

Presječno istraživanje koncentracije grelina, leptina i proupalnih citokina u serumu bolesnika s upalnim bolestima crijeva

Barišić, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:203537>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Barišić

**Presječno istraživanje koncentracije
grelina, leptina i proupalnih citokina u
serumu bolesnika s upalnim bolestima
crijeva**

DISERTACIJA



Zagreb, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Barišić

**Presječno istraživanje koncentracije
grelina, leptina i proupalnih citokina u
serumu bolesnika s upalnim bolestima
crijeva**

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju, Odjelu za kliničku prehranu te u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Željko Krznarić

Posveta:

Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima koji su me pratili na putu prema doktoratu znanosti.

Bez njihove bezuvjetne ljubavi, podrške i svakodnevnih odricanja, ova disertacija nikad ne bi bila napisana.

Zahvala:

Zahvaljujem svom mentoru i učitelju, prof. dr. sc. Željku Krznariću na povjerenju, višegodišnjoj podršci i strpljenju, kao i konstruktivnim savjetima i pomoći u izradi doktorske disertacije.

Neizmjernu zahvalnost dugujem kolegicama Centra za prehranu i medicinskim sestrama Dnevne bolnice Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju na nesebičnoj pomoći i podršci.

Zahvaljujem kolegicama i kolegama iz Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju KBC Zagreb i inženjerki Ani Kozmar koji su mi pomogli, svatko na svoj način, u izradi doktorske disertacije.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci i neizmornoj vjeri u moj uspjeh. Naposljetku, hvala Anti koji je bio moj najveći motivator.

SADRŽAJ

- popis oznaka i kratica

1	UVOD.....	1
1.1.	Upalne bolesti crijeva.....	1
1.1.1.	<i>Ulcerozni kolitis.....</i>	1
1.1.2.	<i>Crohnova bolest.....</i>	1
1.2.	Epidemiologija upalnih bolesti crijeva.....	2
1.3.	Etiologija i patogeneza upalnih bolesti crijeva.....	3
1.3.1.	<i>Genetski faktori.....</i>	3
1.3.2.	<i>Crijevana mikrobiota.....</i>	4
1.3.3.	<i>Okolišni čimbenici.....</i>	4
1.3.4.	<i>Poremećaj imunološkog odgovora.....</i>	5
1.4.	Klinički, endoskopski i laboratorijski indeksi aktivnosti bolesti.....	9
1.4.1.	<i>Klinički indeksi.....</i>	9
1.4.2.	<i>Endoskopski indeksi.....</i>	11
1.4.3.	<i>Laboratorijski indeksi.....</i>	12
1.5.	Uloga biomarkera u upalnim bolestima crijeva.....	14
1.5.1.	<i>Interleukin-6.....</i>	15
1.5.2.	<i>Čimbenik tumorske nekroze.....</i>	17
1.5.3.	<i>Grelin.....</i>	19
1.5.4.	<i>Leptin.....</i>	21
1.6.	Liječenje upalnih bolesti crijeva.....	24
1.6.1.	<i>Konvencionalna terapija.....</i>	24
1.6.2.	<i>Biološka terapija.....</i>	26
1.7.	Nutritivni status bolesnika s upalnim bolestima crijeva.....	27
2	HIPOTEZA.....	30
3	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	31
4	ISPITANICI I METODE.....	32
4.1.	Ispitanici.....	32
4.2.	Metode.....	33
4.2.1.	<i>Standardne laboratorijske metode.....</i>	34
4.2.2.	<i>Imunoenzimske metode (ELISA).....</i>	35

4.2.3. Metode procjene nutritivnog statusa.....	36
4.3. Statistička obrada podataka.....	37
5 REZULTATI	39
5.1. Kliničko-laboratorijski pokazatelji ispitanika.....	39
5.2. Koncentracije ispitivanih biomarkera u serumu.....	46
5.3. Povezanost koncentracije ispitivanih biomarkera s laboratorijskim markerima aktivnosti bolesti.....	49
5.4. Povezanost koncentracije ispitivanih biomarkera s kliničkim indeksima aktivnosti bolesti.....	52
5.5. Povezanost koncentracije ispitivanih biomarkera s endoskopskom aktivnosti bolesti.....	55
5.6. Povezanost koncentracije ispitivanih biomarkera s nutritivnim statusom.....	56
5.7. Koncentracije serumskih razina grelina, lepina i proupalnih citokina kod bolesnika koji primaju različite modalitete terapije.....	59
6 RASPRAVA.....	63
7 ZAKLJUČAK.....	71
8 SAŽETAK.....	72
9 SUMMARY.....	73
10 LITERATURA.....	74
11 ŽIVOTOPIS.....	99

POPIS OZNAKA I KRATICA

ADAM17	<i>ADAM metallopeptidase domain 17</i> , engl.
ALT	alanin aminotransferaza
ALP	alkalna fosfataza
ARH	arkuatna jezgra hipotalamusa
ASCA	anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> protutijela
AST	aspartat aminotransferaza
ATG16L1	protein vezan uz autofagiju (<i>autophagy related 16 like 1</i> , engl.)
BIA	analiza bioelektrične bioimpedance (<i>Bioelectrical Impedance Analysis</i> , engl.)
BM	masa kostiju (<i>bone mass</i> , engl.)
BMR	bazalni metabolizam (<i>basal metabolic rate</i> , engl.)
CART	kokain i amfetamin regulirani transkript
CD	Crohnova bolest (<i>Crohn's disease</i> , engl.)
CDAI	<i>The Crohn's Disease Activity Index</i> , engl.
CDEIS	<i>Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity</i> , engl.
CLR	lektin receptor C-tipa (<i>C-type lectin receptor</i> , engl.)
CRP	C- reaktivni protein
CT	kompjutorizirana tomografija
DAMP	<i>Damage associated patterns</i> , engl.
DXA	denzitometrija
ECCO	<i>European Crohn Colitis Organisation</i> , engl.
ELISA	enzimski povezani imunosorbentni test (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , engl.)
FM	masa masnog tkiva (<i>fat mass</i> , engl.)
FFM	masa nemasnog tkiva (<i>fat-free mass</i> , engl.)
FMI	indeks mase masnog tkiva (<i>fat mass index</i> , engl.)
Fox3p	<i>forkhead box P3</i> , engl.
GATA3	GATA vezajući protein (<i>GATA binding protein 3</i> , engl.)
GGT	gama-glutamilttransferaza
GHRH	hormon koji oslobađa hormon rasta (<i>growth hormone releasing hormone</i> , engl.)

GHS-R	receptor sekretagoga hormona rasta
GRLN-R	grelin receptor
GUK	glukoza u krvi
GWAS	asocijacijske studije s obuhvaćanjem cijelog genoma (<i>genome-wide association study</i> , engl.)
HBI	Harvey-Bradshaw indeks
HDL	lipoprotein visoke gustoće (<i>High-density lipoprotein cholesterol</i> , engl.)
UBC	upalne bolesti crijeva (<i>Inflammatory bowel disease</i> , engl.)
IBS	sindrom iritabilnog crijeva (<i>Irritable bowel syndrome</i> , engl.)
IES	intestinalne epitelne stanice
IL	interleukin
IL-6R	interleukin-6 receptor
IFN	interferon
IRGM	protein iz M porodice GTP-aza povezan s imunitetom (<i>immunity-related GTPase family M protein</i> , engl.)
ITM	indeks tjelesne mase
JAK	Janus kinaza
KS	Kolmogorov–Smirnov test
LDL	lipoproteini male gustoće (<i>low-density lipoprotein cholesterol</i> , engl.)
JAK/STAT	<i>Janus kinase-signal transducer and activator of transcription</i> , engl.
LeptR1-f	leptinski receptor 1-f
MAdCAM-1	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i> , engl.
MCV	srednji volumen eritrocita
MES	<i>Mayo Endoscopic Score</i> , engl.
MHC	glavni kompleks histokompatibilnosti (<i>major histocompatibility complex</i> , engl.)
MM	masa mišićnog tkiva (<i>muscle mass</i> , engl.)
MRI	magnetska rezonanca
mRNK	glasnička ribonukleinska kiselina
MS	<i>Mayo score</i> , engl.
MUAC	opseg nadlaktice (<i>middle upper arm circumference</i> , engl.)

mWAT	mezenterijsko bijelo masno tkivo (<i>mesenteric white adipose tissue</i> , engl.)
NF-κB	nuklearni faktor κB (<i>nuclear factor kappa-light-chain-B</i> , engl.)
NK stanice	prirodnoubilačke stanice (<i>natural killer</i> , engl.)
NOD	nukleotid-vezujuća oligomerizacijska domena (<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> , engl.)
NRS-2002	<i>Nutrition Risk Screening 2002</i> , engl.
NSAR	nesteroidni antireumatici
PAMP	molekularni uzorci povezani s patogenima mikroba (<i>pathogen-associated molecular patterns</i> , engl.)
pANCA	perinuklearna antineutrofilna citoplazmatska protutijela
PCR	polimerazna lančana reakcija (<i>polymerase chain reaction</i> , engl.)
PDAI	<i>Perianal Disease Activity Index</i> , engl.
PGA	liječnikova globalna procjena (<i>Physician Global Assessment</i> , engl.)
PI3Ks	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i> , engl.
PMS	Parcijalni Mayo indeks (<i>Partial Mayo Score</i> , engl.)
POMC	proopiomelanokortni prohormon
PPA- γ	selektivni peroksisom proliferator aktivirani ligand gama
PPAR-γ	selektivni peroksisom proliferator aktivirani receptor gama (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> , engl.)
RLR	retinoičnom kiselinom inducibilni receptor (<i>retinoic acid-inducible gene 1-like receptor</i> , engl.)
RIA	<i>Radioimmunoesej (radioimmunoassay</i> , engl.)
SCCAI	<i>Simple Colitis Clinical Activity Index</i> , engl.
SE	sedimentacija eritrocita
SES-CD	<i>Simple Endoscopic Score for Crohn's disease</i> , engl.
SMAD7	<i>Small mothers against decapentaplegic homolog 7</i> , engl.
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (<i>single-nucleotide polymorphism</i> , engl.)
STAT	signalni prijenosnik i aktivator transkripcije proteina (<i>signaling transducer and activator of transcription</i> , engl.)
TACE	<i>TNFα converting enzyme</i> , engl.
TBW	ukupna tjelesna voda (<i>total body water</i> , engl.)

TIBC	ukupni kapacitet vezanja željeza (<i>total iron binding capacity</i> , engl.)
TLR	Tollu-sličan receptor (<i>toll like receptor</i> , engl.)
TNF-α	čimbenik tumorske nekroze alfa (<i>Tumor necrosis factor α</i> , engl.)
TNFR1	receptor čimbenika tumorske nekroze alfa (<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i> , engl.)
T reg	regulacijski limfociti
TW	Truelove and Witts' kriteriji (<i>Truelowe and Witts' criteria</i> , engl.)
UC	ulcerozni kolitis (<i>ulcerative colitis</i> , engl.)
UCEIS	<i>Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity</i> , engl.
UIBC	nezasićeni kapacitet vezanja željeza (<i>Unsaturated Iron Binding Capacity</i> , engl.)
VFR	stopa visceralnog masnog tkiva (<i>visceral fat rate</i> , engl.)
5-ASA	5-aminosalicilati
6-TG	6-tiogvanin nukleotid

1 UVOD

1.1. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva (UBC, engl. *inflammatory bowel disease*) kronične su upalne bolesti gastrointestinalnog sustava nepoznate etiologije. Uključuju Crohnovu bolest (CD) i ulcerozni kolitis (UC), dok u oko 10 % bolesnika nije moguće sa sigurnošću odrediti o kojem se obliku bolesti radi te tada govorimo o neklasificiranoj upalnoj bolesti crijeva. Slično kao i kod drugih imunološki posredovanih kroničnih bolesti, kao što je primjerice reumatoidni artritis, UBC karakteriziraju periodi remisije i relapsa bolesti. Iako je prevalencija upalnih bolesti crijeva najviša u zapadnim zemljama, porast incidencija bilježi se i u zemljama Azije, Srednjeg istoka, Afrike i Južne Amerike. Kako se radi o bolestima sklonim relapsima koje se često javljaju u mlađoj životnoj dobi te mogu dovesti do po život opasnih komplikacija, UBC predstavlja značajan javnozdravstveni problem.

1.1.1. Ulcerozni kolitis

Ulcerozni kolitis karakteriziran je upalnim procesom koji uvijek zahvaća rektum (proktitis), a može se širiti kontinuirano proksimalnije, dok u nekim slučajevima može zahvatiti i cijeli kolon (pankolitis). Upalni proces je ograničen na sluznicu, a dublji slojevi crijevne stijenke su pošteđeni. Upalne stranice infiltriraju laminu propriju i kripte, a karakteristično je i formiranje kriptalnih apscesa. Vrčaste stanice gube mucin, a u dugotrajnoj bolesti žlijezde postaju deformirane. Ukoliko se radi o dugotrajnoj bolesti, crijevo je skraćeno i dolazi do razvoja postupalnih pseudopolipa.

1.1.2. Crohnova bolest

Crohnovu bolest karakterizira transmuralna upala koja može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava od usne šupljine do anusa. Prema redoslijedu učestalosti lokalizirana je u terminalnom ileumu i desnom kolonu, samo u kolonu, samo u terminalnom ileumu, ileumu i jejunumu. Za CD karakteristično je da se radi o diskontinuiranoj upali, pri čemu je upalni proces isprekidan područjima zdrave sluznice, čime nastaju takozvane „skip“ lezije karakteristične za bolest. Kako se radi o transmuralnoj upali, može doći do penetracije kroz stijenku crijeva i stvaranja apscesa ili fistula između crijeva, mokraćnog mjehura, maternice, rodnice ili kože

perineuma. Histološkom analizom prikazuje se zadebljana stijenka crijeva s kroničnim upalnim infiltratom kroz sve slojeve, a za CD karakteristično je i formiranje granuloma bez kazeozne nekroze.

1.2. Epidemiologija upalnih bolesti crijeva

Podaci iz najnovijih epidemioloških istraživanja pokazuju kako je incidencija upalnih bolesti crijeva u porastu u novoindustrijaliziranim zemljama, dok se u posljednjih nekoliko godina incidencija stabilizirala u zemljama zapadnog svijeta (1-3). Osim toga, porast incidencije se bilježi i među etničkim skupinama i nacionalnostima kod kojih upalne bolesti ranije nisu bile uobičajene (3). Podaci EpiCom skupine pokazuju kako incidencija CD u Europi iznosi od 0.5 do 10.6 slučajeva na 100 000 osoba godišnje, dok za UC ona varira od 0.9 do 24.3 na 100 000 osoba godišnje (4).

S obzirom na kroničnu prirodu bolesti, ranu pojavnost i relativno nizak mortalitet udružen s upalnim bolestima crijeva, prevalencija upalnih bolesti značajno raste sukladno starenju populacije i globalnom porastu incidencije bolesti.

Tako noviji podaci govore kako je 2017. globalno zabilježeno 6.8 milijuna slučajeva upalnih bolesti crijeva. Dobno standardizirana stopa prevalencije 2017. godine iznosila je 84.3 slučajeva na 100 000 stanovnika, dok je dobno standardizirana stopa smrtnosti iznosila 0.51 na 100 000 stanovnika. Najviša stopa dobno standardizirane prevalencije zabilježena je u Sjevernoj Americi (422.0 na 100 000 stanovnika), a promatramo li nacije, Sjedinjene Američke Države imaju najvišu stopu prevalencije (464.5 na 100 000 stanovnika), nakon čega slijedi Ujedinjeno Kraljevstvo (449.6 slučajeva na 100 000 stanovnika). U područjima s višim sociodemografskim indeksom, zabilježene su više stope dobno standardizirane prevalencije, dok područja s nižim sociodemo-grafskim indeksom imaju najniže stope dobno standardizirane prevalencije (5).

Iako se UBC može javiti u bilo kojoj životnoj dobi, vršak pojavnosti CD je u dobi između 20 i 30 godina, a UC između 30 i 40 godina. Ranije se govorilo o bimodalnoj distribuciji upalnih bolesti crijeva, s drugim vrškom između 60 i 70 godina, osobito u bolesnika s UC-om, međutim kasnije studije nisu to potvrdile (6-9).

Rezultati ranijih istraživanja pokazuju kako se UC podjednako javlja i u muškaraca i žena, dok su rezultati istraživanja za CD manje konzistentni, pa je tako u pojedinim kohortama ipak viša incidencija zabilježena u žena (10). Rezultati združenih analiza

populacijskih studija pokazuju kako upravo u pojedinim dobnim skupinama postoji razlika u incidenciji među spolovima. Žene imaju niži rizik za razvoj CD-a u djetinjstvu, do dobi od 10 do 14 godina, a taj rizik je viši u dobnim skupinama od 25 do 29 i u žena starijih od 35. Što se tiče incidencije UC, ona je podjednaka kod muškarca i žena (osim u dobnoj skupini od 5 do 9 godina) sve do 45 godina, nakon čega muškarci imaju višu incidenciju UC u odnosu na žene (11).

