећане концентрације мокраћне киселине у крви и епизода опструктивне диспнее за време спавања (82, 83). Метаболички синдром представља скуп метаболичких поремећаја који повећавају ризик за развој кардиоваскуларних болести и дијабетаса типа 2. Равен је први пут 1988. Године описао факторе ризика који се најчешће јављају удружено, а то су дислипидемија, хипертензија и хипергликемија и назвао их „Синдром X“ (84-86).

Постоји пет најпознатијих дефиниција за дефинисање овог синдрома:

-  World Health Organisation (WHO) – Definition, Diagnosis and Classifications of Diabetes Mellitus and its Complications,
-  European Group for the Study of Insulin Resistance Guidelines (EGIR),
-  National Cholesterol Education Program i Adult Treatment Panel III Definition (NCEP/ATP III)
-  AmericanCollege of Endocrinology (ACE) – Position Statement on the Insulin Resistence Syndrome
-  The IDF (International Diabetes Federation) consensus worldwide definition of the metabolic syndrome

Критеријуми, односно нумеричке вредности појединих компоненти, се мењају у зависности од удружења која га дефинише. И данас још не постоји потпуна термилошка сагласност о овом синдрому. Према терминологији која се користи у Европи ради се о метаболичком или плуриметаболичком синдрому. Американци за наведени синдром употребљавају термин „синдром X“ или „синдром инсулинске резистенције“ (87). Без обзира на ове разлике, сви се слажу да постојање овог синдрома повећава ризик од настанка и развоја кардиоваскуларних болести, што за последицу има повећање морталитета од болести срца и крвних судова (88). Светска здравствена организација (СЗО, WHO World Health Organisation) је на основу концензуса више националних и међународних, ендокринолошких и кардиолошких удружења први пут

утврдила критеријуме за постављање дијагнозе метаболичког синдрома 1998. године (89).

1.4.2. Критеријуми СЗО за постављање дијагнозе метаболичког синдрома:

- ☐ Шећерна болест типа 2, повишена вредност глукозе наше, гликозна интолеранција или инсулинска резистанција потврђена НОМА* индексом (Homeostasis model insulin resistance assessment index) и два или више понуних критеријума:
- ☐ Обим струк/кук > 90 cm код мушкараца, > 85 cm код жена
- ☐ Серумски триглицериди \geq 150 mg/dl
- ☐ HDL холестерол < 35 mg/dl код мушкараца, < 39 mg/dl код жена
- ☐ Микроалбуминурија > 20 mcg/min
- ☐ Крвни притисак \geq 140/90 mmHg.

Препоруке СЗО су биле прва радна основа за будућа истраживања. Критеријуми метаболичког синдрома стандардима СЗО захтевају, поред сурогата за мерење инсулинске резистенције (присутног дијабетес мелитуса типа 2, повећене вредности глукозе наше или након теста оптерећења глукозом) и вредност инсулинске резистенције. Ова вредност се изражава путем НОМА индекса (Homeostasis model insulin resistance assessment index) који се одређује хиперинсулинемијско- еугликемског кламп методом у најнижој четвртини криве доза-одговор (пострецепторски дефект). Овим тестом се добијају вредности инсулинске сензитивности и функционалног капацитета β -ћелија панкреаса (процентно изражено у односу на нормалну вредност), а користи се вредност глукозе наше у односу на вредности инсулина или С-пептида (90). Модел НОМА је адекватан и поуздан метод за процену промена у инсулинској резистенцији, јер примарно прецизно одређује вредност базалне инсулинске резистенције. Одређивање инсулинске резистенције на овај начин неприкладно за клиничку праксу, јер је ово скуп начин проналажења појединаца који припадају метаболичком синдрому у великим епидемиолошким и другим студијама (91).

Још једна дефиниција је предложена од стране Америчког удружења ендокринолога (ACE- American College of Endocrinology). Током 2002. године су предложени критеријуми за синдром инсулинске резистенције. У ову дефиницију није уврштена абдоминална гојазност. За овај синдром су потребна четири поремећаја: повишене

вредности триглицерида, снижене вредности HDL холестерола, хипертензију и повишене вредности шећера у крви наше и након теста оптећења глукозом.

1.4.3. Критеријуми ACE (American College of Endocrinology) за постављање дијагнозе синдрома инсулинске резистанције

Присуство више од једног од понуђених критеријума:

- ▣ Постављена дијагноза кардиоваскуларне болести, артеријске хипертензије, синдрома полицистичних јајника (PCOS), неалкохолне масне болести јетре (NAFLD-Nonalcoholic steatohepatitis) или acanthosis nigricans
- ▣ Породична анамнеза за тип 2 шећерне болести, повишен крвни притисак или друге кардиоваскуларне болести
- ▣ Анамнестички подаци о гестационом дијабетесу или гликозној интолеранцији
- ▣ Припадници других раса
- ▣ Седентерни стил живота
- ▣ Индекс телесне масе (BMI) $> 25 \text{ kg/m}^2$ и/или обим струка > 40 инча код мушкараца, > 35 инча код жена
- ▣ Старост > 40 година
- ▣ и два или више од понуђених критеријума:
 - ▣ Триглицериди $> 150 \text{ mg/dl}$
 - ▣ ХДЛ холестерол: мушкарци $< 40 \text{ mg/dl}$, жене $< 50 \text{ mg/dl}$
 - ▣ Крвни притисак $> 130/85 \text{ mmHg}$
 - ▣ Глукоза наше $110\text{--}125 \text{ mg/dl}$ или OGTT (Орални гликоза толеранс тест) $140\text{--}200 \text{ mg/dl}$

(дијабетес меллитус је искључен из ACE критеријума за IRS- синдром инсулинске резистенције.)

На критеријуме које је установила Светска здравствена организација, ослања се дефиниција метаболичког синдрома EIGR (European Group for the Study of Insulin Resistance Guidelines). Она је донета као модификована варијанта дефиниције СЗО и планирано је да се користи код особа које нису оболеле од дијабетеса. Као меру инсулинске резистенције, EGIR дефиниција предлаже одређивање инсулина наше, чија вредност треба да буде у горњој четвртини вредности инсулина наше код болесника без шећерне болести (92).

1.4.4. Критеријуми EGIR за постављање дијагнозе метаболичког синдрома

- ❑ Хиперинсулинемија наше и два или више од понуђених критеријума:
- ❑ Глукоза наше $\geq 6,1$ mmol/l, али не особе оболеле од дијабетес мелитуса
- ❑ Крвни притисак $\geq 140/90$ mmHg или коришћење лекова за повишен крвни притисак
- ❑ Триглицериди > 2 mmol/l или HDL холестерол < 1 mmol/l или од раније лечен поремећај
- ❑ Обим струк/кук (W-H ratio) > 94 cm код мушкараца или > 80 cm код жена

Најважније компоненте метаболичког синдрома су централна, односно абдоминална гојазност, хипертриглицеридемија, снижена вредност HDL- холестерола, повишен крвни притисак и хипергликемија (93).

Већа истраживања и мултицентричне студије метаболичког синдрома су биле отежане до 2004. године због недостатка концензуса о дефиницији и референтним вредностима појединих компоненти.

Клиничка дефиниција метаболичког синдрома NCEP-АТРИИ (National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III настала је 2001. године део научног програма који је био усмерен ка проналажењу болесника који болују од метаболичког синдрома ради боље превенције коронарне болести. Компоненте метаболичког синдрома су формулисане на начин да би биле доступније и једноставније за примену у клиничкој пракси, јер не укључују директно мерење инсулинске резистенције.

Дефиниција NCEP-АТРИИ је допуњена од стране **Америчког удружења кардиолога** (АНА American Heart Association) 2004. године и заснива се на присуству три од пет критеријума (94).

- ❑ Абдоминална гојазност (обим струка преко 102 cm за мушкарце и преко 88 cm за жене)
- ❑ Повишене вредности триглицерида наше преко 1,7 mmol/l или од раније лечен поремећај
- ❑ Снижен ниво HDL холестерола мање од 1,03 mmol/l за мушкарце и мање од 1,29 mmol/l за жене или већ лечен поремећај
- ❑ Повишен крвни притисак и то систолни притисак преко 130 mmHg и/или

дијастолни преко 85 mmHg или већ лечена хипертензија

- Повишен ниво глукозе наше преко 5,6 mmol/l или већ постојећи дијабетес меллитус тип 2.

Дефиниција **Међународног удружења за дијабетес** (IDF International Diabetes Federation) објављена је 2005. године. Ова дефиниција таконе указује да је инсулинска резистенција значајна компонента метаболичког синдрома, али њено одренивање није неопходно, јер је неприкладно за рутинску праксу. Абдоминална (централна) гојазност добија примарни значај и изражава се преко обима струка који је етнички дефинисан, са изузетком особа код којих је индекс телесне масе (ИТМ) преко 30 kg/m² (95).

IDF (International Diabetes Federation) критеријуми за постављање дијагнозе метаболичког синдрома:

- Абдоминална гојазност (обим струка са вредностима које су одренене етничком припадношћу) и 2 од 4 понунена критеријума:
- Триглицериди $\geq 1,7$ mmol/l или специфични третман дислипидемије
- HDL холестерол мушкарци 1,03 mmol/l, жене 1,29 mmol/l или специфични третман дислипидемије
- Крвни притисак $\geq 135/85$ mmHg или употреба антихипертензивне терапије
- Глукоза наше $\geq 5,6$ ммол/л и/или претходно дијагностикован тип 2 шећерне болести

1.4.5. Етиологија метаболичког синдрома

Фактори ризика за настанак метаболичког синдрома су многобројни: гојазност, старење и генетски фактори, инсулинска резистенција и дијабетес меллитус, пасивни начин живота, липодистрофија и остали фактори (96).

Гојазност. Гојазност и неправилна дистрибуција телесне масе доводе до пораста преваленце метаболичког синдрома. Постоје бројне дефиниције гојазности, као и критеријуми на основу којих се може дијагностиковати. Гојазност је стање када телесна маса прелази идеалну вредност за најмање 20%. Дефиниција Светске здравствене организације гласи: „Гојазност је обољење које се карактерише увећањем телесне масе у мери која доводи до нарушавања здравља и развоја компликација“. Гојазност представља метаболички поремећај у коме је повећање телесне масе

остварено на рачун масног ткива, тако да је удео телесне масти већи од 30% код жена односно 25% код мушкараца. Један од кључних елеманата метаболичког синдрома је централна (абдоминална) гојазност, мада и пацијенти са нормалном телесном масом могу имати инсулинску резистенцију и метаболички синдром (97). У популационим истраживањима спроведеним у Сједињеним (National Health and Nutrition Examination Survey) метаболички синдром је откривен код 5% популације са нормалном телесном масом, у односу на 22% код предгојазних и 60% испитаника са гојазношћу (98). Само повећање обима струка током времена у 46% случајева у наредних пет година доводи до развоја метаболичког синдрома (99). У Фрамингамској студији је доказано да пораст телесне масе за 2,25 и више килограма током наредних шеснаест година доводи до пораста ризика за настанак метаболичких компликација и метаболичког синдрома од 21 до 45 процената (100). У свету је данас присутна глобална епидемија гојазности. Паралално са пандемијом гојазности расте и број људи са метаболичким синдромом (101). С обзиром на овакав тренд раста у будућности се може се предвидети појава повећања броја људи са компликацијама и последицама гојазности.

Старење. Преваленца метаболичког синдрома расте са старењем популације, али се метаболички синдром више није ексклузивно поремећај искључиво адултне популације (102). Гојазности међу децом је данас три пута повећана у односу на шездесете године прошлог века у Сједињеним Америчким Државама. Овај тренд прати и пораст преваленце метаболичког синдрома међу педијатријском популацијом (103). С обзиром да је ова појава присутна и у другим крајевима света Интернационална Фондација за дијабетес (IDF-International Diabetes Foundation) је 2007. године објавила водич и препоруке за дијагностику и даље истраживење метаболичког синдрома за педијатре (104).

Пасивни начин живота (Sedentary Lifestyle). Умерена физичка активност има вишеструке користи за хронично оболеле пацијенте. Оболели од хроничне опструктивне болести плућа због респираторних симптома су слабије физички покретни и често усвајају пасивни начин живота што је један од важних узрока настанка метаболичког синдрома код ових болесника (105). У Сједињеним Америчким Државама се због предвиђеног пораста броја људи са метаболичким синдромом и осталим компликацијама прекомерне телесне масе, највише улаже на превенцију гојазности и повећање физичке активности (106). Стандардне препоруке за здраве људе

су дневно око тридесет минута умерене до средње тешке физичке активности (107). Доказано је да вежбање које доводи до користи смањења телесне масе и абдоминалне гојазности има вишеструке користи не само смањењем абдоминалног масног ткива, већ и кроз низ корисних метаболичких ефеката код особаженског пола (108). Са друге стране уклањање абдоминалног масног ткива липосукцијом или другим методама нема ефекта на повећања инсулинске сензитивности и смањење ризика од коронарне болести. На основу тога, може се рећи да је чињеница да је негативан баланс уноса и потрошње енергије, до којег доводи дијета и повећана физичка активност, неопходан услов за испољавање позитивних метаболичких ефеката губитка телесне масе и абдоминалног масног ткива (109).

Шећерна болест. Шећерна болест типа 2 је компонента која је укључена у две дефиниције метаболичког синдрома: Националног едукационог програма за холестерол у Сједињеним Америчким Државама (NCEP-АТРИИ) и Интернационалне Фондације за дијабетес (IDF). Код болесника са дијабетесом и синдромом глукозне интолеранције присуство метаболичког синдрома је заступљено у великој мери, и ови пацијенти имају већи ризик за настанак кардиоваскуларних компликација у односу на болеснике без синдрома (110).

Исхемијска болест срца. Преко 50% болесника са исхемијском болести срца има метаболички синдром, док је код пацијената мланих од 45 година овај проценат нижи и износи 37%, с тим да је у мланој популацији метаболички синдром учесталији код жена. Са адекватним терапијским мерама примењеним код болесника са исхемијском болести срца овај број се може смањити. Свеобухватне мере лечења обухватају примену кардиоваскуларне рехабилитације, промену начина живота и исхране, смањење телесне тежине и медикаментозну терапију (111).

Липодистрофија. Синдром липодистрофије обухвата клиничка стања која се карактеришу поремећеном дистрибуцијом телесних масти. То су липоатрофија (губитак поткожног масног ткива), липохипертрофија (повећање висцералног масног ткива) и комбинација ова два стања. Липодистрофијски поремећаји могу бити уронени и стечени. У највећој мери су удружени са метаболичким синдромом путем инсулинске резистенције. Уронене липодистрофије представљају ретке болести: Berardinelli Seip-ова урођена липодистрофија и Dunnigan-ова фамилијарна парцијална липодистрофија. Пример стечене, односно секундарне липодистрофије, представљају оболели од AIDS-

а лечени антиретровирусном терапијом. На настанак и развој липодистрофије утиче и сама HIV инфекција, у току које долази повећања синтезе бројних цитокина, који доприносе развоју метаболичких компликација (112).

1.4.6. Патогенеза метаболичког синдрома

Патогенеза метаболичког синдрома је комплексна, мултифакторијална и до данас није у

потпуности разјашњена. Централна гојазност и дисфункционално интраабдоминално масно ткиво имају кључну улогу у настанку инсулинске резистенције, ендотелне дисфункције и развоју атерогенезе као основног поремећаја у настанку срчаних обољења (113). Раније се сматрало да је масно ткиво метаболички инертно и да представља складиште за депоновање вишка енергије. Савремени концепт према коме дисфункционално масно ткиво не може да испуни своју физиолошку улогу у распоренивању вишка енергије пореклом из повећаног калоријског уноса и смањене енергетске потрошње, представља оквир за разумевање основних патофизиолошких особина метаболичког синдрома (114). Увећање броја и повећање волумена масних ћелија (адипоцита) уз ћелијску инфилтрацију доводи до лучења хемијских медијатора запаљења, односно про-инфламаторних цитокина. Повезаност метаболичког синдрома са благим степеном хроничне инфламације је више пута доказана и документована у неколико мултицентричних, рандомизованих студија. Није још увек у потпуности јасно да ли је хронична инфламација узрок или последица метаболичког синдрома (115). Висцерално масно ткиво је метаболички активно и адипоцити луче различите адипокине као што су лептин, адипонектин, резистин, адипсин, цитокине, факторе раста, инхибитор активације плазминогена (PAI)-1, липопротеин липазу и компоненте ренин-ангиотензин система који сви могу произвести локални и системски ефекат у организму (116). Метаболички синдром представља проинфламаторно и протромботично стање. Хемијски медијатори запаљења у које спадају цитокини и протеини акутне фазе у метаболичком синдрому су повећаних концентрација. Измерене су повишене вредности С-реактивног протеина, фибриногена, TNF- α (тумор некротизирајућег фактора α) и IL-6 (интерлеукина 6). Повишен ниво CRP-а је добар предиктивни показатељ за настанак метаболичког синдрома, што је доказано у клиничким студијама пре свега код особа женског пола (117). У досадашњим истраживањима је доказано да је упаво проинфламаторно стање, односно благи пораст маркера инфламације и адипокина, одговоран за повећан ризик од настанка

кардиоваскуларних болести и дијабетеса типа 2 (118). У студији Лангенберг-а и сарадника је потврнена њихова веза са повећаном смртности од кардиоваскуларних болести и нежељених кардиоваскуларних догађаја (119). Свака појединачна компонента метаболичког синдрома и самостално доводи до клиничких последица и компликација. Хипертензија у метаболичком синдрому узрокује хипертрофију миокарда леве коморе, периферну артеријску болест и атријалну фибрилацију (120). Кумулативни ризик који је присутан у метаболичком синдрому доводи до поремећаја микроциркулације и ендотелне дисфункције, што додатно повећава инсулинску резистенцију и потенцира настанак повишеног крвног притиска (121). До сада је откривено је неколико механизма на који метаболички синдром доводи до коронарне болести. Један од најважнијих је путем оксидативног стреса, који се повећава у системској инфламацији. Благ степен системске инфламације је део патогенезе свих компоненти метаболичког синдрома (122). Повећава се коагулабилност крви и склоност тромбогенези путем повећења плазминоген активатора типа 1 и адипокина који доводе до ендотелне дисфункције (123) Један од показатеља који се може измерити у метаболичком синдрому је крутост артерија (arterial stiffness)(124).

1.4.7. Учесталост метаболичког синдрома

Према подацима из различитих студија учесталост метаболичког синдрома је варира у широком распону и зависи од карактеристика популације и начина избора узорка. Преваленца метаболичког синдрома у Сједињеним Америчким Државама меу одраслом популацијом износи око 15-25%. Преваленца је већа код мушкараца и код оболелих од шећерне болести. Учесталост зависи од расне и етничке припадности. Неке етничке групе као што су амерички староседеоци, Американци афричког порекла, становници, полинежанских и пацифичких острва имају већу учесталост метаболичког синдрома. Најважнији подаци о учесталости се добијени у NHANES III студији (National Health and Nutrition Examination Survey III). Употребљавани су критеријуми NCEP (National Cholesterol Education Program) из 2001. године. Студија је изведена над 8814 испитаника који су праћени у периоду од 1988 до 1994. године и добијена је преваленца од 22%, која зависи од животне доби. У популацији од 20 до 29 година износила је 6,7%, у популацији од 60 до 69 година износила је 43,5% и преко седамдесет година 42%. Највећу учесталост имала је етничка група Американаца мексичког порекла од 32,9% након корекција за годиште (125). Подаци из следећих студија говоре о повећању инциденце, нарочито меу особама женског пола у

Сједињеним Америчким Државама (126). Учесталост метаболичког синдрома се повећава се са старењем. Старење утиче на губитак мишићне масе, смањење еластичности зидова артерија, смањење секреторног капацитета β - ћелија панкреаса и појаву запаљенских промена у масном ткиву (127). У европским земљама учесталост метаболичког синдрома је нижа у односу на С.А.Д. Мета анализа 11 проспективних студија у Европи које су обухватале 6156 мушкараца и 5356 жена старости од 30 до 89 година који нису имали шећерну болест (128), показала је да је учесталост метаболичког синдрома већа код мушкараца (15,7%) него код жена (14,2%). Међу овом популацијом током периода праћења од 8.8 година догодила су се 1119 смртна исхода, од којих је 432 директно било узроковано кардиоваскуларном болешћу (129). Доказано је да код здравих људи са метаболичким синдромом постоји повећан ризик од смрти од свих узрока, па тако и од кардиоваскуларних болести. У другим мета анализама утврњена инциденца је била 12,9% за мушкарце и 11,0% за жене за популацију без оболелих од дијабетеса. На територији града Новог Сада је спроведено истраживање учесталости метаболичког синдрома и синдром је доказан код 13,62% испитаника. Повећан ризик за развој метаболичког синдрома је забележен код 35% мушкараца и 60% жена (130). Метаболички синдром и дијабетес мелитус су чешћи код оболелих од хроничне опструктивне болести плућа него у општој популацији. Метаболички синдром је 1,5 до 3 пута чешћи код болесника са НОВР у односу на здраве особе са нормалним спирометријским налазом (130). Према до сада објављеним студијама учесталост износи од 32-53%. Интересантно је напоменути да је преваленца већа код ранијих стадијума НОВР (130). Патопфизиолошки механизми који доводе до повећане учесталости метаболичког синдрома у хроничној опструктивној болести плућа су разноврсни. На првом месту је хронична инфламација, односно инфламација у плућима која се прелива у системску инфламацију. Фактори ризика за развој хроничних плућних, кардиоваскуларних и метаболичких болести су слични и у највећој мери се преклапају. Најважнији је гојазност, смањена физичка активност и седерантни начин живота, пушење цигарета и учестало лечење кортикостероидима.

1.5. Метаболички синдром и улцерозни колитис

У ко-морбидне болести пацијената са УС спадају многе болести као што су реуматоидни артритис, мултипла склероза, лупус, псоријаза, хипотиреоидизам и метаболички синдром (131-136). Међу овим болестима, метаболички синдром је најчешћи, а повезаност са УС има епидемиолошке, патогенетске, клиничке и терапијске импликације (131).

Метаболички синдром и улцерозни колитис деле велики број заједничких компликација, пре свега неуролошких, хепатобилиарних, остеоартикуларних, васкуларних и постоперативних. Није познато да ли дуготрајно истовремено присуство обе болести повећава ризик од таквих компликација (131).

Иако пацијенти са метаболичким синдромом и блажом формом улцерозног колитиса најчешће имају повољан исход, пацијенти са рекурентном болешћу рефрактерном на кортикостероиде и дуготрајном терапијом често имају хипергликемију и хиперинсулинемију и повећан ризик од компликација (131). Исход улцерозног колитиса код пацијената са метаболичким синдромом до сада није истражен и нема пријављених података у великим клиничким студијама (131). Примери најчешћих заједничких компликација метаболичког синдрома и улцерозног колитиса представљени у даљем тексту (Табела 1).

Табела 1. Најчешће заједничке компликације метаболичког синдрома и улцерозног колитиса

Компликације	
Неуролошке	Дистална полинеуропатија (50% MS, 0-39% UC)
Хепатобилијарне	Холелитијаза (20-30% MS, након колектомије у UC) Хепатична стеатоза Неалкохолна масна јетра
Остео-артикуларне	Остеопороза
Васкуларне	Венска тромбоза (са кетоацидозом код MS, са активним UC)
Постперативне	Дехисценција Инфекција Неинфективне компликације

MS- метаболички синдром; UC- улцерозни колитис

Неуролошке компликације. Неуропатија је добро позната компликација метаболичког синдрома. Посебно, дистална симетрична полинеуропатија је најчешћи облик неуролошког поремећаја, који се јавља у до 50% болесника са метаболичким синдромом (137). Периферна неуропатија је такође неуролошка компликација инфламацијских болести црева (138, 139) са опсегом учесталости од 0% до 39%, у зависности од карактеристика испитиване групе и критеријима усвојеним за дефинисање неуропатија.

Хепатобилијарне компликације. Холелитијаза, честа компликација код 20%- 30% болесника са метаболичким синдромом, вероватно због оштећења контракција жучне кесе, гојазности и хиперлипидемије (140), такође се јавља као компликација код пацијената са УС, али тек после колектомије, вероватно због промена у састав жучи и повећање концентрације холестерола у жучи (141). Стеатоза јетре је честа карактеристика и Метаболичког синдрома и УС.

Остео-артикуларне компликације. Често је присутна остеопороза изазвана метаболичким синдромом, вероватно због промена у функционисању остеобласта и формирању костију, подстакнуте хипергликемијом (142). Велика је и преваленција смањене густине костију код болесника са УС, због повећања ресорпције костију. Дуго трајање болести, низак индекс телесне маса, колектомија и посебно високе дозе и продужено лечење кортикостероидима (кумулативна употреба стероида) су препознати као фактори ризика за ове компликације и фрактуре (143-145).

Васкуларне компликације. Метаболички синдром и УС деле васкуларне компликације, као што је венска тромбоза. УС карактерише потенцијално хиперкоагулабилно стање и знатно већа инциденца системске тромбоемболије него у оптој популацији, обично у корелацији са активном болешћу и операцијама (146-148). Метаболички синдром, иако најчешће компликован артеријском тромбозом, такође може бити компликован венском тромбоемболијом, у присуству кетоацидозе (149-151).

Постоперативне компликације. Метаболички синдром је познати фактор ризика са лошим исходом у колоректалној хирургији, углавном због појаве анастомотске дехисценције (152), инфективних и неинфективних компликација.

1.5.1. Кортикостероидима индукован метаболички синдром код пацијената са улцерозним колитисом

Кортикостероиди су главни терапијски агенси у УС, због вишеструких ефеката на ћелијски и хуморални имунски систем, укључујући и инхибиторно деловање на неколико проинфламацијских цитокина и метаболита арахидонске киселине (131). Већ више од 50 година кортикостероиди, као што је преднизон и метил-преднизолон користе се у терапији инфламацијских болести црева, током акутне фазе. Међутим, више од 50% пацијената не реагује на терапију (стероидрезистенција) или имају рецидиве након прекида терапије (стероидна зависност) и око половине њих показују нежељене ефекте различите тежине (153, 154). У већини случајева, појава и тежина нежељених ефеката (осим код остеонекрозе и идиосинкратних реакција) повезана је са трајањем и терапијском дозом.

Карактеристике метаболичког синдрома као што су хипергликемија и дијабетес изазван кортикостероидом су најчешће системске манифестације код оболелих од инфламацијских болести црева под стероидним третманом и представљају велики проблем за збрињавање када се појави рецидив цревне болести.

До данас, постоји мало података о инциденци кортикостероидима индуковане хипергликемије или метаболичког синдрома у инфламацијским болестима црева као и о настанку акутних компликација, као што су кетоацидоза и хиперосмоларна хипергликемија, код пацијената оболелих од болести црева, под стероидном терапијом. Већина података није изведена из гастроентеролошких студија (1). У једној од студија која укључује велики број пацијената (11855 случајева и 11855 контрола) показано је да кортикостероиди (преднизон или аналогуесат у дози од 30 mg дневно или више) повећавају релативни ризик настанка хипергликемије $RR=10$, у поређењу са нетретираним болесницима (155). Друга, ретроспективна студија, укључујући 25 пацијената са неуропатијом (средња старост 50 година) показала је да лечење преднизолоном у дози од 30-60 mg дневно најмање 2 недеље може резултовати постпрандијалном хипергликемијом, упоредивом са дијабетес меллитусом код 13 од 25 пацијената и показала да је старост фактор ризика за ову компликацију (156).

Доступне студије, углавном спроведене на пацијентима који нису оболели од

улцерозног колитиса, потврђују да су укупна доза кортикостероида и трајање терапије важни предиктивни фактори ризика за развој метаболичког синдрома (131). Поред тога, ове студије наглашавају да други фактори, као што су старост, индекс масе тела, позитивна породична анамнеза или претходни гестацијски дијабетес могу утицати на генезу коморбидитета и да би код оваквих пацијената требало препоручити праћење нивоа глукозе у крви током терапије стероидима.

Метаболички синдром и улцерозни колитис деле неуролошке, хепатобилијарне, остеоартикуларне, васкуларне и пост-оперативне компликације. Настанак компликације може се убрзати дуготрајном истовременом активношћу оба обољења. Иако специфичане студије о овом аспекту још увек нису спроведене, ово заслужује пажњу у клиничкој пракси. Нарочито, улога метаболичког синдрома и слабе контроле нивоа глукозе у крви заслужује анализу ризика од компликација пацијената се улцерозним колитисом.

Један од најчешћих и најизазовних проблема код оболелих са метаболичким синдромом и улцерозним колитисом је третман. Кортикостероиди, третман избора код активног улцерозног колитиса, може се повезати са појавом интолеранције глукозе и дијабетеса, и са слабом контролом нивоа глукозе у крви и компликацијама болести.

Старост, индекс телесне масе, породична историја метаболичког синдрома или претходни гестацијски дијабетес увек треба да сугеришу потребу за надгледањем нивоа глукозе у крви током стероидне терапије.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ овог истраживања је да се испита повезаност развојних фаза метаболичког синдрома са тежином болести, те локалним и системским имунским одговором код пацијената са улцерозним колитисом.

У складу са основним циљем истраживања дефинисани су конкретни задаци:

1. Анализом степена резистенције на инсулин и степена толеранције гликозе одредити фазе метаболичког синдрома код болесника са улцерозном колитисом;
2. Анализирати повезаност појединих развојних фаза метаболичког синдрома са клиничким и патохистолошким скором улцерозног колитиса;
3. Анализирати повезаност појединих развојних фаза метаболичког синдрома са концентрацијом цитокина у периферној крви (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, IL-33, sST2, TGF- β) болесника са улцерозном колитисом;
4. Анализирати повезаност појединих развојних фаза метаболичког синдрома са процентуалном заступљеношћу и функционалним фенотипом леукоцитног инфилтрата *lamina propria*-е црева оболелих од улцерозног колитиса.

ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Поједине фазе метаболичког синдрома различито утичу на клиничко-патолошке карактеристике улцерозног колитиса.
2. Концентрација цитокина у серуму пацијената са улцерозном колитисом се мења током прогресије метаболичког синдрома.
3. У различитим фазама метаболичког синдрома значајно се мења процентуална заступљеност и функционални фенотип леукоцитног инфилтрата *lamina propria*-е црева оболелих од улцерозног колитиса.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је спроведено у Центру за гастроентерологију и хепатологију Интерне клинике Клиничког центра Крагујевац и лабораторијама Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу, у периоду од јуна 2016. године до фебруара 2018. године.

Спровођење студије је одобрио Етички одбор Клиничког центра Крагујевац (одлука број 01-7012 од 02.07.2015.) и Етички комитет Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (број 01-5317 од 21.05.2015.). Студија је одобрена као непрофитна клиничка студија, која се спроводи искључиво у научно-истраживачке сврхе. Пре започете студијске процедуре, болесници су потписали образац сагласности за учешће у студији. Протокол је спроведен у складу са важећом регулативом Добре клиничке праксе (GCP, енгл. *Good Clinicall Practice*).

3.1. Испитивани узорак

Рађена је неинтервентна, клиничка, опсервациона студија пресека током које су се упоређивали тестирани параметри у експерименталној и контролној групи испитаника. У студију су укључени болесници код којих је постављена клиничка сумња на улцерозни колитис, те који испуњавају све укључујуће и немају ниједан искључујући критеријум. У студији је учествовало 89 испитаника, старосне доби од 21-80 год.

У студију су укључени испитаници по принципу згодног узорка, а који су са сумњом на улцерозни колитис упућени у Центар за гастроентерологију и хепатологију Интерне клинике КЦ Крагујевац.

Укључујући критеријуми су:

- потписан добровољни пристанак за учешће у студији

а) **експериментална група:** постављена дијагноза улцерозног колитиса на основу ендоскопског прегледа колона и патохистолошког налаза биопсија узетих током ендоскопског прегледа колона, а у складу са критеријумима Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis из 2106. године (157-160).

б) **контролна група:** сачињена од 20 испитаника, добровољних даваоца крви Клиничког центра Крагујевац.

Као контрола за анализу ћелијског састава ламине проприје црева коришћени су ендоскопски узорци са нормалним или неспецифичним налазом на основу ендоскопског прегледа колона и патохистолошког налаза биопсија узетих током ендоскопског прегледа колона. Све контроле имају нормалну слузницу колона, без макроскопских и микроскопских доказа о инфламацији или малигним променама.