1.3. Etiologija i patogeneza upalnih bolesti crijeva

Etiologija upalnih bolesti crijeva još uvijek je nepoznata. Patogeneza upalnih bolesti crijeva uključuje interakciju genetskih faktora, crijevne mikrobiote, okolišnih čimbenika i poremećenog imunološkog odgovora (12).

1.3.1. Genetski faktori

Asocijacijske studije koje obuhvaćaju čitav genom (engl. *genome wide association studies*, GWAS), nove generacije sekvenciranja i druge metode, detektirale su više od 240 rizičnih genetskih lokusa, od kojih je oko 30 genetskih lokusa zajedničko CD i UC (13). Analize gena i genetskih lokusa identificiranih u upalnim bolestima crijeva upućuju na to da je nekoliko puteva važno u održavanju intestinalne homeostaze, kao što su epitelna barijera, urođena sluznička obrana, imunoregulacija migracije stanica, autofagija, stečeni imunitet i metabolički putevi udruženi sa staničnom homeostazom (13-15).

Najpoznatija genetska mutacija povezana s razvojem CD u bijelaca je mutacija NOD2 gena (16). NOD2 polimorfizmi dovode do oštećenog odgovora na prepoznavanje bakterijskih peptidoglikana te se smatra da poremećena funkcija NOD2 proteina dovodi do kronične stimulacije proizvodnje proupalnih citokina. Pojedine varijante (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC) udružene su s povišenim rizikom za razvoj ilealne i ileokoloničke bolesti. Ono što je zanimljivo da su te mutacije udružene sa specifičnim fenotipom bolesti, kao što su mlađa životna dob pri pojavi bolesti i fibrostenozirajući fenotip (16-21).

Genetske analize su pokazale kako u imunološkom odgovoru važnu ulogu ima i autofagija te su otkrile dva gena povezana s autofagijom – ATG16L1 i IRGM (22). Značajna povezanost dokazana je i između UBC-a i IL23R gena (22). Drugi

susceptibilni geni koji reguliraju imunološke funkcije uključuju CARD9, IL1R2, REL, SMAD3 I PRDM1 (22).

1.3.2. Crijevna mikrobiota

Ljudsko tijelo kolonizirano je trilijunima mikroorganizama. Crijevo sadrži 1000 - 5000 različitih vrsta, a 90 % vrsta čine bakterije iz koljena *Bacteroidates* i *Firmicutes*. Smatra se kako je za nastanak upalnih bolesti crijeva odgovoran abnormalni imunološki odgovor domaćina na crijevnu mikrobiotu. Upravo je crijevna mikrobiota prepoznata kao glavni okolišni okidač za UBC (23-25). Mikrobna zajednica koja je nastanjena u probavnom sustavu sudjeluje u nizu fizioloških procesa u domaćina, pa tako ima važnu ulogu u digestivnim i metaboličkim funkcijama, regulaciji epitelne barijere, razvoju i regulaciji imunološkog sustava domaćina i zaštiti od kolonizacije patogena (26). U bolesnika s upalnim bolestima crijeva, zapažena je smanjena raznolikost i poremećena ravnoteža crijevne mikrobiote (disbioza), odnosno smanjenje količine bakterija s protuupalnim djelovanjem, a povišenje količina bakterija s proupalnim djelovanjem. Najčešće zabilježene promjene uključuju smanjenje broja bakterija iz koljena *Firmicutes*, a povećan broj koljena *Proteobacteria* i *Bacteroidates*. Osim toga, broj bakterija koje proizvode kratko lančane masne kiseline (primjerice *Faecalibacterium prausnitzii*) smanjen je u bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Upravo smanjena kolonizacija *F. prausnitzii* korelira s rizikom ilealne CD nakon operacije i održavanjem kliničke remisije u UC-u. S druge strane, porast *Proteobacteria*, prije svega *E. coli*, utječe na permeabilnost crijeva, mijenja raznolikost i sastav mikrobiote i inducira upalni odgovor regulacijom ekspresije upalnih gena (27). Osim toga u upalnim bolestima crijeva povećan je broj mukolitičkih bakterija, koje karakterizira sposobnost degradacije mucina (28, 29). Naposljetku, povišen broj sulfat reducirajućih bakterija (primjerice *Desulfovibrio*) rezultira produkcijom hidrogen sulfata koji oštećuje crijevnu barijeru i omogućava aktivaciju mukozne upale (30).

1.3.3. Okolišni čimbenici

Novija epidemiološka istraživanja ukazuju na to da okolišni faktori imaju važnu ulogu u patogenezi upalnih bolesti crijeva. Incidencija CD je u značajnom porastu u razvijenim zemljama u posljednjih 50 godina a porast incidencije odgovara upravo progresivnoj industrijalizaciji u nerazvijenim zemljama. Unos hrane je važan okolišni

čimbenik koji utječe na razvoj upalnih bolesti crijeva. Istraživanja su pokazala kako prehrana bogata zasićenim masnim kiselinama i procesiranim mesom također povećava rizik za razvoj upalnih bolesti crijeva, dok dijeta s visokim udjelom vlakana smanjuje rizik za razvoj CD i do 40 % (31, 32). Pušenje je također jedan od primjera čimbenika koji mogu utjecati na bolest, pa tako pušenje pogoršava CD, dok ima protektivni učinak za UC. Psihološki stres, apendektomija i pojedini lijekovi (antibiotici, NSAR, statini, oralni kontraceptivi), neki su od okolišnih čimbenika koji također mogu utjecati na razvoj UBC (33, 34).

Podaci iz novije literature sugeriraju da vitamin D ima i imunološku ulogu te može biti povezan s brojnim bolestima uključujući i UBC. Deficijencija vitamina D često se dijagnosticira kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva a pojedini autori sugeriraju kako niske razine vitamina D mogu pridonijeti povišenom riziku za razvoj bolesti (35, 36).

1.3.4. Poremećaj imunološkog odgovora

Istraživanja patogeneze upalnih bolesti crijeva su pokazala kako disfunkcija urođenih i stečenih imunoloških puteva doprinosi razvoju abnormalnog crijevnog imunološkog odgovora u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

Urođeni imunološki sustav

Urođeni imunološki sustav je prva linija obrane protiv vanjskih patogena. On omogućava brzu i nespecifičnu zaštitu domaćina. Urođeni imunološki sustav u crijevu uključuje intestinalne epitelne stanice (IES), makrofage, monocite, neutrofile, eozinofile, bazofile, dendritičke stanice i NK stanice (engl. *natural killer*). Crijevna barijera koja se sastoji od IES i prirođenih imunoloških stanica održava ravnotežu između luminalnog sadržaja i sluznice.

Sluznički sloj i crijevni epitel, koji odvajaju crijevni lumen i mukozni imunološki sustav, predstavljaju prvu fizičku i kemijsku barijeru od crijevnih bakterija, patogena i antigena hrane (37). Defekti sluzničke barijere, moguće uzrokovani okolišnim čimbenicima i/ili infekcijom, rezultiraju povećanom permeabilnosti crijeva (38, 39). Rezultati GWAS studija impliciraju da defekti epitelne barijere mogu predstavljati primarni mehanizam za razvoj upalnih bolesti crijeva, s obzirom da su detektirani susceptibilni polimorfizmi u genima koji kodiraju junkcijske proteine kao što su E-kadherin, guanin nukleotid vezajući protein alfa 12 i zonula occludens-1 (40, 41). Nadalje, defektna ekspresija antimikrobnih peptida i promjene u ekspresiji junkcijskih

proteina kao što su E-kadherin, beta-katenin i kladini nađena je u crijevnim biopsijama bolesnika s upalnim bolestima crijeva (42-46).

Intraluminalni patogeni komuniciraju s imunološkim stanicama urođenog imunološkog sustava putem niza receptora kao što su NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*, engl.), TLR (*toll like receptor*, engl.), CLR (*C-type lectin receptor*, engl.) i RLR (*retinoic acid-inducible gene 1-like receptor*, engl.) (47). Po vezanju na receptore, makrofazi i dendritične stanice prepoznaju molekularne uzorke povezane s patogenima mikroba (*PAMP-pathogen-associated molecular patterns*, engl.) te dolazi do aktivacije signalnih puteva, kao što je nuklearni faktor- κ B (NF- κ B, *nuclear factor kappa-light-chain-B*, engl.), proizvodnje proupalnih citokina, kemokina i drugih antimikrobnih peptida (47). Aktivacija makrofaga ovim citokinima dovodi do eliminacije patogena slobodnim radikalima i proteazama. Makrofazi i dendritičke stanice djeluju i kao antigen prezentirajuće stanice te tako služe kao poveznica između urođenog i stečenog imunološkog sustava.

Nadalje, u funkcioniranju prirođenog imunološkog sustava važnu ulogu ima autofagija, koja služi za zaštitu integriteta i održavanje homeostaze crijeva (16). Osnovno obilježje autofagije je dopremanje sastojaka citoplazme do lizosoma u specifičnim vakuolama s dvostrukom membranom, koje se nazivaju autofagosomima. Istraživanja su pokazala da osim dopremanja sastojaka citoplazme poput staničnih organela ili velikih proteina, autofagija sudjeluje u prirođenoj i stečenoj imunosti ograničavajući život intracelularnih patogena te sudjelujući u prezentaciji citosolnih antigena putem molekula MHC klase II. Rezultati GWAS studija koji su otkrili SNP (*single nucleotide polymorphisms*, engl.) u genima udruženim s autofagijom, doprinijeli su prepoznavanju autofagije kao jednog od faktora povezanih s etiologijom upalnih bolesti crijeva. Ranije su spomenuti lokusi koji su najčešće povezani s autofagijom.

U upalnim bolestima crijeva, povišena je lokalna proizvodnja različitih nespecifičnih upalnih medijatora, kao što su slobodni radikali, leukotrieni, kemokini i proupalni citokini.

Primjerice, IL-1 porodica citokina ima ključnu ulogu u patogenezi upalnih bolesti crijeva (48). IL-1 je ključni medijator prirođenog imuniteta i upale koja rezultira oštećenjem tkiva. Nadalje, IL-6 aktivira signalni put STAT3 i ima važnu ulogu u upalnom odgovoru (49, 50). Osim toga, ima ključnu ulogu u patogenezi UC i karcinogenezi kolorektalnog karcinoma povezanog s UC-om (51). TNF- α kojeg luče

brojne imunološke i stromalne stanice smatra se odgovornim za poticanje i održavanje kronične upale, zbog poticanja transkripcije drugih proupalnih citokina, promicanja adhezijskih molekula na endotelu i aktivacije fagocitne aktivnosti makrofaga (52). TNF- α potiče ekspresiju IL-1B, IL-6 i IL-33 (53). IL-10 je protuupalni citokin, ali studije su pokazale kako je njegova ekspresija viša u bolesnika s upalnim bolestima crijeva nego u zdravih kontrola (54). Također je ekspresija IL10 gena viša u mukoznim T stanicama u bolesnika s UC-om (55). TGF- β je inhibitorni citokin koji je prepoznat kao ključni regulator imunološke homeostaze i upalnog odgovora (56). Smanjena TGF- β aktivnost se smatra odgovornom za razvoj nekoliko autoimunih poremećaja, uključivo i upalnih bolesti crijeva. U upalnim bolestima crijeva oštećeno je TGF signaliranje zbog povišenih razina SMAD7 (57). Međutim, osim što TGF- β djeluje protuupalno, lokalno može imati i proupalna djelovanja. Pa su tako istraživanja pokazala kako TGF- β može sudjelovati u zaštiti tkiva domaćina od luminalnih patogena i olakšati oporavak oštećene mukoze u upalnim bolestima crijeva (58-60). IL-17 je proupalni citokin koji aktivira STAT3, koji stimulira jak kronični upalni imunološki odgovor, zbog čega predstavlja ključan čimbenik u patogenezi upalnih bolesti crijeva (61, 62). Osim toga, dokazano je kako je IL17 mRNK povišena u upaljenoj sluznici bolesnika s upalnim bolestima crijeva (63).

Stečeni imunološki sustav

Za razliku od urođenog imunološkog sustava, stečeni imunitet ovisi o specifičnom prepoznavanju antigena od strane B i T staničnih receptora. Stoga je ovaj tip imunološkog odgovora sporiji od urođenog. Jedan od primarnih koraka u početku stečenog imunološkog odgovora uključuje aktivaciju Th limfocita (Th1, Th2, Th17 i Th22 stanica) i supresiju aktivnosti T reg stanica (38). Dendritičke stanice migriraju u periferna limfna tkiva i aktiviraju antigen specifične naivne T limfocite. Kad antigen prezentirajuće stanice prezentiraju antigene naivnim T stanicama, one diferenciraju u efektorske stanice. Aktivirane T stanice proliferiraju i postaju memorijske i efektorske T stanice te ulaze u cirkulaciju i migriraju do inicijalnog mjesta vezanja antigena za dendritičke stanice (64). Integracija Th stanica u laminu propriju crijeva posredovana je adhezijskim molekulama, kao što su selektini i integrini te njihovim ligandima koji se nalaze na endotelnim stanicama krvnih i limfnih žila. Nakon eliminacije antigena, dolazi do apoptoze većine efektorskih stanica, a mali broj memorijskih T stanica

preživi. Kod sljedećeg izlaganja antigenu, memorijske T stanice brzo diferenciraju u efektorske stanice.

CD4⁺ efektorske T stanice se dijele u nekoliko podskupina Th1, Th2, Th9 i Th17, koje luče karakteristične tipove citokina. Smatra se kako u patogenezi CD važnu ulogu ima Th1 odgovor, a UC Th2 odgovor. Osim navedenog, poznato je kako aktivacija Th17 stanica i neravnoteža između Th17/ regulatornih (tReg) stanica ima važnu ulogu u razvoju intestinalne upale (38).

- Th1 stanice se aktiviraju prezentacijom antigena mikrobnih vrsta koji induciraju otpuštanje IFN γ i IL-12, koji pak aktiviraju transkripcijski faktor STAT1 nakon čega dolazi do aktivacije transkripcijskog faktora T β . Th1 stanice proizvode i IFN γ i TNF α alfa i imaju važnu ulogu u obrani protiv intracelularnih mikroba (65).
- Th2 aktivacija je većinom potaknuta sekrecijom IL4, koji dovodi do aktivacije STAT6 i daljnje aktivacije transkripcijskog faktora GATA-3. Th2 stanice proizvode IL4, IL5 i IL13 te imaju važnu ulogu u imunološkom odgovoru protiv ekstracelularnih patogena, uključivo parazita (65).
- U prisutnosti IL-4 i TGF- β naive CD4⁺ T stanice se mogu diferencirati u Th9 stanice koje luče IL9, IL10 i IL21, koje reguliraju alergijsku upalu, autoimunu upalu i antitumorski imunitet. Th9/IL9 put ima ulogu u patogenezi upalnih bolesti crijeva, osobito UC (65-67).
- Th17 ima važnu ulogu u obrani domaćina protiv bakterija i gljiva. Th17 stanice proizvode IL17, IL22 i IL23. Th17 stanice inducira kombinacija IL-6 i TGF- β pod kontrolom IL23, koji se sastoji od p19 i p40 podjedinice. P40 citokinska podjedinica je zajednička IL12 i IL23. IL23 je važan za održavanje Th17 stanica (65, 68).
- T reg su posebna podskupina T stanica, koje suprimiraju efektornu funkciju drugih T stanica, te imaju važnu ulogu u homeostazi crijevnog mukoznog imunološkog sustava. Iako nije u potpunosti razjašnjeno kako regulatorne T stanice suprimiraju efektornu funkciju, smatra se da inhibitorni citokini kao što su IL10 i TGF- β imaju važnu ulogu. Za razvoj i funkciju regulatornih T stanica ključnu ulogu ima ekspresija transkripcijskog faktora Fox3p (69).

1.4. Klinički, endoskopski i laboratorijski indeksi aktivnosti bolesti

Objektivna procjena aktivnosti bolesti u upalnim bolestima crijeva važna je u liječenju tih bolesnika. Međunaordna organizacija za upalne bolesti crijeva - IOIBD (International Organization for the Study in Inflammatory Bowel Diseases) je u travnju 2021. definirala terapijske ciljeve u liječenju odraslih bolesnika s upalnim bolestima crijeva (*The Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease II-STRIDE II*) (70). Pa su tako smanjenje simptoma i normalizacija serumskih i fekalnih markera (C-reaktivni protein i fekalni kalprotektin) kratkoročni ciljevi liječenja upalnih bolesti crijeva, dok dugotrajni ciljevi liječenja uključuju kliničku remisiju i endoskopsko cijeljenje, ali i odsutnost invaliditeta i normalizaciju kvalitete života. Transmuralno cijeljenje u CD i histološko cijeljenje u UC nisu formalno definirani kao ciljevi, ali je njihova procjena također potrebna.

Upravo zbog navedenog, za praćenje bolesnika s upalnim bolestima crijeva, potrebni su nam standardizirani klinički i endoskopski indeksi. U nastavku će biti prikazani klinički i endoskopski indeksi te ključni laboratorijski parametri koji se koriste u kliničkoj praksi, odnosno koje smo koristili u ovom istraživanju.

1.4.1. Klinički indeksi

Ulcerozni kolitis

Najčešće korišteni klinički parametri za procjenu aktivnosti UC su broj stolica i prisutnost krvi u stolici. Indeksi aktivnosti UC-a većinom su nastali zbog potrebe da se u kliničkim istraživanjima što objektivnije definiraju skupine bolesnika te prati učinak terapije. Kako su kliničke studije ranije koristile različite indekse aktivnosti bolesti, usporedba rezultata kliničkih istraživanja je bila vrlo teška. Stoga, pojavom sve većeg broja molekula koje se istražuju u liječenju UC-a, rasla je i potreba za definiranjem validiranog indeksa. Danas za kliničku procjenu aktivnosti UC-a postoji 17 različitih indeksa, od kojih 8 ne uključuje varijable poput endoskopije i biokemijskih markera. Najčešće korišteni indeksi za procjenu aktivnosti blagog i srednje teškog UC-a su SCCAI (*Simple Clinical Colitis Activity Index-SCCAI*) i *Partial Mayo Score* (71), dok se za procjenu teškog kolitisa i dalje koriste Trueloveove i Wittsove kriterije (72).

- *Partial Mayo Score*

Mayo Clinic Index predstavlja standard u procjeni aktivnosti bolesti u kliničkim ispitivanjima u kojima FDA zahtijeva i endoskopsku procjenu. *Mayo Clinic Index* su razvili Schroeder i suradnici 1987., a uključuje *Partial Mayo Score* –PMS (broj stolica, rektalno krvarenje), globalnu procjenu liječnika - PGA (*Physician Global Assessment*, engl.) te endoskopsku aktivnost - MES (*Mayo Endoscopic Score*, engl.) (71). Iako je *Partial Mayo Score* nevalidiran indeks, pokazalo se kako se radi o dobrom indeksu koji omogućava razlikovanje aktivne bolesti od remisije. Kako PMS, osim bolesnikovih simptoma uključuje i globalnu procjenu liječnika, ponekad je teže primjenjiv u kliničkoj praksi. Ukoliko je $PMS \leq 1$ govorimo o remisiji bolesti.

- Truelove i Wittsov indeks aktivnosti bolesti

Truelove i Witts su 1955. godine razvili indeks kako bi procijenili učinak oralnog kortizona u liječenju aktivnog UC-a. Autori su definirali objektivne varijable, koje nam danas omogućuju stratifikaciju bolesnika po težini bolesti: blagi, umjereno teški i teški UC. U kliničkoj praksi, Trueloveov i Wittsov indeks je najčešće korišten indeks za definiranje teškog akutnog kolitisa, odnosno potrebe za hospitalizacijom i terapijom intravenskim glukokortikoidima. Kriteriji za teški kolitis su ≥ 6 stolica dnevno, krv u stolici, te jedan od sljedećih kriterija: tjelesna temperatura $> 37.8^{\circ}\text{C}$, puls $> 90/\text{min}$, hemoglobin $< 10.5 \text{ g/dl}$ i brzina sedimentacije eritrocita $> 30 \text{ mm/h}$. Nedostatak Trueloveovih i Wittsovih kriterija je što se radi o kvalitativnom, a ne kvantitativnom indeksu koji je potreban za procjenu aktivnosti bolesti prilikom praćenja bolesti i uspjeha terapije.

Crohnova bolest

Za procjenu aktivnosti CD, osim broja stolica i krvi u stolici kao UC-u, najčešće korišten klinički parametar je bol u abdomenu.

- *The Crohn's Disease Activity Index* (CDAI)

Najčešće korišten indeks za procjenu odgovora na terapiju u kliničkim istraživanjima je *The Crohn's disease Activity Index* (CDAI) (73). CDAI sadrži osam varijabli, uključivo hematokrit, fizikalni pregled (pregled abdomena i tjelesnu težinu) i sedmodnevni dnevnik pacijenta. Pacijent bilježi broj mekanih stolica, bolove u abdomenu i opće stanje. Kako se radi o kompleksnom indeksu, rijetko se primjenjuje u kliničkoj praksi. Remisija je definirana CDAI-om manjim od 150. Kako CDAI zahtijeva unos podataka od prethodnih 7 dana, podaci se najčešće unose retrogradno. Osim toga, opće stanje i intenzitet bolova ovise o subjektivnoj procjeni

bolesnika. Iako je CDAI validiran indeks za primjenu u kliničkim istraživanjima, ima određena ograničenja. CDAI slabo korelira s endoskopskom upalom, serumskim markerima upale i fekalnim biomarkerima (kalprotektin i laktoferin). Osim toga, istraživanja su pokazala kako i većina pacijenata sa sindromom iritabilnog crijeva ima CDAI > 150. CDAI se u kliničkim istraživanjima, koja su imala visok udio placebo učinka, pokazao neadekvatnim primarnim ishodom. Osim toga, FDA smjernice preporučuju da indeksi koji se koriste u istraživanjima budu temeljeni na odgovorima pacijenata (74). CDAI nije pouzdan u procjeni aktivnosti perianalne bolesti ili CD s drugim fistulama, koje mogu značajno narušavati kvalitetu života pacijenta. *Perianal Crohn's Disease Activity Index* (PDAI) je trenutno zlatni standard u procjeni težine perianalne bolesti (75).

- *Harvey-Bradshaw Index* (HBI)

Harvey-Bradshaw Index (HBI) je lakši za korištenje od CDAI-a, osim toga bodovi iz ovog indeksa koreliraju s bodovima CDAI. HBI ima pet varijabli (1 - opće stanje, 2 - bolovi u abdomenu, 3 - broj tekućih stolica, 4 - prisutnost abdominalne mase, 5 - prisutnost komplikacija, uključivo lokalne komplikacije bolesti-fistula, apsces ili analna fisura te ekstraintestinalne manifestacije). Za ispunjavanje indeksa nije potrebno prikupljanje podataka u proteklih 7 dana, već se uzimaju podaci od prethodnog dana. Remisija je definirana HBI indeksom ≤ 4 , a rezultat iznad 16 označava izraženu, tešku aktivnu bolest (76).

1.4.2. Endoskopski indeksi

Ulcerozni kolitis

Ključni uvjet za postizanje duge stabilne remisije s upalnim bolestima crijeva je mukozno cijeljenje koje se definira kao endoskopska remisija, odnosno odsutnost mukoznih ulceracija. Stoga endoskopija ima krucijalnu ulogu u procjeni aktivnosti bolesti i učinkovitosti terapije, osobito u UC-u (77, 78).

Najčešće korišteni indeks endoskopske aktivnosti bolesti kod UC-a jest *Mayo Endoscopic Score* (MES) u kojem < 1 bod označava mukozno cijeljenje (normalna sluznica ili gubitak vaskularnog crteža bez frijabilnosti sluznice) (79). Za procjenu upale sluznice evaluira se prisutnost eritema, smanjenje vaskularnog crteža, frijabilnost sluznice, erozije, spontana krvarenja i ulceracije, a bolest se ovisno o navedenom klasificira u 4 kategorije - remisija, blaga aktivnost, umjerena ili teška aktivnost.

Jedan od nedostataka navedenog indeksa je razlika u procjeni aktivnosti među endoskopičarima, stoga se pojavila potreba za razvojem validiranog indeksa endoskopske aktivnosti kod UC-a te je razvijen UCEIS (*Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity*) koji uključuje tri elementa: vaskularni crtež, krvarenje i erozije/ulkusi, svaki s preciznom definicijom i nekoliko razina težine (79). UCEIS se temelji na makroskopskoj procjeni najteže zahvaćenog segmenta debelog crijeva, a ne uzima u obzir ekstenziju UC-a.

Crohnova bolest

Za razliku od UC-a, u CD kod koje je prisutna transmuralna upala koja može zahvatiti cijelo crijevo, često lezije nisu dostupne endoskopom. Međutim, endoskopija je važna u procjeni zahvaćenosti crijeva i težine bolesti, te procjeni učinkovitosti liječenja. Za procjenu aktivnosti upale većina CD studija koristi CDEIS (*Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity*) (80) ili jednostavniji SES-CD (*Simple Endoscopic Score for Crohn's disease*) (81) te Rutgeertsov indeks za evaluaciju ileokolične anastomoze nakon resekcije (82). CDEIS se smatra zlatnim standardom za procjenu endoskopske aktivnosti u CD (raspon od 0 do 44 boda) gdje je prag endoskopske remisije postavljen kao CDEIS < 6 uz dodatne kriterije poput odgovora na terapiju (smanjenje CDEIS > 5), kompletnu endoskopsku remisiju (CDEIS < 3) i mukozno cijeljenje (odsutnost ulceracija). Kako se radi o kompleksnom indeksu, razvijena je jednostavnija verzija- SES-CD. SES-CD uključuje četiri endoskopske varijable bodovane od 0 do 3 (veličina ulkusa, ulcerirana površina, zahvaćena površina, prisutnost suženja) u 5 segmenata: ileumu i 4 segmenta debelog crijeva. U slučaju da ukupni zbroj iznosi 0 do 3, govorimo o endoskopskoj remisiji, 4 - 10 o blagoj bolesti, 11 do 19 srednje teškoj bolesti i teškoj bolesti ukoliko je ukupni zbroj po segmentima 20 ili više od 20. Iako je jednostavniji od CDEIS i dalje se radi o kompleksnom indeksu.

1.4.3. Laboratorijski indeksi

Trenutno ne postoji specifični laboratorijski test za dijagnozu upalnih bolesti crijeva, kao ni test koji bi omogućavao diferencijaciju CD od UC. Čitav je niz laboratorijskih markera koji se istražuju u dijagnostičke i diferencijalno dijagnostičke svrhe, procjenu aktivnosti bolesti i rizika komplikacija, kao i predikciju relapsa i monitoriranje učinka

terapije. U nastavku će biti prikazana dva najčešće korištena laboratorijska markera u upalnim bolestima crijeva.

- C reaktivni protein

C-reaktivni protein je jedan od najvažnijih reaktanata akutne faze, a proizvode ga hepatociti kao odgovor na stimulaciju upalnih citokina (interleukin-1, IL-1 β i TNF- α). CRP ima kratak poluvijek (oko 19 h), a njegove vrijednosti rastu vrlo brzo tijekom akutne faze upale. Široko je korišten indikator upale u upalnim bolestima crijeva, a njegove vrijednosti niže od 10 mg/L ukazuju na remisiju UBC-a (83). Endoskopska aktivnost bolesti također dobro korelira sa serumskim razinama CRP-a. Međutim, CRP nije specifičan za bolest i njegove vrijednosti mogu biti povišene u ne-UBC enteritisu, upalnim poremećajima koji nisu vezani za probavni trakt, kod oštećenja tkiva, dijabetesa, maligniteta i kardiovaskularnih bolesti. Osim toga, osjetljivost CRP-a je ograničena u upalnim bolestima crijeva pa tako bolesnici s aktivnom upalnom bolesti crijeva mogu imati normalne vrijednosti CRP-a (84). Također, moguće su normalne vrijednosti CRP-a u asimptomatskih bolesnika koji pak imaju blage mukozne lezije, osobito kod izoliranog zahvaćanja ileuma. Na razine CRP-a mogu utjecati i genetski faktori, dob, spol i ITM (85).

Razine CRP-a kod odraslih bolesnika s CD-om bolje koreliraju s aktivnosti bolesti nego kod bolesnika s UC-om. CRP se pokazao korisnim markerom u UC-u za predikciju ishoda na početku bolesti te u teškom kolitisu (86).

- Fekalni kalprotektin

Fekalni kalprotektin je protein u neutrofilnim granulocitima i makrofazima, prvi put opisan 1980. godine. Radi se o markeru koji je stabilan i dobro raspoređen u fecesu, stoga je za njegovo određivanje dovoljan i mali uzorak stolice. Otpuštaju ga aktivirane imunološke stanice u stanju staničnog stresa i oštećenja. Sprječava migraciju neutrofila kroz upaljenu crijevnu stijenku do sluznice. Koristan je marker za predikciju aktivne bolesti sluznice. Sve je više istraživanja uloge fekalnog kalprotektina u dijagnostici, evaluaciji aktivnosti bolesti te monitoriranju relapsa upalnih bolesti crijeva. Meta analiza 30 prospektivnih studija je potvrdila njegovu visoku osjetljivost i specifičnost koja iznosi do 95 % ili 91 %, što je više od vrijednosti za CRP, SE, ASCA i pANCA (87). Vrijednosti fekalnog kalprotektina značajno su više u aktivnoj bolesti kolona nego u aktivnoj bolesti ileuma te u lijevostranom i distalnom kolitisu u odnosu na pankolitis (88, 89). Nadalje, fekalni kalprotektin je marker koji se pokazao korisnim u praćenju učinkovitosti terapije (89). Fekalni kalprotektin također

ima važnu ulogu u razlikovanju upalnih bolesti crijeva od sindroma iritabilnog crijeva (IBS) u odraslih, s osjetljivošću od 93 % i specifičnošću od 94 % za *cut-off* razinu od 50 μ g/g. (90). Istraživanje Suarez i suradnika je pokazalo da serumski kalprotektin ima višu AUC za aktivnost bolesti od CRP-a, SE, hemoglobina i trombocita (91).

1.5. Uloga biomarkera u upalnim bolestima crijeva

Biomarkeri su mjerljive supstance iz tkiva i tjelesnih tekućina, a mogu uključivati od često korištenih laboratorijskih indeksa, kao što je koncentracija hemoglobina, pa sve do ekspresije genskih profila. U posljednjih nekoliko godina sve je veći interes istraživanja u području upalnih bolesti crijeva za serumske biomarkere. Za razliku od markera u bioptiranom tkivu, stolici, izdahnutom zraku i tjelesnim tekućinama, određivanje serumskih markera nije invazivno ni skupo, a uzorci su lakše dostupni. Idealan biomarker trebao bi biti neinvazivan, osjetljiv, specifičan za bolest, lako odrediv i *cost effective* (92).

Korisnim biomarkerima su se pokazala serološka protutijela, uključivo autoantitijela i mikroba protutijela, koja su rezultat pretjeranog autoimunog odgovora, oštećenja intestinalne barijere i gubitka imunološke tolerancije na bakterijske antigene (93-95).

Najčešće korištena serološka protutijela u kliničkoj praksi uključuju:

- pANCA

Perinuklearna antineutrofilna citoplazmatska protutijela (pANCA) su protutijela koja reagiraju s lizosomskim enzimima u citoplazmi neutrofila i monocita. Navedena protutijela su specifična za UC, a mogu se koristiti u diferenciranju UC-a od CD-a. Titar pANCA se mijenja s aktivnosti bolesti kod bolesnika s UC-om, ali njihova osjetljivost je niska kod bolesnika sa sumnjom na UC. Gotovo 25 % bolesnika s CD-om koji imaju lijevostrani kolitis i simptome UC-a, imaju i povišene vrijednosti pANCA, što ograničava ulogu pANCA u diferenciranju UC-a od CD-a. Protutijela na neutrofilnu proteinazu 3, jedno od antineutrofilnih citoplazmatskih protutijela (PR3-ANCA), mogla bi imati ulogu u distinkciji UC-a od CD-a, s obzirom da su ona pozitivna u 15 – 40 % bolesnika s UC-om, odnosno 0 – 10 % bolesnika s CD-om (96, 97).

- *Anti-saccharomyces Cerevisiae* protutijela (ASCA)

Radi se o protutijelima koja imaju visoku specifičnost, a nisku osjetljivost u identificiranju bolesnika s CD-om. ASCA su marker rizika za rani početak bolesti, fibrostenoze i penetrirajuću bolest. Ekspresija ASCA je niska kod bolesnika s izoliranom bolesti kolona, a ekspresija varira u različitim etnički populacijama (98). Kombinacija ASCA i pANCA protutijela vrijedan su alat u diferenciranju UC-a od CD.