Искључујући критеријуми су:

1. испитаници млађи од 18 година, труднице, дојиље и особе са лимитираном правном одговорношћу и смањеним когнитивним способностима
2. испитаници са хроничним болестима и/или терапијом која може утицати на испитиване параметре: раније дијагностиковани дијабетес мелитус, болести панкреаса, урођене болести метаболизма, болести бубрега праћене смањеном реналном функцијом (клиренс креатинина испод 60 $\mu\text{mol/L}$), болести јетре, аутоимунске болести на терапији имуносупресивном, имуномодулаторном и кортикостероидном терапијом, малигне болести (сем базоцелуларног карцинома), коронарна болест у акутној фази, нерегулисана артеријска хипертензија, болести ендокриног система (хипер или хипокортицизам, феохромоцитом, акромегалија, неуроендокрини тумори).
3. инфекција и инфективни синдроми две недеље пре и у тренутку истраживања
4. примена лекова и/или медицинских процедура и поступака који могу утицати на испитиване параметре две недеље пре и у тренутку истраживања
5. испитаници са субклиничком или клиничком тироидном дисфункцијом

3.2. Истраживачки поступак

Испитивање је обављено током три посете пацијента истраживачком центру, а у складу са следећим протоколом (Табела 2):

Посета 1. Временски оквир дан 1. Током ове посете пацијентима који имају клиничку сумњу на улцерозни колитис обављене су следеће процедуре:

- У складу са принципима Добре клиничке праксе, пре било каквих других процедура, обављен је разговор о природи истраживања и објашњен је образац Добровољног пристанка. Пацијенту и евентуално његовим пратиоцима достављен је образац Добровољног пристанка, омогућено им је довољно времена да га прочитају и у случају пристанка пацијент (или његов законски заступник) је потписао и датирао два примерка обрасца Добровољног пристанка, а исто је учинио и главни истраживач.
- Затим је обављен разговор са пацијентом и, у складу са стандардизованим упитником, прикупљени су анамнестички подаци (лични административни подаци, медицинска лична и породична анамнеза).
- Обављен је стандардни физикални преглед са одређивањем антропометријских параметера (телесна висина, телесна маса, израчунавање ВМІ- енгл. Body Mass Index) и мерењем виталних параметара: артеријски крвни притисак у супин положају и пулс.
- Ехо горњег абдомена (присутна или не стеатоза јетре)
- Пацијенту је урађен стандардни 12-канални електрокардиограм- ЕКГ
- Још једном су размотрени укључујући и искључујући критеријуми и уколико пацијент има све укључујуће и нема ни један искључујући критеријум даље је опсервиран у истраживању и заказана му је Посета 2.
- Пацијенту је објашњен начин живота (стандардна исхрана и умерена физичка активност) 3 дана пре заказане посете 2, те неопходност доласка наштину на ову посету.

Посета 2. Временски оквир 3.-7. дан истраживања. Током ове посете, пацијенти су долазили наштину и до 9 сати, а спроведене су следеће процедуре:

- Пласирање хепаринизоване пластичне каниле у кубиталну вену и узорковање узорака крви:

- 3,5 ml пуне крви са антикоагулансом (левендер епрувета) за комплетну крву слику и одређивање HbA1c;
 - 3,5 ml пуне крви са антикоагулансом (левендер епрувета) за анализу леукоцита периферне крви;
 - 10 ml пуне крви за издвајање серума (ред епрувета) за одређивање биохемијских анализа: гликемија 0 мин, укупни, HDL, LDL холестерол, триглицериди, ацидум урицум, CRP, AST, ALT, GGT, уреја, креатинин, калијум, натријум, калцијум, фосфат, витамин D, укупни протеини, албумини, глобулини, алкална фосфатаза, LDH;
 - 5 ml пуне крви за издвајање серума (ред епрувета) за одређивање fT4, TSH, АнтиТРО Ab, АнтиTG Ab, Инсулинемија 0 мин;
 - 10 ml пуне крви за издвајање серума (ред епрувета) за одређивање концентрације цитокина у серуму.
- Извођење оралног глукоза толеранс теста (енгл. Oral Glucose Tolerance Test- OGTT) са 75g глукозе и одређивањем гликемије (5 ml крви ред епрувета) и инсулинемије (5 ml крви ред епрувета) у 30. мин, 60. мин, 90. мин, 120. мин и 180. мин теста. Током теста пацијент седи, нема физичку активност, не узима храну и не конзумира дуван.
 - Преглед столице на амебе, ламбилије, паразите, копрокултуру, *Clostridium difficile* (искључивање инфективних колитиса и псеудомембранозног колитиса).
 - Пацијенту се заказује Посета 3 и објашњен је начин припреме за еноскопски преглед колона.

Посета 3. Временски оквир 10.-14.дан. Пацијенти су долазили адекватно припремљени за ендоскопски преглед колона у заказаном термину. Током ове посете извођене су следеће процедуре:

- Извођење ендоскопског прегледа колона и опис резултата у складу са стандардном медицинском праксом
- Узимање узорака ткива слузнице колона (најмање 5) током прегледа ради патохистолошке и имунохистохемијске анализе
- Узимање узорака столице ради одређивања вредности калпротектина и цитокина

Табела 2. План посета током истраживања („chart flow“)

Посета	Посета 1	Посета 2	Посета 3
Временски оквир	1.дан	3.-7.дан	10.-14.дан
Информисани пристанак	x		
Укључујући/искључујући критеријуми	x	x	x
Стандардизовани упитник	x		
Лична и породична анамнеза	x		
Телесна висина, маса	x		
Физикални преглед, витални параметри	x	x	x
ККС, биохемијске анализе		x	
Концентрација цитокина у серуму		x	
НбА1с		x	
Параметри тироидног статуса		x	
ОГТТ (75g глукозе)		x	
Ендоскопски преглед колона			x
Узимање узорака ткива слузнице колона и патохистолошка и имунохистохемијска анализа			x
Узимање узорака столице			x

3.3. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: улцерозни колитис, фазе метаболичког синдрома

Зависне варијабле: тежина болести, клиничко-патохистолошки налаз, концентрације цитокина у серуму, функционални фенотип инфилтришућих ћелија имунског система.

Збуњујуће варијабле: старост и клиничке карактеристике испитаника.

Одређивање фаза у развоју метаболичког синдрома

Анализом прикупљених података постављена је дијагноза метаболичког синдрома (критеријуми IDF, 2005), а на основу кретања гликемије и инсулинемије током OGTT-а, према критеријумима Америчке дијабетеске асоцијације (ADA) и Европске асоцијације за проучавање дијабетеса (EASD) одређене су фазе у развоју метаболичког синдрома:

- Фаза 1: нормална толеранција гликозе и нормоинсулинемија
- Фаза 2: нормална толеранција гликозе и хиперинсулинемија
- Фаза 3: патолошка толеранција гликозе и хиперинсулинемија
- Фаза 4: патолошка толеранција гликозе и нормо или хипоинсулинемија

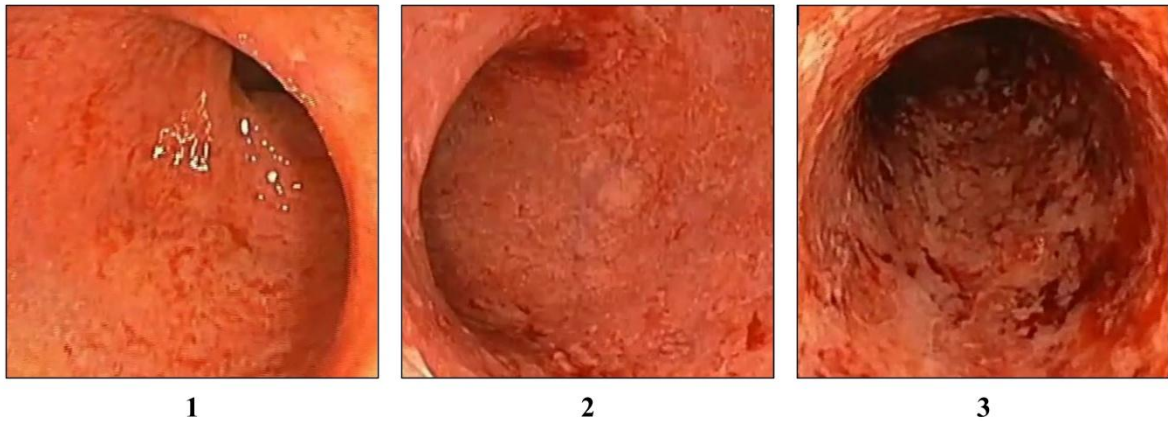
Под патолошком толеранцијом гликозе подразумева се повишена гликемија наштину, интолеранција гликозе, нарушена хомеостаза гликозе и дијабетес мелитус. Хиперинсулинемијом се сматра вредности инсулина у 0., 120. и 180. мин. изнад референтних вредности. Израчунавани су НОМА RI и НОМА Бета индекси.

Процена тежине улцерозног колитиса- индекс активности

Колоноскопија је ендоскопска процедура којом се откривају патолошке промене и абнормалности у дебелом цреву. Колоноскопија се изводи помоћу колоноскопа и на врху овог апарата је камера која омогућава визуализацију унутрашњости црева. За колоноскопију је неопходна припрема испитаника у периоду од неколико дана и изводи се по стандардним протоколима припреме.

Иако је у последњих педесетак година предложен велики број различитих индекса активности болести (164), до сада ниједан није прошао поступак адекватног вредновања. Из систематских прегледа литературе је видљиво да се у дневној пракси најчешће користи нека од модификација Truelove-овог и Witts-овог индекса, а у клиничким студијама оригинални или модификовани Mayo Clinic индекс (скор). У овој студији, клиничка активност болести је процењена према подацима доступним у евиденцији пацијената. Анализиране су три клиничке варијабле: учесталост пражњења, количина крви у столицу и општа процена лекара. Клиничко подскор Mayo 0 дефинисан је као ремисија, 1-3 као благо активна болест (I), 4-6 као умерено активна болест (II), и ≥ 7 као јако активна болест (III) (161). Ендоскопски налази су забележени

у складу са Мауо ендоскопским подскором, класификован као нормална (0), блага (I), умерена (II) или озбиљна (III) активност болести. На крају, пуна оцена Мауо израчуната је на основу четири параметра: фреквенција столице, ректално крварење, ендоскопска евалуација и глобална процена доктора (Фигура 4; 162). Скор 0-I дефинисан је као ремисија а скорови II-III као активна болест (163).



Фигура 4. Ендоскопске слике Мауо скорова улцерозног колитиса. Мауо 1: блага активност (еритем, мање изражена васкуларна шара, мања распрострањеност); Мауо 2: умерена активност (изражен еритем, недостатак васкуларне шаре, крхкост, ерозије); Мауо 3: тешка форма (спонтано крварење, велике улцерације).

Хистолошка активност болести

У току колоноскопије узимани су ткивни исечци на местима измењене слузнице колона (са хиперемичне, вулнерабилне, гранулиране слузнице), на местима улцерација, фибринских наслага, псеудополипа и сужења. Ови исечци ткива су коришћени за патохистолошку анализу (од сваког испитаника узето је по 5 исечака ткива, величине 4-5 mm).

Исечци ткива су фиксирани у пуферисаном 4% формалину, 18-24 сата, дехидрисани у алкохолу и калупљени у парафин. Парафински блокови ткива су серијски сечени на пресеке дебљине 5–7 μm . Уследило је бојење ткивних пресека методом хематоксилин-еозин по Heidenhain-у (165) и сагласно препорукама Gurr-а (166): на почетку су плочице са ткивним пресецима излагане пуферу формалдехида 10 секунди, онда су опране у текућој води, а затим су потопљене два минута у Мауег-ов хематоксилин (Merck). На крају су плочице са ткивним пресецима испране један минут у текућој води и бојене алкохолним еозином (Merck) у трајању од једног минута. Након бојења исечци су дехидрирани тако што су потапани у серију растућих концентрација алкохола и то следећим редом: најпре један минут у 85%-тном алкохолу, затим два пута по 50 секунди

у 96%-тном и на крају два пута по 50 секунди у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидратације, уследио је поступак просвет- љавања потапањем у мешавину ксилола и алкохола у односу 1:1, 50 секунди, а затим два пута по 50 секунди само у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет Канада бал- зам (Canadabalsam, Centrohem, Србија) и препарати су прекривени покровним стаклима. Овако припремљени ткивни исечци су, након 24-часовног сушења, анализирани светлосном микроскопијом (увеличање 10x и 40x).

Патохистолошком анализом инфламиране слузнице колона је дефинисан степен хистолошких промена слузнице црева. Хистолошки преглед је обавио патолог, који није имао увид у резултате ендоскопског скорирања колона. Тренутно ни један хистолошки индекс није оптимални избор, али постоји општа препорука да се и хистолошка анализа укључи у процену активности болести и одговора на различите терапијске покушаје (164). У примени су најчешће два индекса хистолошке активности. Geboes-ов и Rileyev индекс (167, 168). Geboes-ов индекс (Geboes Score- GS) обухвата 6 параметара: структурне промене, хронични запаљенски инфилтрат, неутрофилну и еозинофилну инфилтрацију ламине проприје, неутрофилну инфилтрацију епитела, деструкцију крипти и ерозије и улцерације слузнице (167). Број бодова се креће између 0 и 5/4, а што је број већи то је тежа болест (164).

Одређивање комплетне крвне слике, HbA1c, биохемијских анализа, инсулинемија и параметара тироидног статуса

Одређивање комплетне крвне слике, HbA1c и биохемијских анализа урађено је у Централној биохемијској лабораторији КЦ Крагујевац стандардним методама, апаратом *Beckman Coulter AU 400 Unicel DXC 800 Synchron Clinical System*.

- Гликемија је одређивана из пуне венске крви кинетичким *UV* тестом (метода са хексокиназом) за квантитативно одређивање глукозе у хуманом серуму, плазми, урину, хемодијализату, и ликвору, изражавана у *mmol/L*, (референтна вредност 4.4-6.1 *mmol/L*).
- *HbA1c* је одређиван уз помоћ имуноинхибиционог комерцијалног реагенса, латекс аглутнационо инхибиционим поступком (мери се апсорбанција изазвана аглутинацијом на 700 *nm*), изражаван је у процентима (%), (референтна вредност ≤ 42 *mmol/mol*, $\leq 6,0\%$).

- ККС је одређивана на апарату *Beckman Coulter AcT diff Analyzer*: одређиван је број леукоцита, еритроцита, тромбоцита (мерењем промене у електричном отпору када партикула-ћелија у проводној течности пролази кроз мали отвор, изражавани у броју $\times 10^9/l$, $\times 10^{12}/l$), хемоглобин се одређује колориметријски, изражаван је у g/L , (референтна вредност 120-140).
- Протеини су одређивани фотометријским колор тестом за квантитативно одређивање укупних протеина у хуманом серуму и плазми, изражавани у g/L , (референтна вредност 64-83).
- Албумини су одређивани фотометријским колор тестом за квантитативно одређивање албумина у хуманом серуму и плазми, изражавани у g/L , (референтна вредност 35-52).
- Уреа је одређивана кинетичким *UV* тестом за квантитативно одређивање уреје у хуманом серуму, плазми и урину, изражавана је у $mmol/L$, (референтна вредност 3.0-8.0).
- Креатинин је одређиван кинетичким колор тестом (*Jaffe* метода) за квантитативно одређивање креатинина у хуманом серуму, плазми и урину, изражаван је у $\mu mol/L$, (референтна вредност 49-106).
- Мокраћна киселина је одређивана ензимским колор тестом за квантитативно одређивање мокраћне киселине у хуманом серуму, плазми и урину, изражавана је у $\mu mol/L$, (референтна вредност 154-428).
- *CRP* (C-реактивни протеин) је одређиван имунотурбидиметријским тестом за квантитативно одређивање *CRP* у хуманом серуму и плазми, изражаван је у mg/L , (референтна вредност 0-5).
- *K* (калијум), *Na* (натријум) *Cl* (хлор) и *P* (фосфор) су одређивани јон селективном електрода индиректном методом, изражаван је у $mmol/L$, (референтна вредност 3.5-5.3).
- *Ca* (калцијум) је одређиван фотометријским колор тестом за квантитативно одређивање укупног калцијума у хуманом серуму, плазми и урину, изражаван је у $mmol/L$, (референтна вредност 2.02-2.65).
- *AST* (аспартат аминотрансфераза) је одређиван кинетичким *UV* тестом за квантитативно одређивање *AST*-а у хуманом серуму и плазми, изражаван је у U/L , (референтна вредност 0-40).

- *ALT* (аланин аминотрансфераза) је одређиван кинетичким *UV* тестом за квантитативно одређивање *ALT*-а у хуманом серуму и плазми, изражаван је у *U/L*, (референтна вредност 0-40).
- Укупни холестерол (*tHol*), је одређиван ензимским колор тестом за квантитативно одређивање холестерола у хуманом серуму и плазми, изражаван је у *mmol/L*, (референтна вредност 3.1-5.2).
- *HDL*-холестерол (*HDL*) је одређиван ензимским колор тестом за квантитативно одређивање *HDL*-холестерола у хуманом серуму и плазми, изражаван је у *mmol/L*, (референтна вредност 1.1-2.5).
- Триглицериди (*TAG*) су одређивани ензимским колор тестом за квантитативно одређивање триглицерида у хуманом серуму и плазми, изражавани су у *mmol/L*, (референтна вредност 0.1-1.7).
- *LDL*-холестерол (*LDL*) је израчунаван по *Friedewald*-овој формули (уз услов да је ниво *TAG* <4,5 *mmol/L*): $LDL\text{-холестерол} = tHol - HDL - TAG/2,2$), изражаван је у *mmol/L*, (референтна вредност 0.1-3.5).

Одређивање инсулинемија и параметара тироидног статуса је изведено у Центру за нуклеарну медицину, КЦ Крагујевац стандардним нуклеарно-медицинским методама. Инсулинемија је одређивана *RIA* методом уз помоћ *radioimmunoassay INSULIN-CT* кита за квантитативно одређивање инсулина у хуманом серуму и плазми на гама цинтилационом бројачу, изражавана у *mU/mL*, (референтна вредност 4.3-19.9). Клинички тироидна дисфункција је сматрана уколико је абнормалан *TSH* уз абнормалан *fT4*, субклиничка тироидна дисфункција је сматрана уколико је абнормалан *TSH* а нормалан *fT4*.

- *fT3* је одређиван *RIA* методом уз помоћ кита за радиоимунолошко одређивање концентрације *fT3* у хуманом серуму на гама сцинтилационом бројачу, изражаван у *pg/mL*, (референтна вредност 2-4.25).
- *fT4* је одређиван *RIA* методом уз помоћ кита за радиоимунолошко одређивање концентрације *fT4* у хуманом серуму на гама сцинтилационом бројачу, изражаван у *pg/mL*, (референтна вредност 7-18).
- *TPOAt* су одређивана *RIA* методом уз помоћ *radioligand assay TPO-AB-CT* кита за мерење аутоантитела на тироидну пероксидазу (*TPO*) у хуманом серуму на гама сцинтилационом бројачу, концентрација од 70 *U/ml* је сматрана позитивном, (референтна вредност 0-70).
- *TSH* је одређиван уз помоћ *IRMA TSH* дијагностичког комплета за квантитативно одређивање *TSH* у хуманом серуму, имунорадиометријском методом на чврстој фази, у којој се користе два клона моноклонских антитела специфична за различите епитопе на молекулу хуманог *TSH*, изражаван је у *mIU/L*, (референтна вредност 0.3-5.5).
- Тиреоглобулинска *At* су одређивана уз помоћ *THYROGLOBULINE IRMA* кита, имунорадиометријског теста за одређивање тиреоглобулина у хуманом серуму, изражаван у *IU/ml*, (референтна вредност 0-30).

Изолација течне фракције фецеса

Узорци столице пацијената (1-10 g) сакупљани су у стерилним контејнерима и премерени. Подељени су на аликвоте од по 1 g и затим ресуспендовани у 5 ml коктела инхибитора протеазе (protease inhibitor cocktail- SIGMA, P83401), разблаженог 1:100, и центрифугирани 5 минута на G, на 4°C, како је претходно описано (169, 170). Супернатанти су сакупљени и складиштени на - 80°C до анализе.

Одређивање концентрације калпротектина у фецесу

Концентрација калпротектина одређивана је ELISA методом према утврђеном протоколу произвођача (CALPROTECTIN ELISA TEST).

Одређивање концентрације медијатора инфламације у серуму и фецесу

Издвојени серум и течна фракција фецеса испитаника који учествују у истраживању су замрзнути на -20°C до извођења анализе. Концентрације TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, IL-33, sST2, TGF- β , CXCL11, CXCL8, Gal-1 и Gal-3 одређиване су одговарајућим комерцијалним ELISA тестовима специфичним за хумане цитокине (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), као што је описано у нашим претходним истраживањима (171, 172).

Стандарди су пре употребе растворени у PBS-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације буду 500 pg/ml за CXCL11; 600 pg/ml за IL-6; 1000pg/ml за IL-17, TNF- α ; 1500 за IL-33; 2000 pg/ml за IL-10, TGF- β , sST2, CXCL8; 4000 pg/ml за Gal-3; 8000 pg/ml за IL-23; 20ng/ml за Gal-1, а од оваквих штокова направљена су серијска опадајућа разблажења у 7 тачака у комерцијалном растварачу, према упутству произвођача. 100 μ l радне концентрације везујућег антитела (енгл. Capture Antibody) сипано је у бунарчиће полистиренских микротитар плоча (енгл. microtiter plate- MTP) са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). Плоче су потом прелепљене адхезивном фолијом (енгл. ELISA Plate Sealers) и остављене преко ноћи на собној температури, након чега су испране пуфером за испирање (енгл. Wash Buffer) у аутоматској машини за испирање MTP-а. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (BlockBuffer, 1%BSA у PBS-у) финалног волумена 300 μ l и MTP су остављене минимум један сат на собној температури, а потом испране пуфером за испирање. Сви узорци су претходно разблажени два пута у дејонизованој води. Анализа

TGF- β подразумева претходну активацију латентног TGF- β у имунореактиван облик.

Разблажени узорци и припремљени стандарди насути су у МТР, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања МТР, у све бунарчиће је додато по 100 μ l радне концентрације детекционог антитела (енгл. DetectionAntibody), плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на собној температури. Плоче су потом испране, а у бунарчиће је сипано 100 μ l радне концентрације Streptavidin-HRP (енгл. Streptavidin horseradish peroxidase). Инкубација на собној температури и без директног излагања светлости прекинута је након 20 минута, испирањем МТР-а. У бунарчиће је сипано 100 μ l раствора супстрата (енгл. Substrate Solution: Color reagent A + Color reagent B, 1:1). Двадесет минута касније, додати је 50 μ l стоп раствора (енгл. Stop Solution: 2N H₂SO₄) и одмах потом мерена оптичка густина у сваком бунарчићу, помоћу Microplate reader-а (Zenyth, Anthos, UK) подешеног на 450nm. Све измерене вредности су умањене за вредности апсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда направљена је стандардна крива, а помоћу ње израчуната вредност за сваки појединачан узорак. Сви узорци су мерени у дубликату.

Одређивање серумских концентрација туморских маркера AFP, CEA и CA 19-9

Серумске вредности туморских маркера Alpha-fetoprotein (AFP), Carcino-embryonic antigen (CEA), и Cancer antigen 19-9 (CA19-9) одређиване су хемилуминисцентном методом (chemiluminescence enzyme immunoassay- CLIA) у централној биохемијској лабораторији Клиничког центра Крагујевац.

Изолација ћелија из ламине проприје ткива колона

Фенотип ћелија које инфилтрирају колон анализиран је проточном цитометријом. Имушке ћелије су изоловане из колона пацијената са улцерозним колитисом, као и код контрола (173). Узорци ткива су опрани три пута у HBSS-у. Након испирања, инкубирани су у HBSS-у са 1 mM EDTA током 10 минута на 37°C, уз благо мешање да би се издвојиле епителне ћелије. Након инкубирања, ћелије су поново испране у HBSS-у и инкубиране током 20-30 минута у 2 ml RPMI са 1 mg/ml колагеназом типа I (=336 U/ml), 0.1 mg/ml DNase-ом и 1 mg/ml хијалоуронидазом без FCS на 37°C. Након инкубирања ћелије су два

пута испране PBS-ом и финално ресуспендоване са Ficoll градијентом. Тако ресуспендоване ћелије су центрифугиране током 20 минута на 690 G без кочења. Интерфаза се полако уклања и испира PBS-ом. Супернатант је одливен, а на ћелијски талог је додато 5ml раствора за лизирање (4mg EDTA, 100mg NaHCO₃, 826mg NH₄Cl, растворено у 100ml ddH₂O), и инкубирано 5 минута на леду. Даље лизирање заустављено је додавањем 5ml RPMI-1640 (10% FBS). Затим су ћелије центрифугиране, супернатант је одливен а талог ресуспендован у 8ml RPMI-1640 (10% FBS). Ћелије су пропуштене кроз ћелијско сито. Овако добијена суспензија је залеђена у крио-протективном медијуму (комплетан медијум за раст ћелија са додатком 5% DMSO) до извођења анализе (проточна цитометрија).

Анализа леукоцитног инфилтрата ламине проприје колона проточном цитометријом

Ћелије изоловане из ламине проприје извађене су из контејнера са течним азотом су брзо одмрзаване у воденом купатилу (37°C, не дуже од 2 минута). Додавањем 9 ml комплетног медијума и центрифугирањем на 350G 10 минута, уклоњен је крио-протективни медијум. Након одливања супернатанта, ћелије су ресуспендоване у 1 ml комплетног медијума. Приликом бројања ћелија одређивана је и њихова вијабилност помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом и у експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 90%.

Проточном цитометријом идентификоване су субпопулације леукоцита и одређени њихови процентуални односи. Детектовани су: неутрофили, Т лимфоцити, NK ћелије, макрофаги и дендритске ћелије. Уз то, испитиван је и функционални фенотип Т лимфоцита, NK ћелија, макрофага и дендритских ћелија. Примењена су анти-хумана моноклонска антитела специфична за различите молекуле, обележена различитим флуоресцентним бојама (Табела 3). На 5×10^5 ћелија ресуспендованих у 50µl пуфера за бојење (енгл. Staining Buffer; BD) додата је одговарајућа количина моноклонских антитела примарно обележених различитим флуоресцентним бојама у одређеним комбинацијама. Леукоцити су такође инкубирани и са одговарајућим изотипским контролама (Табела 4). Бојење изотипским контролама помаже нам да разграничимо специфично од неспецифичног бојења. Непосредно након процедуре

бојења ћелије су анализирани на проточном цитометру FACSCaliber (BD) помоћу софтвера (BD). Уколико у даљем тексту није другачије назначено, за цитометријску анализу коришћен је регион (енгл. Gate) мононуклеарних ћелија у FSC/SSC плоту. Регистровано је најмање 10.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу FLOWJO софтвера (TRISTAR) (174-177).

Табела 3. Примарно конјугована моноклонска антитела

	назив	клон	изотип	произвођач
1	FITC anti-human CD19	J4.119	IgG1	Beckman Coulter
2	PE anti-human CD56	N901	IgG1	Beckman Coulter
3	PerCP anti-human CD3	BW264/56	IgG2a κ	Miltenyi Biotec
4	APC anti-human Gal-3	1B4C3	IgG2a κ	BioLegend [®]
5	PerCP anti-human CD4	M-T466	IgG1a κ	Miltenyi Biotec
6	FITC anti-human CD8	B9.11	IgG1	Beckman Coulter
7	APC anti-human Foxp3	236A/E7	IgG1 κ	eBioscience [™]
8	PE anti-human Gal-3	Gal397	IgG1a κ	SONY
9	PE anti-human IFN-γ	B27	IgG1 λ	SONY
10	FITC anti-human CD56	hcd56	IgG1a κ	SONY
11	APC anti-human IL-10	JES3-19F1	IgG2a κ	SONY
12	APC anti-human IL-17	CZ8-23G1	IgG1a κ	Miltenyi Biotec

Табела 4. Изотипске контроле

	назив	клон	изотип	произвођач
1	Alexa Fluor® 488 Hamster Isotype Control	A19-3	IgG1 κ	BD Pharmingen
2	PE Hamster Isotype Control	B81-3	IgG2a κ	BD Pharmingen
3	Alexa Fluor® 488 Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
4	Alexa Fluor® 647 Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
5	FITC Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
6	APC Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
7	PerCP-Cy™5.5 Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
8	FITC Rat Isotype Control	B39-4	IgG1 λ	BD Pharmingen

Интрацелуларно бојење цитокина. Бојење интрацелуларних цитокина изведено је по BD Cytofix/CytoPerm™ методи. Након инкубације са примарно конјугованим антителима за површинске антигене, ћелије су опране у пуферу за бојење (1 ml/епрувети; 300G). Ћелијски талог је ресуспендован у 250µl Cytofix/CytoPerm™ раствора (BD Pharmingen) и инкубиран 20 минута на +4°C. Затим су ћелије опране два пута у Perm/Wash™ пуферу (BD Pharmingen; 1ml/епрувети; 300G) и додата су примарно конјугована моноклонска антитела специфична за цитокине и транскрипциони фактор Foxp3. Користили смо и одговарајуће изотипске контроле.

3.4. Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима серумске концентрације про-инфламацијског цитокина TNF-α, публикованих у студији сличног дизајна (178). Студијски узорак је израчунат узимајући α као 0.05 и снагу студије од 0.8 за *Student's t* тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. С обзиром да је за вредности серумске концентрације TNF-α нађена најмања разлика између група пацијената са различитим хистолошким стадијумом болести, ова вредност је коришћена за израчунавање величине узорка. Разлика у

вредностима серумске концентрације TNF- α међу групама износила је 35.07 pg/ml, а стандардна девијација 20.14 и утврђени број узорака према групама износи 15 за сваку од група.

3.5. Статистичка обрада података

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, прво је испитвана правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који тест користимо за ту проверу). За поређење средњих вредности променљиве двеју популација користили смо параметарски *Student's t* тест, уколико су вредности имале правилну расподелу, док се неправилна расподела поредила коришћењем непараметарског *Mann-Whitney* теста. Испитивање зависности две описне променљиве испитивана је помоћу χ^2 и *Fisher*-овог теста. Испитивање утицаја више променљивих на бинарну променљиву помоћу мултиваријанте бинарне логистичке регресије. Резултати експеримента су изражавани као вредност \pm стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.01$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Карактеристике испитаника

У студију је укључено 89 болесника са улцерозним колитисом. Демографске и клиничке карактеристике ових болесника представљене су у Табели 5. Није нађена статистички значајна разлика у полној дистрибуцији. Сви болесници су били старости од 21-80 година. Нема значајне разлике у дистрибуцији локализације болести нити присуства екстраинтестиналних манифестација (масна метаморфоза јетре, примарни склерозирајући холангитис, холелитијаза, коштано- зглобне промене, хематопоезне промене, афтозни стоматитис, промене на уропоетском систему, очне промене и кожне промене).

Табела 5. Демографски подаци и клиничке карактеристике

	Број
Пол (мушки/женски)	52/37
Старост (средња вредност [ранг])	50 [21-80] године
Локализација (Р/ЛК/РЕК)	13/51/25
Екстраинтестиналне манифестације (+/-)	34/55
Стеатоза јетре (0/И/II/III)	7/51/26/5

Напомена: Р: проктитис; ЛК: левострани колитис; РЕК: проширени екстензивни колитис.