Osim seroloških biomarkera sve je više novijih biomarkera koji uključuju genetske i imunološke biomarkere (99). Nadalje, citokini su često istraživani biomarkeri u upalnim bolestima crijeva, s obzirom da je poznato da su upravo oni ključne komponente u upalnim putevima važnima u patogenezi upalnih bolesti crijeva. S obzirom na povišenu ekspresiju proupalnih citokina u crijevnoj sluznici kod aktivnog UBC-a, koju nužno ne prati i povišena koncentracija citokina u krvi, rezultati istraživanja serumskih koncentracija citokina koji se proizvode u crijevu često su nekonzistentni (100).

Kako u upalnim bolestima crijeva dolazi do čitavog niza metaboličkih promjena, što naposljetku dovodi do anoreksije, malnutricije, promjene sastava tijela, hipertrofije mezenterijskog bijelog masnog tkiva (mWAT) te posljedično tome fluktuacije proizvodnje adiponektina i grelina (101) upravo bi njihove serumske razine mogle predstavljati potencijalne biomarkere u upalnim bolestima crijeva.

U nastavku će biti prikazani biomarkeri čije su koncentracije mjerene u ovom istraživanju.

1.5.1. Interleukin 6

U posljednjih 30 godina otkrivene su molekularne karakteristike i uloge brojnih citokina, uključujući i IL-6. IL-6 je glikoprotein molekulske mase 21-28 kDa, građen od 212 aminokiselina. Gen za IL-6 je lociran na kraćem kraku kromosoma 7 (7p15.3), sadrži 6 eksona i 4 introna. Proizvode ga imunološke stanice, kao što su makrofagi, neutrofili i mastociti, ali i neimune stanice i organi (102).

Svoje biološke učinke ostvaruje klasičnom signalizacijom, vezanjem na membranske receptore za IL-6 (IL-6R) koji se nalaze u mnogim stanicama (pretežito leukocitima i hepatocitima), a nakon vezanja liganda IL-6R se povezuje sa signalnim receptorom proteinom gp130, koji potom dimerizira te dolazi do aktivacije janus kinaza (JAK) i

posljedične fosforilacije tirozinskih ostataka u citoplazmatskom dijelu gp130 te dalje do aktivacije puta Ras/Rad/protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPL *mitogen-activated protein kinsase*). Aktiviranjem transkripcijskih faktora dolazi do aktivacije ciljanih gena. Osim klasične signalizacije, sve stanice se mogu stimulirati preko topljivog IL-6R (sIL-6R) tzv. trans-signalizacijom, jer se gp130 eksprimira ubikvitarno (103, 104).

IL-6 je pleiotropni upalni citokin koji inducira upalnu signalizaciju i odgovor na infekciju te regulira metaboličke i regeneracijske procese u stanici, ali osim proupalnih, posjeduje i protu-upalne učinke (105). IL-6 svoje protuupalne i protektivne učinke ostvaruje klasičnom signalizacijom, a proupalni učinci su uglavnom udruženi sa signaliranjem putem topljivog IL6R (106).

IL-6 ima čitav niz uloga:

- Potiče sazrijevanje megakariocita u trombocite.
- Sudjeluje u aktivaciji hematopoetskih matičnih stanica.
- Pojačava stvaranje T limfocita.
- Regulira ekspresiju IL-2R.
- Potiče finalno sazrijevanje limfocita B u stanice koje stvaraju protutijela.
- Stimulira hepatocite koji produciraju proteine akutne faze upale kao što su C-reaktivni protein (CRP), serumski amiloid A, fibrinogen, hepcidin, haptoglobin (107, 108).
- Profibrotički citokin, koji potiče proliferaciju fibroblasta i diferencijaciju miofibroblasta (109).
- Poticanje proliferacije keratinocita i produkcija kolagena u dermalnim fibroblastima (110).
- Stimulacija rasta stanica kao što su stanice mijeloma/plazmacitoma i mezangijalne stanice (111-112).
- Stimulira osovinu hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda djelujući na kortikotropin - otpuštajući hormon i na taj način pomaže kontroli upalne reakcije (113).
- Ima ulogu u kontroli tjelesne mase, hranjenju i potrošnji energije. Djeluje tako da centralno, vjerojatno na razini hipotalamusa, utječe na smanjenje razine masnog tkiva povećavajući potrošnju energije (113).

- IL-6 može utjecati na povećanje inzulinske sekrecije (114).

U ranoj fazi infektivnog upalnog zbivanja, monociti i makrofazi proizvode IL-6, odmah nakon stimulacije *toll-like* receptora (TLR) molekularnim uzorkom patogena (PAMP). U neinfektivnoj upali, kao što su opekline i trauma, molekularni uzorci povezani s oštećenjem (DAMP-*damage associated patterns*, engl.) iz oštećenih stanica stimuliraju TLR da proizvode IL-6.

IL-6 ima važnu ulogu u obrani domaćina od okolišnih čimbenika kao što su infekcija i ozljeda, a kada je stresni čimbenik uklonjen, dolazi do normalizacije razina IL-6. Međutim, disregulirana trajna produkcija IL-6 ima važnu ulogu u razvoju brojnih autoimunih kroničnih upalnih bolesti (115). O važnosti IL-6 u razvoju autoimunih bolesti govori i činjenica da su se IL-6 inhibitori, uključivo protutijela na alfa lanac IL-6 receptora i IL-6 blokatori pokazali učinkoviti u liječenju upalnih bolesti kao što su RA i Castelmanova bolest (116, 117).

U homeostatskim uvjetima, razina IL-6 u cirkulaciji iznosi 1 - 5 pg/ml, dok tijekom upalnih zbivanja te razine mogu porasti i više od 1000 puta (118).

1.5.2. Čimbenik tumorske nekroze

Čimbenik tumorske nekroze (TNF) je otkriven 1975., kada su Carswell i suradnici otkrili da serum miševa, štakora i zečeva, koji su prethodno inficirani *Mycobacterium bovis* sojem *Bacillus Calmette-Guerin* uzrokuje hemoragičnu nekrozu tumora u miševa. Otkrili su kako je hemoragična nekroza *in vivo* uzrokovana takozvanim TNF-om koji se otpušta iz stanica domaćina, vjerojatno makrofaga, kao odgovor na uneseni endotoksin (119). 1985. je kloniran humani TNF- α . Proizvode ga uglavnom aktivirani makrofagi, a u manjoj količini i T i B limfociti, NK stanice, endotelne i mišićne stanice, fibroblasti i osteoklast. TNF se nalazi u formi vezanoj za membranu (protein od 26kDA, 233 aminokiseline) i u topivoj formi (17kDA, 157 aminokiselina), koja se otpušta nakon proteolitičkog djelovanja metaloproteaze TNF- α konvertirajućeg enzima (TNF α *converting enzyme*- TACE, poznatiji kao ADAM17) na formu TNF- α integriranog u membranu. Obje forme su aktivne, a djeluju putem dvije vrste receptora: TNFR1, koji se nalazi na svim tkivima i TNFR2, koji se nalazi primarno na imunološkim stanicama, neuronima i endotelnim stanicama. Obje forme TNF- α djeluju na TNFR1 receptor, dok na TNFR2 receptor djeluje membranski TNF- α . Glavna razlika između ova dva receptora je postojanje domene smrti (*death*

domain, engl.) na TNFR1 receptoru. Svaki od navedenih receptora uključen je u različite složene puteve intracelularnog signaliranja.

TNF- α je pleiotropni citokin koji je uključen u čitav niz homeostatskih, ali i patoloških mehanizama (120).

Nakon što se TNF- α otpusti iz makrofaga, aktivira imunološke stanice i djeluje kao medijator proizvodnje proupalnih citokina tijekom imunološkog odgovora, stoga ga smatramo uglavnom proupalnim citokinom (121). Dok TNF- α u akutnoj upali štiti od bakterijskih endotoksina, virusa i parazita, osigurava nutrijente za imunološke stanice i potiče odgovor domaćina, u kroničnoj upali TNF- α aktivira puteve koji su odgovorni za čitav niz patoloških stanja.

TNF- α stimulira fagocitozu i proizvodnju IL-1 i prostaglandina E2. TNF- α i IL-1 zajedno moduliraju proupalne signale tako što koordiniraju vaskularnim i staničnim promjenama u imunološkom sustavu, koje dovode do brzog odgovora domaćina na bakterijsku infekciju. U jetri stimulira proizvodnju C-reaktivnog proteina i drugih medijatora. TNF- α također sudjeluje u remodeliranju kostiju tako što regulira razine prekursora osteoklasta i aktivira osteoklase. TNF- α sudjeluje u poticanju dislipidemije i inzulinske rezistencije koje su obje prepoznate kao rizični faktori za aterosklerozu. Naime, TNF- α djeluje na metabolizam ugljikohidrata, lipogenezu, adipogenezu i termogenezu i stimulaciju lipolize te utječe na endokrine funkcije adipoznog tkiva. Time doprinosi metaboličkoj disregulaciji, utječući na funkciju adipoznog tkiva i njegovoj sposobnosti da skladišti prekomjerne količine energije (122).

Svojim djelovanjem u hipotalamusu, sudjeluje u stimuliranju lučenja kortikotropin opuštajućeg hormona (CRH), supresiji apetita i indukciji vrućice.

S obzirom da je rekombinantni TNF pokazivao potencijalno antitumorsku aktivnost, testiran je u nekoliko studija faze I i II kao potencijalni lijek u liječenju karcinoma. Međutim, primijenjen samostalno se pokazao toksičnim, a njegova terapijska učinkovitost nije dokazana (123, 124).

Poznato je da je narušena ravnoteža u stvaranju TNF- α važna u patogenezi određenih kroničnih upalnih stanja, stoga se TNF- α pokazao kao važna meta u liječenju kroničnih bolesti kao što su reumatoidni artritis (125), CD (126), ankilozantni spondilitis (127) i psorijaza (128).

TNF- α obično nije moguće detektirati kod zdravih osoba, dok se njegove povišene vrijednosti nalaze u serumu i tkivu u upalnim i infektivnim stanjima (129, 130), a

njegove serumske razine koreliraju s težinom infekcije (131, 132). Prvi dokazi povezanosti između TNF- α i UBC-a dolaze iz publikacija koje navode da su razine TNF- α povišene u serumu, stolici i bioptičkim uzorcima (133-136).

1.5.3. Ghrelin

Ghrelin je izoliran 1999. u sadržaju želuca štakora a predstavlja endogeni ligand za receptor sekretagoga hormona rasta (GHS-R). Gen za humani ghrelin je lokaliziran na kromosomu 3p25-26. Radi se o peptidu koji sadrži 28 aminokiselina, koji postoji u dvije različite forme: acilirani (ili n-oktanoilirani) kod kojeg je treća aminokiselina, obično serin, acilirana, pomoću enzima ghrelin-O-acetiltransferaze, što je ključno za aktivnost ghrelina; te druga forma ghrelina, deacilirani ghrelin (137). U krvi, deacilirani ghrelin cirkulira u količinama većim od količina aciliranog ghrelina, koji u cirkulaciji čini manje od 10 % ukupnog ghrelina (138). Acilirani ghrelin ima veći afinitet za vezanje za ghrelinski receptor od deaciliranog ghrelina, stoga se dugo deacilirani ghrelin smatrao inaktivnom formom ghrelina.

Iako je sve više istraživanja o fiziološkim ulogama ghrelina, još uvijek se malo zna od njegovom metabolizmu i odstranjivanju iz organizma (139).

U ljudi, normalne koncentracije ghrelina u uzorcima plazme su 10 - 20 fmol/ml za n-oktanoil ghrelin i 100 - 150 fmol/ml za ukupni ghrelin, uključivo acilirani i deacilirani ghrelin (137, 140, 141).

Većinu ghrelina izlučuju X/A stanice u oksintičkim žlijezdama fundusa želuca, a ghrelin imunoreaktivne stanice se također nalaze u duodenumu, jejunumu, ileumu i kolonu. U crijevu, koncentracija ghrelina postupno pada od duodenuma do kolona (142). U manjim količinama ghrelin se luči i hipotalamusu, hipofizi, plućima, kori nadbubrežne žlijezde, bubrezima, kosi, testisima, posteljici i pankreasu.

Najpoznatiji faktor koji regulira sekreciju ghrelina je hranjenje (140), pa tako plazmatske koncentracije rastu u gladovanju, a smanjuju se nakon unosa hrane. Drugi faktori koji reguliraju njegovu sekreciju su još uvijek nepoznati. Mogući regulator je razina glukoze u krvi. Naime oralna ili intravenska primjena glukoze utječe na smanjenje koncentracije ghrelina (143). Samo unosom vode koja dovodi do mehaničke distenzije želuca ne utječe na otpuštanje ghrelina (144, 145). Plazmatska koncentracija ghrelina raste noću. Osim toga njegova koncentracije je niska u pretilih i visoka u mršavih ljudi (146).

Kako su receptori sekretagoga hormona rasta (GHS-R) rasprostranjeni u čitavom nizu tkiva, vjerojatno i grelin ima čitav niz funkcija osim utjecaja na otpuštanje hormona rasta i unos hrane.

Fiziološke funkcije grelina su:

- Njegova primarna funkcija je djelovanje na otpuštanje hormona rasta (146-148). Nekoliko je modela kako grelin stimulira sekreciju hormona rasta. Prvi govori kako grelin djeluje primarno na stanice hipofize, dok drugi sugerira kako djeluje na hipotalamus. Nakon intravenske injekcije grelina, hormon rasta vršak koncentracije doseže za otprilike 5 - 15 minuta, a ukoliko se n.vagus prekine, indukcija otpuštanja hormona rasta nakon injekcije grelina dramatično pada, što može govoriti u prilog tome da je v. vagus potreban za maksimalni stimulatorni učinak grelina (149, 150). Osim toga, za stimulaciju lučenja hormona rasta, važan je i sinergistički učinak GHRH (*growth hormone releasing hormone*, engl.) i grelina (151).
- Grelin je jedini signal gladi iz perifernih tkiva. Intravenska i subkutana injekcija grelina, jednako kao i periferno injiciran grelin, povećava unos hrane (152). Grelin hipotalamiču regiju aktivira indirektnim putevima, s obzirom da je prelazak perifernog grelina kroz krvno moždanu barijeru nizak. S obzirom da su receptori za grelin pronađeni na aferentnim neuronima vagusa u štakora, smatra se da grelin signale prenosi do mozga putem n.vagusa (149, 153). Dakle, grelin se luči primarno u želucu kao odgovor na glad i gladovanje, cirkulira u krvi i djeluje kao periferni signal, koji obavještava središnji živčani sustav putem n. vagusa da stimulira hranjenje.
- Intravenska primjena grelina dovodi do povećanja sekrecije želučane kiseline i stimulacije želučanog motiliteta (155). Osim što grelin ima ulogu u stimuliranju želučanog motiliteta, grelin stimulira i motilitet tankog i debelog crijeva i skraćuje tranzitno vrijeme kroz kolon (156-158).
- Studije su pokazale kako grelin ima brojne kardioprotektivne učinke: dovodi do smanjenja srednjeg arterijskog krvnog tlaka, povećava kontraktilitet miokarda, štiti endotelne stanice i poboljšava metabolizam stanica miokarda, poboljšava koronarni protok, srčanu frekvenciju, dilataciju perifernih krvnih žila i konstrikciju koronarnih arterija (159-163).

- Ima ulogu u regulaciji homeostaze glukoze djelovanjem na sekreciju inzulina ovisno o razinama glukoze u krvi (164-166).
- Grelin ima važnu ulogu u osteoklastogenezi – inhibira lokalno progenitorne stanice osteoklasta, ali sistemski stimulira osteoklastogenezu. Nasuprot grelinu, leptin ima suprotan učinak na metabolizam kostiju (167-169).
- Grelin sudjeluje u regulaciji skladištenja lipida u bijelom masnom tkivu. Potiče adipogenezu, povećava aktivnost enzima koji sudjeluju u skladištenju masti, povećava sadržaj triglicerida i smanjuje lipolizu (170-172).
- Prepoznata je i uloga grelina u imunološkom odgovoru i procesu (173, 174). Periferene mononuklearne stanice, monociti, neutrofil i B i T limfociti ekspimiraju GRLN-R, a T limfociti, B limfociti i neutrofil ekspimiraju grelin i njegove receptora. Di Giovangiulio i suradnici su dokazali protektivni učinak grelina u eksperimentalnom modelu kolitisa, utjecajem na T stanični odgovor (175). Grelin je potentan protuupalni medijator koji utječe na sniženje sekrecije proupalnih citokina (IL-6, TNF α , IL 1 β) i produkciju kemokina u endotelnim stanicama i aktiviranim monocitima inhibicijom aktivacije NF- κ B. Povišene razine grelina mogu biti posljedica oštećenja tkiva jer crijevna upala i oštećenje stimuliraju endogenu proizvodnju grelina (176).
- Stimulira oslobađanje prolaktina iz laktotropnih stanica (177, 178).
- Grelin je također pronađen u hipotalamusu, i to u arkuatnom nukleusu hipotalamusa, regiji koja je uključena u regulaciju apetita (146). Oreksigeni učinci grelina posredovani su preko NPY/AgRP neurona. S druge strane, kako bi se suprimiralo otpuštanje anoreksigenih peptida, grelin inhibitorno djeluje na propiomelanokortin (POMC) neurone. Arkuatane jezgre su također ciljano mjesto djelovanja leptina koji kompetitivno s grelinom djeluje na regulaciju hranjenja (154).