Анализа обухвата 89 испитаника са улцерозним колитисом. Није нађена статистички значајна разлика у полу, локализацији болести, присуству екстраинтестиналним манифестација. ($p > 0,05$). Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

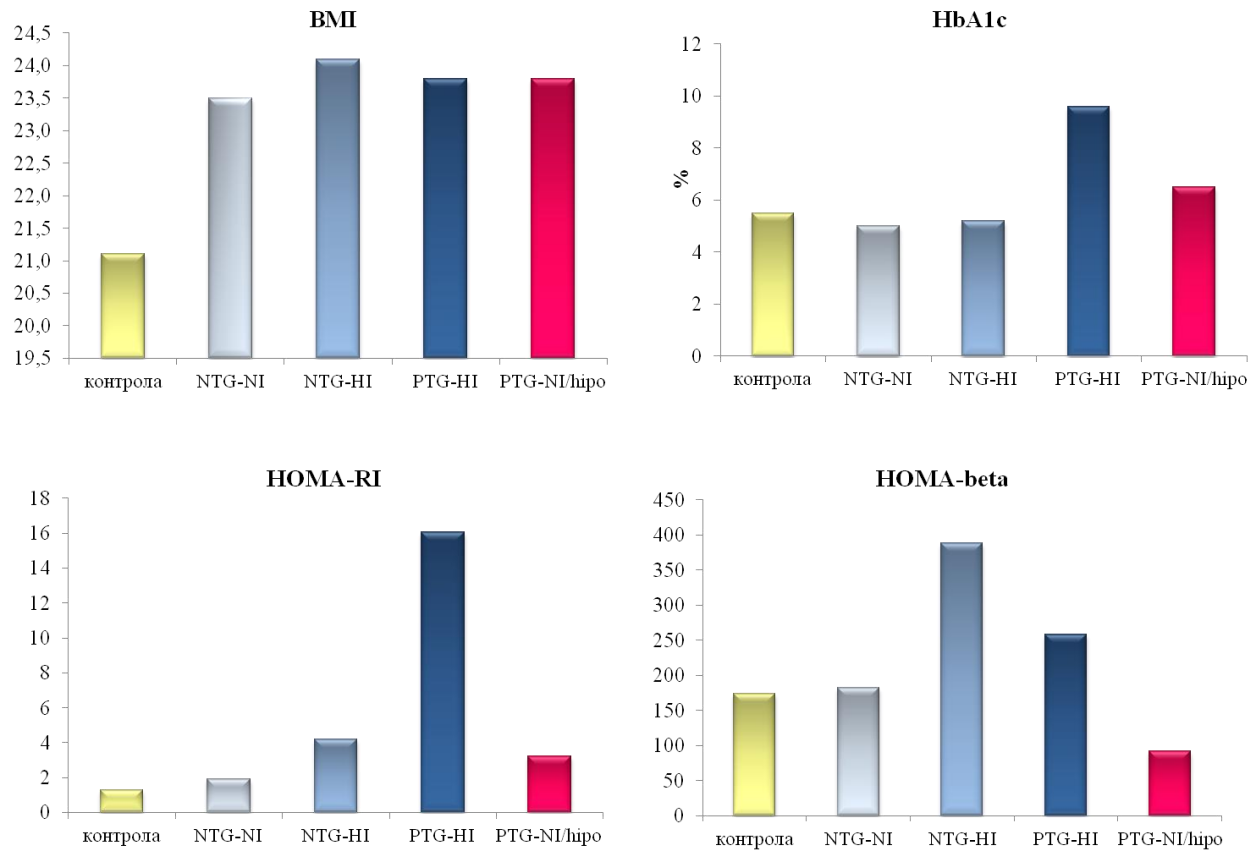
4.2. Фазе метаболичког синдрома код болесника са улцерозним колитисом

Испитивани болесници са улцерозним колитисом су на основу постојања критеријума АТР III за дијагнозу метаболичког синдрома подељени у две групе: контролну (без метаболичког синдрома) и групу са метаболичким синдромом (179). Према овим критеријумима, за дијагнозу метаболичког синдрома неопходно је да оболели имају најмање 3 од 5 наведених поремећаја: дисгликемија (гликемија наштину већа од 5,5mM или активно лечење), артеријска хипертензија (артеријска тензија већа од 130/85mmHg или активно лечење), централни тип гојазности, низак HDL холестерол или повишени

триглицериди. У циљу анализе утицаја развојних фаза метаболичког синдрома на испитиване параметре, испитаници којима је постављена дијагноза метаболичког синдрома су надаље, на основу кретања гликемије и инсулинемије током ОГТТ-а, подељени у 4 подгрупе које кореспондирају са развојним фазама овог синдрома:

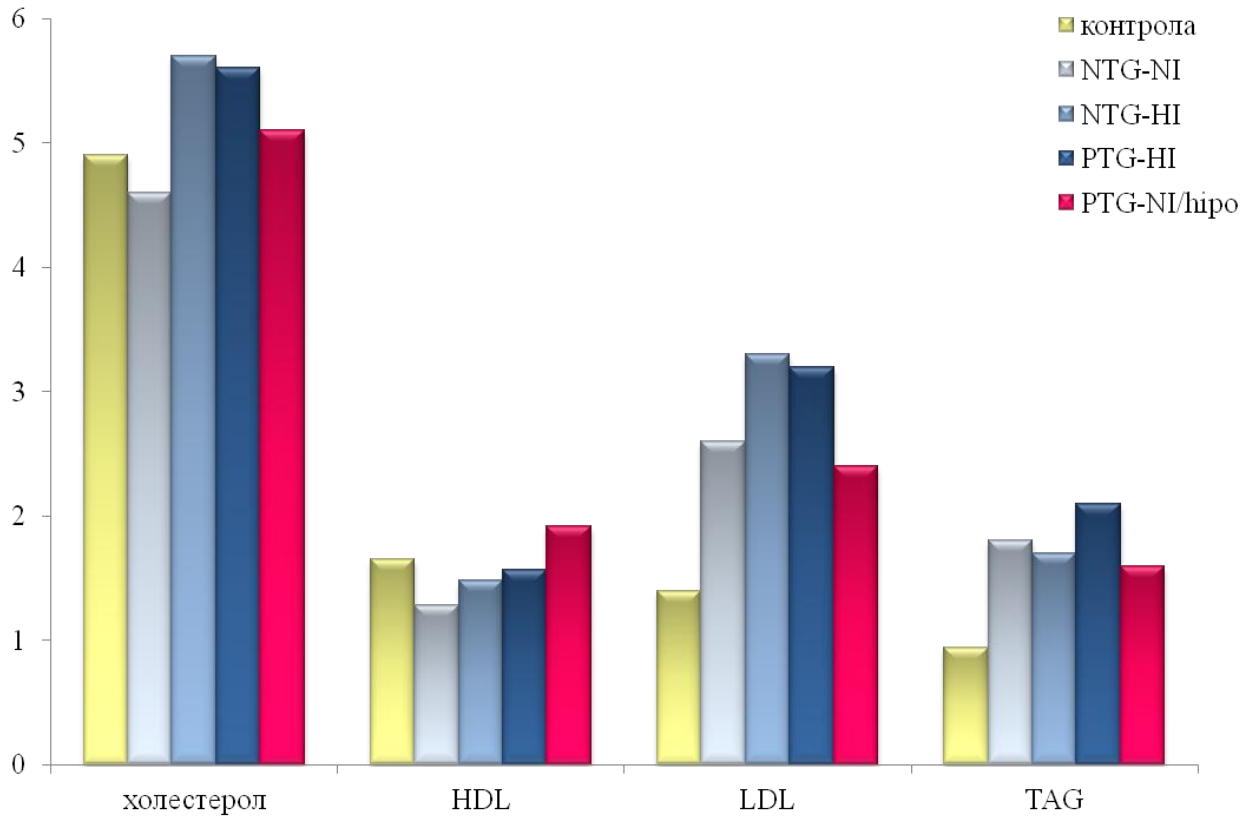
- I. нормална толеранција гликозе и нормоинсулинемија (NTG-NI),
- II. нормална толеранција гликозе и хиперинсулинемија (NTG-HI),
- III. патолошка толеранција гликозе и хиперинсулинемија (PTG-HI) и
- IV. патолошка толеранција гликозе и нормо/хипоинсулинемија (PTG-NI/Hipo).

Нормалном толеранцијом гликозе сматрана је гликемија наштину мања од 6,1 mM и у 120min ОГТТ-а мања од 7,8mM, док вредности гликемије изнад ових су сматране патолошком толеранцијом гликозе (укључују поремећај толеранције гликозе који се дефинише као: повишена гликемија наштину, интолеранција гликозе и *diabetes mellitus*). Нормоинсулинемијом је сматрана инсулинемија у 0 мин ОГТТ-а у опсегу референтних вредности, а у 120 мин нижа од двоструке горње границе референтних вредности. Пораст инсулинемије било у 0мин или 120 мин изнад ових вредности сматран је хиперинсулинемијом (180).



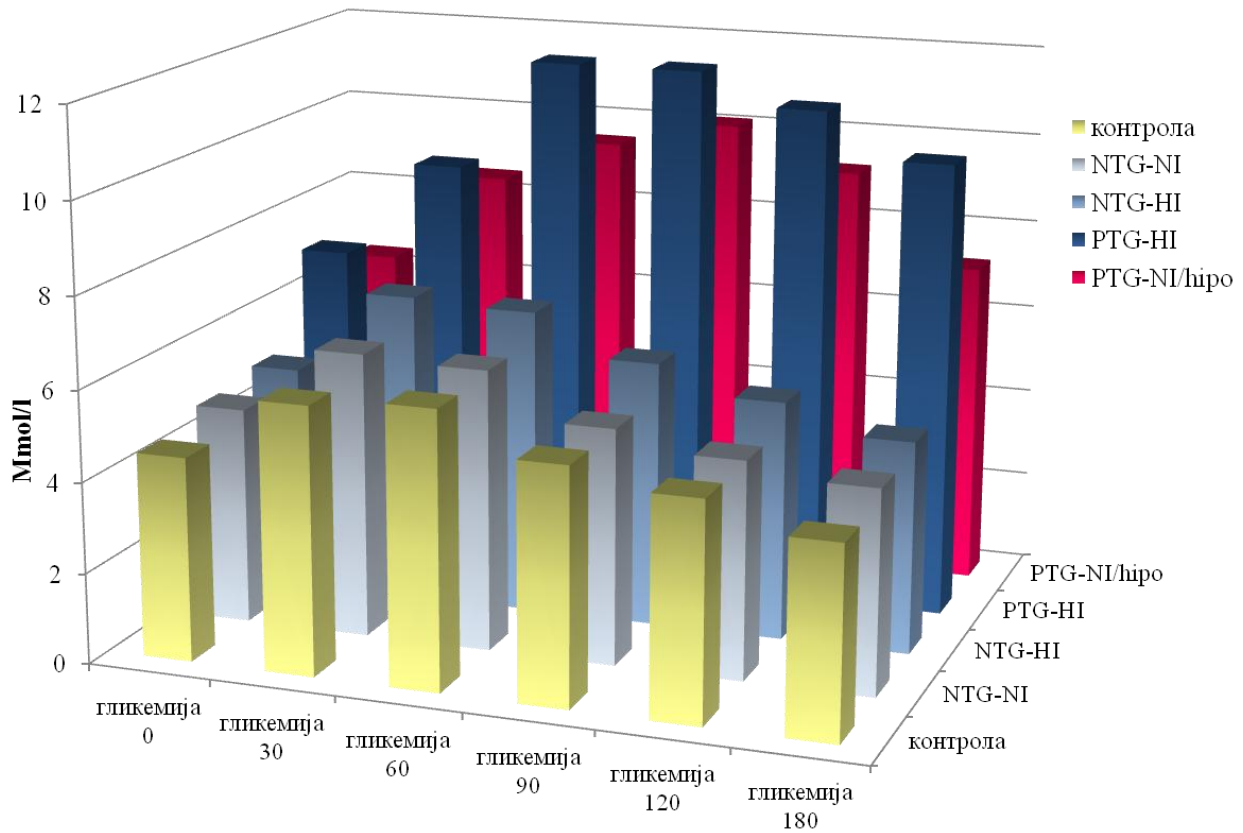
Фигура 5. Вредности BMI, HbA1c, HOMA-RI и HOMA-beta индекса у различитим фазама метаболичког синдрома. I фаза 1: NG-NI; II фаза NTG-HI; III фаза: PTG-HI; IV фаза: PTH-NI/hipo.

Испитивање метаболичких параметара обухватило је анализу гликемија и инсулинемија у 0, 30, 60, 90 и 120мин OGTT-а, HOMA-RI и HOMA-beta, HbA1c, липидног статуса (укупни, HDL- и LDL-холестерол и trigliceridi) и BMI (Фигуре 5 и 6). У зависности од нормалности расподеле унутар испитиваних група, статистичка анализа је обављена једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) или непараметријским Kruskal-Wallis-овим тестом.



Фигура 6. Вредности холестерола, HDL, LDL и TAG у различитом фазама метаболичког синдрома. I фаза 1: NG-NI; II фаза NTG-HI; III фаза: PTG-HI; IV фаза: PTH-NI/hipo.

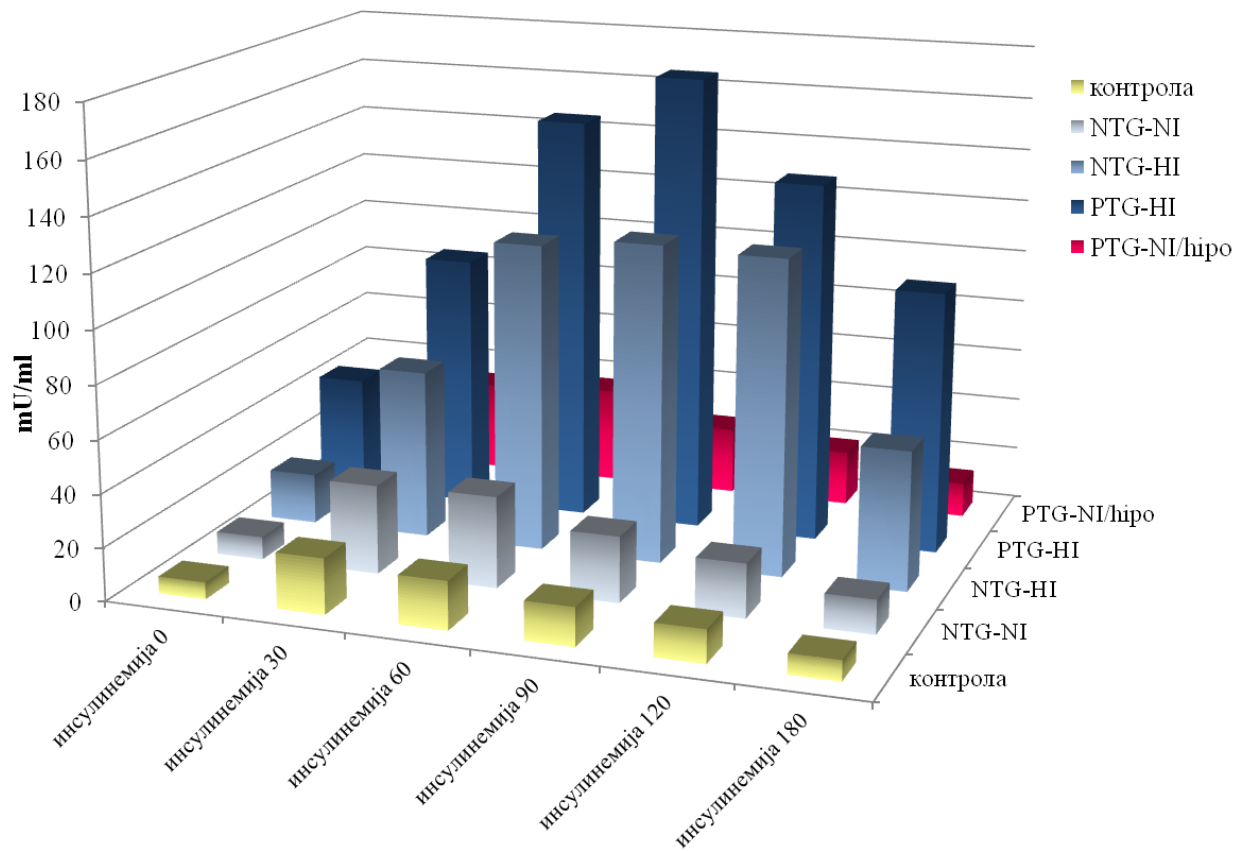
Између испитиваних група Kruskal-Wallis-овим тестом регистроване су статистички значајне разлике у вредностима гликемије у свим испитиваним временима током OGTT-а: 0 мин ($\chi=31,06$, $p<0,001$), 30 мин ($\chi=27,49$, $p<0,001$), 60 мин ($\chi=41,66$, $p<0,001$), 90 мин ($\chi=41,19$, $p<0,001$), 120 мин ($\chi=57,35$, $p<0,001$) и 180 мин ($\chi=37,91$, $p<0,001$). У базалним условима, најнижу вредност гликемије су имали пацијенти из контролне групе ($4,5\pm 0,9$ mM), а анализа међугрупних разлика је показала да је та вредност била статистички нижа у односу на групу са PTG-HI (III фаза; $7,1\pm 1,9$ mM, $p<0,001$) и групу са PTG-NI/hipo (IV фаза; $6,4\pm 1,5$ mM, $p<0,001$). Прва следећа анализа вредности гликемија је рађена у 30 мин OGTT-а, а анализа разлика између испитиваних група је показала да су средње вредности биле највише у групи са PTG-HI (III фаза; $9,3\pm 2,1$ mM), што је било статистички значајно више у односу како на контролну групу ($5,9\pm 1,7$ mM, $p<0,001$), тако и у односу на групе NTG-NI (I фаза; $6,3\pm 1,7$ mM, $p<0,001$) и NTG-HI (II фаза, $6,9\pm 1,4$ mM, $p=0,001$) (Фигура 7).



Фигура 7. Кретање гликемије током ОГТТ-а. Применом Kruskal-Wallis-ovog теста поређено је кретање гликемија током ОГТТ-а између четири групе пацијената који одговарају развојним фазама метаболичког синдрома (I-IV) и контролне групе без метаболичког синдрома. У свим испитиваним временима ОГТТ-а забележена је статистички високо значајна разлика ($p < 0,001$).

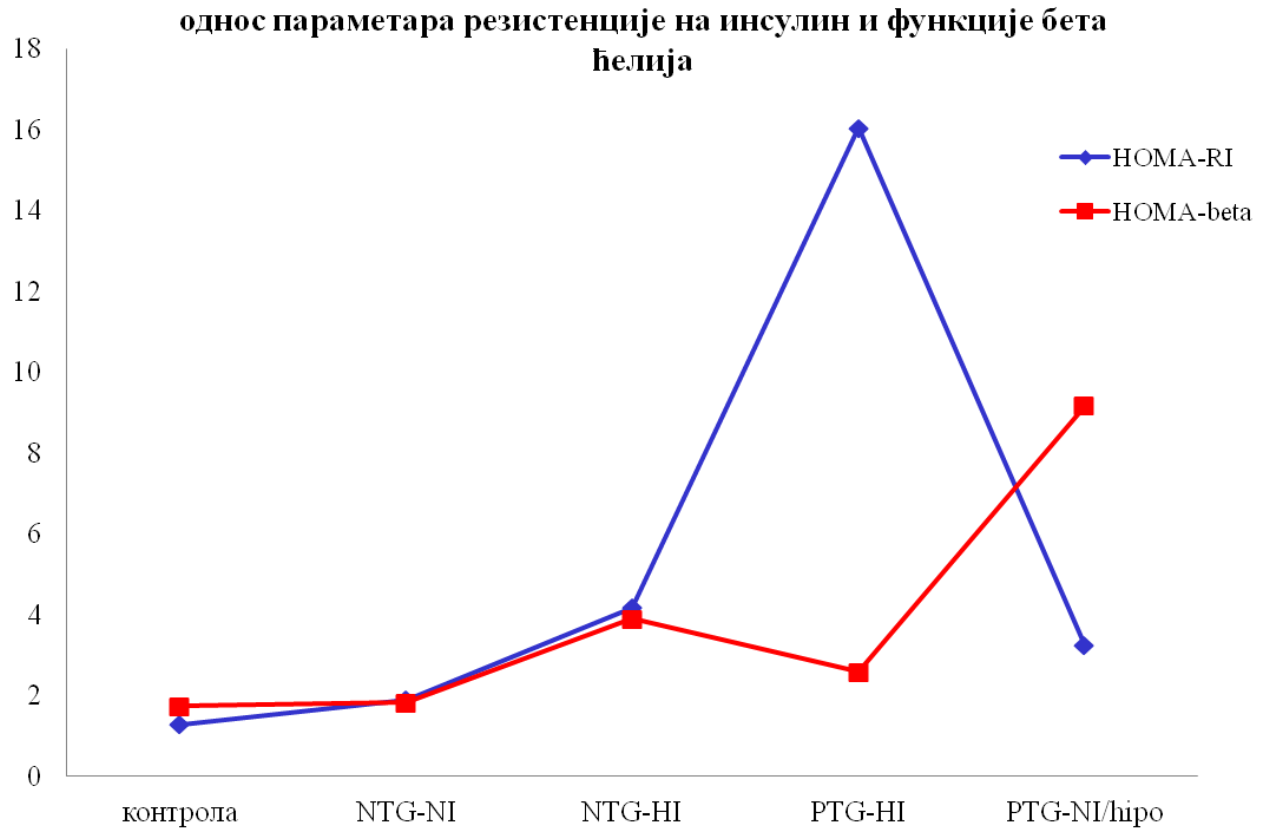
Просечне вредности гликемије су достигле највише вредности у 60 мин ОГТТ-а, при чему најнижа средња вредност гликемије забележена у контролној групи ($6,2 \pm 1,6$ mM), а поређење између група је показало да је та вредност била статистички сигнификантно нижа у односу на групу PTG-HI (III фаза; $11,8 \pm 2,9$ mM, $p < 0,001$) и групу PTG-NI/Hipo (IV фаза; $9,5 \pm 2,4$ mM, $p < 0,001$), али постоји и статистички значајна разлика између група PTG-HI (III фаза) и PTG-NI/Hipo (IV фаза; $p = 0,037$). Овакав тренд је настављен и у 90 мин оралног теста оптерећења гликозом, тако да су средње вредности биле највише у групи

са PTG-НI (III фаза; $11,8 \pm 3,0$ mM), што је било статистички значајно више у односу како на контролну групу ($5,2 \pm 1,0$ mM, $p < 0,001$), тако и у односу на групе NTG-НI (I фаза; $5,2 \pm 1,1$ mM, $p < 0,001$) и NTG-НI (II фаза; $5,9 \pm 1,0$ mM, $p < 0,001$). Гликемија у 120мин ОГТТ-а представља другу референтну тачку за процену квалитета гликорегулације, најнижа средња вредност је забележена у контролној групи ($4,8 \pm 1,0$ mM), а поређење између група је показало да је та вредност била статистички сигнификантно нижа у односу на групу PTG-НI (III фаза; $11,1 \pm 2,6$ mM, $p < 0,001$) и групу PTG-НI/Ниро (IV фаза; $9,2 \pm 2,5$ mM, $p < 0,001$), али постоји и статистички значајна разлика између група PTG-НI и PTG-НI/Ниро (IV фаза; $p = 0,034$). Гликемија је праћена до 180мин ОГТТ-а, а анализа разлика између испитиваних група је показала да су средње вредности биле највише у групи са PTG-НI (III фаза; $10,1 \pm 3,4$ mM), што је било статистички значајно више у односу како на контролну групу ($4,2 \pm 0,9$ mM, $p < 0,001$), тако и у односу на групе NTG-НI (I фаза; $4,5 \pm 0,8$ mM, $p < 0,001$), NTG-НI (II фаза; $4,7 \pm 0,8$ mM, $p < 0,001$), као и PTG-НI/Ниро (IV фаза, $7,2 \pm 2,4$ mM, $p = 0,005$).



Фигура 8. Кретање инсулинемије током OGTT-а. Применом Kruskal-Wallis-ovog теста поређено је кретање инсулинемије током OGTT-а између четири групе пацијената који одговарају развојним фазама метаболичког синдрома (I-IV) и контролне групе без метаболичког синдрома. У свим испитиваним временима OGTT-а забележена је статистички високо значајна разлика ($p < 0,001$).

Забележен је готово исти тренд „кретања“ инсулинемије током OGTT теста као и код гликемије (Фигура 8).



Фигура 9. Однос параметара резистенције на инсулин и функције бета ћелија.

4.3. Утицај метаболичког синдрома на тежину улцерозног колитиса, локални и системски имунски одговор

Сви испитаници са улцерозним колитисом су подељени на две групе, на основу критеријума АТР III за дијагнозу метаболичког синдрома:

- 1) контролну (без метаболичког синдрома) и
- 2) групу са метаболичким синдромом

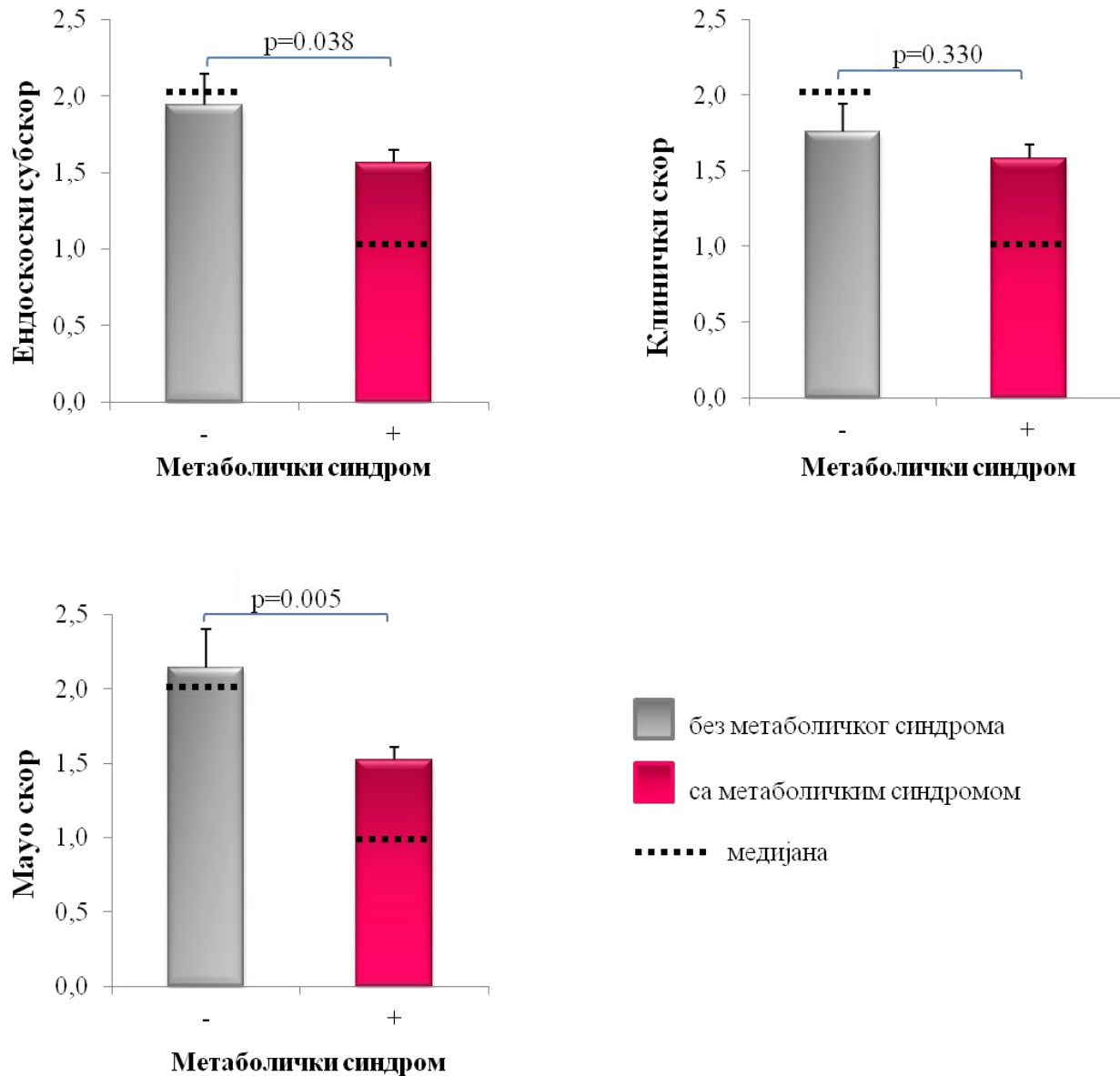
Испитаници са метаболичким синдромом имају блажу форму улцерозног колитиса

Анализирана је повезаност метаболичког синдрома са клиничким карактеристикама улцерозног колитиса (Табела 6). Показано је да оболели од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом имају значајно мање вредности ендоскопског субскора ($p=0.038$) и Мауо скова ($p=0.005$) (Фигура 10). Мања је и вредност клиничког скова у оболелих са метаболичким синдромом, али ова разлика није достигла статистичку значајност (Табела 6).

Табела 6. Клинички параметри улцерозног колитиса у односу на метаболички синдром

	1	2	3	<i>p</i>
Ендоскопски субскор				
Без метаболичког синдрома	6	6	5	0.038
Метаболички синдром	41	22	9	
Клинички скор				
Без метаболичког синдрома	7	7	3	0.330
Метаболички синдром	42	19	11	
Мауо скор				
Без метаболичког синдрома	6	6	5	0.005
Метаболички синдром	43	19	9	

Анализа обухвата 89 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома ($n=17$), са метаболичким синдромом ($n=72$). Анализиране су вредности клиничких скорова болести и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.



Фигура 10. Клинички параметри улцерозног колитиса у односу на метаболички синдром. Анализа обухвата 89 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома (n=17), са метаболичким синдромом (n=72). Анализиране су вредности клиничких скорова болести и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна грешка/медијана.

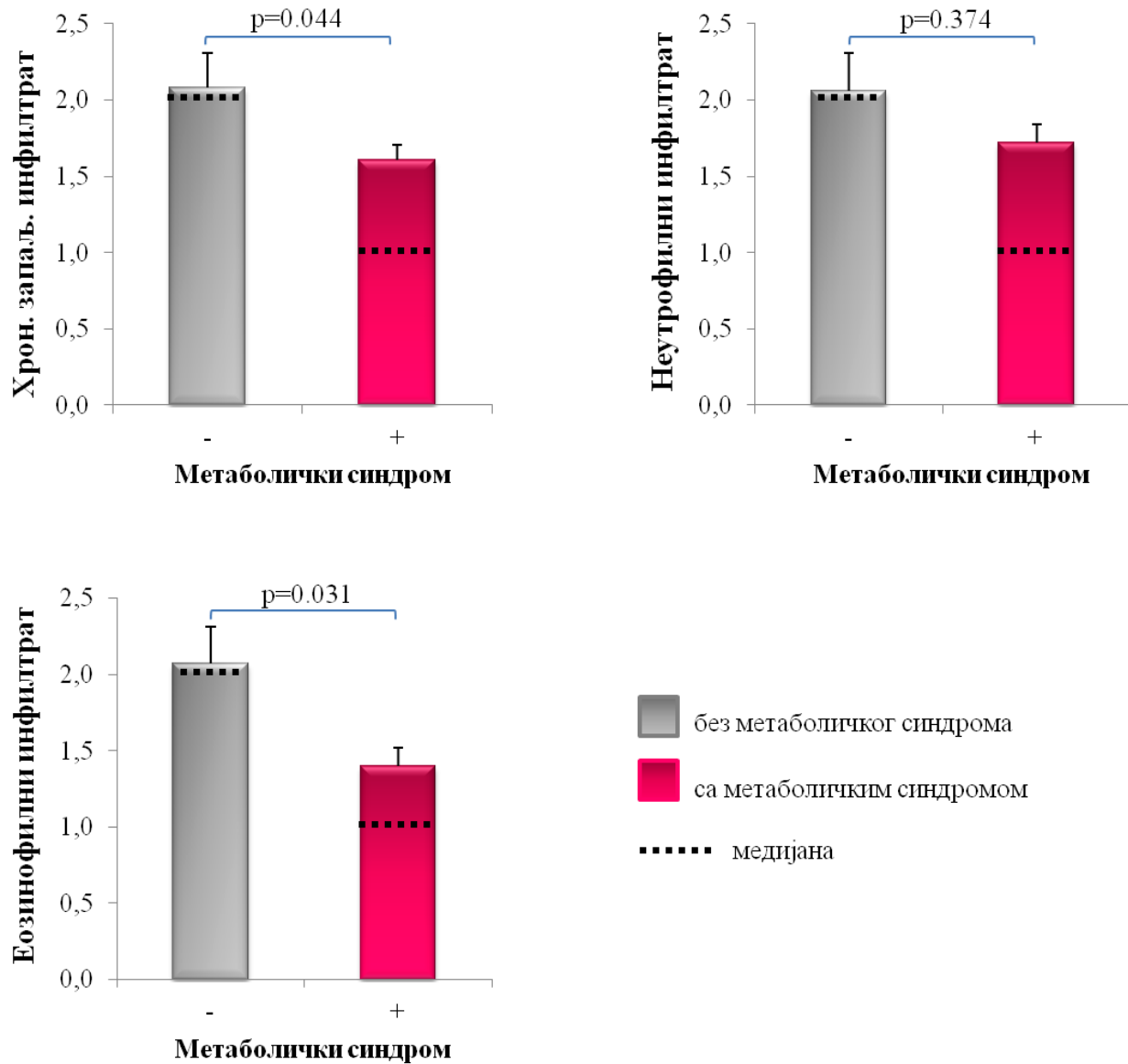
Затим је анализирана повезаност метаболичког синдрома са патохистолошким карактеристикама улцерозног колитиса (Табела 7). Обојели од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом имају значајно мање изражен хронични запаљенски инфилтрат

($p=0.044$) и еозинофилни инфилтрат ($p=0.031$) (Фигура 11). Мање је и вредности осталих патохистолошких параметара тежине болести у оболелих са метаболичким синдромом, али ове разлике нису достигле статистичку значајност (Табела 7).

Табела 7. Патохистолошки параметри улцерозног колитиса у односу на метаболички синдром

	0	1	2	3	4	<i>p</i>
Структурне промене						
Без метаболичког синдрома		7	4	6		0.453
Метаболички синдром		36	20	16		
Хрон. зап. инфилтрат						
Без метаболичког синдрома		8	5	4		0.044
Метаболички синдром		43	13	16		
Неутрофилна инфилтрација						
Без метаболичког синдрома	1	5	3	8		0.374
Метаболички синдром	6	32	11	23		
Еозинофилна инфилтрација						
Без метаболичког синдрома	2	6	3	6		0.031
Метаболички синдром	16	24	19	13		
Деструкција крипти						
Без метаболичког синдрома	3	6	2	6		0.698
Метаболички синдром	3	38	13	18		
Ерозија слузнице						
Без метаболичког синдрома	3	5	3	0	6	0.512
Метаболички синдром	20	20	8	14	10	

Анализа обухвата 89 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома ($n=17$), са метаболичким синдромом ($n=72$). Анализиране су вредности патохистолошких скорова болести и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.



Фигура 11. Патохистолошки параметри улцерозног колитиса у односу на метаболички синдром. Анализа обухвата 89 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома (n=17), са метаболичким синдромом (n=72). Анализиране су вредности патохистолошких скорова болести и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна грешка/медијана.

Испитаници са метаболичким синдромом имају измењен системски и локални имунски одговор

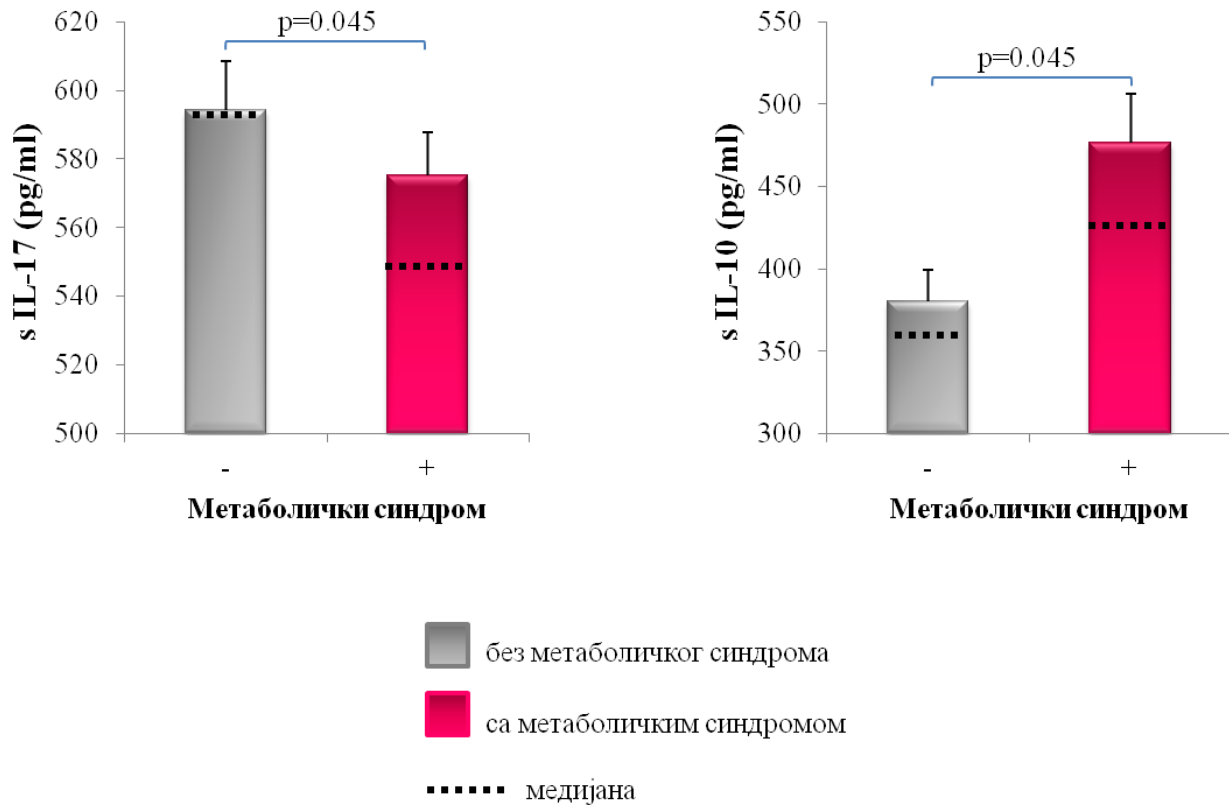
У наставку истраживања, одређивали смо серумске и фецесне концентрације биомаркера TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, IL-33, sST2, TGF- β , CXCL11, CXCL8, Gal-1 и Gal-3 (Табела 8). Испитивали смо да ли и како метаболички синдром индукује селективне промене у концентрацијама наведених медијатора код оболелих од улцерозног колитиса. Није нађена статистички значајна разлика у системским и фецесним вредностима цитокина IL-23 и IL-33 (резултати нису приказани).

Табела 8. Концентрација испитиваних биомаркера у *серуму* болесника са улцерозним колитисом у односу на метаболички синдром

	Болесници са улцерозним колитисом		<i>p</i>
Серумске вредности (pg/ml)	без метаболичког синдрома	метаболички синдром	
IL-6	566,14 \pm 23,33/549,71	587,50 \pm 24,68/534,71	0.874
IL-17	594,37 \pm 14,02/594,50	575,17 \pm 12,68/552,00	0.045
IL-10	380,50 \pm 19,14/359,00	476,34 \pm 30,08/411,00	0.045
CXCL11	242,70 \pm 9,51/240,17	413,29 \pm 85,30/244,50	0.517
CXCL8	90,40 \pm 31,73/79,50	121,88 \pm 25,26/63,00	0.909
sST2	686,35 \pm 82,34/643,75	713,71 \pm 49,99/643,75	0.526
Gal-3	1434,2 \pm 255,7/1122,0	933,0 \pm 84,1/892,0	0.338
Gal-1	1037,0 \pm 80,0/954,0	1181,4 \pm 110,7/918,0	0.538
TNF- α	403,67 \pm 26,81/383,67	412,41 \pm 18,45/382,33	0.542
Kinurenin (mol/l)	0,89 \pm 0,16/0,81	1,16 \pm 0,31/0,29	0.800

Анализа обухвата 84 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома (n=15), са метаболичким синдромом (n=69). Анализиране су серумске концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.

Оболели са метаболичким синдромом имају значајно мање системске вредности проинфламацијског циткина IL-17 ($p=0.045$; Фигура 12), док су вредности имunosупресивног IL-10 значајно веће ($p=0.045$; Фигура 12).



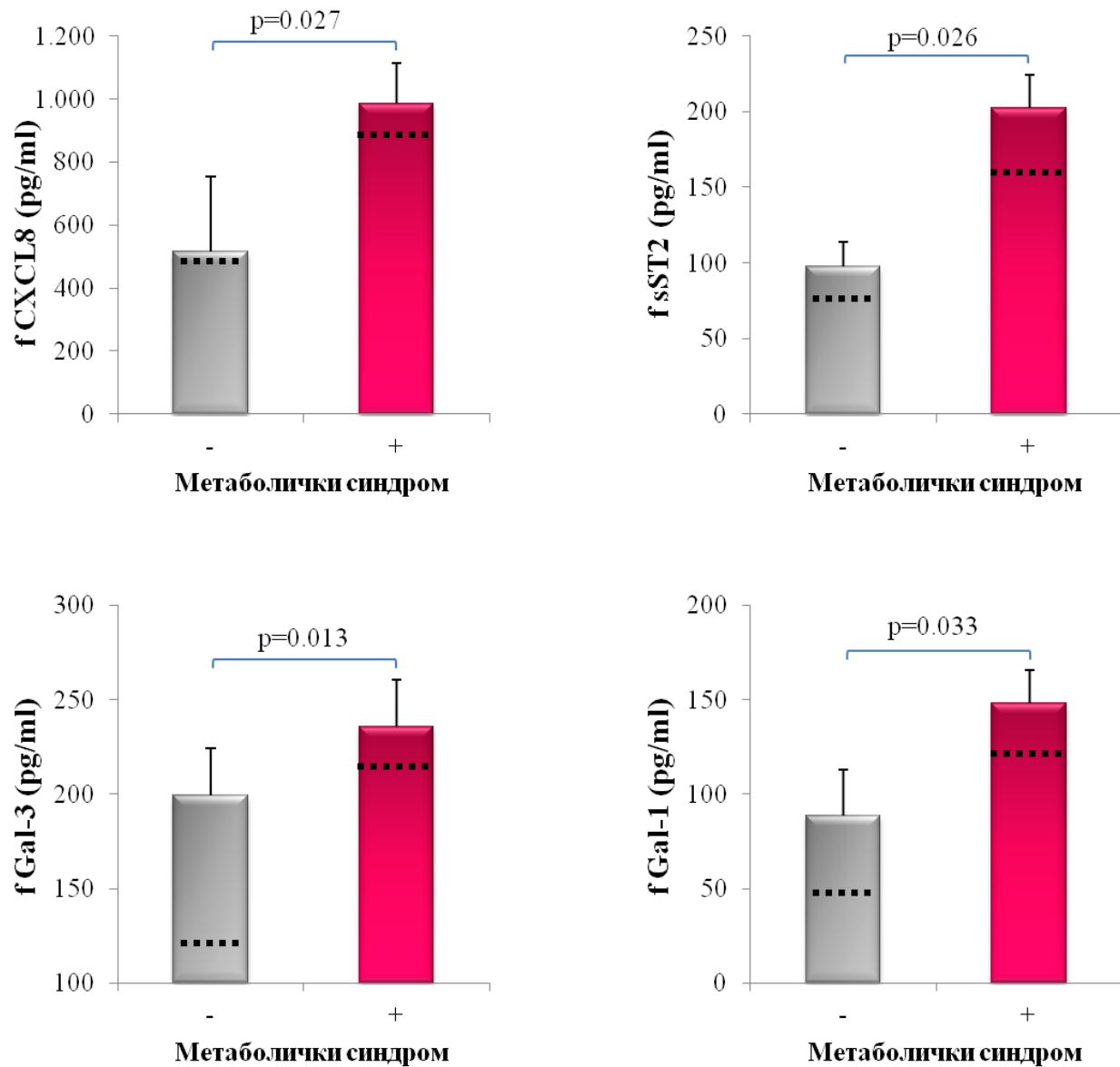
Фигура 12. Концентрација IL-17 и IL10 у *серуму* болесника са улцерозним колитисом у односу на метаболички синдром. Анализа обухвата 84 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома (n=15), са метаболичким синдромом (n=69). Анализиране су серумске концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.

Анализом концентрација испитиваних биомаркера у узорцима столице показано је да оболели са метаболичким синдромом имају значајно веће фецесне вредности CXCL8 ($p=0.027$), sST2 ($p=0.026$), Gal-3 ($p=0.013$) и Gal-1 ($p=0.033$; Фигура 13). За остале испитиване маркере није нађена значајна разлика између дефинисаних група (Табела 9).

Табела 9. Концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са улцерозним колитисом у односу на метаболички синдром

Фецесне вредности (pg/ml)	Болесници са улцерозним колитисом		<i>p</i>
	без метаболичког синдрома	метаболички синдром	
IL-6	240,48±44,24/188,81	294,59±28,07/226,63	0.674
IL-17	430,72±86,26/326,88	507,95±49,82/375,06	0.833
IL-10	1365,59±188,62/1261,23	1655,43±170,75/1295,31	0.950
CXCL11	373,46±65,35/336,27	399,36±38,86/321,16	0.599
CXCL8	515,79±238,12/517,09	985,78±128,91/839,28	0.027
sST2	97,27±16,53/73,17	202,11±22,11/157,23	0.026
Gal-3	199,18±24,93/127,85	235,72±25,01/216,67	0.013
Gal-1	88,7±24,01/49,16	147,95±17,57/113,45	0.033
TNF- α	350,65±57,78/280,56	420,17±41,23/317,90	0.900
Kinurenin (mol/l)	20,27±4,35/16,46	17,60±2,50/15,58	0.537

Анализа обухвата 84 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома ($n=15$), са метаболичким синдромом ($n=69$). Анализиране су фецесне концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Манн-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.



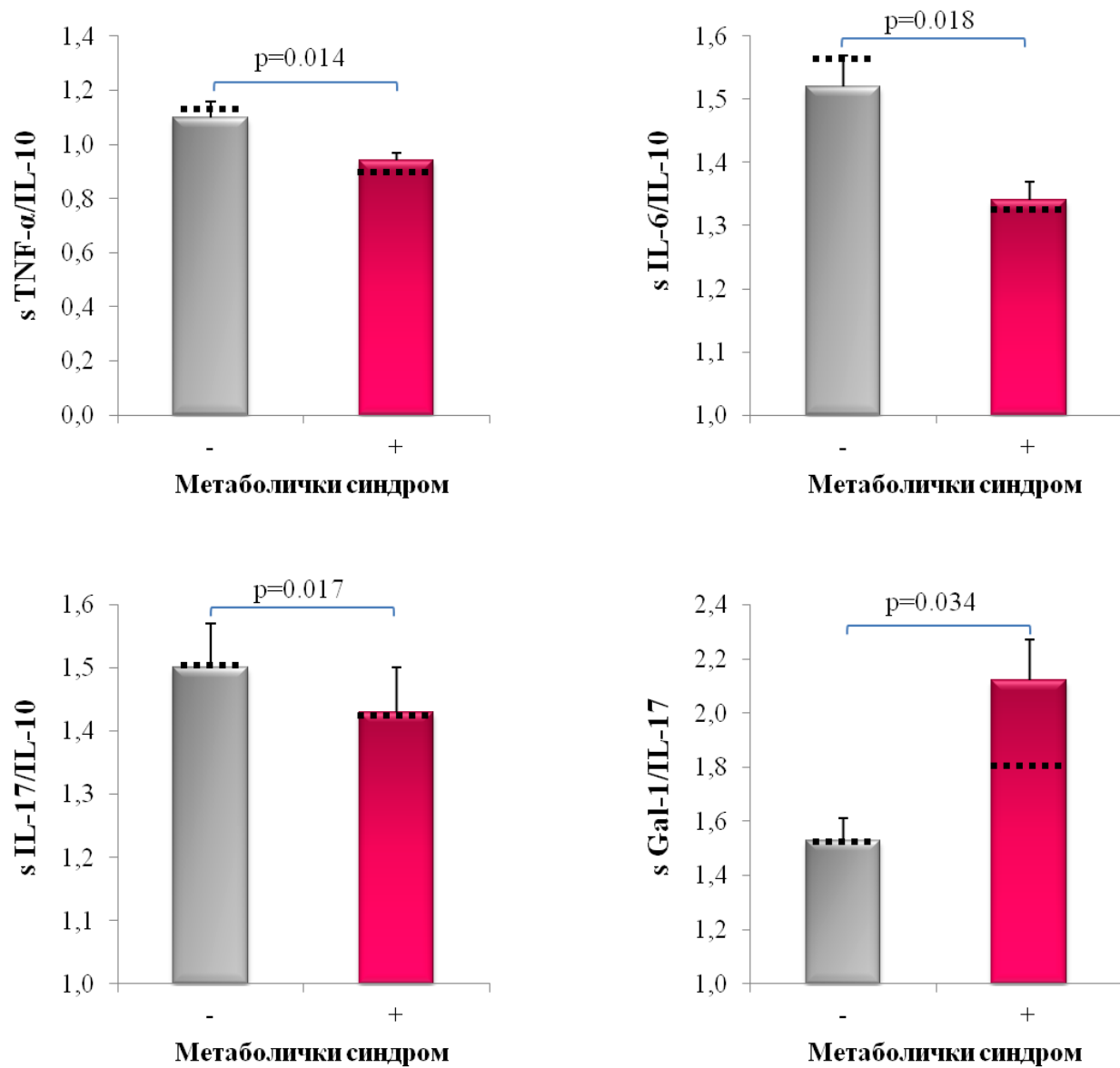
Фигура 13. Концентрација CXCL8, sST2, Gal-3 и Gal-1 у фецесу болесника са улцерозним колитисом у односу на метаболички синдром. Анализа обухвата 84 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома (n=15), са метаболичким синдромом (n=69). Анализиране су фецесне концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна грешка/медијана.

Сматра се да однос контррегулаторних цитокина може да представља релевантан показатељ обољења. Стога смо у наставку истраживања анализирали међусобне односе испитиваних биомаркера. Уочена је значајна разлика у односу серумских вредности проинфламацијских цитокина и имunosупресивног IL-10 (Табела 10). Односи TNF- α /IL-10 ($p=0.014$), IL-6/IL-10 ($p=0.018$) и IL-17/IL-10 ($p=0.017$) значајно су мањи у групи болесника са метаболичким синдромом, док је однос Gal-1/IL-17 значајно већи у истој групи ($p=0.034$; Фигура 14).

Табела 10. Односи концентрација испитиваних биомаркера у *серуму* болесника са улцерозним колитисом у односу на метаболички синдром

Серумске вредности (pg/ml)	Болесници са улцерозним колитисом		<i>p</i>
	без метаболичког синдрома	метаболички синдром	
TNF-α/IL-10	1,10 \pm 0,06/1,10	0,94 \pm 0,03/0,92	0.014
IL-6/IL-10	1,52 \pm 0,05/1,58	1,34 \pm 0,03/1,33	0.018
IL-17/IL-10	1,50 \pm 0,07/1,51	1,43 \pm 0,07/1,48	0.017
Gal-1/TNF- α	2,58 \pm 0,14/2,48	3,06 \pm 0,51/2,38	0.746
Gal-1/IL-6	1,89 \pm 0,15/1,84	2,16 \pm 0,34/1,74	0.625
Gal-1/IL-17	1,53 \pm 0,08/1,53	2,12 \pm 0,15/1,73	0.034
Gal-3/TNF- α	3,88 \pm 0,93/2,76	2,95 \pm 0,36/2,68	0.351
Gal-3/IL-17	2,61 \pm 0,48/1,94	2,03 \pm 0,22/1,84	0.596
Gal-3/CXCL8	44,08 \pm 27,25/11,91	17,88 \pm 13,43/12,96	0.918
Gal-3/CXCL11	6,26 \pm 1,27/4,67	4,39 \pm 0,57/3,89	0.157
sST2/IL-10	1,88 \pm 0,23/1,67	1,91 \pm 0,22/1,73	0.914

Анализа обухвата 84 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома ($n=15$), са метаболичким синдромом ($n=69$). Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређени између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.



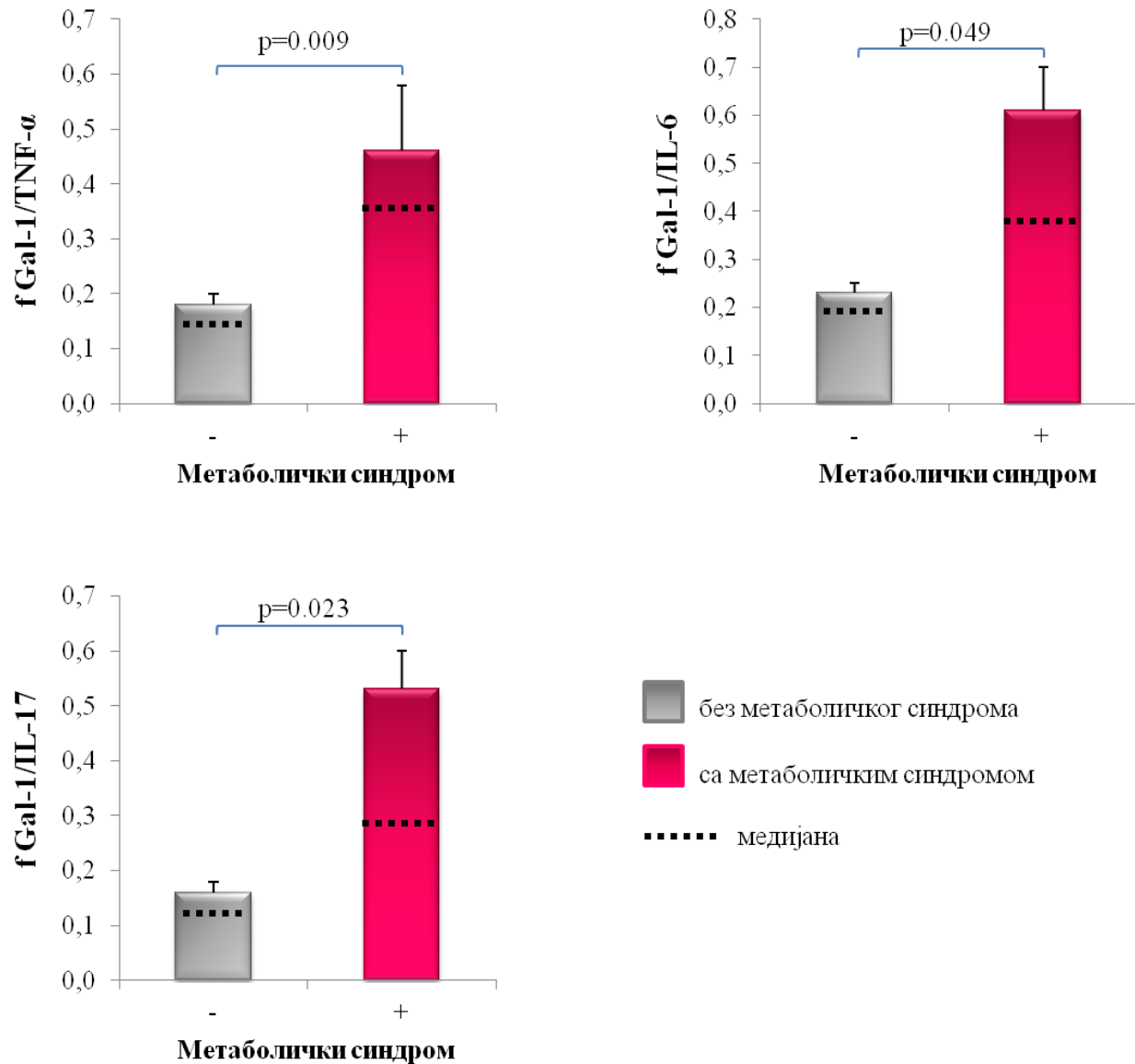
Фигура 14. Односи концентрација *TNF- α /IL-10*, *IL-6/IL-10*, *IL-17/IL-10* и *Gal-1/IL-17* у серуму болесника са улцерозним колитисом у односу на метаболички синдром. Анализа обухвата 84 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома (n=15), са метаболичким синдромом (n=69). Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређени између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.

Испитивање односа истих биомаркера у фецесу (Табела 11) показало је значајно веће вредности количника Gal-1/TNF- α ($p=0.009$), Gal-1/IL-6 ($p=0.049$) и Gal-1/IL-17 ($p=0.023$) у болесника са метаболичким синдромом (Фигура 15). Такође, забележене су и веће вредности односа Gal-3/TNF- α ($p=0.039$) и Gal-3/IL-17 ($p=0.029$) у фецесу истих испитаника (Фигура 16). Ови резултати указују на преминацију Gal-1 и Gal-3 над проинфламацијским цитокинима у фецесу оболелих од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом.

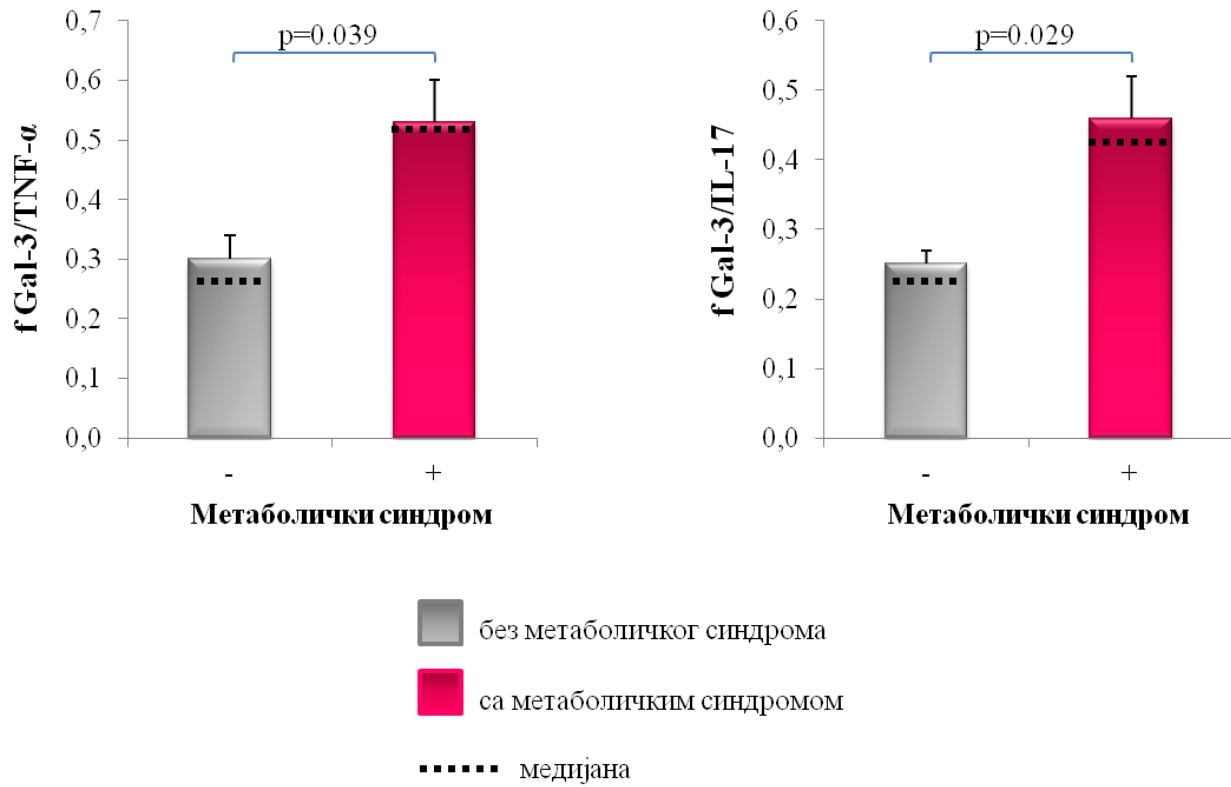
Табела 11. Односи концентрација испитиваних биомаркера у **фецесу** болесника са улцерозним колитисом у односу на метаболички синдром

Фецесне вредности (pg/ml)	Болесници са улцерозним колитисом		<i>p</i>
	без метаболичког синдрома	метаболички синдром	
TNF- α /IL-10	0,28 \pm 0,04/0,25	0,27 \pm 0,01/0,26	0.377
IL-6/IL-10	0,18 \pm 0,02/0,14	0,19 \pm 0,01/0,19	0.283
IL-17/IL-10	0,32 \pm 0,04/0,28	0,32 \pm 0,01/0,32	0.970
Gal-1/TNF-α	0,18 \pm 0,02/0,15	0,46 \pm 0,12/0,34	0.009
Gal-1/IL-6	0,23 \pm 0,02/0,20	0,61 \pm 0,09/0,36	0.049
Gal-1/IL-17	0,16 \pm 0,02/0,12	0,39 \pm 0,05/0,26	0.023
Gal-3/TNF-α	0,30 \pm 0,04/0,27	0,53 \pm 0,07/0,51	0.039
Gal-3/IL-17	0,25 \pm 0,02/0,23	0,46 \pm 0,06/0,41	0.029
Gal-3/CXCL8	1,78 \pm 0,70/1,18	0,59 \pm 0,21/0,18	0.067
Gal-3/CXCL11	1,14 \pm 0,32/0,74	0,82 \pm 0,11/0,67	0.181
sST2/IL-10	0,08 \pm 0,02/0,06	0,14 \pm 0,01/0,13	0.542

Анализа обухвата 84 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома ($n=15$), са метаболичким синдромом ($n=69$). Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређени између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.



Фигура 15. Односи концентрација галектина 1 и проинфламацијских цитокина *TNF-α*, *IL-6* и *IL-17* у фецесу болесника са улцерозним колитисом, у односу на метаболички синдром. Анализа обухвата 84 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома (n=15), са метаболичким синдромом (n=69). Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређени између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна грешка/медијана.



Фигура 16. Односи концентрација галектина 3 и проинфламацијских цитокина *TNF- α* и *IL-17* у фецесу болесника са улцерозним колитисом, у односу на метаболички синдром. Анализа обухвата 84 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома (n=15), са метаболичким синдромом (n=69). Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређени између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.

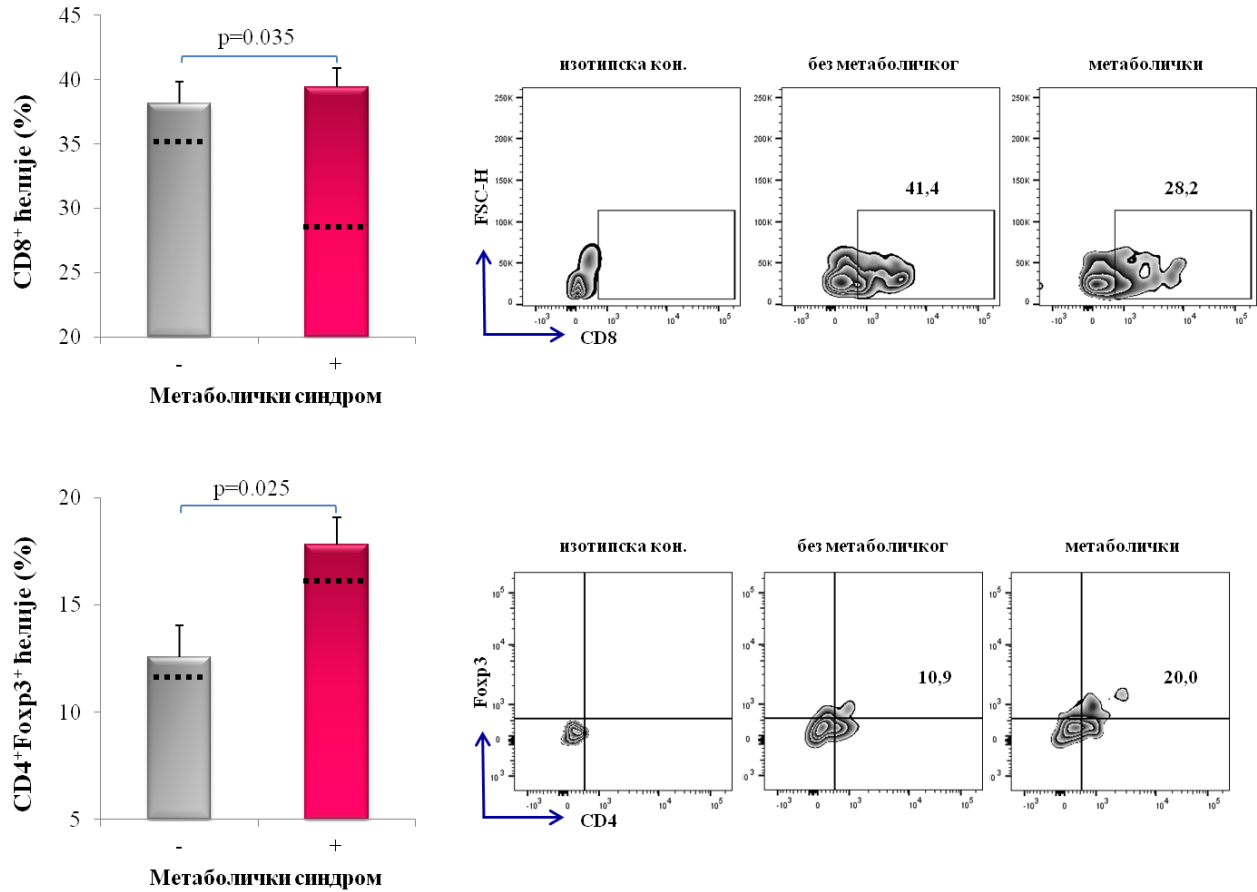
У наставку истраживања анализирана је процентуална заступљеност и функционални фенотип ћелија имунског система које инфилтришу колон. Леукоцитни инфилтрат изолован из *lamina propria*-е је анализиран проточном цитометријом (Табела 12).