1.5.4. Leptin

Leptin (grčki *leptós* – mršav) je peptidni hormon od 16 kDa koji sadrži 167 aminokiselina, kloniran je 1994. (179). Gen za leptin lociran je na kromosomu 7. Proizvode ga uglavnom adipociti, a u manjim količinama i mliječne žlijezde, jajnici, skeletni mišići, želudac, hipofiza i limfoidno tkivo (180). Količina leptina koja se luči,

proporcionalna je masi masnog tkiva, stoga njegove razine predstavljaju važan marker energetske zaliha (181). Značajno je to da sekrecija leptina ima cirkadijalni ritam, odnosno da su vršne koncentracije leptina u plazmi noću približno 30 do 100 % veće od onih mjerenih ujutro ili rano popodne. Dakle, pri uzimanju uzoraka krvi za određivanje koncentracije leptina, potrebno je uzeti u obzir osim unosa hrane (niske razine u gladovanju, visoke kod unosa hrane) i cirkadijalni ritam (182). Sekrecija leptina ima i naznačen seksualni dimorfizam, pa su tako koncentracije leptina u žena s bilo kojom razinom adipoziteta više (183).

Nekoliko faktora sudjeluje u regulaciji sekrecije leptina iz adipocita, pa tako njegovu sekreciju povećavaju primarno prekomjerni unos hrane i prekomjerne količine masnog tkiva ali i prehrana s visokim udjelom masti, glukokortikoidi, inzulin, estrogen, upalni citokini (TNF- α i IL-6; akutni učinak) te izlaganje hladnoći, a smanjuju primarno manji unos hrane i smanjene zalihe masnog tkiva, ali i povećana aktivnost simpatičkog živčanog sustava, hormoni štitnjače, androgeni te upalni citokini (uključivo TNF- α ; kronični učinak) (184).

Leptin je prevelik da bi pasivno prošao krvno moždanu barijeru pa se umjesto toga transportira reguliranim transportnim sustavom.

Leptin djeluje tako da se veže na membranske receptore koji su eksprimirani u mnogim tkivima, dominantno u mozgu. Identificirano je 6 izoformi leptinskih receptora (LeptR1-f), koje se razlikuju po intracelularnoj domeni (185). Vezanjem leptina na receptore aktivira se nekoliko puteva, uključivo JAK-STAT3 koji je važan za regulaciju energetske homeostaze (186), te PI3K put koji je važan za reguliranje unosa hrane i homeostaze glukoze.

Uloge leptina:

- Leptin ima ključnu ulogu u regulaciji unosa hrane. Leptin je signal sitosti, a pad koncentracije leptina u serumu dovodi do neurohumoralnih promjena i promjena u ponašanju, koje nastoje očuvati energetske rezerve za normalno funkcioniranje vitalnih funkcija, odnosno vitalnih organa – mozga, srca i jetre. Tijekom perioda gladovanja i nakon redukcije mase masnog tkiva, smanjenje razina leptina dovodi do redukcije ukupne energetske potrošnje (187). Najvažnija regija koja je odgovorna za učinke leptina na unos hrane je arkuatna jezgra hipotalamusa (ARH), gdje leptin djeluje na dvije populacije neurona, neurone koji koeksprimiraju proopiomelanokortni prohormon

(POMC) i kokain i amfetamin regulirani transkript (CART). ARH POMC/CART neuroni se aktiviraju pod utjecajem leptina te inhibiraju unos hrane. Leptin ima djelovanje i na NPY/AgRP/GABA neurone.

- Osim što modulacijom unosa hrane utječe na energetska ravnotežu, leptin ima učinke i na energetska potrošnja tako što dovodi do promjena u autonomnom živčanom sustavu ali i utjecajem na neuroendokrine mehanizme. Dakle, leptin signaliranjem u regijama hipotalamusa modulira autonomnim živčanim sustavom i endokrinim osima, što dovodi do promjena u energetska potrošnji i termogenezi.
- Struktura leptina slična je strukturi citokina, pa ne čudi da leptin ima važnu ulogu u imunološkom sustavu. Njegove razine rastu tijekom infekcije, upale i izlaganja lipopolisaharidima (188). Istraživanja na animalnim modelima pokazuju kako sistemska upala uzrokovana lipopolisaharidima dovodi do povišenja cirkulirajućeg leptina (189, 190), a prije nego što koncentracija leptina dosegne vršnu razinu, dolazi do porasta razine TNF- α , koji i sam po sebi ima mogućnost povišenja cirkulirajućih razina leptina (190). Dokazano je kako su leptinski receptori eksprimirani na B i T limfocitima, što govori u prilog tome da leptin regulira B i T stanični odgovor (191). Njegova uloga u moduliranju imunološkog odgovora je posredovana i regulacijom hematopoeze i limfopoeze (192). Receptori leptina nalaze se i u neutrofilima, monocitima i limfocitima. Svojim djelovanjem leptin ima proupalni učinak, aktivirajući proupalne stanice, potičući T-pomoćnički odgovor i posredovajući proizvodnju drugih proupalnih citokina kao što su TNF- α , IL-2 i IL-6 (193).
- Leptin utječe na centralne termoregulatorne mehanime (194).
- Do sada objavljeni rezultati istraživanja ukazuju da leptin ima brojne učinke na kardiovaskularni sustav. Djelovanjem na autonomni živčani sustav sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka (195). Također, leptin moguće djeluje i kao medijator ateroskleroze, promoviranjem regrutacije monocita u intimu arterija te indukcijom proupalnih citokina (196, 197).
- Leptin sudjeluje u regulaciji homeostaze glukoze, neovisno o unosu hrane, potrošnji energije i tjelesnoj težini (198).
- Leptin svojim djelovanjem na autonomni živčani sustav sudjeluje u moduliranju početka puberteta i reprodukciji (199).

Rezistencija na leptin (oštećeno signaliranje) prisutna je u pretilosti, što dovodi do hiperleptinemije. Budući da se leptin ponaša kao proupalni adipokin, hiperleptinemija može doprinijeti kroničnom upalnom stanju u pretilosti. S druge strane, kronična upala može narušiti djelovanje leptina, dovodeći do rezistencije na leptin, tako što utječe na signaliranje leptinskih receptora. Rezistencija na leptin u hipotalamusu dovodi do oštećenja kontrole tjelesne težine što može dovesti do pretilosti (200). Koncentracije leptina u plazmi služe kao signal hipotalamusu što dovodi do anoreksije i povećane energetske potrošnje kad su zalihe masti prevelike. Tijekom upale, leptin može hipotalamusu lažno signalirati kako postoji povećana masa masnog tkiva i time potaknuti neadekvatan fiziološki odgovor.

1.6. Liječenje upalnih bolesti crijeva

Liječenje bolesnika s CD-om i UC-om ovisi o nekoliko čimbenika: lokalizaciji bolesti, aktivnosti i težini bolesti, ponašanju bolesti u slučaju CD, pridruženim bolestima, te o odgovoru na raniju terapiju. Danas je u literaturi prihvaćeno kako je optimalni terapijski cilj za postizanje kvalitete života i prevenciju progresije bolesti upravo postizanje takozvane duboke remisije bolesti, koja obuhvaća kliničku i bioemijsku remisiju te mukozno cijeljenje (70, 201).

Lijekove u liječenju upalnih bolesti crijeva možemo podijeliti u dvije skupine: konvencionalne lijekove (gdje spadaju protuupalni i imunosupresivni lijekovi) i biološke lijekove. U ovom poglavlju će bit prikazane medikamentozne terapijske opcije za liječenje upalnih bolesti crijeva trenutno dostupne u Republici Hrvatskoj.

1.6.1. Konvencionalna terapija

1.6.1.1. Aminosalicilati

5-aminosalicilati (5-ASA) imaju višestruke protuupalne učinke, uključivo inhibiciju ciklooksigenaze, lipoksigenaze, B stanica i nekoliko ključnih citokina, a osim toga blokiraju privlačenje neutrofila i mastocita. Nadalje, 5-aminosalicilati aktiviraju selektivni peroksisom proliferator aktivirani ligand gama (PPA- γ), nuklearni receptor koji kontrolira proliferaciju i apoptozu (202). 5-ASA se koriste u liječenju UC-a, gdje su se pokazali učinkovitima u indukciji i održavanju remisija (203). Iako u kliničkoj praksi liječenje bolesnika s CD-om aminosalicilatima nije u potpunosti napušteno,

smjernice European Crohn Colitis Organisation (ECCO) preporučaju da se 5-aminosalicilati ne koriste u indukciji kao ni u održavanju remisije u bolesnika s CD-om (204).

1.6.1.2. Glukokortikoidi

Vežanjem za intracitoplazmatske glukokortikoidne receptore koji se nalaze u većini stanica, glukokortikoidi aktiviraju glukokortikoid odgovorne elemente (*glucocorticoid responsive elements*, engl.) te rezultiraju širokim spektrom učinaka na imunološki sustav, uključivo inhibiciju nakupljanja i proliferacije limfocita, monocita i makrofaga, migraciju neutrofila na mjesta upale i smanjenje proizvodnje topivih upalnih medijatora, uključivo citokine, leukotriene i prostaglandine (205). Primarni mehanizam djelovanja glukokortikoida je upravo supresija proupalnih citokina, kao što su TNF- α i IL-1 β . Osim toga glukokortikoidi imaju važnu ulogu u regulaciji diferencijacije T pomoćničkih stanica i produkciji interferona. U liječenju upalnih bolesti crijeva koriste se lokalno aktivni steroidi (kao što je budesonid) i sistemski glukokortikoidi. Sistemski glukokortikoidi koriste se u indukciji remisije u srednje teškom i teškom UC-u. Lokalni glukokortikoidni pripravci u obliku klizmi učinkoviti su u liječenju aktivnog distalnog UC-a (203). Liječenje budesonidom indicirano je za indukciju kliničke remisije u bolesnika s aktivnom blagom i srednje teškom CD ograničenom na ileum i/ili ascedentni kolon. U bolesnika s aktivnom, srednje teškom do teškom CD sistemski steroidi se koriste za indukciju kliničkog odgovora i remisije (204).

1.6.1.3. Azatioprin/6 merkaptopurin

6-merkaptopurin i njegov prolijek azatioprin su analozi purina koji se konvertiraju u 6-tiogvanin nukleotid (6-TG), a aktivni metaboliti interferiraju sa sintezom nukleinskih kiselina te imaju antiproliferativne učinke na aktivirane limfocite te induciraju apoptozu (206, 207). U UC-u tiopurini su indicirani za održavanje remisije u steroid-ovisnom obliku UC-a, održavanju remisije s ranim ili čestim relapsima koji zahtijeva steroidnu terapiju, održavanju remisije nakon indukcije remisije ciklosporinom, takrolimusom ili intravenskim steroidima te u terapiji akutnog ili kroničnog refraktornog pouchitisa (upale zdjeličnog rezervoara – *pouch*, engl.) (203). Tiopurini se koriste kao terapija indukcije remisije u srednje teškoj do teškoj luminalnoj CD, za održavanje remisije u bolesnika sa steroid ovisnom CD, za cijeljenje kompleksnih perianalnih fistula, u postoperativnoj prevenciji relapsa, u kombinaciji s anti-TNF lijekovima u svrhu smanjenja imunogeničnosti (204).

1.6.1.4. Metotreksat

Metotreksat je analog folata i reverzibilni kompetitivni inhibitor dihidrofolat reduktaze (DHFR). Interferira sa sintezom DNA te ima brojne protuupalne učinke, uključivo smanjenje proizvodnje proupalnih citokina i apoptoze limfocita (208). Metotreksat se može koristiti za indukciju remisije kao terapijska opcija kod steroid ovisnih bolesnika sa srednje teškom do teškom CD kod kojih nisu moguće druge terapijske opcije (uključivo i kirurgiju). Za održavanje remisije u bolesnika sa steroid ovisnom CD, metotreksat može biti jedna od terapijskih opcija, i to primijenjen parenteralno (204). Međutim, s obzirom da danas imamo dostupan čitav niz drugih terapijskih opcija, njegova upotreba je uglavnom ograničena na davanje metotretksata u kombinaciji s anti-TNF lijekovima u svrhu smanjenja njihove imunogeničnosti.

1.6.1.5. Ciklosporin

Ciklosporin je lipofilni peptid s brojnim protuupalnim učincima, uključivo inhibiciju i aktivaciju T pomoćničkih stanica (209). Ciklosporin se pokazao učinkovitim u liječenju teškog ulceroznog kolitisa, međutim kod nas se iznimno rijetko koristi u toj indikaciji (203).

1.6.2. Biološka terapija

1.6.2.1. Anti-TNF lijekovi

Anti-TNF lijekovi uključuju infliksimab, adalimumab i golimumab. Infliksimab je kimeričko anti-TNF monoklonalno protutijelo, koje se u kombinaciji s azatioprinom pokazalo učinkovitim u održavanju remisije i CD i UC-a (210).

Adalimumab je rekombinatno humano IgG₁ monoklonalno protutijelo koje ima visoku specifičnost i afinitet za humani TNF- α .

Golimumab je humano IgG₁ monoklonalno protutijelo, a za razliku od infliksimaba i adalimumaba koji su indicirani i u UC-u i CD, golimumab je indiciran samo u ulceroznom kolitisu.

U UC-u TNF inhibitori su indicirani u steroid refraktornom teškom kolitisu, steroid ovisnom aktivnom kolitisu, steroid refraktornoj bolesti i u imunomodulator refraktornoj bolesti (203). TNF inhibitori indicirani su u steroid refraktornoj i ovisnoj CD, imunomodulator refraktornoj, u teškoj aktivnoj bolesti s negativnim prognostičkim faktorima te u fistulizirajućoj bolesti (204).

1.6.2.2. Vedolizumab

Vedolizumab je selektivno IgG1 monoklonalno protutijelo usmjereno na integrin. Naime UBC karakteriziran je perzistentnim nakupljanjem velikog broja leukocita iz krvi u crijevnu sluznicu. Do nakupljanja limfocita u kroničnoj upali dolazi nakon interakcije površinskih molekula, zvanih integrini ($\alpha 4\beta 7$) na T stanicama i tkivno specifičnih adhezijskih molekula zvani ligandi (MAdCAM-1) koji se nalaze na endotelnim venulama (211-213). Vedolizumab se koristi u indukciji i održavanju remisije bolesnika s UC i CD bolesti (203, 204).

1.6.2.3. Ustekinumab

Interleukini IL-12 p35-p40 i IL-23 p19-p40 su proupalni heterodimerni citokini koji dijele zajedničku p40 podjedinicu i induciraju T pomoćničke stanice Th1 i Th17 diferencijaciju, te tako dovode do T staničkog imunološkog odgovora. Navedene citokine eksprimiraju dendritičke stanice i makrofagi. Ustekinumab je humano IgG1 monoklonalno protutijelo protiv IL-12 i IL-23 zajedničke p40 podjedinice, koje utječe na smanjenje aktivacije T stanica. Ustekinumab se koristi u indukciji i održavanju remisije bolesnika s UC-om i CD-om (204, 214).

1.6.2.4. Tofacitinib

Janus kinaze (JAK1, JAK2, JAK3 i TYK2) su intracelularni signalni medijatori koji stupaju u interakciju s aktivatorima transkripcije (STAT - *signal transducers and activators of transcription*, engl.). JAK-STAT signalni put regulira transkripciju nekoliko gena i važan je za imunološke i hematopoetske stanice koje su uključene u rast, preživljavanje, razvoj i diferencijaciju različitih stanica. Upravo blokadom navedenog puta ne dolazi do transmisije ekstracelularnih kemijskih signala u intracelularnu jezgru, čime dolazi do smanjenja upale crijeva. Tofacitinib je mala molekula koja inhibira JAK1 i JAK3 te učinke brojnih proupalnih citokina, uključivo IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-15, IL-21 i IFN γ . Lijek se pokazao učinkovitim u indukciji i održavanju remisije u srednje teškom i teškom UC-u (215).

1.7. Nutritivni status bolesnika s upalnim bolestima crijeva

Malnutricija je važna komplikacija upalnih bolesti crijeva, a značajno je veći problem kod CD-a, koja zbog mogućnosti zahvaćanja bilo kojeg dijela probavnog sustava češće ima izravan učinak na malapsorpciju. Prevencija malnutricije može iznositi od

23 % u izvanbolničkih bolesnika, pa čak do 85 % u bolesnika hospitaliziranih zbog egzacerbacije bolesti (216). Postojeći podaci govore kako malnutricija zahvaća velik broj bolesnika s upalnim bolestima crijeva, procjenjuje se 65 – 75 % bolesnika s CD-om i 18 – 62 % bolesnika s UC-om (217-220). Uzroci narušenog nutritivnog statusa su brojni, a uključuju suboptimalni energetske unos, malapsorpciju, gubitak nutrijenata kroz crijeva, povećanu bazalnu energetske potrošnju i lijekove koji mogu utjecati na absorpciju mikronutrijenata i njihovo iskorištavanje.

Međutim, opisana je i povezanost upalnih bolesti crijeva i pretilosti, a podaci govore kako ona može biti prisutna u čak do 32,7 % UBC bolesnika, i to 30,3 % bolesnika s Crohnovom bolesti i 35,2 % bolesnika s UC-om (221, 222).

Sarkopenija je učestala u UBC populaciji, a definira se kao sindrom karakteriziran progresivnim i generaliziranim gubitkom skeletne mišićne mase i snage. Faktori koji dovode do sarkopenije su malnutricija, imobilizacija, smanjena sinteza proteina i povećana proteoliza (223).

Kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva česte su i deficijencije mikronutrijenata, prije svega željeza, kalcija, selena, cinka i magnezija. Deficijencije vitamina uključuju posebice B12, folnu kiselinu i vitamine topive u mastima: A, D i K (224).

Procjena nutritivnog statusa u bolesnika s upalnim bolestima crijeva je nužna ne bi li se detektirala malnutricija i/ili sarkopenija i shodno tome započelo adekvatno zbrinjavanje. Za procjenu nutritivnog statusa koristimo nekoliko kvantitativnih i kvalitativnih metoda s obzirom da ne postoji jedinstveni laboratorijski marker ni instrument.

Jedan od prvih koraka u rješavanju problema pothranjenosti je pravodobno prepoznavanje bolesnika koji su pothranjeni ili su u riziku od pothranjenosti. Sukladno preporuci ESPEN-a, za procjenu nutritivnog rizika koristi se validirani alat NRS 2002 (225).

U procjeni sastava tijela potrebno je uzeti u obzir tjelesnu težinu, visinu, indeks tjelesne mase (ITM) i opseg pojedinih dijelova tijela (opseg nadlaktice, opseg struka). ITM manji od 18.5 kg/m^2 se smatra malnutricijom dok osobe koje imaju ITM veći od 25 kg/m^2 imaju prekomjernu tjelesnu težinu, a one s ITM većim od 30 kg/m^2 smatramo pretilima.

Konvencionalni indeksi, kao što je ITM, su se pokazali suboptimalnima u procjeni nutritivnog statusa. Metode koje nam omogućavaju procjenu mase masti i postotka

tjelesne masti te ne-masne mase (*lean mass, fat free mass*, engl.) i indeksa nemasne mase, puno su bolji pokazatelji nutritivnog statusa.

Zlatni standard za procjenu mišićne mase su DXA, CT i MRI, a kako se radi o metodama koje nisu široko dostupne u kliničkoj praksi, BIA se pokazala kao dobra alternativa denzitometriji.

Bioelektrična impedancijska analiza je indirektna tehnika mjerenja sastava tijela, temeljena na 2 principa: rezistenciji i reaktanciji. Rezistencija je sposobnost biološke strukture da se suprotstavi prolazu električnog signala i ona je obrnuto proporcionalna sadržaju vode. Tako su nemasna tkiva dobri konduktori, dok su masno tkivo i kosti loši konduktori. Reaktancija se suprotstavlja električnoj sili i mjeri se na razini stanične membrane, pa tako masno tkivo ima nisku reaktanciju, dok nemasno ima visoku. Kombiniranom analizom ova dva parametra možemo izračunati fazni kut. U zdravih osoba normalne vrijednosti su između 6 i 8 stupnjeva, a u kataboličkim stanjima, primjerice u sarkopeniji, vrijednosti su niže od 6 (226). Metodom bioelektrične impedancije možemo izmjeriti distribuciju masnog tkiva i mišićne mase unutar tijela. Mišićna snaga može se mjeriti jednostavnom tehnikom pomoću dinamometra.

2 HIPOTEZA

Kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva serumske koncentracije grelina, leptina i proupalnih citokina ovisne su o aktivnosti bolesti, nutritivnim statusom i različitim modalitetima terapije.

3 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Primarni cilj ovog istraživanja je odrediti serumske koncentracije grelina, leptina i proupalnih citokina (TNF- α , IL-6) kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva te istražiti povezanost serumskih razina grelina, leptina i proupalnih citokina s aktivnosti bolesti i nutritivnim statusom.

SPECIFIČNI CILJEVI:

- Istražiti postoji li razlika u serumskim razinama grelina, leptina i proupalnih citokina kod bolesnika koji primaju različite modalitete terapije.
- Istražiti postoji li razlika u serumskim razinama grelina, leptina i proupalnih citokina kod skupine bolesnika s Crohnovom bolesti u odnosu na skupinu bolesnika s ulceroznim kolitisom.
- Istražiti potencijalnu ulogu grelina, leptina i proupalnih citokina kao biomarkera za procjenu aktivnosti bolesti upalnih bolesti crijeva.

4 ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u Zavodu za gastroenterologiju, Centru za kliničku prehranu i Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb. Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim načelima i Deklaracijom iz Helsinkija iz 2000. godine. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi ispitanici su upoznati s protokolom i svrhom istraživanja, a prije uključivanja potpisali su obaviješteni pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Ovo presječno istraživanje provedeno je na ukupno 153 odrasla bolesnika oboljelih od upalnih bolesti crijeva te na 29 odrasla ispitanika u kontrolnoj skupini, koja je uključivala zdrave dobrovoljce bez simptoma ili pozitivne obiteljske anamneze na upalnu bolest crijeva. Razdoblje istraživanja iznosilo je 4 godine (od siječnja 2017. do prosinca 2020. godine).

Dijagnoza CD-a i UC-a temeljena je na opće prihvaćenim kliničkim, radiološkim, endoskopskim i histološkim kriterijima. U istraživanje su uključeni bolesnici s novootkrivenom upalnom bolesti crijeva koji još nisu počeli uzimati terapiju za upalnu bolest crijeva ili bolesnici koji se već liječe, ali pod uvjetom da u posljednja tri mjeseca kod bolesnika nije promijenjena vrsta terapije za upalnu bolest crijeva. Novootkriveni bolesnici su uključeni u trenutku postavljanja dijagnoze, a inicijalna terapija za dijagnosticiranu bolest nije odgađana zbog sudjelovanja u istraživanju. Isključujući kriteriji su dob < 18 ili > 75 godina, trudnoća, indeks tjelesne mase > 30 kg/m², hiperlipidemija (ukupni kolesterol > 8.0 mmol/L, trigliceridi > 2.5 mmol/L), koronarna bolest, kronična opstruktivna plućna bolest, kronična bubrežna insuficijencija, maligne bolesti ili druge autoimune bolesti. Kontrolnu skupinu su činili zdravi dobrovoljci različitih dobnih skupina, kojima je izvađena krv za koncentraciju grelina, leptina, TNF- α i IL-6, laboratorijski parametri te su učinjena antropometrijska mjerenja i BIA. Zdravi dobrovoljci nisu bili podvrgnuti kolonoskopiji kao ni bilo kojoj invazivnoj pretrazi.

4.2. Metode

Ispitanicima su zabilježeni detaljni anamnestički podaci, učinjen klinički pregled i antropometrijska mjerenja (tjelesna visina, tjelesna masa, indeks tjelesne mase, dinamometrija šake, kožni nabor tricepsa, opseg struka) te BIA. Istovremeno je učinjen i nutritivni probir metodom NRS2002. Ispitanicima je krv jednokratno izvađena iz kubitalne vene natašte (10 ml), u jutarnjim satima (od 7:00 do 09:00 h) te uzet urin za mikroskopski pregled sedimenta. Uzorkovanje krvi, antropometrijska mjerenja i BIA kod bolesnika koji su tog dana imali predviđenu aplikaciju biološke terapije, učinjeni su prije same aplikacije terapije. Bolesnici su dobili posudice za prikupljanje stolice koju su naknadno donijeli u Zavod.

Laboratorijske pretrage učinjene istog dana vađenja krvi su: sedimentacija eritrocita, hemoglobin, hematokrit, srednji volumen eritrocita (MCV), eritrociti, leukociti (postotak neutrofila i limfocita) i trombociti, protrombinsko vrijeme, aktivirano parcijalno trombotično vrijeme, d-dimeri, fibrinogen, glukoza u krvi (GUK), lipidogram (ukupni kolesterol, kolesterol vezan uz lipoprotein niske gustoće (eng. *low-density lipoprotein cholesterol*, LDL), kolesterol vezan uz lipoprotein visoke gustoće (eng. *high-density lipoprotein cholesterol*, HDL) i trigliceridi), elektroliti (natrij, kalcij ukupni i ionizirani, fosfat, magnezij), željezo (*Unsaturated Iron Binding Capacity*, nezasićeni kapacitet vezanja željeza - UIBC i *Total Iron Binding Capacity* - ukupni kapacitet vezanja željeza - TIBC), feritin, parametri bubrežne funkcije (ureja, kreatinin), jetreni enzimi (bilirubin, alkalna fosfataza (AP), alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST), gama-glutamilttransferaza (GGT)), ukupni proteini i albumin te vitamini (vitamin B12, folna kiselina, 25hidroksi vitamin D3). Iz stolice je analiziran fekalni kalprotektin. Dio seruma svih ispitanika pohranjen je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku medicinu na -70 °C. Nakon što su prikupljeni uzorci svih ispitanika, iz pohranjenih seruma analizirane su razine grelina, leptina, IL-6, TNF- α .

Analizom zabilježenih anamnestičkih podataka i uvidom u medicinsku dokumentaciju utvrđena je trenutna terapija koju bolesnici primaju za liječenje upalnih bolesti crijeva (aminosalicilati, glukokortikoidi, imunosupresivi, biološka terapija) te eventualni suplementi (preparati željeza, vitamin B12, folna kiselina, kolekalciferol).

Temeljem Montrealske klasifikacije, ispitanici s CD-om stratificirani su i prema dobi pri dijagnozi, lokalizaciji i ponašanju bolesti. Na temelju lokalizacije bolesti

stratificirani su u jednu od četiri skupine: L1 - bolest zahvaća terminalni ileum, L2 - bolest zahvaća kolon, L3 - bolest zahvaća i terminalni ileum i kolon te L4 - izolirana zahvaćenost gornjeg probavnog trakta. Na temelju ponašanja bolesti stratificirani su u jednu od 3 skupine: B1 - bolest inflamatornog fenotipa, B2 - bolest strukturirajućeg fenotipa, B3 - penetrantni fenotip bolesti, pri čemu je u sve tri skupine moguća prisutnost perianalne bolesti. Ispitanici s UC-om podijeljeni su po dobi pri dijagnozi i lokalizaciji bolesti. Na temelju lokalizacije bolesti stratificirani su u 3 skupine: L1 - ograničena na rektum, L2 - bolest ograničena na lijevi kolon (upalne promjene se ne nalaze proksimalno od lijevalne fleksure kolona), L3 - ukoliko je bolest proksimalno od lijevalne fleksure. Također su utvrđeni i komorbiditeti te eventualni kirurški zahvati vezani za upalnu bolest crijeva. Temeljem prikupljenih kliničkih i anamnestičkih podataka, vrijednosti hematokrita, ispitanicima je određena aktivnost bolesti u trenutku provođenja istraživanja upotrebom Harvey Bradshaw indeksa i CDAI za ispitanike s CD-om, odnosno Trulove Wittsovih kriterija i PMS za bolesnike s UC-om. Iz medicinske dokumentacije bolesnika kod kojih je endoskopski pregled učinjen tri mjeseca prije ili nakon uključivanja u istraživanje, utvrđena je endoskopska aktivnost bolesti upotrebom SES-CD u bolesnika s CD-om, odnosno MES u bolesnika s UC-om.

4.2.1. Standardne laboratorijske pretrage

Sve laboratorijske pretrage izvršene su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Kompletna krvna slika sa svim pripadajućim parametrima (broj eritrocita, leukocita i trombocita, koncentracija hemoglobina te postotak neutrofila i limfocita) određena je koristeći lasersku tehnologiju rasipanja svjetlosti (uređaj Sysmex XE 5000). Svi biokemijski parametri u nastavku analizirani su iz seruma na uređaju Cobas c 501, Roche. Elektroliti: kalij i natrij indirektnom potenciometrijom, zatim ukupni kalcij fotometrijom s NMBAPTA i anorganski fosfat UV fotometrijom s amonij-molibdatom. Fotometrijskom metodom s ferozinom određeni su serumsko željezo i UIBC, feritin metodom imunotuborbidimetrije, ukupni protein fotometrijskom metodom s biuret reagensom bez slijepe probe, a albumin fotometrijskom metodom bromkrezol zelenilom (BCG). Aktivnosti enzima određene su preporučenim IFCC metodama na 37 °C: ALT (UV fotometrija s TRIS puferom, L-alaninom, α - 40 ketoglutaratom i piridoksal fosfatom), AST (UV fotometrija s TRIS puferom L-aspartatom α ketoglutaratom i piridoksal

fosfatom), ALP („kontinuirana“ fotometrija s p-nitrofenilfosfatom) te GGT („kontinuirana“ fotometrija s L-gama-glutamil-karboksi-p-nitroanilid uz glicilglicin). Koncentracije analita također su određene preporučenim metodama: glukoza UV fotometrijom s heksokinazom, ukupni bilirubin (fotometrija s 3,5 diklorfenil-diazonium-tetrafluoroboratom), ureja fotometrijom s ureazom i glutamat dehidrogenazom, kreatinin fotometrijom s kreatininazom, urati (fotometrija s urikazom uz askorbat-oksidadu), trigliceridi fotometrijom s glicerolfosfatoksidazom (GPO-PAP) i ukupni kolesterol fotometrijom s kolesterol-oksidadom (CHOD-PAP), HDL/LDL homogenom enzimskom kolorimetrijskom metodom. Na istom uređaju ili Cobas 6000cee, Roche imunoturbidimetrijskim metodama određene su koncentracije CRP. Modificiranom Claussovom metodom s multifibrenom određena je koncentracija fibrinogena u citratnoj plazmi na uređaju Siemens BCSxp. Na istom uređaju, optičkom koagulometrijom određeni su PV i APTV. D dimeri određeni su imunokemijskom metodom (*Enzyme Linked Fluorescent Assay* - ELFA princip) na uređaju Biomerieux Mini Vidas. Vitamin B12, folna kiselina i 25-OH-vitaminD3 određeni su imunokemijskom metodom (*electrochemiluminescence immunoassay* - ECLIA princip) na Roche Cobas E601 uređaju. Fekalni kalprotektin određen je na RocheCobas C501 uređaju metodom imunoturbidimetrije koristeći Buhlmann fCAL reagens.

4.2.2. Imunoenzimske metode (ELISA)

Za određivanje serumskih koncentracija IL-6, TNF- α , grelina i leptina prikupljeni su uzorci venske krvi od bolesnika uključenih u istraživanje. Uzorci su prikupljeni u količini od 4 ml u epruvetama sa smolom nakon čega su centrifugirani 10 min na 3000 okretaja/min. Dobiveni serum odijeljen je u plastične epruvete i pohranjen na -20°C. Koncentracije grelina, leptina i citokina IL-6 i TNF- α u uzorcima seruma određivane su pomoću komercijalnih enzimskih imunotestova (ELISA, od eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*). ELISA testovi za određivanje IL-6, TNF- α i leptin su rađeni prema uputama proizvođača R&D Systems Inc. (Bio-Techne Ltd., Minneapolis, MN, SAD), a za grelin prema uputama proizvođača Novus Biologicals (Bio-Techne Ltd., Abingdon, Velika Britanija). Za određivanje leptina uzorci seruma su početno razrijeđeni u omjeru 1:100 dok su uzorci seruma za IL-6, TNF- α i grelin određivani bez razrjeđivanja.