Табела 12. Процентуална заступљеност субпопулација мононуклеарних леукоцита у *lamina propria*-и болесника са улцерозним колитисом, у односу на метаболички синдром

Леукоцити (%)	Болесници са улцерозним колитисом		<i>p</i>
	без метаболичког синдрома	метаболички синдром	
CD56 ⁺	19,07±5,47/12,90	24,27±2,49/20,35	0.206
CD3 ⁺ CD56 ⁺	39,58±8,28/36,9	38,98±3,18/40,40	0.866
CD4 ⁺	19,47±4,09/19,00	23,55±1,82/24,25	0.817
CD8⁺	38,12±1,74/35,20	39,43±1,47/27,9	0.035
CD19 ⁺	29,65±7,54/24,80	20,66±2,41/16,85	0.527
CD4⁺Foxp3⁺	12,57±1,47/11,90	17,80±1,28/16,00	0.025
(CD56 ⁺) Gal-3 ⁺	40,70±5,67/49,10	41,29±4,02/32,55	0.704
(CD3⁺CD56⁺) Gal-3⁺	5,74±2,14/1,89	12,52±0,72/10,00	0.029
(CD19 ⁺) Gal-3 ⁺	46,64±9,62/50,00	51,52±4,18/49,40	0.691
(CD8 ⁺) Foxp3 ⁺	36,56±7,76/37,10	25,52±2,95/17,55	0.115
(CD8⁺Foxp3⁺) Gal-3⁺	90,34±2,35/91,60	95,36±1,09/99,15	0.034
(CD4 ⁺) IFN-γ ⁺	43,98±4,98/40,40	42,94±2,11/41,60	0.592
(CD8 ⁺) IFN-γ ⁺	47,47±4,26/42,20	47,09±2,18/47,20	0.446
(CD56⁺) IL-10⁺	15,43±1,91/13,80	29,24±3,36/20,10	0.012
(CD4⁺) IL-10⁺	9,09±1,41/8,99	19,07±2,17/14,00	0.003
(CD56 ⁺) IL-17 ⁺	3,43±1,41/2,41	4,53±1,09/1,49	0.893
(CD4 ⁺) IL-17 ⁺	2,83±1,13/2,41	6,68±1,82/1,95	0.725

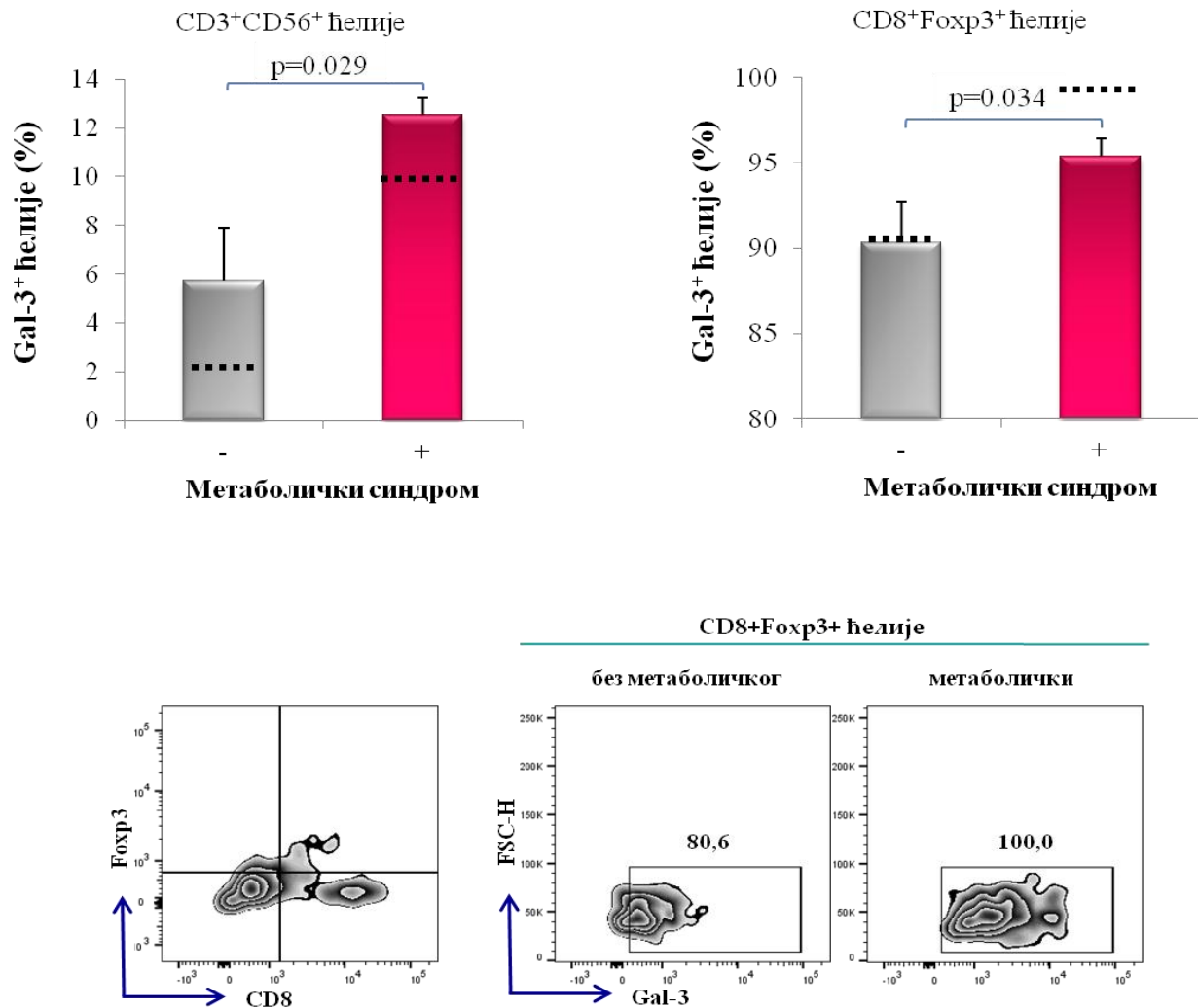
Анализа обухвата 63 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома (n=15), са метаболичким синдромом (n=48). Анализиран је ћелијски састав мононуклеарног инфилтрата *lamina propria*-е и упоређена је заступљеност између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности процената ± стандардна грешка/медијана.

Анализом проточне цитометрије нисмо забележили значајне разлике у процентуалној заступљености NK ћелија ($CD56^+$), NKT ћелија ($CD3^+CD56^+$), помагачких Т лимфоцита ($CD4^+$) и В лимфоцита ($CD19^+$) (Табела 12). Регистрован је значајно мањи проценат инфилтришућих $CD8^+$ Т лимфоцита ($p=0.035$), а већа заступљеност $CD4^+Foxp3^+$ регулаторних Т лимфоцита ($p=0.025$) у *lamina propria*-и болесника са метаболичким синдромом (Фигура 17).



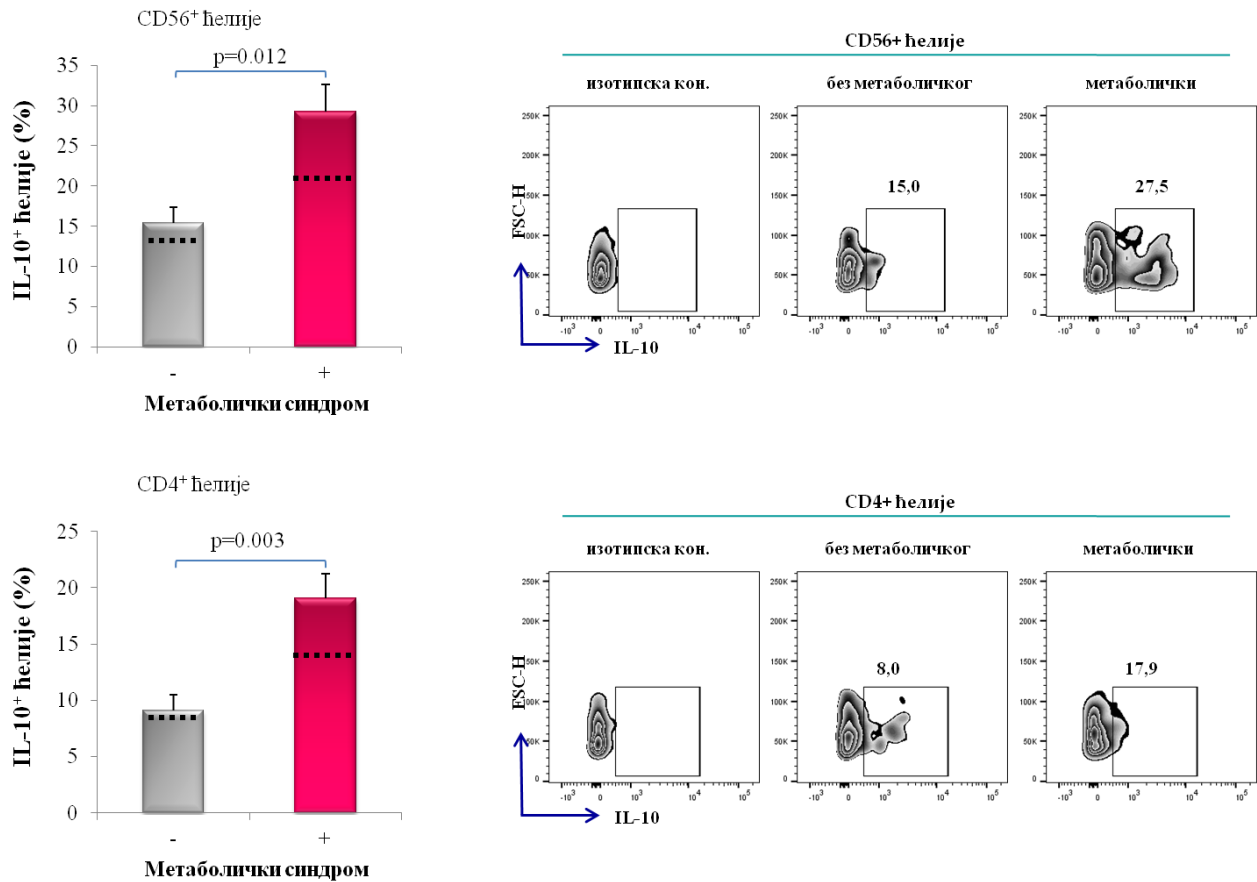
Фигура 17. Процентуална заступљеност $CD8^+$ и $CD4^+Foxp3^+$ ћелија у *lamina propria*-и болесника са улцерозним колитисом, у односу на метаболички синдром. Анализа обухвата 63 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома ($n=15$), са метаболичким синдромом ($n=48$). Анализиран је ћелијски састав мононуклеарног инфилтрата *lamina propria*-е и упоређена је заступљеност између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности процената \pm стандардна грешка/медијана. Приказани су репрезентативни FACS-плотови $CD8^+$ и $CD4^+Foxp3^+$ ћелија за све експерименталне групе.

Није нађена разлика у експресији Gal-3 на NK ћелијама ($CD56^+$) и В лимфоцитима ($CD19^+$), као ни у експресији Foxp3⁺ у цитотоксичким Т лимфоцитима ($CD8^+$). Забележено је и значајно повећање експресије Gal-3 на $CD3^+CD56^+$ NKT ћелијама ($p=0.029$) као и на $CD8^+Foxp3^+$ регулаторним лимфоцитима ($p=0.034$) у оболелих са метаболичким синдромом (Фигура 18).



Фигура 18. Процентуална заступљеност ($CD3^+CD56^+$) Gal-3⁺ ћелија и ($CD8^+Foxp3^+$) Gal-3⁺ ћелија у *lamina propria*-и болесника са улцерозним колитисом, у односу на метаболички синдром. Анализа обухвата 63 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома ($n=15$), са метаболичким синдромом ($n=48$). Анализиран је ћелијски састав мононуклеарног инфилтрата *lamina propria*-е и упоређена је заступљеност између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Ман-Витнеу-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности процената \pm стандардна грешка/медијана. Приказани су репрезентативни FACS-плотови ($CD8^+Foxp3^+$) Gal-3⁺ ћелија.

Нема значајне разлике у броју инфилтришућих помагачких, цитотоксичких Т лимфоцита и NK ћелија које продукују проинфламацјске цитокине IFN- γ и IL-17 (Табела 12). Статистички је значајно већи проценат IL-10 продукујућих CD56⁺ NK ћелија (p=0.034) и CD4⁺ помагачких Т лимфоцита (p=0.012) нађен у *lamina propria*-и оболелих са метаболичким синдромом (Фигура 19).



Фигура 19. Процентуална заступљеност (CD56⁺) IL-10⁺ћелија и (CD4⁺) IL-10⁺ћелија у *lamina propria*-и болесника са улцерозним колитисом, у односу на метаболички синдром. Анализа обухвата 63 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома (n=15), са метаболичким синдромом (n=48). Анализиран је ћелијски састав мононуклеарног инфилтрата *lamina propria*-е и упоређена је заступљеност између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности процената ± стандардна грешка/медијана. Приказани су репрезентативни FACS-плотови (CD56⁺) IL-10⁺ћелија и (CD4⁺) IL-10⁺ћелија за све експерименталне групе.

Крвна слика и биохемијски параметри код оболелих од улцерозног колитиса у односу на метаболички синдром

Анализом крвне слике нисмо нашли значајну разлику у „броју“ еритроцита и тромбоцита, као и у „количини“ хемоглобина између па цијената са улцерозним колитисом са и без метаболичког синдрома. (Табела 13). Значајно мање број леукоцита нађен је код оболелих са метаболичким синдромом (<0.05 ; Табела 13). Није забележена разлика ни у вредностима параметара функције штитасте жлезде $fT4$ и TSH (Табела 13), односно $fT3$, $TPOAt$ и Тиреоглобулинска At (резултати нису приказани). Поређењем концентрација јона у крвотоку нисмо нашли разлику у концентрацији K^+ , Cl^- , P^- , Ca^+ , Na^+ (Табела 13).

Табела 13. Крвна слика, хормонски статус штитасте жлезде и јонограм болесника са улцерозним колитисом, у односу на метаболички синдром

	Болесници са улцерозним колитисом		<i>p</i>
	без метаболичког с.	метаболички с.	
Леукоцити ($\times 10^9/l$)	10,27 \pm 1,04/9,67	7,69 \pm 0,49/5,8	<0.05
Еритроцити ($\times 10^{12}/l$)	4,07 \pm 0,18/4,32	4,42 \pm 0,08/4,45	>0.05
Тромбоцити ($\times 10^9/l$)	400,8 \pm 28,1/423,0	371,6 \pm 11,6/388,0	>0.05
Хемоглобин (g/l)	120,9 \pm 4,1/126,0	126,8 \pm 2,1/131,0	>0.05
$fT4$ (pg/mL)	12,08 \pm 1,03/11,40	12,66 \pm 0,65/11,70	>0.05
TSH (mIU/l)	3,37 \pm 0,39/3,29	4,23 \pm 0,69/3,89	>0.05
K^+ (mmol/l)	3,64 \pm 0,18/3,80	4,10 \pm 0,08/4,40	>0.05
Cl^- (mmol/l)	99,77 \pm 0,62/100,00	100,79 \pm 0,42/101,00	>0.05
P^- (mmol/l)	1,21 \pm 0,05/1,16	1,47 \pm 0,04/1,17	>0.05
Ca^+ (mmol/l)	2,28 \pm 0,05/2,32	2,55 \pm 0,09/2,30	>0.05
Na^+ (mmol/l)	139,18 \pm 1,09/140,00	141,52 \pm 0,73/142,00	>0.05

Анализа обухвата 89 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома ($n=17$), са метаболичким синдромом ($n=72$). Анализирани су крвна слика, хормони штитасте жлезде и јониграма у дефинисаним групама. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности процената \pm стандардна грешка/медијана.

Анализом липидограма нађене су значајно веће вредности холестерола, триглицерида, LDL-а код оболелих од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом (Табела 14). Анализом хепатограма нађене су значајно веће вредности ALT-а, AST-а, GGT-а код оболелих од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом (Табела 14). У истој групи испитаника забележене су и значајно веће вредности креатинина (Табела 14).

Табела 14. Параметри биохемијских анализа болесника са улцерозним колитисом, у односу на метаболички синдром

	Болесници са улцерозним колитисом		<i>p</i>
	без метаболичког синдрома	метаболички синдром	
Леукоцити (%)			
Холестерол (mmol/l)	3,71±0,21/3,25	5,19±0,19/4,87	<0.05
Триглицериди (mmol/l)	0,89±0,07/0,90	1,81±0,11/1,44	<0.05
HDL (mmol/l)	1,73±0,14/1,76	1,50±0,07/1,28	>0.05
LDL (mmol/l)	1,49±0,28/1,26	2,89±0,19/2,65	<0.05
AST (U/l)	20,65±2,27/19,00	32,31±2,07/29,00	<0.05
ALT (U/l)	23,29±2,24/20,00	35,53±5,28/28,50	<0.05
GGT	20,94±2,51/20,00	39,56±7,88/26,50	<0.05
Уреа (mmol/l)	3,69±0,43/3,90	5,47±0,33/5,10	>0.05
Креатинин (μmol/l)	68,71±3,31/73,00	85,00±3,09/78,45	<0.05
Протеини (g/l)	69,71±0,92/70,00	68,67±0,59/69,00	>0.05
Албумини (g/l)	41,88±0,88/41,00	41,19±0,40/41,50	>0.05
Глобулини (g/l)	27,82±0,59/27,00	27,35±0,42/28,00	>0.05
LDH	318,18±20,18/345,00	308,11±10,61/298,00	>0.05

Анализа обухвата 89 испитаника са улцерозним колитисом, који су подељени на две групе: Без метаболичког синдрома (n=17), са метаболичким синдромом (n=72). Анализирани су биохемијски параметри у дефинисаним групама. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности процената ± стандардна грешка/медијана.

4.4. Утицај фазе метаболичког синдрома на тежину улцерозног колитиса, локални и системски имунски одговор

У циљу анализе утицаја развојних фаза метаболичког синдрома на тежину улцерозног колитиса, испитаници којима је постављена дијагноза метаболичког синдрома су надаље, на основу кретања гликемије и инсулинемије током OGTT-а, подељени у 4 подгрупе које кореспондирају са развојним фазама овог синдрома:

- 1) I фаза: нормална толеранција гликозе и нормоинсулинемија (NTG-NI),
- 2) II фаза: нормална толеранција гликозе и хиперинсулинемија (NTG-HI),
- 3) III фаза: патолошка толеранција гликозе и хиперинсулинемија (PTG-HI) и
- 4) IV фаза: патолошка толеранција гликозе и нормо/хипоинсулинемија (PTG-NI/Hipo).

У овако дефинисаним групама праћени су клинички и патохистолошки параметри болести, системске и локалне вредности медијатора инфламације, ћелијски састав леукоцитног инфилтрату у *lamina propria*-и, функционални фенотип инфилтришућих ћелија и *ex vivo* продукција цитокина инфилтришућих леукоцита.

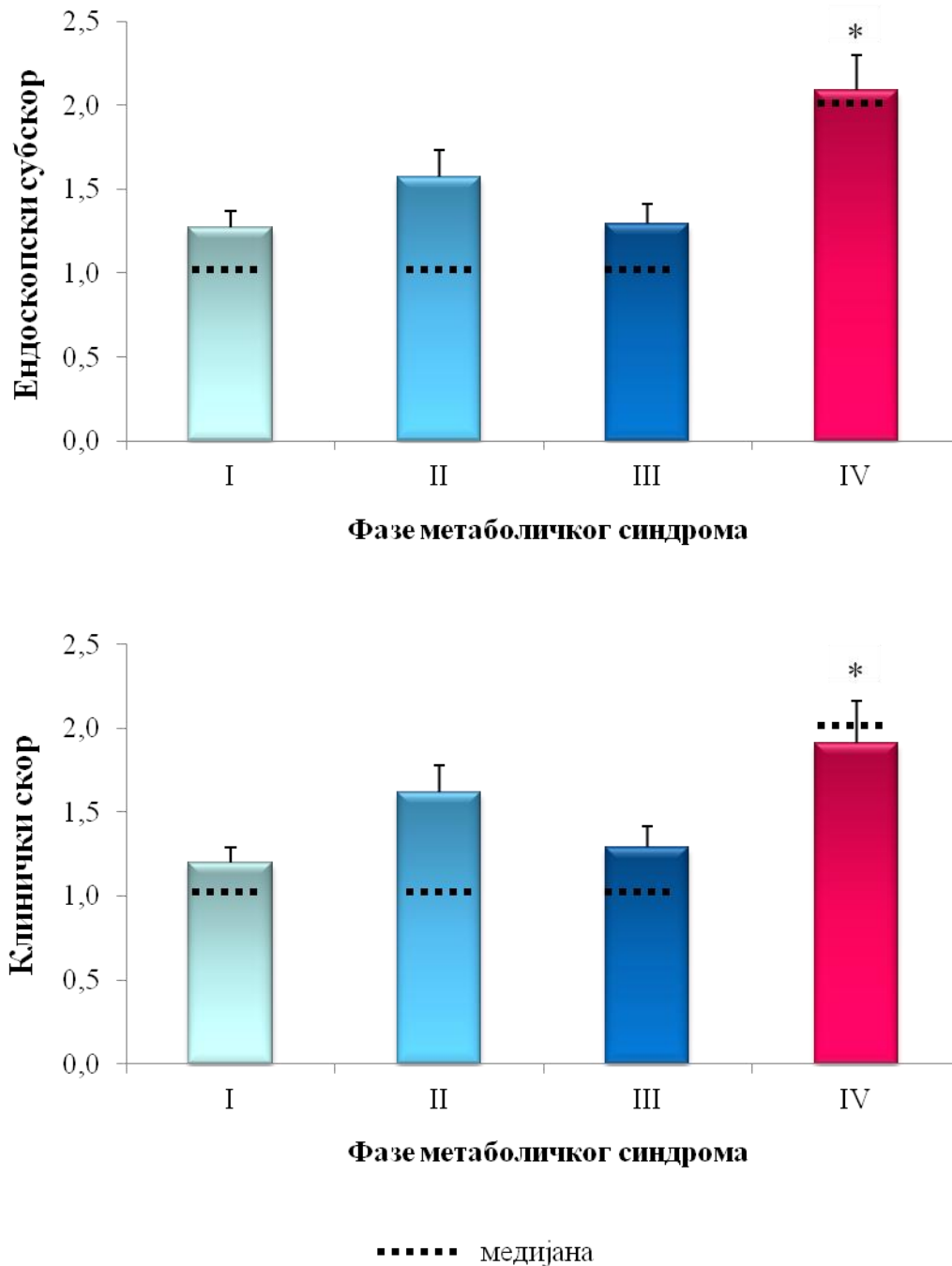
Испитаници у терминалној фази метаболичког синдрома имају тежу форму улцерозног колитиса

Анализиране су клиничке карактеристике улцерозног колитиса у свим развојним фазама метаболичког синдрома (Табела 15). Показано је да оболели од улцерозног колитиса у терминалној фази метаболичког синдрома имају значајно веће вредности ендоскопског субскора ($p=0.017$) и клиничког скора ($p=0.049$) (Фигура 20). Већа је и вредност Мауо скора код оболелих у IV фази метаболичког синдрома, али ова разлика није достигла статистичку значајност (Табела 15).

Табела 15. Клинички параметри улцерозног колитиса у односу на фазу метаболичког синдрома

Фазе метаболичког синдрома	I	II	III	IV	<i>p</i>
Ендоскопски субскор					
1	16	12	10	3	
2	6	6	4	6	0.017
3	0	3	0	3	
Клинички скор					
1	16	11	10	5	
2	4	7	4	4	0.049
3	0	3	0	3	
Мауо скор					
1	16	11	10	6	
2	5	9	3	2	
3	4	1	1	3	0.699

Анализа обухвата 72 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=25), II фаза- NTG-NI (n=21), III фаза- PTG-NI (n=14), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=12). Анализиране су вредности клиничких скорова болести и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.



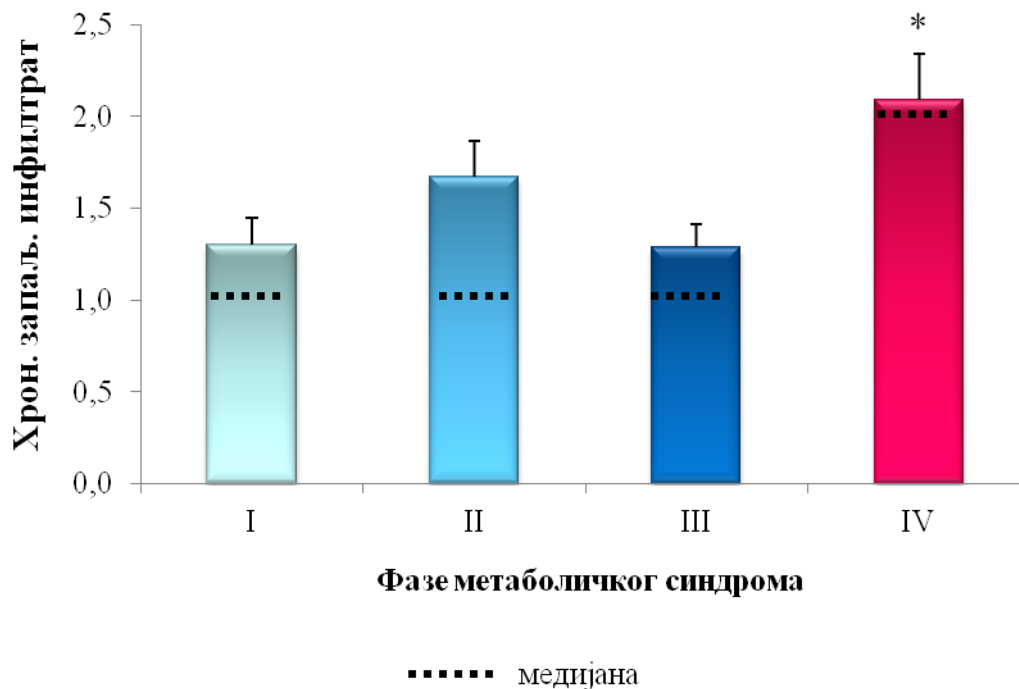
Фигура 20. Клинички параметри улцерозног колитиса у односу на фазу метаболичког синдрома. Анализа обухвата 72 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=25), II фаза- NTG-NI (n=21), III фаза- PTG-NI (n=14), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=12). Анализиране су вредности клиничких скорова болести и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна грешка/медијана.

Табела 16. Патохистолошки параметри улцерозног колитиса у односу на фазу метаболичког синдрома

Фазе метаболичког синдрома	I	II	III	IV	<i>p</i>
Структурне промене					
1	15	10	7	4	0.413
2	4	7	6	3	
3	6	4	1	5	
Запаљенски инфилтрат					
1	16	13	10	4	0.049
2	2	2	4	4	
3	2	6	0	4	
Неутрофилна инфилтрација					
0	4	1	1	0	0.418
1	11	10	8	3	
2	2	3	1	5	
3	8	7	4	4	
Еозинофилна инфилтрација					
0	6	4	5	1	0.323
1	9	9	4	2	
2	4	5	3	7	
3	6	3	2	2	
Деструкција крипти					
0	1	1	1	0	0.479
1	16	9	8	5	
2	1	6	3	3	
3	7	5	2	4	
Ерозија слузнице					
0	6	9	3	2	0.539
1	10	2	6	2	
2	1	4	1	2	
3	4	3	3	4	
4	4	3	1	2	

Анализа обухвата 72 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=25), II фаза- NTG-NI (n=21), III фаза- PTG-NI (n=14), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=12). Анализиране су вредности патохистолошких скорова болести и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

Затим су анализирани патохистолошке карактеристике улцерозног колитиса у свим развојним фазама метаболичког синдрома (Табела 16). Оболели од улцерозног колитиса у терминалној фази метаболичког синдрома имају значајно већи хронични запаљенски инфилтрат ($p=0.049$) (Фигура 21). Веће су и вредности осталих патохистолошких параметара тежине болести код оболелих у IV фази метаболичког синдрома, али ове разлике нису достигле статистичку значајност (Табела 16).



Фигура 21. Патохистолошки параметри улцерозног колитиса у односу на фазу метаболичког синдрома. Анализа обухвата 72 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=25), II фаза- NTG-NI (n=21), III фаза- PTG-NI (n=14), IV фаза- PTG-NI/Ніро (n=12). Анализирани су вредности патохистолошких скорова болести и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна грешка/медијана.

Кроз развојне фазе метаболичког синдрома мења се системски и локални имунски одговор код оболелих од улцерозног колитиса

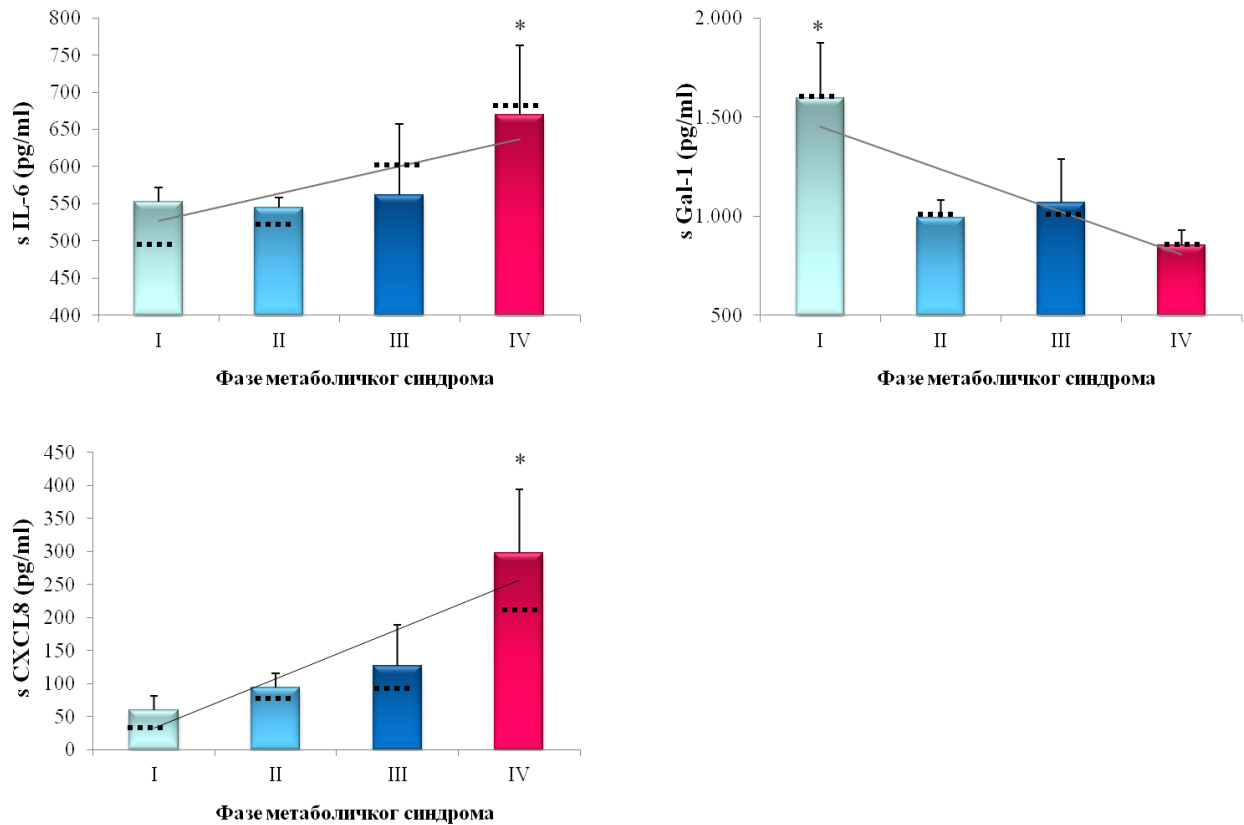
У наставку истраживања, одређивали смо серумске и фецесне концентрације биомаркера TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, IL-33, sST2, TGF- β , CXCL11, CXCL8, Gal-1 и Gal-3 (Табеле 17 и 18). Испитивали смо да ли и како развој метаболичког синдрома утиче на концентрације наведених медијатора код оболелих од улцерозног колитиса.

Табела 17. Концентрација испитиваних биомаркера у **серуму** болесника са улцерозним колитисом, у односу на фазу метаболичког синдрома

Серум (pg/ml)	Фазе метаболичког синдрома				p
	I	II	III	IV	
IL-6	552,6 \pm 19,5/506,5	544,6 \pm 13,6/532,6	651,9 \pm 95,1/568,3	669,6 \pm 93,6/583,3	0.06
IL-17	581,0 \pm 16,5/565,3	561,2 \pm 17,4/540,3	588,9 \pm 33,4/564,5	580,2 \pm 33,5/519,5	0.42
IL-10	409,1 \pm 27,2/400,0	396,3 \pm 22,9/445,8	547,0 \pm 94,9/366,0	494,7 \pm 81,3/403,0	0.51
CXCL11	253,2 \pm 16,3/245,0	415,2 \pm 94,1/268,8	534,2 \pm 96,7/233,2	591,6 \pm 91,7/229,2	0.79
CXCL8	59,4 \pm 22,3/37,0	93,9 \pm 22,3/69,5	126,5 \pm 62,3/81,0	297,7 \pm 95,9/214,0	0.01
sST2	754,9 \pm 93,1/715,0	741,2 \pm 85,1/677,8	686,8 \pm 90,8/623,8	607,3 \pm 88,3/553,8	0.82
Gal-3	1130 \pm 153/1102	998 \pm 168/976	594 \pm 148/589	797 \pm 106/860	0.58
Gal-1	1596 \pm 278/1275	994 \pm 89/882	1070 \pm 216/863	854 \pm 75/818	0.08
TNF- α	393,1 \pm 15,5/390,4	388,6 \pm 19,4/377,0	481,7 \pm 74,7/384,3	419,5 \pm 57,4/379,7	0.39
Kinurenin (mol/L)	1,35 \pm 0,44/1,01	0,92 \pm 0,32/0,27	2,77 \pm 0,81/3,32	3,64 \pm 2,31/2,11	0.63

Анализа обухвата 62 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=16), II фаза- NTG-NI (n=16), III фаза- PTG-NI (n=15), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=15). Анализиране су серумске концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.

Оболели у IV фази метаболичког синдрома имају значајно веће системске вредности проинфламацијског циткина IL-6 ($p=0.045$), и хемокина CXCL8 ($p=0.001$), у односу на оболеле у другим развојним фазама метаболичког синдрома (Фигура 22). Вредности Gal-1 значајно су веће код испитаника у I фази метаболичког синдрома ($p=0.045$; Фигура 22).



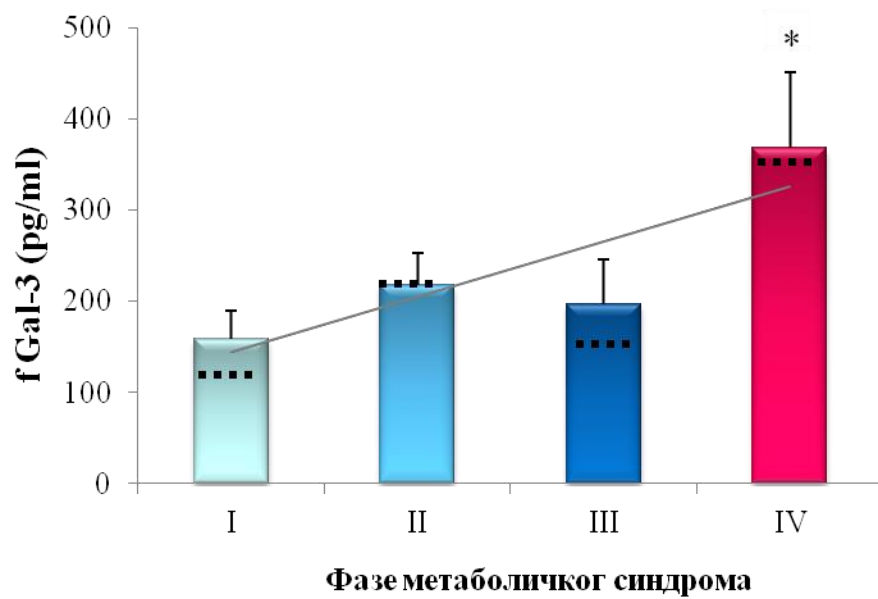
Фигура 22. Концентрација IL-6, CXCL8 и Gal-1 у серуму болесника са улцерозним колитисом у односу на фазу метаболичког синдрома. Анализа обухвата 62 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI ($n=16$), II фаза- NTG-NI ($n=16$), III фаза- PTG-NI ($n=15$), IV фаза- PTG-NI/Hipo ($n=15$). Анализиране су серумске концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.

Анализом концентрација испитиваних биомаркера у узорцима столице показано је да оболели од улцерозног колитиса у терминалном стадијуму метаболичког синдрома имају значајно веће фецесне вредности Gal-3 ($p=0.013$) у односу на испитанике у осталим фазама метаболичког синдрома (Фигура 23). За остале испитиване маркере није нађена значајна разлика између дефинисаних група (Табела 18).

Табела 18. Концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са улцерозним колитисом у односу на фазу метаболичког синдрома

Фецес (pg/ml)	Фазе метаболичког синдрома				<i>p</i>
	I	II	III	IV	
IL-6	274,4±42,9/194,9	284,2±47,2/263,2	270,5±65,6/204,6	383,4±94,6/256,5	0.53
IL-17	499,5±91,2/353,9	492,8±90,8/461,4	445,9±85,8/375,3	625,8±98,3/405,7	0.84
IL-10	1666±333/1246	1454±229/1303	1397±175/1307	2331±634/1215	0.95
CXCL11	417,0±69,9/371,9	329,8±39,2/315,6	315,3±40,6/307,7	599,2±98,6/325,1	0.57
CXCL8	1057±295/1126	963±211/979	863±444/373	1029±268/864	0.64
sST2	193,6±43,9/98,3	187,9±32,8/178,7	191,6±59,2/168,2	259,3±51,5/264,9	0.49
Gal-3	158,4±31,4/111,1	218,2±35,1/223,0	196,9±49,3/155,6	367,9±83,3/357,0	0.08
Gal-1	141,9±35,4/68,8	158,5±30,0/146,3	135,7±42,8/96,0	98,1±17,9/94,8	0.72
TNF- α	398,6±71,4/325,9	385,4±63,7/313,2	392,9±78,5/313,9	563,8±95,2/317,9	0.87
Kinurenin (mol/L)	19,45±4,04/15,58	17,04±5,76/13,65	16,88±1,37/15,98	12,97±3,57/12,97	0.71

Анализа обухвата 62 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=16), II фаза- NTG-NI (n=16), III фаза- PTG-NI (n=15), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=15). Анализиране су фецесне концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.



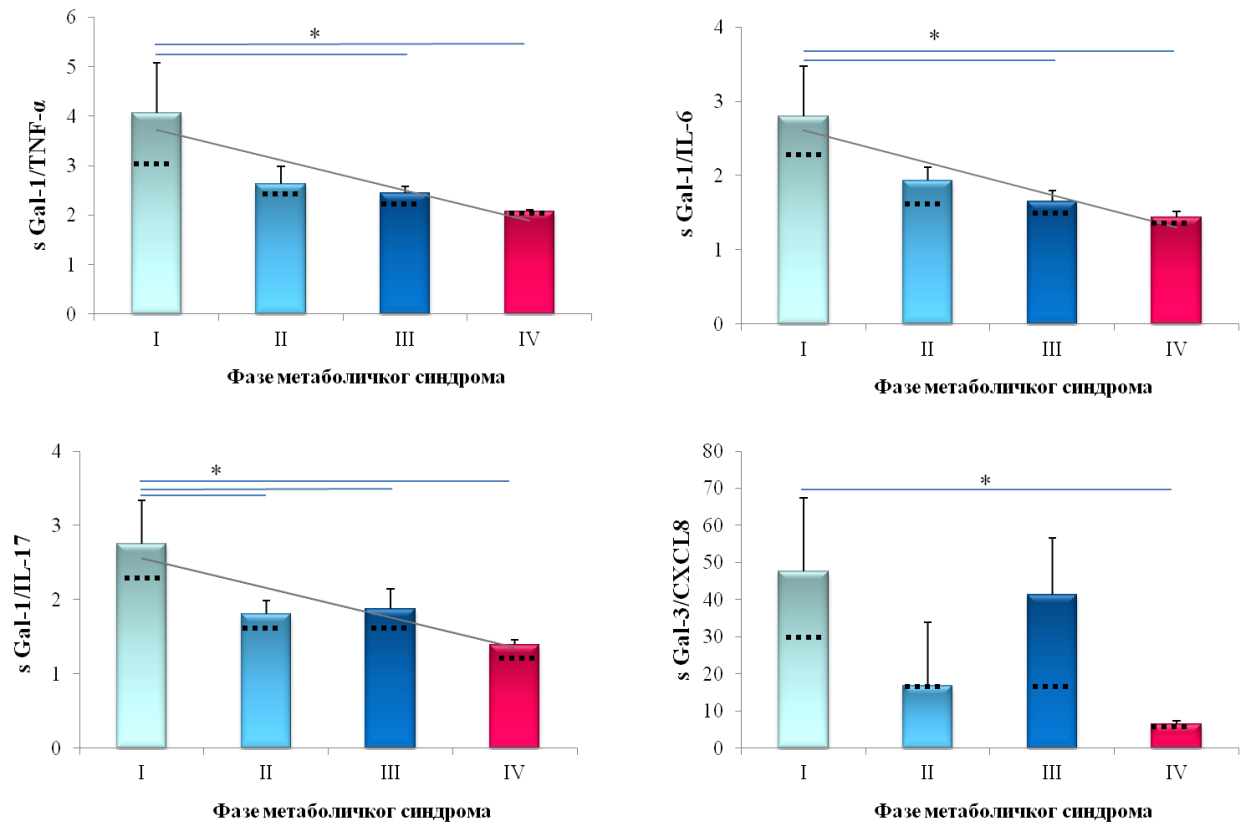
Фигура 23. Концентрација Gal-3 у фецесу болесника са улцерозним колитисом у односу на фазу метаболичког синдрома. Анализа обухвата 62 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=16), II фаза- NTG-NI (n=16), III фаза- PTG-NI (n=15), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=15). Анализирана је серумска концентрација Gal-3 и упоређена између дефинисаних група. Концентрација биомаркера је одређена ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна грешка/медијана.

У наставку истраживања анализирали смо међусобне односе контррегулаторних цитокина између дефинисаних група. Уочена је значајна разлика у односу серумских вредности Gal-1 и проинфламацијских цитокина (Табела 19). Односи Gal-1/TNF- α ($p=0.04$) и Gal-1/IL-6 ($p=0.01$) значајно су већи код оболелих у I фази метаболичког синдрома у односу на испитанике у III и IV фази, док је вредност односа Gal-1/IL-17 у I фази значајно већа од вредности у свим осталим фазама ($p=0.03$; Фигура 24). Такође, однос Gal-3/CXCL8 значајно је већи у I фази метаболичког синдрома у односу на испитанике у IV фази ($p=0.04$; Фигура 24).

Табела 19. Односи концентрација испитиваних биомаркера у **серуму** болесника са улцерозним колитисом у односу на фазу метаболичког синдрома

Серум	Фазе метаболичког синдрома				<i>p</i>
	I	II	III	IV	
TNF- α /IL-10	1,02 \pm 0,09/0,98	1,15 \pm 0,14/1,45	0,94 \pm 0,10/0,99	0,97 \pm 0,11/1,01	0.73
IL-6/IL-10	1,46 \pm 0,12/1,41	1,46 \pm 0,09/1,39	1,40 \pm 0,15/1,48	1,38 \pm 0,11/1,34	0.98
IL-17/IL-10	1,46 \pm 0,11/1,50	1,58 \pm 0,10/1,50	1,33 \pm 0,19/1,47	1,45 \pm 0,14/1,40	0.42
Gal-1/TNF-α	4,06 \pm 1,01/3,02	2,63 \pm 0,35/2,36	2,44 \pm 0,14/2,45	2,08 \pm 0,03/2,11	0.04
Gal-1/IL-6	2,80 \pm 0,67/2,18	1,93 \pm 0,18/1,69	1,65 \pm 0,15/1,55	1,44 \pm 0,08/1,42	0.01
Gal-1/IL-17	2,75 \pm 0,59/2,19	1,81 \pm 0,18/1,63	1,87 \pm 0,28/1,71	1,39 \pm 0,07/1,35	0.03
Gal-3/TNF- α	3,09 \pm 0,67/2,21	3,43 \pm 0,63/2,78	2,01 \pm 0,51/2,00	2,32 \pm 0,03/2,32	0.49
Gal-3/IL-17	2,08 \pm 0,42/1,81	2,34 \pm 0,41/1,98	1,49 \pm 0,31/1,40	1,60 \pm 0,11/1,60	0.52
Gal-3/CXCL8	47,7 \pm 19,7/28,6	16,8 \pm 17,1/15,8	41,3 \pm 15,3/13,9	6,5 \pm 0,9/6,5	0.04
Gal-3/ CXCL11	4,76 \pm 1,09/3,95	4,85 \pm 0,93/4,63	3,10 \pm 1,82/3,03	3,50 \pm 0,39/3,50	0.41
sST2/IL-10	2,03 \pm 0,37/1,61	2,13 \pm 0,42/1,80	1,11 \pm 0,25/1,05	2,10 \pm 0,41/2,10	0.34

Анализа обухвата 62 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=16), II фаза- NTG-NI (n=16), III фаза- PTG-NI (n=15), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=15). Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређени између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.



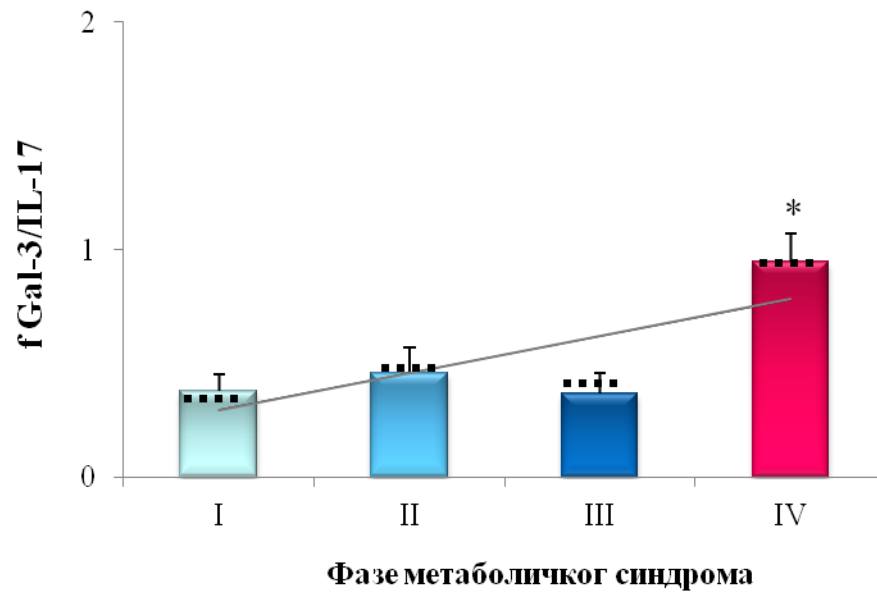
Фигура 24. Односи концентрација галектина 1 и проинфламацијских цитокина *TNF- α* , *IL-6* и *IL-17* и галектина 3 и хемокина *CXCL8* у *серуму* болесника са улцерозним колитисом у односу на фазу метаболичког синдрома. Анализа обухвата 62 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=16), II фаза- NTG-NI (n=16), III фаза- PTG-NI (n=15), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=15). Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређени између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.

Испитивање односа истих биомаркера у фецесу (Табела 20) показало је значајно веће вредности количника Gal-3/IL-17 ($p=0.05$) код болесника у I фази метаболичког синдрома у односу на терминалну фазу (Фигура 25). Ови резултати указују на преминацију Gal-3 над проинфламацијским цитокинима у фецесу оболелих од улцерозног колитиса у првој развојној фази метаболичког синдрома.

Табела 20. Односи концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са улцерозним колитисом у односу на фазу метаболичког синдрома

Фецес	Фазе метаболичког синдрома				<i>p</i>
	I	II	III	IV	
TNF- α /IL-10	0,25 \pm 0,01/0,27	0,28 \pm 0,01/0,27	0,27 \pm 0,02/0,26	0,24 \pm 0,01/0,25	0.26
IL-6/IL-10	0,19 \pm 0,01/0,19	0,19 \pm 0,01/0,17	0,18 \pm 0,02/0,17	0,19 \pm 0,01/0,19	0.62
IL-17/IL-10	0,32 \pm 0,02/0,32	0,31 \pm 0,02/0,29	0,31 \pm 0,03/0,29	0,30 \pm 0,02/0,30	0.41
Gal-1/TNF- α	0,58 \pm 0,17/0,36	0,59 \pm 0,13/0,45	0,38 \pm 0,20/0,18	0,27 \pm 0,06/0,28	0.48
Gal-1/IL-6	0,73 \pm 0,21/0,42	0,91 \pm 0,22/0,63	0,53 \pm 0,26/0,27	0,34 \pm 0,06/0,33	0.63
Gal-1/IL-17	0,46 \pm 0,13/0,23	0,53 \pm 0,12/0,38	0,32 \pm 0,15/0,15	0,21 \pm 0,04/0,22	0.59
Gal-3/TNF- α	0,48 \pm 0,07/0,41	0,58 \pm 0,11/0,55	0,41 \pm 0,09/0,37	0,79 \pm 0,18/0,83	0.17
Gal-3/IL-17	0,38 \pm 0,07/0,29	0,46 \pm 0,11/0,41	0,37 \pm 0,09/0,35	0,95 \pm 0,12/0,95	0.05
Gal-3/CXCL8	0,32 \pm 0,11/0,19	0,75 \pm 0,39/0,36	1,08 \pm 0,94/0,15	0,28 \pm 0,13/0,28	0.29
Gal-3/ CXCL11	0,74 \pm 0,14/0,81	1,04 \pm 0,27/0,79	0,64 \pm 0,15/0,57	0,63 \pm 0,03/0,63	0.35
sST2/IL-10	0,13 \pm 0,02/0,11	0,13 \pm 0,03/0,12	0,15 \pm 0,04/0,17	0,16 \pm 0,06/0,16	0.97

Анализа обухвата 62 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=16), II фаза- NTG-NI (n=16), III фаза- PTG-NI (n=15), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=15). Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређени између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна грешка/медијана.



Фигура 25. Односи концентрација галектина 3 и проинфламацијског цитокина IL-17 у фецесу болесника са улцерозним колитисом у односу на фазу метаболичког синдрома. Анализа обухвата 62 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=16), II фаза- NTG-NI (n=16), III фаза- PTG-NI (n=15), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=15). Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређени између дефинисаних група. Концентрације биомаркера су одређене ELISA тестом. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна грешка/медијана.

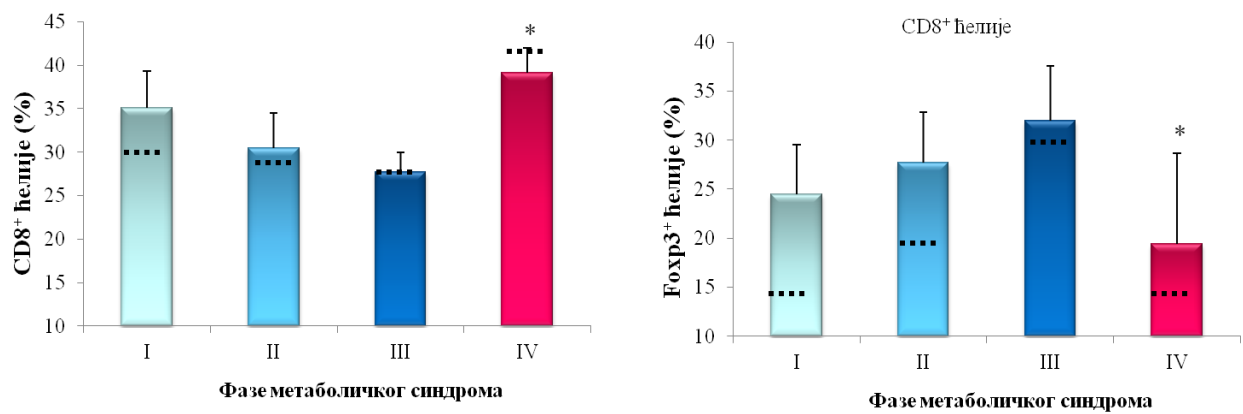
У наставку истраживања анализирана је процентуална заступљеност и функционални фенотип ћелија имунског система које инфилтришу колон. Леукоцитни инфилтрат изолован из *lamina propria*-е је анализиран проточном цитометријом (Табела 21).

Табела 21. Процентуална заступљеност субпопулација леукоцита у *lamina propria*-и болесника са улцерозним колитисом у односу на фазу метаболичког синдрома

Леукоцити (%)	Фазе метаболичког синдрома				p
	I	II	III	IV	
CD56 ⁺	21,67±4,61/15,8	23,63±3,96/20,4	28,39±5,03/21,6	27,52±4,74/31,9	0.49
CD3 ⁺ CD56 ⁺	32,09±5,68/36,0	47,31±5,08/51,6	44,92±5,13/45,3	42,14±9,06/50,7	0.47
CD4 ⁺	23,77±3,21/24,8	22,77±2,78/23,7	25,09±4,20/24,2	25,08±3,92/25,3	0.98
CD8⁺	35,13±4,21/30,9	30,50±4,00/28,9	27,66±2,34/27,3	39,14±2,88/41,5	0.05
CD19 ⁺	17,55±3,98/10,1	25,59±4,98/21,8	18,06±3,61/13,0	21,09±4,33/19,9	0.56
CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	15,04±2,81/12,5	11,46±1,82/10,4	17,98±2,18/16,7	19,89±4,33/18,2	0.10
(CD56 ⁺) Gal-3 ⁺	41,22±5,09/46,7	36,65±7,72/26,5	42,06±9,99/27,3	52,08±9,51/48,9	0.56
(CD3 ⁺ CD56 ⁺) Gal-3 ⁺	9,51±2,66/5,6	7,27±2,65/2,9	16,75±4,89/14,4	8,20±2,43/6,2	0.23
(CD19 ⁺) Gal-3 ⁺	45,58±6,60/39,0	47,32±8,21/49,2	55,86±8,03/47,5	76,96±9,93/86,7	0.24
(CD8 ⁺) Foxp3 ⁺	24,43±5,11/13,5	27,74±5,12/18,9	31,95±5,58/28,4	19,38±9,27/13,6	0.59
(CD8 ⁺ Foxp3 ⁺) Gal-3 ⁺	91,23±2,69/98,2	91,67±3,27/99,0	94,53±1,66/95,9	95,34±2,13/94,9	0.92
(CD4 ⁺) IFN-γ ⁺	44,03±4,09/41,4	43,31±3,47/43,1	43,99±3,88/42,4	41,24±4,72/42,5	0.88
(CD8 ⁺) IFN-γ ⁺	49,45±4,41/48,1	44,05±2,79/43,4	48,46±3,39/49,1	48,98±5,33/48,8	0.72
(CD56 ⁺) IL-10 ⁺	27,37±5,59/20,1	24,52±5,08/16,4	14,51±3,49/11,5	24,92±8,56/18,8	0.29
(CD4 ⁺) IL-10 ⁺	18,66±4,19/11,2	17,38±2,81/14,8	10,38±2,78/8,4	18,47±5,29/12,0	0.37
(CD56 ⁺) IL-17 ⁺	2,75±1,21/0,94	8,62±2,68/4,24	2,95±1,37/1,68	3,82±1,86/1,54	0.06
(CD4 ⁺) IL-17 ⁺	3,41±1,17/1,96	8,06±2,54/6,90	10,12±6,36/1,39	6,96±4,42/4,48	0.34

Анализа обухвата 62 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=16), II фаза- NTG-NI (n=16), III фаза- PTG-NI (n=15), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=15). Анализиран је ћелијски састав мононуклеарног инфилтрата *lamina propria*-е и упоређена је заступљеност између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности процената ± стандардна грешка/медијана.

Анализом проточне цитометрије нисмо забележили значајне разлике у процентуалној заступљености НК ћелија ($CD56^+$), NKT ћелија ($CD3^+CD56^+$), помагачких Т лимфоцита ($CD4^+$) и В лимфоцита ($CD19^+$) између дефинисаних група (Табела 21). Регистрован је значајно већи проценат инфилтришућих $CD8^+$ Т лимфоцита ($p=0.05$) као и $CD8^+Foxp3^+$ регулаторних Т лимфоцита (разлика није достигла статистичку значајност) у *lamina propria*-и болесника у терминалној фази метаболичког синдрома, у односу на ране фазе болести (Фигура 26).



Фигура 26. Процентуална заступљеност $CD8^+$ и $CD8^+Foxp3^+$ ћелија у *lamina propria*-и болесника са улцерозним колитисом, у односу на фазу метаболичког синдрома. Анализа обухвата 62 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=16), II фаза- NTG-NI (n=16), III фаза- PTG-NI (n=15), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=15). Анализиран је ћелијски састав мононуклеарног инфилтрата *lamina propria*-е и упоређена је заступљеност између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности процената \pm стандардна грешка/медијана.

Није нађена разлика у експресији Gal-3 на NK ћелијама (CD56⁺), NKT ћелијама (CD3⁺CD56⁺) и CD8⁺Foxp3⁺ регулаторним лимфоцитима (Табела 21).

Нема значајне разлике у броју инфилтришућих помагачких, цитотоксичких Т лимфоцита и NK ћелија које продукују проинфламацјске цитокине IFN- γ и IL-17 као и имуносупресивни IL-10, између дефинисаних група (Табела 21).

У наставку истраживања, одређивали смо концентрације биомаркера TNF- α , IL-10, IL-17, IFN- γ и TGF- β (Табела 22). Испитивали смо да ли и како развој метаболичког синдрома утиче на промене у продукцији наведених медијатора у леукоцитима изолованим из *lamina propria*-е болесника са улцерозним колитисом у различитим фазама метаболичког синдрома. Лекоцити су *ex vivo* култивисани у медијуму, односно у медијуму са додатим пан-активатором лимфоцита- конканавалином (ConA).

Није нађена статистички значајна разлика у продукцији цитокина TNF- α , IL-10, IFN- γ и TGF- β (Табела 21) између дефинисаних група. Концентрација IL-17 била је значајно већа у култури леукоцита изолованих из болесника са улцерозним колитисом и првим развојним стадијумом метаболичког синдрома ($p=0.05$), у односу на терминални стадијум (Табела 21).

Табела 22. Концентрација испитиваних биомаркера у супернатанту, након *ex vivo* култивације мононуклеарних леукоцита из *lamina propria*-е болесника са улцерозним колитисом у различитим фазама метаболичког синдрома

(pg/ml)	Фазе метаболичког синдрома				<i>p</i>
	I	II	III	IV	
TGF-β	3312±139/3274	3157±115/3199	3145±88/3169	3598±242/3598	0.58
TGF-β (ConA)	2695±76/2720	2682±102/2594	2622±208/2746	2848±77/2848	0.46
IL-10	2076±61/2107	1971±78/1850	2168±69/2219	2263±289/2263	0.43
IL-10 (ConA)	3509±139/3809	3281±262/2978	3376±478/3416	3443±354/3443	0.66
IL-17	318,7±18,9/349,4	272,9±25,3/272,9	249,5±54,3/207,5	277,7±49,5/277,7	0.05
IL-17 (ConA)	436,1±40,0/439,4	334,1±51,7/276,2	437,9±46,8/440,9	391,1±1,5/391,0	0.49
IFN-γ	3709±165/3638	4451±494/3885	4425±512/4645	4287±105/4287	0.75
IFN-γ (ConA)	1671±151/1498	2049±232/1871	1905±205/1762	1933±439/1933	0.97
TNF-α	7863±193/7818	7577±259/7618	7371±141/7407	7455±1018/7455	0.14
TNF-α (ConA)	12060±757/12602	13353±661/12881	14860±2082/14151	10911±822/10911	0.25

Анализа обухвата 62 испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом, који су сврстани у 4 развојне фазе метаболичког синдрома: I фаза- NTG-NI (n=16), II фаза- NTG-NI (n=16), III фаза- PTG-NI (n=15), IV фаза- PTG-NI/Hipo (n=15). Анализиране су концентрације испитиваних биомаркера након *ex vivo* култивације мононуклеарних леукоцита из *lamina propria*-и и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности процената ± стандардна грешка/медијана.

5. ДИСКУСИЈА

У овој студији испитивана је повезаност развојних фаза метаболичког синдрома са тежином болести, те локалним и системским имунским одговором код пацијената са улцерозним колитисом.

У првом делу истраживања испитивани болесници са улцерозним колитисом су подељени у две групе: контролну (без метаболичког синдрома) и групу са метаболичким синдромом. Анализиране су клиничке и патохистолошке карактеристике улцерозног колитиса, серумске и фецесне концентрације медијатора имунског одговора, као и односи контрарегулаторних цитокина, и процентуална заступљеност и функционални фенотип инфилтришућих леукоцита у *lamina propria*-и. Код испитаника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом забележена је клинички и патохистолошки блажа болест са системском и локалном преминацијом галектина 1, галектина 3 и имуносупресивног цитокина IL-10, уз снижену концентрацију проинфламацијских цитокина TNF- α , IL-6 и IL-17. Такође је регистрована већа заступљеност CD8⁺ Т лимфоцита, а мања заступљеност регулаторних CD4⁺Foxp3⁺ лимфоцита у *lamina propria*-и оболелих од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом. У истој групи испитаника забележена је већа експресија галектина-3 на NKT ћелијама и на CD8⁺Foxp3⁺ регулаторним лимфоцитима, као и већа продукција имуносупресивног IL-10 у NK ћелијама и помагачким Т лимфоцитима.

Други део истраживања базиран је на анализи утицаја развојних фаза метаболичког синдрома на тежину болести, локални и системски имунски одговор. На основу „кретања“ гликемије и инсулинемије током OGTT-а, испитаници са улцерозним колитисом подељени су у 4 подгрупе које кореспондирају са развојним фазама овог синдрома. Код испитаника у терминалној фази метаболичког синдрома забележена је клинички и патохистолошки тежа форма улцерозног колитиса. У овој групи испитаника нађена је системска и локална преминација проинфламацијских цитокина TNF- α , IL-6 и IL-17 над галектином-1, галектина-3 над проинфламацијским медијаторима TNF- α и IL-17 као и повећана експресија галектина-3 на имунокомпетентним ћелијама које инфилтришу *lamina propria*-у.

5.1. Болесници са метаболичким синдромом имају блажу форму улцерозног колитиса

У ко-морбидне болести пацијената са УС спадају многе болести међу којима и метаболички синдром. У овој студији испитивана је повезаност метаболичког синдрома са тежином болести и карактеристикама локалног и системског имунског одговора код оболелих од УС. У истраживање је укључено 89 болесника са улцерозним колитисом, просечне старости 50 година (21-80). На основу постојања критеријума АТР III за дијагнозу метаболичког синдрома сви испитаници су подељени у две групе: групу без метаболичког синдрома и групу са метаболичким синдромом (179). Према овим критеријумима, за дијагнозу метаболичког синдрома неопходно је да оболели имају најмање 3 од 5 наведених поремећаја: дисгликемија (гликемија наштину већа од 5,5mM или активно лечење), артеријска хипертензија (артеријска тензија већа од 130/85mmHg или активно лечење), централни тип гојазности, низак HDL холестерол или повишени триглицериди. Анализом клиничких и патохистолошких карактеристика болести показано је да оболели од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом имају значајно блажу болест са мањим ендоскопским и Мауо скором (Фигура 9) као и значајно мањим запаљенским инфилтратом и акумулацијом еозинофила у оштећено ткиво колона (Фигура 10). Клинички и хистолошки параметри активности болести указују на блажу форму улцерозног колитиса код испитаника са метаболичким синдромом.