Za određivanje IL-6, TNF- α , leptina i grelina u bunariće mikrotitarskih pločica obloženih s odgovarajućim specifičnim antitijelom usmjerenim na traženi analit dodani su standardi, kontrole i uzorci ispitivanih seruma i inkubirani na sobnoj temperaturi (za TNF- α inkubacija se odvijala na miješalici na 500 rpm (Biosan, Riga, Latvija)). Nakon ispiranja u bunariće pločica je dodano peroksidazom (HRP) obilježeno monoklonsko anti-humano antitijelo specifično za IL-6, TNF- α ili leptin, ovisno o analizi. Za određivanje grelina, inkubacija s biotinom obilježenim monoklonskim anti-humanim antitijelom na grelin prethodila je inkubaciji s avidin-HRP konjugatom. Nakon inkubacije i ispiranja dodana je otopina supstrata TMB (tetrametil benzidid) i inkubirana tijekom 15 do 30 minuta nakon čega je reakcija zaustavljena dodatkom stop otopine.

Apsorbanca dobivene razvijene boje je očitana na 450 nm s referentnom valnom duljinom od 630 nm na čitaču mikrotitarskih pločica Sunrise (Tecan Trading AG, Männedorf, Švicarska). Rezultati mjerenja su izračunati prema dobivenoj standardnoj krivulji (programska podrška Magellan, Tecan Trading AG, Männedorf, Švicarska), pomnoženi s odgovarajućim faktorom razrijeđenja i izraženi u pg/ml.

4.2.3. Metode procjene nutritivnog statusa

Za probir nutritivnog rizika korišten je alat NRS 2002. Pozitivan odgovor na bilo koje od pitanja inicijalnog probira (ITM <20,5 kg/m², gubitak težine u posljednja 3 mjeseca, smanjeni unos hrane posljednjeg tjedna i težina bolesti) upućuje ispitivača na završni probir u kojem se procjenjuje odstupanje u nutritivnom statusu i težina bolesti. Osobama životne dobi > 70 godina dodaje se još jedan bod. Ukupan broj ≥ 3 znači ustanovljen nutritivni rizik i potrebu nutritivne potpore.

Tjelesna visina je mjerena portabilnim stadiometrom (Seca 220, Njemačka).

Sastav tijela određivan je pomoću TANITA vage (model TANITA *body composition analyser*, BC-420MA), koja se temelji na bioelektričnoj analizi impedancije. Bolesnici su mjereni nakon što su ispraznili mokraćni mjehur, natašte, u laganoj odjeći u stajaćem položaju, bez obuće. Za analizu su uneseni podaci o ispitanikovo dobi, spolu i tjelesnoj visini te približna težina odjeće na ispitaniku. Za svako mjerenje unesen je i podatak o fizičkoj spremnosti ispitanika (odabir između standardnog i atletskog tipa). Mjerenjem TANITA vagom dobiveni su sljedeći podaci: tjelesna težina (TT, kg), udio masnog tkiva (*fat*, %), masa masnog tkiva (FM-*fat mass*, kg), masa nemasnog tkiva (FFM - *fat-free mass*, %), mišićna masa (MM - *muscle mass*,

kg), masa vode u organizmu (TBW - *total body water*, kg), udio vode u organizmu (TBW - *total body water*, %), masa kosti (BM - *bone mass*, kg), bazalni metabolizam (BMR - *basal metabolic rate*, kJ i kcal), metabolička dob, udio visceralne masti (VFR - *visceral fat rate*), ITM te bioelektrična impedancija. Postotak masti se odnosi na udio masti u cijeloj tjelesnoj težini. FFM predstavlja zbroj mase mišića, kosti, tkiva i vode. TBW uključuje ukupnu količinu tekućine u ispitanikovom tijelu. BMR nam otkriva kolike su minimalne energetske potrebe u mirovanju za tjelesne funkcije. Skeletna mišićna masa (SMM - *skeletal muscle mass*, kg) dobivena je računski iz formule $SMM = [(TV^2/R \times 0.401) + (\text{spol} \times 3.825) + (\text{dob} \times -0.071)] + 5.102$; pri čemu je TV tjelesna visina izražena u centimetrima, a R je bioelektrična impedancija u omima, muški spol je 1, a ženski spol 0, dob je izražena u godinama.

Opseg struka i opseg nadlaktice (MUAC - *middle upper arm circumference*, engl.) mjereni su centimetarskom trakom. Opseg nadlaktice mjereno je na lijevoj nadlaktici, na njenom najširem dijelu. Opseg struka mjerio se na polovici udaljenosti između pupka i rebrenih lukova. Kožni nabor nadlaktice mjereno je kaliperom kao uzdužni nabor na stražnjoj strani nadlaktice (iznad *m. triceps brachii*) na polovici udaljenosti između akromiona i oleokranona. Učinjena su tri uzastopna mjerenja, a za analizu je uzeta središnja od izmjerenih vrijednosti.

Za procjenu mišićne snage korišten je dinamometar. Test je izveden u sjedećem položaju, s nadlakticom paralelnom s trupom i kutom između nadlaktice i podlaktice od 90°. Testirana je prvo nedominantna ruka, zatim dominantna ruka, a potom su mjerenja ponovljena na svakoj ruci još dva puta, s pauzom od oko 10 sekundi. Za analizu je uzeta središnja od izmjerenih vrijednosti za pojedinu ruku.

Sva mjerenja vršio je educirani član Centra za kliničku prehranu.

4.3. Statistička obrada podataka

Normalnost kontinuiranih varijabli ispitana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Kontinuirane varijable opisane su aritmetičkom sredinom, standardnom devijacijom, medijanom te interkvartilnim rasponom.

Distribucija kategorijskih varijabli prikazana je frekvencijskim tablicama koje sadržavaju raspodjelu učestalosti po skupinama i udio za svaku pojedinu skupinu (postotak).

Jednakosti varijance 2 ili više kontinuiranih varijabli provedena je Leveneovim testom.

Za utvrđivanje razlika u parametrijskim varijablama između 2 nezavisna uzorka upotrebljavan je Studentov t-test, dok se za neparametrijske varijable (odstupanje raspodjele od normalne) koristio Mann-Whitneyev U-test. Za utvrđivanje razlika u kontinuiranim varijablama između 3 ili više nezavisnih uzoraka korištena je ANOVA za parametrijsku, te Kruskal-Wallis ili Kolmogorov-Smirnov test za neparametrijsku raščlambu (ovisno o homogenosti varijance).

Za utvrđivanje razlika u kategorijskim varijablama među proporcijama između dva nezavisna uzorka upotrebljavan je se Fisherov egzaktni test, a između više od 2 nezavisna uzorka Pearsonov χ^2 .

Za utvrđivanje povezanosti između numeričkih varijabli korišten je Pearsonov koeficijent korelacije za parametrijske varijable, te Spearmanov koeficijent korelacije za neparametrijske varijable.

Za utvrđivanje veze aktivnosti bolesti te grelina, leptina te upalnih citokinina korištena je logistička regresija.

Statistička značajnost je prihvaćena uz $p < 0,05$. Za statističku analizu bio je korišten statistički program SAS.

5 REZULTATI

5.1. Kliničko-laboratorijski pokazatelji ispitanika

U istraživanje je uključeno ukupno 153 odraslih bolesnika (64 žena i 89 muškarca) s upalnom bolesti crijeva, 98 bolesnika s CD-om i 55 bolesnika s UC-om. U kontrolnu skupinu uključeno je 29 odraslih ispitanika. U tablici 1 su prikazana osnovna demografska i klinička obilježja skupine bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

Srednja dob ispitanika bila je 36,86 godina (s rasponom između 17 i 70 godina) u skupini UBC bolesnika te 40,34 godina (s rasponom između 29 i 56 godina) u skupini zdravih dobrovoljaca. Ispitanici s CD-om imali su prosječnu dob od 36,58 godina, a prosječna dob ispitanika s UC-om je 37,34 godine.

Prosječno trajanje bolesti u bolesnika s CD-om je 11,33 što je značajno više u usporedbi s trajanjem bolesti od 7,73 godine u ispitanika s UC-om ($p = 0,01$).

Prema lokalizaciji bolesti CD: 17,71 % je imalo zahvaćen terminalni ileum (L1), 12,50 % kolon (L2), 64,58 % ileokolon a 5,21 % gornji probavni trakt (L4). Prema ponašanju bolesti 37,50 % je imalo luminalni tip (B1), 41,67 % stenozirajući fenotip (B2), 19,79 % penetrirajući fenotip (B3). Prema lokalizaciji UC-a: 4 % bolesnika je imalo proktitis (E1), 30 % ljevostrani kolitis (E2) a 66 % pankolitis (E3).

Ukupno 64,29 % ispitanika s CD-om u trenutku mjerenja primalo je biološku terapiju, 35,71 % imunomodulatore, a 2,04 % glukokortikoide. Veći dio bolesnika s UC-om liječen je glukokortikoidima (16,36 %) u odnosu na bolesnike s CD-om ($p = 0,002$). Ukupno 50,91 % bolesnika s UC-om u trenutku mjerenja primalo je biološku terapiju, 29,09 % imunomodulatore. 60 % bolesnika s UC-om u terapiji je imalo aminosalicilate, što je statistički značajno više nego kod bolesnika s CD-om (33,67 %, $p = 0,002$).

Tablica 1. Osnovni demografski i klinički podaci ispitanika

Parametar	Crohnova bolest n = 98	Ulcerozni kolitis n = 55	Kontrolna skupina n = 29	p
Dob (godine); srednja vrijednost Median (IQR)	36,58 36 (17)	37,34 36 (24)	40,34 40 (13)	0,30
Spol: Ž M	41 (41,84 %) 57 (58,16 %)	23 (41,82 %) 32 (58,18 %)	25 (86,21 %) 4 (13,79 %)	<0,0001*
Trajanje bolesti; srednja vrijednost Medijan (IQR)	11,33 9,5 (12)	7,73 6 (8)		0,01*
Aktivni pušači	18 (18,37 %)	5 (9,09 %)	5 (17,24 %)	0,29
UBC operacija	48 (48,98 %)	6 (10,91 %)		<0,0001*
Terapija				
<i>Bez terapije</i>	12 (12,24 %)	7 (12,73 %)		1,0
<i>Aminosalicilati</i>	33 (33,67 %)	33 (60,00 %)		0,002*
<i>Glukokortikoidi</i>	2 (2,04 %)	9 (16,36 %)		0,002*
<i>Imunomodulator</i>	35 (35,71 %)	16 (29,09 %)		0,48
<i>Biološka terapija</i>	63 (64,29 %)	28 (50,91 %)		0,12
<i>Infliksimab</i>	35 (35,71 %)	18 (32,73 %)		0,73
<i>Adalimumab</i>	23 (23,47 %)	1 (1,85 %)		0,0003*
<i>Golimumab</i>	0 (0,00 %)	7 (12,96 %)		0,0005*
<i>Vedolizumab</i>	2 (2,04 %)	2 (3,70 %)		0,62
<i>Ustekinumab</i>	3 (3,06 %)	0 (0,00 %)		0,55
Dob pri dijagnozi (Montreal)				
<i>A1 (< 16 godina)</i>	22 (22,92 %)	11 (22,00 %)		0,03*
<i>A2 (17 i 40 godina)</i>	71 (73,96 %)	31 (62,00 %)		
<i>A3 (> 40 godina)</i>	3 (3,13 %)	8 (16,00 %)		
Lokalizacija bolesti CB (Montreal)				
<i>L1 (ileum)</i>	17 (17,71 %)			
<i>L2 (kolon)</i>	12 (12,50 %)			
<i>L3 (ileokolon)</i>	62 (64,58 %)			
<i>L4 (gornji probavni trakt)</i>	5 (5,21 %)			
Ponašanje bolesti CB (Montreal)				
<i>B1 (luminalni)</i>	36 (37,50 %)			
<i>B2 (stenozirajući)</i>	40 (41,67 %)			
<i>B3 (penetrirajući)</i>	19 (19,79 %)			
<i>P perianalna bolest</i>	1 (1,04 %)			
Lokalizacija bolesti UC (Montreal)				
<i>E1 (proktitis)</i>		2 (4,00 %)		
<i>E2 (ljevostrani kolitis)</i>		15 (30,00 %)		
<i>E3 (pankolitis)</i>		33 (66,00 %)		
Težina bolesti UC (Montreal)				
<i>S1 (blaga)</i>		19 (38,78 %)		
<i>S2 (srednje teška)</i>		24 (48,98 %)		
<i>S3 (teška)</i>		6 (12,24 %)		

*p < 0.05

U tablici 2 bolesnici su stratificirani prema kliničkoj i endoskopskoj aktivnosti bolesti te su navedene prosječne vrijednosti najvažnijih laboratorijskih parametara.

Prema kliničkim bodovnim sustavima 15,47 % (HBI), odnosno 16,5 % (CDAI) bolesnika s CD-om je imalo aktivnu bolest. Klinički aktivnu bolest prema Partial Mayo *scoreu* je imalo 55,1 % bolesnika, odnosno prema TW kriterijima 77, 54 % bolesnika s UC-om.

Nalaze učinjene endoskopske pretrage unutar 3 mjeseca od prikupljanja seruma za istraživanje imalo je 73 (47,71 %) bolesnika. Endoskopska aktivnost bolesti zabilježena je na temelju pisanih endoskopskih nalaza gastroenterologa KBC-a Zagreb koji su učinili endoskopsku pretragu. Korišteni su validirani endoskopski indeksi, SES-CD za CD i MES za UC. Endoskopski aktivnu bolest (prema SES-CD) među bolesnicima koji su imali dostupne nalaze endoskopskih pretraga, imalo je 48 % ispitanika s CD-om, dok je 80,56 % bolesnika s UC-om imalo endoskopsku aktivnost (prema MES-u).

Tablica 2. Klinička, biokemijska i endoskopska aktivnost bolesti

Parametar	Crohnova bolest n = 98	Ulcerozni kolitis n = 55	p
Klinički			
HBI			
Remisija	82 (79,61 %)		
Blaga bolest	8 (8,25 %)		
Umjerena bolest	7 (7,22 %)		
Teška bolest	0 (0,00 %)		
CDAI			
Remisija	81 (83,51 %)		
Blaga bolest	9 (9,28 %)		
Umjerena bolest	6 (6,19 %)		
Teška bolest	1 (1,03 %)		
Truelove i Witts kriteriji			
Remisija		11 (22,45 %)	
Blagi kolitis		16 (32,65 %)	
Umjereni kolitis		17 (34,69 %)	
Teški kolitis		5 (10,20 %)	
Partial Mayo Score			
Remisija		22 (44,90 %)	
Blagi kolitis		13 (26,53 %)	
Umjereni kolitis		11 (22,45 %)	
Teški kolitis		3 (6,12 %)	
Biokemijski			
Hemoglobin (mmol/l) param	137,20	132,83	0,16
HGB	140 (24)	131,5 (26)	
CRP non-param	6,11	15,03	0,047*
CRP	1,8 (3,8)	3,5 (8,7)	
SE (mm/h) non-param	17,97	21,57	0,37
SE	11 (16)	19 (28)	
Leukociti (x10⁹/l) param	7,22	7,52	0,46
Leukociti	6,9 (2,8)	6,9 (3,9)	
Trombociti (x10⁹/l) param	302,32	307,84	0,72
TRC	294 (127)	293 (129)	
Fekalni kalprotektin (µg/g) non-param	227,05	574,36	0,002*
KALPROTEKTIN	117 (306)	288 (875)	
Endoskopski			
Kategorije	SES-CD (25)	MES (36)	
0 (remisija)	13 (52 %)	7 (19,44 %)	
1 (blaga bolest)	5 (20 %)	14 (38,89 %)	
2 (srednje teška bolest)	5 (20 %)	6 (16,67 %)	
3 (teška bolest)	2 (8 %)	9 (25,00 %)	

HBI - Harvey Bradshaw index, **CDAI** - Crohn's disease activity index, **HGB** - hemoglobin, **CRP** - C-reaktivni protein, **SE** - sedimentacija eritrocita, **SES-CD** - Simple Endoscopic Score for Crohn's disease, **MES** - Mayo Endoscopic Score; ***p < 0.05**

Prosječne vrijednosti laboratorijskih nalaza bile su unutar referentnih vrijednosti osim vrijednosti sedimentacije, C-reaktivnog proteina i fekalnog kalprotektina koje su povišene, u CD-u i UC-u, 25-hidroksi vitamina D koji je snižen i u CD-u i UC-u te vrijednosti D-dimera koje su povišene u UC-u (Tablica 3).