5.2. Метаболички синдром индукује селективне промене локалног и системског имунског одговора код оболелих од улцерозног колитиса

Имунски одговор представља главни механизам у генези и прогресији улцерозног колитиса (181). Разне компоненте имунског система слузница су укључене у патогенезу улцерозног колитиса. Одбрану у урођеној имуности обезбеђују моноцити/макрофаги, неутрофили, NK ћелије и NKT ћелије, док су главне компоненте стечене имуности В лимфоцити (у хуморалној имуности) и Т лимфоцити (у целуларној имуности). Деструкција интесиналног епитела, која је директно повезана са тежином болести, последица је интензивног имунског одговора. У наставку истраживања, анализирали смо локалне и системске параметре имунског одговора, са циљем откривања узрока блаже болести код испитаника са улцерозним колитисом.

Мерене су вредности цитокина и других медијатора запаљења у серуму и течној фракцији фецеса, оболелих од УС са и без метаболичког синдрома (Табеле 7 и 8). Мање системске вредности проинфламацијског IL-17, уз веће вредности IL-10 (Фигура 11) као и мање вредности односа цитокина TNF- α /IL-10, IL-6/IL-10, IL-17/IL-10 и Gal-1/IL-17 (Фигура 13) указују на преминацију имуносупресивног цитокина IL-10 и Gal-1 у серуму испитаника са метаболичким синдромом. Значајно веће фецесне вредности sST2, Gal-3 и Gal-1 (Фигура 12) као и односа цитокина Gal-1/TNF- α , Gal-1/IL-6, Gal-1/IL-17, Gal-3/TNF- α и Gal-3/IL-17 (Фигура 14) указују на још израженију локалну превагу Gal-1 и Gal-3 над проинфламацијским медијаторима. Показано је да испитаници са метаболичким синдромом имају блажу болест и локалну и системску преминацију IL-10, Gal-1 и Gal-3 над проинфламацијским медијаторима. Добијени резултати указују да је блажа форма улцерозног колитиса код испитаника са метаболичким синдромом највероватније последица слабијег имунског одговора. Супримиран хронични запаљенски процес у слузници колоне може бити последица директног ефекта метаболичког синдрома (хипергликемија и инсулинска резистенција) на имунски систем или последица посредног ефекта галектина-1 и галектина-3.

5.3. Метаболички синдром и имуносупресија

Скорија истраживања су указала на повезаност метаболичког синдрома са дисфункцијом ћелија имунског система (182, 183). Метаболички поремећаји индукују активацију имунског одговора у ткивима као што су масно ткиво, јетра, панкреас и крвни судови, што се често манифестује благо повишеним вредностима маркера хроничног запаљења (182, 184-186). Додатно, утврђено је да метаболички синдром негативно утиче на имунски одговор, што потврђује већа учесталост неуспешних вакцинација као и компликација код инфекција (187, 188). Негативан ефекат метаболичког синдрома на имунитет огледа се кроз промену архитектуре лимфоног ткива и фенотипа ћелија имунског система (183, 189, 190). Овај ефекат не само да погоршава имунски посредован метаболички синдром, већ и повећава ризик од других заразних и хроничних болести (184, 188, 191, 192).

Показано је и да метаболички синдром повећава садржај масти у примарним лимфним органима, тимусу и костној сржи, чиме се мења ћелијски састав и интегритет ткива (183,18

9, 193), што може утицати на хематопоеетске нише (194). Тако, адипоцити у костној сржи могу да инхибирају хематопоезу (195). Метаболички синдром негативно утиче на динамику у секундарним лимфним органима. Исхрана богата високим садржајем масти је повезана са већим бројем ефекторских/ меморијских Т лимфоцита са смањеном разноликошћу рецептора за антиген (189). Ови налази указују да метаболички синдром смањује репертоар циркулишућих Т лимфоцита, чиме се ограничава број патогених антигена на које они могу одговорити (183, 196). Метаболички синдром смањује и величину ингвиналних лимфних чворова, миграцију дендритских ћелија у периферне лимфне органе као и укупан број Т лимфоцита у лимфним чворовима (197). Све у свему, метаболички синдром утиче на развој леукоцита, миграцију и разноликост.

Имуномодулаторе карактеристике у метаболичком синдрому могу бити последица повишене гликемије и инсулинске резистенције. Наивни и меморијски Т лимфоцити имају мале енергетске потребе, док активација лимфоцита значајно повећава експресију рецептора за инсулин и следствени транспорт глукозе у ћелије. Међутим, инсулинска резистенција код метаболичког синдрома инхибира инсулински сигнални пут што онемогућава адекватну активацију Т лимфоцита у одговору на патогене (198). Испитаници са метаболичким синдромом укључени у ову студију имају хиперинсулинемију (Фигура 7) и хипергликемију (Фигура 6), што указује на изражену инсулинску резистенцију.

Метаболички синдром карактерише и измењена продукција адипокина који утичу на имунски систем. Лептин, један од најбоље окарактерисаних адипокина, игра значајну улогу у метаболизму и имуности (199). Метаболичку дисфункцију, која је основа метаболичког синдрома, често прати системска резистенција на лептин (200). Оваква „дефицијенција“ лептина повезана је са смањеним интензитетом хематопоезе, пролиферације Т лимфоцита и ослабљеним имунитетом (198, 201-203), јер лептин игра регулаторну улогу у хематопоези у коштаном сржи (201) док истовремено учествује у развоју Т лимфоцита у тимусу и диференцијацији подгрупа Т лимфоцита у лимфним чворовима (199, 204). Слично лептину, адипонектин такође утиче на имунски систем. Адипонектин има и антиинфламаторна и инсулин-сензибилишућа својства и често је смањене продукције у метаболичком синдрому (205). Док лептин игра значајну улогу у припреми и иницирању имунског одговора, адипонектин је важан за настанак и резолуцију запаљенских процеса.

У овој студији односи контрарегулаторних цитокина TNF- α /IL-10, IL-6/IL-10 и IL-17/IL-10 (Фигура 13) значајно су мањи у групи болесника са метаболичким синдромом. Преминација имуносупривног над проинфламацијским цитокинима указује на антиинфламацијски ефекат метаболичког синдрома на улцерозни колитис.

5.4. Утицај метаболичког синдрома на ћелијски састав леукоцитног инфилтрата *lamina propria*-е оболелих од UC

Као што је већ поменуто, метаболички синдром је повезан са ослабљеним Т ћелијским имунским одговором и последица је смањене тимопоезе и разноликости рецептора Т лимфоцита (189). У овој студији колоноскопским прегледом узиман је узорак ткива за анализу проточном цитометријом. Анализиран је проценат и функционални фенотип леукоцита који инфилтришу оболелу слузницу колона. Није нађена разлика у процентуалној заступљености NK ћелија (CD56⁺), NKT ћелија (CD3⁺CD56⁺), помагачких Т лимфоцита (CD4⁺) и В лимфоцита (CD19⁺) (Табела 11). Регистрован је значајно мањи проценат CD8⁺ Т лимфоцита, а већа заступљеност CD4⁺Foxp3⁺ регулаторних Т лимфоцита код болесника са метаболичким синдромом (Фигура 17).

Неколико клиничких студија и експеримената на животињама (206, 207) потврдило је да су Tregs или инхибиција посредована њима критични за спречавање настанка спонтаних запаљенских процеса у дигестивном тракту, указујући тако да би дефект Tregs могао бити веома значајан у патогенези UC и/или Кронове болести.

Хистолошки, у оштећеној слузници клона оболелих од UC налазе се инфилтрације моноклеарних ћелија, посебно цитотоксичких Т лимфоцита (CTLs), који спадају у главне актере оштећења ткива (208).

Поред тога што утиче на архитектонику лимфоидног ткива и развој леукоцита, метаболички синдром мења дистрибуцију леукоцита, њихов функционални фенотип, као и укупан број (183). Показано је да пацијенти са метаболичким синдромом имају већу учесталост CD4⁺ Т лимфоцита и смањен број CD8⁺ Т лимфоцита (209), што је у сагласности са резултатима ове студије.

Интересантно, недавна студија (210) показала је двоструко већи број периферних CD4⁺ Т

лимфоцита код особа са метаболичким синдромом у односу на здраву контролу, са преминацијом антиинфламаторних Th2 и Treg лимфоцита. У нашем истраживању, статистички је значајно већи проценат имуносупресивних IL-10 продукујућих CD56⁺ NK ћелија и CD4⁺ помагачких Т лимфоцита (Фигура 19) нађен у *lamina propria*-и уз преминацију имуносупресивног цитокина IL-10 у серуму оболелих са метаболичким синдромом.

Метаболички синдром има значајан утицај на имунски систем. Интегритет и архитектура лимфоидних ткива и број и фенотип подтипова леукоцита неки су од начина на који метаболички синдром мења имунски одговор и утиче на развој и ток хроничних болести као што је улцерозни колитис (183). Смањена инфилтрација ефекторских CD8⁺ Т лимфоцита, уз повећану акумулацију регулаторних Т лимфоцита и IL-10 продукујућих NK ћелија и помагачких Т лимфоцита праћене преминацијом имуносупресивних над проинфламацијским цитокинима локално и системски указују на супресивну улогу метаболичког синдрома у улцерозном колитису. Ова супресија се манифестује клинички и патохистолошки блажом формом болести.

5.5. Метаболички синдром корелира са повећаним локалним вредностима Gal-3

Недавно су дефинисани нови биомаркери који могу да укажу на инсулинску резистенцију. Један од тих маркера је галектин-3 (Gal-3). (211) Припада фамилији β-галактозид везујућих протеина. Услед присуства колагенског домена у својој структури, галектин може да интерреагује са великим бројем различитих екстрацелуларних протеина као што су тенасцин, фибронектин и ламинин (212). Gal-3 продукују многе ћелије, укључујући неутрофиле, макрофаге, лаброците, фибробласте и остеокласте (213). Gal-3 се експримира у плућима, стомаку, цревима и материци. (214). До сада је доказано његово учешће у пролиферацији, хемотакси макрофага, фагоцитози, кретању неутрофила, оксидативном стресу, апоптози, ангиогенези, као и развојем инсулинске резистенције (215, 216).

У студији Vobronnikov-е и сарадника (217) уочено је да ниво Gal-3 позитивно корелира са индексима резистенције на инсулин (CRP, НОМА). Ови подаци потврђују улогу Gal-3 у настанку инсулинске резистенције. Студија Сеферовића и сарадника (218) описује повећане вредности Gal-3 код пацијената са дијабетесом тип 2, које снажно корелирају са

вредностима HbA1c. Yilmaz и сарадници (219) су показали да Gal-3 може бити независни предиктор дијабетеса тип 2. У општој популацији, серумска концентрација галектина-3 позитивно корелира са старашћу, преваленцом гојазности, дијабетеса, хиперхолестеролемије и хипертензије, проинфламацијским медијаторима (220, 221), што указује на директну повезаност галектина-3 са метаболичким поремећајима. У нашој студији концентрација Gal-3 у фецесу је значајно већа код оболелих са метаболичким синдромом (Фигура 12). Испитаници са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом имају блажу болест и веће локалне вредности Gal-3, што указује на везу Gal-3 и тежине болети.

5.6. Метаболички синдром корелира са повећаним локалним и системским вредностима Gal-1

Галектин-1, недавно идентификован пептид, примарно се ослобађа из масног ткива. Иако је показано да галектин-1 има анти-инфламаторни ефекат, његова специфична функција није тачно дефинисана. Циљ нам је био да упоредимо однос серумских и фецесних нивоа галектина-1 код испитаника у односу на метаболички синдром. Нашли смо веће вредности галектина код оболелих са метаболичким синдромом у фецесу (Фигура 12) и серуму (Табела 7). Раније студије су показале повишене системске вредности Gal-1 у болестима поремећаја метаболизма. Асаг са сарадницима је показао знатно већи серумски ниво галектина-1 код гојазне деце него код деце са нормалном тежином (222). Ниво Gal-1 је значајно повећан у субкутаном дијализату оболелих од дијабетеса типа 2 у поређењу са здравим контролама. Такође, експресија информационе RNA за Gal-1 повећана је у адипоцитима пацијената са дијабетесом типа 2 (223). У складу са тим, серумска вредност Gal-1 већа је 4,8 пута у дијабетичким узорцима у односу на контролу (224). Ови резултати указују на потенцијалну улогу Gal-1 у генези поремећаја метаболизма и идентификују Gal-1 као нови дијагностички маркер ових болести (222-224).

5.7. Улога Gal-1 и Gal-3 у биологији улцерозног колитиса

Иако је неколико клиничких студија (225-227) испитивало улогу Gal-3 у инфламацијским болестима црева, прецизна улога овог лектина у патогенези је и даље непозната. Једна од студија које су испитивале улогу Gal-3 у акутном експерименталном колитису је указала на појачану експресију Gal-3 у *lamina propria*-и и криптама епитела током прогресије болести (228). Концентрација Gal-3 је повећана у пацијената са активном формом улцерозног колитиса и Кронове болести, указујући на његову улогу у патогенези (229).

Gal-1 је присутан у запаљеном ткиву и његова секреција је појачана и активираним макрофагима који инфилтришу запаљенско ткиво (230). У претходним студијама је утврђено значајно повећање серумске концентрације Gal-1 код пацијената са UC и благим запаљењем ткива колона у поређењу са пацијентима са тешким запаљеним процесом, што указује на заштитну улогу Gal-1 за цревни епител (231).

5.8. Имуносупресивна улога Gal-3

Постоји више описаних механизма имуносупресивног дејства Gal-3. Током оксидативног стреса, реактивне врсте кисеоника, као и други токсични продукти, акумулирају се у ћелији и индукују стварање разградних продуката гликације (енгл. *advanced glycation end products*- AGEs) (232). Гликолизирани липиди и протеини синтетишу се током различитих метаболичких поремећаја као што су дијабетес, атеросклероза, хронично обољење бубрега и везују се за рецептор (RAGE) стимулишући оксидативни стрес у ћелији и локалну инфламацију (233). Gal-3 инхибира AGE-RAGE сигнални пут компетитивним инхибирањем везивања AGE за RAGE или смањењем експресије RAGE гена. Ова инхибиција супримира RAGE-индуковану локалну инфламацију (234). Друга студија показује да Gal-3 директно инхибира ћелијски имунски одговор инхибирањем интеракције између Т лимфоцита и антиген-презентујућих ћелија (APC) (235). У нашој студији, болесници са метаболичким синдромом имали су знатно веће односе локалних вредности Gal-3/TNF- α и Gal-3/IL-17 (Фигура 15). За разлику од студија о улози галектина-3 и Th1/Th2 поларизацији, оскудни су литературни подаци о улози галектина-3 у Th17 поларизацији. Недавно су, Radosavljević и сар, детектовали висок ниво IL-17 код Gal3^{-/-} мишева оболелих од

меланома, указују да галактин-3 може негативно регулисати Th17 одговор код туморских модела (236). Други недавни експерименти на моделу мишјем колитиса указују на заштитну улогу Gal-3 модулацијом секреције проинфламацијског IL-6 (237).

Даље је у нашој студији анализирана експресија Gal-3 у субпопулацијама леукоцита у *lamina propria*-и болесника са улцерозним колитисом. Није нађена разлика у експресији Gal-3 у NK ћелијама и В лимфоцитима (Табела 11), док је већа експресија Gal-3 регистрована у NKT ћелијама и CD8⁺Foxp3⁺ регулаторним лимфоцитима код оболелих са метаболичким синдромом (Фигура 18). Повећана експресија Gal-3 на инфилтришућим субпопулацијама лимфоцита праћена је већом заступљеношћу IL-10 продукујућих лимфоцита (Фигура 19). Недавна студија показује да је примена Gal-3 смањила запаљење мукозе колона и тежину болести индуковањем акумулације регулаторних Т лимфоцита, у експерименталном моделу колитиса (238).

Иако се показало да галектини функционишу екатрацелуларно, све више доказа указује на њихове интрацелуларне функције (239, 240). Раније је показано да интрацелуларни галектин-3 регулише фагоцитозу макрофага и производњу медијатора у мастоцитима (241). Интрацелуларно локализован Gal-3 делује инхибиторно на Т лимфоците. Раније студије показују да експресија Gal-3 у Т лимфоцитима индукује слабо везивање ових ћелија за APC, што објашњава његову инхибиторну улогу у активацији. Овај феномен потврђује нижи степен везивања Т лимфоцита за APC, код повећане експресије Gal-3. Као још један од разлога слабије повезаности CD4⁺ Т лимфоцита и APC наводи се смањена експресија Т ћелијског рецептора (TCR-а) на лимфоцитима посредована галектином-3 као и дестабилизујућа улога Gal-3 на синапсу (245).

5.9. Имуносупресивна улога Gal-1

Галектин-1 може деловати интрацелуларно, као и екстрацелуларно, после секреције (242). Солубилни Gal-1 може да интерреагује са фибронектином, интегрином, ламинином и VEGFR2 рецепторима, и следствено покрене пролиферацију, адхезију, миграцију или ангиогенезу (243, 244). Улога Gal-1 у настанку, прогресији и резолуцији запаљења је добро дефинисана (245). Претходне студије су показале да Gal-1 инхибира ћелијски раст и

индукује апоптозу активираних леукоцита (246, 247). Претходним студијама је показано да Gal-1 усмерава стечени имунски одговор ка типу 2, истовремено инхибирајући секрецију IFN γ , TNF α , IL-2 и IL-12 док фацитира продукцију тип 2 цитокина IL-5 (248-250). Неке студије сугеришу да Gal-1 може инхибирати ефекторске Т лимфоците и следствено супримирати потентан имунски одговор покренут проинфламацијским цитокинима (249, 251-253). Анти-инфламацијска својства Gal-1 потврђена су у неколико модела хроничних запаљенских болести и аутоимунских болести, укључујући експериментални аутоимунски енцефаломиелитис (254), артритис (255), увеитис (256), хепатитис (257) и дијабетес (258). Употреба хуманог рекомбинантног галектина-1 индукује смањену секрецију цитокина типа 1 (TNF- α , IL-1 β , IL-12 и IFN- γ) и супресију запаљења у дигестивном тракту, специфичном индукцијом апоптозе IFN- γ продукујућих ефекторских Т лимфоцита (259). Недавна студија показала је да запаљење, праћено продукцијом проинфламацијских цитокина (IL-1 β , TNF, IL-13) интензивира везивање Gal-1 за ентероците и следствену модулацију, што покреће компензаторни ефекат на ентероцитима за заштиту епитела и обнову интестиналне хомеостазе (260).

У нашем истраживању, нађене су веће системске и локалне вредности Gal-1 (Табеле 7 и 8) као и преминација Gal-1 над проинфламацијским цитокинима TNF- α , IL-6 и IL-17 (Фигуре 13 и 14) код испитаника са метаболичким синдромом, што је у сагласности са претходно наведеним студијама. Повећана концентрација и преминација имуносупресивне активности Gal-1 ограничава локални хронични инфламацијски одговор тако што инхибира активност инфилтришућих леукоцита и секрецију медијатора запаљења.

5.10. Повећане локалне и системске вредности sST2 код оболелих од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом

У наставку студије анализирани су концентрације sST2 у серуму и фецесу. sST2 представља рецептор мамац за IL-33 (261). Различите ћелије могу бити стимулисане да произведу и ослободе IL-33, а активирани леукоцити су само један од извора IL-33 (262). IL-33 игра двојаку биолошку улогу у запаљенским поремећајима: протективну у гојазности, атеросклероза и експерименталном фулминантном хепатитису и

проинфламацијску у астми и артритису изазваном антигеном (263, 264).

У нашој студији показано је да су болесници са метаболичким синдромом имали повећан ниво sST2 (Фигура 12). Ранија истраживања су показала да sST2 инхибира активацију макрофага и следствену продукцију проинфламацијских цитокина TNF- α , IL-6, IL-12. Истовремено sST2 не утиче на продукцију антиинфламацијских медијатора: IL-10, TGF- β (265). Прогресијом инфламације, активирани макрофаги, фибробласти и други типови ћелија продукују sST2 (266). Ослобођени sST2, на даље, инхибира проинфламацијски одговор негативном повратном спрегом, највероватније инактивацијом TLRs (267). Дакле, sST2 функционише као значајан учесник негативне повратне спреге за спречавање неконтролисане запаљенске реакције.

Узевши то у обзир, код испитаника са метаболичким синдромом повећано ослобађање sST2 зауставља прогресију хроничног запаљенског процеса и ограничава локално оштећење ткива.

До сада приказани резултати показују да болесници са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом имају клинички и патохистолошки блажу форму болести. Код ових испитаника снижене су системске и локалне вредности проинфламацијских цитокина као и акумулација ефекторских Т лимфоцита у *lamina propria*-и колона. Блажа болест и мање оштећење ткива корелирају са лимитираним запаљенским процесом.

Метаболички синдром може на бар два начина да супримира локално запаљење: Директним ефектом метаболита на имунокомпетентне ћелије или посредством имуномодулаторних медијатора, чија се концентрација значајно мења у метаболичком синдрому. Повишене вредности имуносупресивних цитокина, sST2, Gal-1 и Gal-3 као и локална преминација Gal-1 и Gal-3 над проинфламацијским цитокинима уз повећан инфлукс Gal-3⁺ и IL-10 продукујућих субпопулација лимфоцита указују на улогу sST2 и галектина у ограничавању запаљенског процеса.

5.11. Испитаници у терминалној фази метаболичког синдрома имају тежу форму улцерозног колитиса

У другом делу истраживања анализиран је утицај развојних фаза метаболичког синдрома на тежину улцерозног колитиса. Испитаници којима је постављена дијагноза метаболичког синдрома су, на основу кретања гликемије и инсулинемије током OGTT-а, подељени у 4 подгрупе које кореспондирају са развојним фазама овог синдрома. У овако дефинисаним групама праћени су клинички и патохистолошки параметри болести. Показано је да оболели од улцерозног колитиса у терминалној фази метаболичког синдрома имају значајно веће вредности ендоскопског и клиничког скорa (Фигура 20) као и израженији хронични запаљенски инфилтрат (Фигура 21). Дакле, иако, генерално, оболели од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом имају блажу форму болести, они са терминалним стадијумом метаболичког синдрома имају много тежу болест у поређењу са оболелима у раној фази метаболичког синдрома. У наставку студије испитивани су параметри имунског одговора са циљем да се нађе објашњење овог феномена.

5.12. Преминација проинфламацијских цитокина над галектинима 1 и 3 у терминалној фази метаболичког синдрома

Анализа системских и локалних вредности цитокина показала је да оболели у терминалној фази метаболичког синдрома имају значајно веће системске вредности проинфламацијског циткина IL-6 и хемокина CXCL8, док су вредности Gal-3 значајно веће код испитаника у I фази метаболичког синдрома (Фигура 22). У фецесу су, пак, вредности Gal-3 значајно веће код испитаника у IV фази метаболичког синдрома (Фигура 23).

Значајно већи односи Gal-1/TNF- α , Gal-1/IL-6, Gal-1/IL-17 као и Gal-3/CXCL8 у серуму (Фигура 24) и Gal-3/TNF- α , Gal-3/IL-17 и Gal-3/CXCL8 у фецесу (Фигура 25) оболелих у раној фази метаболичког синдрома у односу на испитанике у терминалној фази указују на преминацију Gal-1 и Gal-3 над проинфламацијским цитокинима и хемокинима у раним фазама метаболичког синдрома, у којима је и улцерозни колитис у блажој форми. Са напредовањем метаболичког синдрома преовладавају проинфламацијски агенси над Gal-1 и Gal-3, и системски и локално, што прати и интензивније оштећење ткива и тежа болест.

Тако код оболелих у терминалној фази метаболичког синдрома имамо значајно већу акумулацију CD8⁺ Т лимфоцита, а смањен инфлукс регулаторних CD8⁺ Т лимфоцита (Фигура 26). Овај налаз поткрепљује претходни закључак да развој метаболичког синдрома прати пораст проинфламацијских медијатора уз пад системских и локалних вредности Gal-1 и Gal-3. Смањен ефекат имуносупресивних галектина уз интензивирану секрецију медијатора инфламације прати и повећан инфлукс ефекторских Т лимфоцита а смањен број регулаторних. Наведено указује на појачан локални имунски одговор што резултира већим оштећењем ткива и тежом формом болести.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Резултати приказани у овом раду по први пут указују на мање оштећење ткива и клинички блажу болест код болесника са улцерозним колитисом и метаболичким синдромом. Локална и системска преминација Gal-1 и Gal-3 над проинфламацијским цитокинима код оболелих са метаболичким синдромом може представљати механизам заустављања и ограничавања проинфламацијског процеса и спречити оштећење ткива, указујући на имunosупресивну улогу Gal-1 и Gal-3 у биологији улцерозног колитиса код болесника са метаболичким синдромом.

Оболели у терминалној фази метаболичког синдрома имају клинички и патохистолошки тежу форму улцерозног колитиса у односу на ране фазе метаболичког синдрома. Системска и локална преминација проинфламацијских цитокина TNF- α , IL-6 и IL-17 над Gal-1 и Gal-3 у терминалној фази метаболичког синдрома појачава запаљење и следствено оштећење ткива.

Закључак је изведен на основу следећих доказа:

1. Мање вредности ендоскопског и Мауо скорa као и мање изражен хронични запаљенски и еозинофилни инфилтрат код оболелих од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом у поређењу са болесницима без метаболичког синдрома;
2. Мања системска вредност IL-17 као и односи TNF- α /IL-10, IL-6/IL-10 и IL-17/IL-10, а већа вредност IL-10 и однос Gal-1/IL-17 детектовани су код оболелих од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом у поређењу са контролом без метаболичког синдрома;
3. Веће фецесне вредности CXCL8, sST2, Gal-3 и Gal-1 и већи односи Gal-1/TNF- α , Gal-1/IL-6, Gal-1/IL-17, Gal-3/TNF- α и Gal-3/IL-17 регистровани су код оболелих од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом;
4. Већа заступљеност CD8⁺ Т лимфоцита, а мања регулаторних Т лимфоцита, уз већу експресију галектина-3 на NKT ћелијама и CD8⁺Foxp3⁺ регулаторним лимфоцитима, као и већу продукцију IL-10 у NK ћелијама и помагачким Т

лимфоцитима у *lamina propria*-и код оболелих од улцерозног колитиса са метаболичким синдромом;

5. Оболели у терминалној фази метаболичког синдрома имају клинички и патохистолошки тежу форму улцерозног колитиса.
6. Оболели у терминалној фази метаболичког синдрома имају значајно веће системске вредности IL-6 и CXCL8 као и односе Gal-1/TNF- α , Gal-1/IL-6, Gal-1/IL-17 и Gal-3/CXCL8, док је вредност Gal-3 значајно већа код испитаника у I фази метаболичког синдрома;
7. Значајно већи односи Gal-3/TNF- α , Gal-3/IL-17 и Gal-3/CXCL8 у фецесу оболелих у раној фази метаболичког синдрома у односу на испитанике у терминалној фази;
8. Већа заступљеност CD8⁺ Т лимфоцита, а мања регулаторних Т лимфоцита у *lamina propria*-и оболелих од улцерозног колитиса у терминалној фази метаболичког синдрома.

7. СКРАЋЕНИЦЕ

ACE	(енгл. <i>American College of Endocrinology</i>)
AFP	(енгл. <i>Alpha-fetoprotein</i>)
ALT	Аланин аминотрансфераза
AST	Аспартат аминотрансфераза
APC	Антиген презентујућа ћелија
BMI	(енгл. <i>Body Mass Index</i>)
CA19-9	(енгл. <i>Cancer antigen 19-9</i>)
CD	(енгл. <i>Crohn's disease</i>)
CEA	(енгл. <i>Carcino-embryonic antigen</i>)
CLIA	(енгл. <i>Chemiluminescence enzyme immunoassay</i>)
CRP	С-реактивни протеин
CT	Компјуторизирана томографија
CTL	Цитотоксички Т лимфоцити (енгл. <i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>)
DCs	Дендритске ћелије
DMSO	(енгл. <i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	(енгл. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	(енгл. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	(енгл. <i>EnzymeLinkedImmunosorbentAssay</i>)
FBS	(енгл. <i>Fetal bovine serum</i>)
HBSS	(енгл. <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HDL	HDL-холестерол
HLA	(енгл. <i>Human leukocyte antigen</i>)
HOMA	(енгл. <i>Homeostasis model insulin resistance assessment</i>)
GALT	(енгл. <i>Gut Associated Lymphoid Tissues</i>)
GCP	(енгл. <i>Good Clinical Practice</i>)
IECs	(енгл. <i>Intestinal Epithelial Cells</i>)
IBD	(enl. <i>Inflammatory bowel disease</i>)
IBDU	(enl. <i>Inflammatory bowel disease unclassified</i>)
ICAM1	(енгл. <i>Intracellular cell adhesion molecule 1</i>)
IDF	(енгл. <i>International Diabetes Federation</i>)
IL	Интерлеукин (енгл. <i>Interleukin</i>)
IFN-γ	Интерферон гама (енгл. <i>Interferon-gama</i>)
LDH	Лактат дехидрогеназа

LDL	LDL-холестерол
LPMC	(енгл. <i>Lamina propria mononuclear cells</i>)
LPS	Липополисахарид
MR	Магнетна резонанца
MTP	(енгл. <i>Microtiter plate</i>)
NCEP-АТРИИ	(енгл. <i>National Cholesterol Education Program- Adult Treatment Panel III</i>)
NK ћелије	Урођене убилачке ћелије (енгл. <i>Natural Killer cells</i>)
NKG2D	Активациони рецептор (енгл. <i>Natural Killer Group 2, Member D</i>)
NKT	(енгл. <i>Natural killer T cell</i>)
NLR	<i>NOD-like</i> рецептори
OGTT	(енгл. <i>Oral Glucose Tolerance Test</i>)
PAMPs	(енгл. <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PBS	(енгл. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PGN	(енгл. <i>Peptidoglycan</i>)
RNK	Рибонуклеинска киселина
ROS	(енгл. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
TAG	Триглицериди
Th ћелије	Помагачки Т лимфоцити (енгл. <i>T helper cells</i>)
TLR	(енгл. <i>Toll like receptor</i>)
Treg	Регулаторни Т лимфоцити
TNF	Фактор некрозе тумора (енгл. <i>Tumor necrosis factor</i>)
TGF-β	Трансформишући фактор раста бета (енгл. <i>Transforming growth factor β</i>)
UC	(енгл. <i>Ulcerative Colitis</i>)
WBC	Број леукоцита

8. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Shih QD and Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(3): 390–400.
2. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Folsch UR, Timmis KN, Schreiber S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53: 685-693.
3. Contractor NV, Bassiri H, Reya T, Park AY, Baumgart DC, Wasik MA, Emerson SG, Carding SR. Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. *J Immunol* 1998; 160: 385-394.
4. Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB. Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* 2003; 52: 370-376.
5. Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, Sartor RB. Lactobacillus plantarum 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 71-80.
6. Danese S, Semeraro S, Marini M, Roberto I, Armuzzi A, Papa A, Gasbarrini A. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications for gut inflammation. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 811-818.
7. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005; 115: 66-75.
8. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 13-19.
9. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-(kappa)B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-663.
10. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390-407.
11. Schlaak JF, Barreiros AP, Pettersson S, Schirmacher P, Meyer Zum Buschenfelde KH, Neurath MF. Antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-

- kappaB abrogate fulminant septic shock induced by *S. typhimurium* in mice. *Scand J Immunol* 2001; 54: 396-403.
12. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497.
 13. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 557-568.
 14. Strober W, James SP. The immunologic basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 1986; 6: 415-432.
 15. Sartor R. Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In: Kirsner JB, eds. *Inflammatory Bowel Disease*, 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000;153-178.
 16. Zhang S, Zhao X and Zhang D. Cellular and molecular immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Cell Mol Immunol*. 2014; 11(3): 314.
 17. Martin B, Banz A, Bienvenu B, Cordier C, Dautigny N, Becourt C, et al. Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo. *J Immunol* 2004; 172: 3391-8.
 18. Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 2005; 206: 296-305.
 19. Matricon J, Barnich N and Ardid D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself*. 2010; 1(4): 299-309.
 20. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014 7; 20(1): 6-21.
 21. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 227-257.
 22. Shih DQ, Targan SR, McGovern D. Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10: 568-575.
 23. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma,

- whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996; 157: 1261-1270.
24. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497.
25. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; 129: 550-564.
26. Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, Corazza GR, Monteleone G, Di Sabatino A, Macdonald TT. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 2009; 58: 1629-1636.
27. Vainer B, Nielsen OH, Hendel J, Horn T, Kirman I. Colonic expression and synthesis of interleukin 13 and interleukin 15 in inflammatory bowel disease. *Cytokine* 2000; 12: 1531-1536.
28. Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2009; 137: 1736-1745.
29. Dong C, Nurieva RI. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS. *J Autoimmun* 2003; 21: 255-260.
30. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 337-348.
31. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8: 967-97.
32. Shih QD and Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(3): 390-400.

33. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Folsch UR, Timmis KN, Schreiber S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53: 685-693.
34. Contractor NV, Bassiri H, Reya T, Park AY, Baumgart DC, Wasik MA, Emerson SG, Carding SR. Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. *J Immunol* 1998; 160: 385-394.
35. Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB. Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* 2003; 52: 370-376.
36. Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, Sartor RB. Lactobacillus plantarum 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 71-80.
37. Danese S, Semeraro S, Marini M, Roberto I, Armuzzi A, Papa A, Gasbarrini A. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications for gut inflammation. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 811-818.
38. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005; 115: 66-75.
39. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 13-19.
40. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-(kappa)B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-663.
41. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390-407.
42. Schlaak JF, Barreiros AP, Pettersson S, Schirmacher P, Meyer Zum Buschenfelde KH, Neurath MF. Antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappaB abrogate fulminant septic shock induced by *S. typhimurium* in mice. *Scand J Immunol* 2001; 54: 396-403.
43. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells

- that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497.
44. Kronenberg M, Gajarin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 557-568.
 45. Strober W, James SP. The immunologic basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 1986; 6: 415-432.
 46. Sartor R. Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In: Kirsner JB, eds. *Inflammatory Bowel Disease*, 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000;153-178.
 47. Zhang S, Zhao X and Zhang D. Cellular and molecular immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Cell Mol Immunol*. 2014; 11(3): 314.
 48. Martin B, Banz A, Bienvenu B, Cordier C, Dautigny N, Becourt C, et al. Suppression of CD4⁺ T lymphocyte effector functions by CD4⁺CD25⁺ cells in vivo. *J Immunol* 2004; 172: 3391-8.
 49. Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 2005; 206: 296-305.
 50. Matricon J, Barnich N and Ardid D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself*. 2010; 1(4): 299-309.
 51. Shih QD and Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(3): 390–400.
 52. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Folsch UR, Timmis KN, Schreiber S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53: 685-693.
 53. Contractor NV, Bassiri H, Reya T, Park AY, Baumgart DC, Wasik MA, Emerson SG, Carding SR. Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. *J Immunol* 1998; 160: 385-394.
 54. Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB. *Lactobacillus GG* prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* 2003; 52: 370-376.

55. Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, Sartor RB. *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 71-80.
56. Danese S, Semeraro S, Marini M, Roberto I, Armuzzi A, Papa A, Gasbarrini A. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications for gut inflammation. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 811-818.
57. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005; 115: 66-75.
58. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 13-19.
59. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-(kappa)B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-663.
60. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390-407.
61. Schlaak JF, Barreiros AP, Pettersson S, Schirmacher P, Meyer Zum Buschenfelde KH, Neurath MF. Antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappaB abrogate fulminant septic shock induced by *S. typhimurium* in mice. *Scand J Immunol* 2001; 54: 396-403.
62. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497.
63. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 557-568.
64. Strober W, James SP. The immunologic basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 1986; 6: 415-432.
65. Sartor R. Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In: Kirsner JB, eds. *Inflammatory Bowel Disease*, 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000;153-178.

66. Zhang S, Zhao X and Zhang D. Cellular and molecular immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Cell Mol Immunol*. 2014; 11(3): 314.
67. Martin B, Banz A, Bienvenu B, Cordier C, Dautigny N, Becourt C, et al. Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo. *J Immunol* 2004; 172: 3391-8.
68. Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 2005; 206: 296-305.
69. Matricon J, Barnich N and Ardid D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself*. 2010; 1(4): 299-309.
70. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014 7; 20(1): 6-21.
71. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 227-257.
72. Shih DQ, Targan SR, McGovern D. Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10: 568-575.
73. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996; 157: 1261-1270.
74. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497.
75. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; 129: 550-564.
76. Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, Corazza GR, Monteleone G, Di Sabatino A, Macdonald TT. Differential regulation of interleukin 17

- and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 2009; 58: 1629-1636.
77. Vainer B, Nielsen OH, Hendel J, Horn T, Kirman I. Colonic expression and synthesis of interleukin 13 and interleukin 15 in inflammatory bowel disease. *Cytokine* 2000; 12: 1531-1536.
78. Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2009; 137: 1736-1745.
79. Dong C, Nurieva RI. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS. *J Autoimmun* 2003; 21: 255-260.
80. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 337-348.
81. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8: 967-97.
82. Shih QD and Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(3): 390–400.
83. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Folsch UR, Timmis KN, Schreiber S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53: 685-693.
84. Contractor NV, Bassiri H, Reya T, Park AY, Baumgart DC, Wasik MA, Emerson SG, Carding SR. Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. *J Immunol* 1998; 160: 385-394.
85. Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB. Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* 2003; 52: 370-376.
86. Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, Sartor RB. Lactobacillus plantarum 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 71-80.

87. Danese S, Semeraro S, Marini M, Roberto I, Armuzzi A, Papa A, Gasbarrini A. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications for gut inflammation. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 811-818.
88. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005; 115: 66-75.
89. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 13-19.
90. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-(kappa)B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-663.
91. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390-407.
92. Schlaak JF, Barreiros AP, Pettersson S, Schirmacher P, Meyer Zum Buschenfelde KH, Neurath MF. Antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappaB abrogate fulminant septic shock induced by *S. typhimurium* in mice. *Scand J Immunol* 2001; 54: 396-403.
93. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497.
94. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 557-568.
95. Strober W, James SP. The immunologic basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 1986; 6: 415-432.
96. Sartor R. Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In: Kirsner JB, eds. *Inflammatory Bowel Disease*, 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000;153-178.
97. Zhang S, Zhao X and Zhang D. Cellular and molecular immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Cell Mol Immunol*. 2014; 11(3): 314.

98. Martin B, Banz A, Bienvenu B, Cordier C, Dautigny N, Becourt C, et al. Suppression of CD4⁺ T lymphocyte effector functions by CD4⁺CD25⁺ cells in vivo. *J Immunol* 2004; 172: 3391-8.
99. Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 2005; 206: 296-305.
100. Matricon J, Barnich N and Ardid D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself*. 2010; 1(4): 299-309.
101. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014 7; 20(1): 6-21.
102. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 227-257.
103. Shih DQ, Targan SR, McGovern D. Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10: 568-575.
104. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996; 157: 1261-1270.
105. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497.
106. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; 129: 550-564.
107. Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, Corazza GR, Monteleone G, Di Sabatino A, Macdonald TT. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 2009; 58: 1629-1636.

108. Vainer B, Nielsen OH, Hendel J, Horn T, Kirman I. Colonic expression and synthesis of interleukin 13 and interleukin 15 in inflammatory bowel disease. *Cytokine* 2000; 12: 1531-1536.
109. Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2009; 137: 1736-1745.
110. Dong C, Nurieva RI. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS. *J Autoimmun* 2003; 21: 255-260.
111. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 337-348.
112. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8: 967-97.
113. Shih QD and Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(3): 390–400.
114. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Folsch UR, Timmis KN, Schreiber S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53: 685-693.
115. Contractor NV, Bassiri H, Reya T, Park AY, Baumgart DC, Wasik MA, Emerson SG, Carding SR. Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. *J Immunol* 1998; 160: 385-394.
116. Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB. Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* 2003; 52: 370-376.
117. Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, Sartor RB. Lactobacillus plantarum 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 71-80.
118. Danese S, Semeraro S, Marini M, Roberto I, Armuzzi A, Papa A, Gasbarrini A. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications for gut inflammation. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 811-818.

119. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005; 115: 66-75.
120. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 13-19.
121. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-(kappa)B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-663.
122. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390-407.
123. Schlaak JF, Barreiros AP, Pettersson S, Schirmacher P, Meyer Zum Buschenfelde KH, Neurath MF. Antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappaB abrogate fulminant septic shock induced by *S. typhimurium* in mice. *Scand J Immunol* 2001; 54: 396-403.
124. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497.
125. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 557-568.
126. Strober W, James SP. The immunologic basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 1986; 6: 415-432.
127. Sartor R. Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In: Kirsner JB, eds. *Inflammatory Bowel Disease*, 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000;153-178.
128. Zhang S, Zhao X and Zhang D. Cellular and molecular immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Cell Mol Immunol*. 2014; 11(3): 314.
129. Martin B, Banz A, Bienvenu B, Cordier C, Dautigny N, Becourt C, et al. Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo. *J Immunol* 2004; 172: 3391-8.

130. Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 2005; 206: 296-305.
131. Maconi G, Furfaro F, Sciurti R, Bezzio C, Ardizzone S, de Franchis R. Glucose intolerance and diabetes mellitus in ulcerative colitis: pathogenetic and therapeutic implications. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 3507-15
132. Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF. The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 2005; 129: 827-836
133. Cohen R, Robinson D, Paramore C, Fraeman K, Renahan K, Bala M. Autoimmune disease concomitance among inflammatory bowel disease patients in the United States, 2001-2002. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 738-743
134. Gupta G, Gelfand JM, Lewis JD. Increased risk for demyelinating diseases in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 129: 819-826
135. Bardella MT, Elli L, De Matteis S, Floriani I, Torri V, Piodi L. Autoimmune disorders in patients affected by celiac sprue and inflammatory bowel disease. *Ann Med* 2009; 41: 139-143
136. Kappelman MD, Galanko JA, Porter CQ, Sandler RS. Association of paediatric inflammatory bowel disease with other immune-mediated diseases. *Arch Dis Child* 2011; 96: 1042-1046
137. Singleton JR, Smith AG. The diabetic neuropathies: practical and rational therapy. *Semin Neurol* 2012; 32: 196-203.
138. Shen TC, Lebwohl B, Verma H, Kumta N, Tennyson C, Lewis S, Scherl E, Swaminath A, Capiak KM, DiGiacomo D, Bosworth BP, Brannagan TH, Green PH. Peripheral neuropathic symptoms in celiac disease and inflammatory bowel disease. *J Clin Neuromuscul Dis* 2012; 13: 137-145.
139. Lossos A, River Y, Eliakim A, Steiner I. Neurologic aspects of inflammatory bowel disease. *Neurology* 1995; 45: 416-421.
140. Tanno N, Koizumi M, Goto Y. The relationship between cholelithiasis and diabetes mellitus: discussion of age, obesity, hyperlipidemia and neuropathy. *Tohoku J Exp Med* 1988; 154: 11-20.

141. Harvey PR, McLeod RS, Cohen Z, Strasberg SM. Effect of colectomy on bile composition, cholesterol crystal formation, and gallstones in patients with ulcerative colitis. *Ann Surg* 1991; 214: 396-401; discussion 401-402.
142. Wongdee K, Charoenphandhu N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes* 2011; 2: 41-48.
143. Bjarnason I, Macpherson A, Mackintosh C, Buxton-Thomas M, Forgacs I, Moniz C. Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 228-233.
144. Khan N, Abbas AM, Almkhatar RM, Khan A. Prevalence and predictors of low bone mineral density in males with ulcerative colitis. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 2368-2375.
145. Navaneethan U, Shen L, Venkatesh PG, Hammel J, Patel V, Remzi FH, Kiran RP. Influence of ileal pouch anal anastomosis on bone loss in ulcerative colitis patients. *J Crohns Colitis* 2011; 5: 415-422.
146. Grainge MJ, West J, Card TR. Venous thromboembolism during active disease and remission in inflammatory bowel disease: a cohort study. *Lancet* 2010; 375: 657-663.
147. Kappelman MD, Horvath-Puho E, Sandler RS, Rubin DT, Ullman TA, Pedersen L, Baron JA, Sørensen HT. Thromboembolic risk among Danish children and adults with inflammatory bowel diseases: a population-based nationwide study. *Gut* 2011; 60: 937-943.
148. Maconi G, Bolzacchini E, Dell'Era A, Russo U, Ardizzone S, de Franchis R. Portal vein thrombosis in inflammatory bowel diseases: a single-center case series. *J Crohns Colitis* 2012; 6: 362-367.
149. Cherian SV, Khara L, Das S, Hamarneh WA, Garcha AS, Frechette V. Diabetic ketoacidosis complicated by generalized venous thrombosis: a case report and review. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012; 23: 238-240.
150. Gill GV, MacNamara G, English P. Diabetic ketoacidosis complicated by axillary vein thrombosis. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 73: 104-106.
151. Schweigart JH, Klotsas A, Schelenz S, Dhatariya K. Portal vein thrombosis despite anticoagulation in a person with diabetes. *J R Soc Med* 2005; 98: 161-163.

152. Vignali A, Fazio VW, Lavery IC, Milsom JW, Church JM, Hull TL, Strong SA, Oakley JR. Factors associated with the occurrence of leaks in stapled rectal anastomoses: a review of 1,014 patients. *J Am Coll Surg* 1997; 185: 105-113.
153. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut* 1994; 35: 360-362.
154. Rutgeerts P, Löfberg R, Malchow H, Lamers C, Olaison G, Jewell D, Danielsson A, Goebell H, Thomsen OO, Lorenz- Meyer H. A comparison of budesonide with prednisolone for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 1994; 331: 842-845.
155. Gurwitz JH, Bohn RL, Glynn RJ, Monane M, Mogun H, Avorn J. Glucocorticoids and the risk for initiation of hypoglycemic therapy. *Arch Intern Med* 1994; 154: 97-101.
156. Iwamoto T, Kagawa Y, Naito Y, Kuzuhara S, Kojima M. Steroid-induced diabetes mellitus and related risk factors in patients with neurologic diseases. *Pharmacotherapy* 2004; 24: 508-514.
157. Jenkins D, Balsitis M, Gallivan S et al. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative. *J Clin Pathol* 1997; 50: 93-105
158. Geboes K, Riddell R, Ost A, Jensfelt B, Persson T, Lofberg R. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis (comment). *Gut* 2000; 47: 404-09.
159. Moran CP, Neary B, Doherty GA. Endoscopic evaluation in diagnosis and management of inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Endosc.* 2016 Dec 16. 8(20):723-32.
160. Fernando Magro, Paolo Gionchetti, Rami Eliakim, Sandro Ardizzone, Alessandro Armuzzi, Manuel Barreiro-de Acosta, Johan Burisch, Krisztina B. Gece, Ailsa L. Hart, Pieter Hindryckx, Cord Langner, Jimmy K. Limdi, Gianluca Pellino, Edyta Zagórowicz, Tim Raine, Marcus Harbord, Florian Rieder, for the European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO]; Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis* 2017 jjx008. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx008

161. Gomollón F, García-López S, Sicilia B, Gisbert JP, Hinojosa J, Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa. Therapeutic guidelines on ulcerative colitis: a GRADE methodology based effort of GETECCU. *Gastroenterol y Hepatol.* 2013; 36: 104-114.
162. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2462-2476.
163. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, Geboes K, Hanauer SB, Irvine EJ et al. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 763-786.
164. M Katičić. Indeksi aktivnosti upalnih bolesti crijeva. *Acta Med Croatica* 2013; 67: 93-110.
165. Heidenhain M. Noch einmal uber die darstellung der centralkorper durch eishamatoxylin nebst einigen allgemeinen bemerkungen uber die hamatoxylinfarben. *Z Wiss Mikrosk* 1896; 13: 186.
166. Gurr AB. Biological staining methods. *Hopkin and Williams Chadowell Heath* 1976.
167. Geboes K, Riddell R, Ost A, Jensfelt B, Persson T, Lofberg R. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis (comment). *Gut* 2000; 47: 404-09.
168. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Dutt S, Herd ME. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 1991; 32: 174-8.
169. Heilmann RM, Cranford SM, Ambrus A, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of canine S100A12. *Vet Clin Pathol.* 2016; 45: 135-47.
170. Prakash N, Stumbles P, Mansfield C. Initial Validation of Cytokine Measurement by ELISA in Canine Feces. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2013; 3: 282-288.
171. Jovanovic M, Zdravkovic N, Jovanovic I, Radosavljevic G, Gajovic N, Zdravkovic N, Maric V, Arsenijevic N. TGF- β as a marker of ulcerative colitis and disease severity. *Ser J Exp Clin Res* DOI: 10.1515/sjecr-2017-0019

172. Zdravkovic N, Pavlovic M, Radosavljevic G, Jovanovic M, Arsenijevic A, Zdravkovic N, Maric V, Loncarevic S, Srzentic Z, Jovanovic I. Serum levels of immunosuppressive cytokines and tumor markers in metastatic colorectal carcinoma. *JBUON* 2017; 22: 1-8
173. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Kosic M, Mitrovic S, Milosavljevic M, Besra G, Trajkovic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Gal-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL- β in macrophages. *J Crohns Colitis* 2016; 10: 593-606.
174. Jovanovic I, Pejnovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Milovanovic M, Arsenijevic N, Lukic M. Interleukin-33/ST2 Axis Promotes Breast Cancer Growth and Metastases by Facilitating Intratumoural Accumulation of Immunosuppressive and Innate Lymphoid Cells. *Int J Cancer* 2014; 134:1669-1682.
175. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Lisnic Juranic V, McKenzie ANJ, Arsenijevic N, Jonjic S. and Lukic ML. ST2 Deletion Enhances Innate and Acquired Immunity to Murine Mammary Carcinoma. *Eur J Immunol* 2011; 41:1902-1912.
176. Jovicic N, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. *PLoS One* 2015; 10: e0134089.
177. Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Gajovic NM, Arsenijevic NN, Conlon JM, Lukic ML. The frog skin host-defense peptide frenatin 2.1S enhances recruitment, activation and tumoricidal capacity of NK cells. *Peptides* 2017; 93: 44-50.
178. N.D. Zdravkovic, I.P. Jovanovic, G.D. Radosavljevic, A.N. Arsenijevic, N.D. Zdravkovic, S.Lj. Mitrovic, N.N. Arsenijevic. Potential Dual Immunomodulatory Role of VEGF in Ulcerative Colitis and Colorectal Carcinoma. *Int J Med Sci* 2014; 11: 936-947.
179. Paul L. Huang A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2009; 2: 231-237.
180. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2017. *Diab Care* 2017; 40: S11
181. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 126: 1620-1633.

182. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 367-377.
183. Kanneganti TD, Dixit VD. Immunological complications of obesity. *Nat Immunol* 2012; 13: 707-712.
184. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 2009; 15: 921-929.
185. Bremer AA, Jialal I. Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. *J Obes* 2013; 2013: 393192.
186. Bremer AA, Devaraj S, Afify A, Jialal I. Adipose tissue dysregulation in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1782-1788.
187. Bandaru P, Rajkumar H, Nappanveettil G. The impact of obesity on immune response to infection and vaccine: an insight into plausible mechanisms. *Endocrinol Metab Syndr* 2013; 2: 2.
188. Sheridan PA, Paich HA, Handy J, Karlsson EA, Hudgens MG, Sammon AB, Holland LA, Weir S, Noah TL, Beck MA. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *Int J Obes (Lond)* 2012; 36: 1072-1077.
189. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Rood J, Kumar KG, Butler AA, Dixit VD. Obesity accelerates thymic aging. *Blood* 2009; 114: 3803-3812.
190. Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 2004; 110: 1564-1571.
191. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 2009; 15: 930-939.
192. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140: 883-899.
193. Cortez M, Carmo LS, Rogero MM, Borelli P, Fock RA. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF-alpha production by increasing NF-kappaB and attenuating PPAR-

- gamma expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation* 2013; 36: 379-386.
194. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 2014; 505: 327-334.
195. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 2009; 460: 259-263.
196. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble JM, Greenway F, Stephens JM, Mynatt RL, Dixit VD. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol* 2010; 185: 1836-1845.
197. Weitman ES, Aschen SZ, Farias-Eisner G, Albano N, Cuzzone DA, Ghanta S, Zampell JC, Thorek D, Mehrara BJ. Obesity impairs lymphatic fluid transport and dendritic cell migration to lymph nodes. *PLoS One* 2013; 8: e70703.
198. Maciver NJ, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Coloff JL, Rathmell JC. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 949-957.
199. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 371-379.
200. Yang R, Barouch LA. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ Res* 2007; 101: 545-559.
201. Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol* 1996; 6: 1170-1180.
202. Chandra RK. Cell-mediated immunity in genetically obese C57BL/ 6J ob/ob mice. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 13-16.
203. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002; 110: 1093-1103.

204. Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, Ritter MA, Lechler RI, Bloom SR. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J Clin Invest* 1999; 104: 1051-1059.
205. Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta* 2007; 380: 24-30.
206. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006; 177: 5852-5860.
207. Gad M. Regulatory T cells in experimental colitis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 293: 179-208.
208. Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, Isozaki K, Kitamura S, Kondo S, Miyagawa J, Kanayama S, Shinomura Y, Ishikawa H, Ohtani T, Nezu R, Nagata S, Matsuzawa Y. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut* 1998; 43: 48-55.
209. O'Rourke RW, Kay T, Scholz MH, Diggs B, Jobe BA, Lewinsohn DM, Bakke AC. Alterations in T-cell subset frequency in peripheral blood in obesity. *Obes Surg* 2005; 15: 1463-1468.
210. van der Weerd K, Dik WA, Schrijver B, Schweitzer DH, Langerak AW, Drexhage HA, Kiewiet RM, van Aken MO, van Huisstede A, van Dongen JJ, et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes* 2012; 61: 401-408.
211. Ho JE, Liu C, Lyass A, Courchesne P, Pencina MJ, Vasan RS, Larson MG, Levy D. Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60: 1249-1256.
212. de Boer RA, van Veldhuisen DJ, Gansevoort RT, Muller Kobold AC, van Gilst WH, Hillege HL, Bakker SJ, van der Harst P. The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population. *J Intern Med* 2012; 272: 55-64.
213. van der Velde AR, Gullestad L, Ueland T, Aukrust P, Guo Y, Adourian A, Muntendam P, van Veldhuisen DJ, de Boer RA. Prognostic value of changes in galectin-3 levels over time in patients with heart failure: data from CORONA and COACH. *Circ Heart Fail* 2013; 6: 219-226.

214. Barrow H, Rhodes JM, Yu LG. Simultaneous determination of serum galectin-3 and -4 levels detects metastases in colorectal cancer patients. *Cell Oncol (Dordr)* 2013; 36: 9-13.
215. Vereecken P, Awada A, Suci S, Castro G, Morandini R, Litynska A, Lienard D, Ezzedine K, Ghanem G, Heenen M. Evaluation of the prognostic significance of serum galectin-3 in American Joint Committee on Cancer stage III and stage IV melanoma patients. *Melanoma Res* 2009; 19: 316-320.
216. McCullough PA, Olobatoke A, Vanhecke TE. Galectin-3: a novel blood test for the evaluation and management of patients with heart failure. *Rev Cardiovasc Med* 2011; 12: 200-210.
217. Bobronnikova. Galectin-3 as a potential biomarker of metabolic disorders and cardiovascular remodeling in patients with hypertension and type 2 diabetes. *Vessel Plus* 2017; 1: 61-7.
218. Seferovic JP, Lalic NM, Floridi F, Tesic M, Seferovic PM, Giga V, Lalic K, Jotic A, Jovicic S, Colak E, Salerno G, Cardelli P, Di Somma S. Structural myocardial alterations in diabetes and hypertension: the role of galectin-3. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: 1499-1505.
219. Yilmaz H, Cakmak M, Inan O, Darcin T, Akcay A. Increased levels of galectin-3 were associated with prediabetes and diabetes: new risk factor? *J Endocrinol Invest* 201; 38: 527-533.
220. de Boer RA, van Veldhuisen DJ, Gansevoort RT et al. The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population. *Journal of Internal Medicine* 2012; 272: 55-64.
221. Ho JE, Liu C, Lyass A et al. Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; 60: 1249-1256.
222. Acar S, Paketçi A, Küme T, Tuhan H, Gürsoy Çalan Ö, Demir K, Böber E, Abacı A. Serum galectin-1 levels are positively correlated with body fat and negatively with fasting glucose in obese children. *Peptides*. 2017; 95: 51-56.
223. Fryk E, Sundelin JP, Strindberg L, Pereira MJ, Federici M, Marx N, Nyström FH, Schmelz M, Svensson PA, Eriksson JW, Borén J, Jansson PA. Microdialysis and

- proteomics of subcutaneous interstitial fluid reveals increased galectin-1 in type 2 diabetes patients. *Metabolism*. 2016; 65: 998-1006.
224. Liu X, Feng Q, Chen Y, Zuo J, Gupta N, Chang Y, Fang F. Proteomics-based identification of differentially-expressed proteins including galectin-1 in the blood plasma of type 2 diabetic patients. *J Proteome Res*. 2009; 8: 1255-1262.
225. Müller S, Schaffer T, Flogerzi B, Fleetwood A, Weimann R, Schoepfer AM, et al. Galectin-3 modulates T cell activity and is reduced in the inflamed intestinal epithelium in IBD. *Inflammatory Bowel Diseases* 2006; 12: 588-597.
226. Frol'ová L, Smetana K Jr, Borovská D, Kitanovicová A, Klimesová K, Janatková I, et al. Detection of galectin-3 in patients with inflammatory bowel diseases: new serum marker of active forms of IBD? *Inflammation Research* 2009; 58: 503-512.
227. Brazowski E, Dotan I, Tulchinsky H, Filip I, Eisenthal A. Galectin-3 expression in pouchitis in patients with ulcerative colitis who underwent ileal pouchanal anastomosis (IPAA). *Pathology Research and Practice* 2009; 205: 551-558.
228. Mathieu A, Nagy N, Decaestecker C, Ferdinande L, Vandenbroucke K, Rottiers P, Cuvelier CA, Salmon I, Demetter P. Expression of galectins-1, -3 and -4 varies with strain and type of experimental colitis in mice. *Int J Exp Pathol* 2008; 89: 438-446.
229. Frol'ová L, Smetana K Jr, Borovská D, Kitanovicová A, Klimesová K, Janatková I, Malícková K, Lukás M, Drastich P, Benes Z, Tucková L, Manning JC, André S, Gabius HJ, Tlaskalová-Hogenová H. Detection of galectin-3 in patients with inflammatory bowel diseases: new serum marker of active forms of IBD? *Inflamm Res* 2009; 58: 503-512.
230. Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, et al. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *Journal of Immunology* 1998; 160: 4831-4840.
231. Simovic Markovic B, Jovanovic I, Volarevic V, Zdravkovic N, Jovanovic M, Zdravkovic N, Maric V, Arsenijevic N and Lukic ML. Potential inversely immunomodulatory roles of Galectin-1 and Galectin-3 in ulcerative colitis. *Wulfenia journal* 2016; 29: 188-205.
232. Krane V, Wanner C. The metabolic burden of diabetes and dyslipidaemia in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17 Suppl 11: 23-7.

233. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006; 114: 597-605.
234. Nomoto K, Tsuneyama K, Abdel Aziz HO, Takahashi H, Murai Y, [Cui ZG](#), [Fujimoto M](#), [Kato I](#), [Hiraga K](#), [Hsu DK](#), [Liu FT](#), [Takano Y](#). Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice. *J Pathol*. 2006; 210: 469-477.
235. Chen HY, Fermin A, Vardhana S, Weng IC, Lo KF, Chang EY et al. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 14496-14501.
236. G. Radosavljevic, I. Jovanovic, I. Majstorovic, M. Mitrovic, V. Juranic Lisnic, N. Arsenijevic, S. Jonjic, ML. Lukic. Deletion of Galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis* 2011; 28(5): 451-462.
237. Lippert E, Stieber-Gunckel M, Dunger N, Falk W, Obermeier F, Kunst C. Galectin-3 Modulates Experimental Colitis. *Digestion* 2015; 92: 45-53.
238. Tsai HF, Wu CS, Chen YL, Liao HJ, Chyuan IT, Hsu PN6. Galectin-3 suppresses mucosal inflammation and reduces disease severity in experimental colitis. *Journal of Molecular Medicine (Berl)* 2016; 94: 545-556.
239. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1572: 263-273.
240. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1673: 75-93.
241. Sano H, [Hsu DK](#), [Apgar JR](#), [Yu L](#), [Sharma BB](#), [Kuwabara I](#), [Izui S](#), [Liu FT](#). Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest*. 2003; 112: 389-397.
242. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K and et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597-598
243. D'Haene N, Sauvage S, Maris C, Adanja I, Le Mercier M, Decaestecker C, Baum L and Salmon I. VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis. *PLoS One* 2013; 8: e67029

244. Suzuki O and Abe M. Galectin-1-mediated cell adhesion, invasion and cell death in human anaplastic large cell lymphoma: regulatory roles of cell surface glycans. *Int J Oncol* 2014; 44: 1433-1442
245. Almkvist, J. and Karlsson, A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj. J.* 2004; 19: 575-581
246. Blaser, C, Kaufmann, M, Muller, C, Zimmermann, C, Wells, V, Mallucci, L, and Pircher, H. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 2311-2319
247. He, J. and Baum, L.G. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 4705-4712
248. Allione, A, Wells, V, Forni, G, Mallucci, L, and Novelli, F. Betagalactoside-binding protein (beta GBP) alters the cell cycle, upregulates expression of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor, and triggers IFN-gamma-mediated apoptosis of activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 1998; 161: 2114-2119
249. Baum, L.G, Blackall, DP, Arias-Magallano, S, Nanigian, D, Uh, SY, Browne, JM, Hoffmann, D, Emmanouilides, CE, Territo, MC, and Baldwin, GC. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin. Immunol.* 2003; 109: 295-307
250. Santucci, L, Fiorucci, S, Rubinstein, N, Mencarelli, A, Palazzetti, B, Federici, B, Rabinovich, GA, and Morelli, A. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology.* 2003; 124: 1381-1394
251. van der Leij, J, van den Berg, A, Blokzijl, T, Harms, G, van Goor, H, Zwiers, P, van Weeghel, R, Poppema, S, and Visser, L. Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J. Pathol.* 2004; 204: 511-518
252. van den Brule, FA, Waltregny, D, and Castronovo, V. Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J. Pathol* 2001; 193: 80-87
253. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006; 16: 137-157
254. Offner H, Celnik B, Bringman TS, Casentini-Borocz D, Nedwin GE, Vandenberg AA. Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and

- histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* 1990; 28: 177-184.
255. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, et al. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 190: 385-398.
256. Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, Bianco GA, Liberman A, Serra HM, et al. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *Journal of Immunology* 2006; 176: 6323-6332.
257. Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, Federici B, Morelli A. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2000; 31: 399-406.
258. Perone MJ, Bertera S, Tawadrous ZS, Shufesky WJ, Piganelli JD, Baum LG, et al. Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. *Journal of Immunology* 2006; 177: 5278-5289.
259. Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, Federici B, et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1381-1394.
260. Muglia CI, Papa Gobbi R, Smaldini P, Orsini Delgado L, Candia M, Zanuzzi C, et al. Inflammation Controls Sensitivity of Human and Mouse Intestinal Epithelial Is to Galectin-1. *Journal of Cellular Physiology* 2016; 231: 1575-1585.
261. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005; 23: 479-490.
262. Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol*. 2016;17:122-131.
263. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:103-110.
264. Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, K uchler AM. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol*. 2009;30:227-33.

265. Sweet MJ, Leung BP, Kang G, Sogaard M, Schulz K, Trajković V et al. A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol.* 2001;166:6633-6639.
266. Trajkovic V, Sweet MJ, Xu D. T1/ST2—an IL-1 receptor-like modulator of immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2004;15:87-95.
267. Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T Cells. *J Exp Med.* 1998;187:787-794.