Tablica 3: Laboratorijski nalazi ispitanika

Parametar	Crohnova bolest			Ulcerozni kolitis			p	Kontrolna skupina			
	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (IQR)	KS test	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (IQR)	KS test		Srednja vrijednost ± SD	Medijan (IQR)	KS test	p
SE mm/h	17,97 ± 18,12	11 (16)	<0,01	21,57 ± 19,95	19 (28)	<0,01	0,36	9,74 ± 7,39	7 (11)	0,14	0,08
CRP mg/L	6,11 ± 13,32	1,8 (3,8)	<0,01	15,03 ± 32,03	3,5 (8,7)	<0,01	0,046	4,73 ± 16,79	0,8 (3,1)	<0,01	0,003
Eritrociti x10 ¹² /L	4,80 ± 0,58	4,89 (0,8)	>0,15	4,60 ± 0,55	4,64 (0,72)	>0,15	0,03*	4,70 ± 0,44	4,69 (0,75)	>0,15	0,08
Hgb g/L	135,81 ± 22,28	140,00 (24,0)	0,02	130,44 ± 25,96	131,00 (26,00)	<0,01	0,15	137,25 ± 15,70	135,00 (19,00)	>0,15	0,31
MCV	86,32 ± 6,03	86,25 (7,7)	>0,15	86,88 ± 6,54	87,00 (7,0)	0,02	0,33	86,63 ± 4,68	85,55 (5,05)	>0,15	0,43
Leukociti x10 ⁹ /L	7,22 ± 2,31	6,9 (2,8)	0,09	7,52 ± 2,64	6,9 (3,9)	>0,15	0,46	6,97 ± 1,77	6,5 (2,6)	0,04	0,79
Trc x10 ⁹ /L	302,32 ± 94,82	294,0 (127,0)	0,14	307,84 ± 88,32	293,0 (129,0)	>0,15	0,72	260,09 ± 72,29	274,5 (55,0)	0,12	0,06
Fibrinogen g/L	3,63 ± 1,13	3,6 (1,2)	<0,01	3,64 ± 1,34	3,65 (1,7)	>0,15	0,95	3,07 ± 0,71	2,7 (0,8)	<0,01	0,01*
D-dimeri mg/L	0,35 ± 0,40	0,24 (0,18)	<0,01	0,75 ± 1,26	0,34 (0,51)	<0,01	0,002	0,35 ± 0,39	0,27 (0,14)	<0,01	0,007
Glukoza mmol/L	4,70 ± 0,66	4,6 (0,7)	<0,01	4,94 ± 1,02	4,7 (1,0)	0,01	0,22	4,65 ± 0,39	4,65 (0,4)	0,06	0,44
Bilirubin μmol/L	10,15 ± 6,88	9,0 (6,0)	<0,01	9,38 ± 5,29	8,0 (5,0)	<0,01	0,63	10,63 ± 8,07	10,0 (6,0)	<0,01	0,69
ALP U/L	83,10 ± 68,47	69,00 (30,00)	<0,01	77,42 ± 40,25	70,00 (24,00)	<0,01	0,58	58,86 ± 16,32	59,50 (23,00)	>0,15	0,009
AST U/L	28,18 ± 16,42	23,0 (11,0)	<0,01	23,13 ± 11,11	21,0 (10,0)	<0,01	0,02*	21,75 ± 6,71	20,5 (6,0)	0,02	0,01*
ALT U/L	32,05 ± 37,84	21,5 (18,0)	<0,01	21,47 ± 9,68	19,0 (13,0)	0,02	0,13	21,82 ± 14,81	19,5 (10,5)	<0,01	0,22
GGT U/L	35,56 ± 54,83	19,0 (20,0)	<0,01	39,91 ± 70,94	18,0 (32,0)	<0,01	0,83	15,68 ± 8,67	13,5 (5,5)	<0,01	0,03*
Ureja mmol/L	4,68 ± 1,86	4,4 (1,6)	<0,01	4,77 ± 1,80	4,7 (2,6)	>0,15	0,40	4,75 ± 1,22	4,7 (1,9)	>0,15	0,60
Kreatinin μmol/L	76,03 ± 49,66	72,0 (21,0)	<0,01	75,65 ± 16,10	73,0 (23,0)	0,10	0,37	70,86 ± 12,52	68,5 (12,0)	0,02	0,45
Kolesterol mmol/L	4,07 ± 1,00	3,8 (1,2)	<0,01	4,34 ± 1,13	4,35 (1,6)	>0,15	0,16	5,04 ± 0,90	4,9 (1,15)	>0,15	<0,0001*
Tg mmol/L	1,33 ± 0,76	1,13 (0,95)	<0,01	1,06 ± 0,59	0,98 (0,56)	<0,01	0,03*	0,97 ± 0,54	0,78 (0,70)	<0,01	0,01*
HDL mmol/L	1,44 ± 0,41	1,42 (0,5)	0,06	1,45 ± 0,45	1,43 (0,55)	0,13	0,89	1,57 ± 0,32	1,63 (0,49)	>0,15	0,34
LDL mmol/L	2,00 ± 0,88	1,8 (1,01)	0,02	2,42 ± 0,91	2,3 (1,35)	>0,15	0,01*	3,03 ± 0,84	2,82 (0,77)	0,06	<0,0001*

Parametar	Crohnova bolest			Ulcerozni kolitis			p	Kontrolna skupina			p
	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (IQR)	KS test	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (IQR)	KS test		Srednja vrijednost ± SD	Medijan (IQR)	KS test	
Kalij mmol/L	4,29 ± 0,37	4,3 (0,4)	0,13	4,26 ± 0,33	4,2 (0,5)	>0,15	0,61	4,38 ± 0,33	4,3 (0,35)	>0,15	0,35
Natrij mmol/L	140,57 ± 2,69	141,0 (3,0)	<0,01	140,48 ± 2,31	140,0 (3,0)	0,02	0,74	140,46 ± 2,87	140,0 (4,5)	>0,15	0,90
Fosfati mmol/L	1,07 ± 0,21	1,06 (0,22)	0,12	1,11 ± 0,20	1,09 (0,23)	>0,15	0,19	1,07 ± 0,19	1,05 (0,2)	>0,15	0,39
Magnezij mmol/L	0,82 ± 0,08	0,83 (0,08)	<0,01	0,83 ± 0,07	0,83 (0,09)	>0,15	0,65	0,86 ± 0,05	0,86 (0,09)	>0,15	0,06
Željezo µmol/L	13,64 ± 7,45	12,0 (10,0)	<0,01	12,53 ± 8,36	10,0 (10,0)	0,03	0,21	15,63 ± 7,62	15,0 (10,0)	>0,15	0,11
UIBC µmol/L	48,84 ± 13,78	47,5 (17,0)	<0,01	41,61 ± 14,56	39,0 (21,0)	0,07	0,01*	39,19 ± 12,49	37,0 (17,0)	0,14	0,0008*
TIBC µmol/L	62,36 ± 11,37	61,0 (14,0)	0,03	55,47 ± 11,98	55,0 (18,0)	>0,15	0,003	55,93 ± 8,33	55,0 (11,0)	0,07	0,002
Feritin µg/L	78,74 ± 96,20	37,25 (99,70)	<0,01	83,60 ± 131,23	33,2 (70,9)	<0,01	0,66	78,07 ± 95,67	41,3 (71,9)	<0,01	0,72
Albumin g/L	44,23 ± 5,89	44,9 (5,0)	<0,01	42,92 ± 5,66	43,6 (8,1)	>0,15	0,15	46,97 ± 3,43	46,25 (4,0)	>0,15	0,01*
Proteini g/L	72,85 ± 5,11	73,0 (7,0)	0,12	71,67 ± 5,94	72,0 (9,5)	>0,15	0,33	71,44 ± 4,31	71,0 (5,0)	>0,15	0,28
vitaminD nmol/L	44,45 ± 23,78	38,00 (28,00)	<0,01	51,09 ± 16,13	50,00 (21,00)	>0,15	0,006	72,81 ± 30,84	72,00 (50,00)	>0,15	<0,0001*
Vitamin B12 nmol/L	260,67 ± 167,78	229,0 (163,0)	<0,01	313,40 ± 145,67	278,0 (132,0)	0,01	0,01*	344,30 ± 147,03	338,0 (180)	>0,15	0,001
Folna kiselina nmol/L	25,72 ± 15,29	18,7 (32,5)	<0,01	26,59 ± 13,97	25,5 (29,0)	0,02	0,79	18,36 ± 10,37	15,6 (10,9)	<0,01	0,08

Hgb – hemoglobin, **Trc** – trombociti, **CRP** - C-reaktivni protein, **SE** - sedimentacija eritrocita, **MCV**- prosječni volumen eritrocita, **AST** -aspartat-aminotranferaza, **ALT** - alanin-aminotranferaza, **GGT** - gama-glutamiltanferaza, **Tg** – trigliceridi, **HDL** -lipoproteini visoke gustoće, **LDL** - lipoproteini niske gustoće, **UIBC** - nezasićeni kapacitet vezanja željeza, **TIBC** - ukupni kapacitet vezanja željeza; *p< 0,05

Tablica 4 prikazuje pokazatelje nutritivnog statusa ispitanika. Ispitanici s CD-om i UC-om imaju značajno niže vrijednosti mišićne mase (p = 0,04) i postotka mišićne mase od kontrolne skupine (p = 0,01). Osim toga, ukupni postotak tjelesne vode niži je kod ispitanika s upalnim bolestima crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,003). Između skupina bolesnika s CD-om i UC-om, nisu uočene značajnije razlike u ostalim parametrima nutritivnog statusa.

Tablica 4. Pokazatelji nutritivnog statusa ispitanika

Parametar	Crohnova bolest			Ulcerozni kolitis			p	Kontrolna skupina			p
	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (IQR)	KS test	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (IQR)	KS test		Srednja vrijednost ± SD	Medijan (IQR)	KS test	
Tjelesna težina (kg)	71,71 ± 17,21	68,75 (22,7)	0,06	75,08 ± 14,43	76,0 (23,3)	>0,15	0,08	73,84 ± 18,44	67,4 (20,5)	<0,01	0,21
Tjelesna visina (cm)	173,31 ± 9,38	173,0 (12,0)	>0,15	175,85 ± 9,54	176,0 (14,0)	>0,15	0,13	172,0 ± 13,04	170,0 (9,0)	<0,01	0,04*
ITM (kg/m²)	23,72 ± 4,61	23,04 (6,36)	>0,15	24,28 ± 4,55	23,86 (6,79)	0,08	0,41	24,80 ± 4,24	22,82 (6,96)	<0,01	0,42
Opseg struka (cm)	81,84 ± 14,80	78,5 (20,0)	0,01	83,33 ± 13,10	82,0 (19,5)	0,07	0,45	77,54 ± 9,70	76,0 (17,0)	0,09	0,27
Mišićna snaga											
Dominantna ruka	31,44 ± 11,38	28,87 (18,38)	0,04	34,48 ± 9,90	31,5 (17,28)	0,12	0,11	30,82 ± 9,97	28,50 (6,3)	<0,01	0,22
Nedominantna ruka	29,82 ± 10,62	27,73 (16,46)	<0,01	32,99 ± 10,55	30,75 (19,50)	0,09	0,12	29,35 ± 9,20	27,45 (7,50)	<0,01	0,27
Kožni nabor nadlaktice	20,82 ± 11,42	19,92 (10,37)	<0,01	18,94 ± 7,65	19,27 (10,66)	>0,15	0,53	21,01 ± 9,76	18,51 (11,27)	<0,01	0,82
MUAC (cm)	29,66 ± 9,74	28,5 (6,0)	<0,01	28,98 ± 3,43	29,0 (5,0)	>0,15	0,40	28,83 ± 3,45	28,0 (3,5)	<0,01	0,67
FM (kg)	16,36 ± 9,71	14,7 (11,0)	<0,01	19,60 ± 13,11	16,4 (17,2)	<0,01	0,22	22,06 ± 11,37	18,2 (10,9)	0,01	0,04*
FM (%)	22,72 ± 8,83	21,7 (12,9)	>0,15	24,09 ± 10,58	24,3 (13,3)	>0,15	0,47	29,75 ± 10,17	29,0 (12,4)	>0,15	0,01*
FFM (kg)	53,86 ± 12,58	52,4 (21,6)	<0,01	56,02 ± 12,18	52,1 (23,5)	0,04	0,27	50,49 ± 10,87	46,8 (4,8)	<0,01	0,37
SMM (kg)	27,76 ± 6,74	28,17 (11,38)	<0,01	29,21 ± 7,09	28,88 (11,66)	>0,15	0,31	25,40 ± 5,14	23,62 (2,82)	<0,01	0,15
MM (kg)	50,99 ± 12,13	49,7 (20,6)	<0,01	53,21 ± 11,61	49,5 (22,4)	0,04	0,23	47,94 ± 10,35	44,4 (4,6)	<0,01	0,35
TBW (kg)	37,57 ± 8,91	36,75 (13,85)	<0,01	38,88 ± 8,19	38,7 (15,8)	0,04	0,30	35,12 ± 6,76	32,8 (4,4)	<0,01	0,39
TBW (%)	53,74 ± 5,92	53,85 (6,8)	0,11	52,63 ± 6,56	52,4 (7,8)	>0,15	0,37	47,62 ± 7,68	49,0 (11,0)	>0,15	0,00
BMR (kJ)	6667,3 ± 1501	6372,5 (2281,0)	<0,01	6948,5 ± 1385	6661,0 (2456,0)	0,10	0,20	6336,6 ± 1315	5828,0 (836,0)	<0,01	0,27
BMR (kCal)	1593,99 ± 358,96	1523 (545)	<0,01	1660,63 ± 330,88	1592 (587)	0,10	0,20	1518,04 ± 321,70	1393 (200)	<0,01	0,27
VFR	5,6 ± 4,77	4,5 (5,0)	<0,01	6,0 ± 5,19	5,0 (8,0)	0,01	0,72	5,08 ± 2,87	4,0 (5,0)	0,07	0,88
BIA	532,33 ± 86,98	519,2 (112,0)	0,13	517,28 ± 89,29	520,5 (125,1)	>0,15	0,40	520,46 ± 52,49	526,9 (80,6)	>0,15	0,62

MUAC - opseg nadlaktice, **FM** - masa masnog tkiva (*fat mass*, engl.), **FMI** - indeks mase masnog tkiva (*fat mass index*, engl.), **FFM** - masa nemasnog tkiva (*fat-free mass*, engl.), **SMM** - skeletna mišićna masa (*skeletal muscle mass*, engl.), **MM** - mišićna masa (*muscle mass*, engl.), **TBW** - udio vode u organizmu (*total body water*, engl.), **BMR** - bazalni metabolizam (*basal metabolic rate*), **VFR** - udio visceralne masti (*visceral fat rate*), **BIA** – bioelektrična impedanca; ***p** < 0.05

5.2. Koncentracije ispitivanih biomarkera u serumu

U 73,47 % uzoraka bolesnika s CD-om vrijednosti grelina su bile nedetektabilne, dok je 67,27 % s UC-om imalo nedetektabilne vrijednosti. Vrijednosti leptina su bile nedetektabilne u 2,04 % bolesnika s CD-om, odnosno 3,64 % bolesnika s UC-om. Vrijednosti IL-6 su bile nedetektabilne u 16,33 % bolesnika s CD-om i 14,55 % bolesnika s UC-om. Vrijednosti TNF- α su bile nedetektabilne u 28,57 % bolesnika s CD-om, dok je 20 % bolesnika s UC-om imalo nedetektabilne vrijednosti. Unutar svake pojedine skupine nema statistički značajne razlike u postotku nedetektabilnih vrijednosti. U Tablici 5 prikazane su navedeni brojevi uzoraka izvan granica detektabilnosti, prema pojedinima skupinama.

Tablica 5. Broj uzoraka izvan granica detektabilnosti

	Crohnova bolest	Ulcerozni kolitis	Kontrolna skupina	p
GRELIN				
Nedetektabilni	72 (73,47 %)	37 (67,27 %)	19 (65,52 %)	0,60
LEPTIN				
Nedetektabilni	2 (2,04 %)	2 (3,64 %)	0 (0,00 %)	0,64
IL-6				
Nedetektabilni	16 (16,33 %)	8 (14,55 %)	4 (13,79 %)	0,96
TNF-α				
Nedetektabilni	28 (28,57 %)	11 (20,00 %)	10 (34,48 %)	0,31

IL-6- interleukin-6, TNF- α - Čimbenik tumorske nekroze alfa (*Tumor necrosis factor α* , engl.)

Koncentracije ispitivanih biomarkera prikazane su u Tablici 6 te grafički na Grafu 1. Prosječne vrijednosti biomarkera u CD-u iznosile su: grelin 26,26 pg/ml, leptin 12566,53 pg/ml, IL-6 5,76 pg/ml, a TNF- α 52,59 pg/ml. Prosječne vrijednosti u biomarkera u UC-u iznosile su: grelin 45,5 pg/ml, leptin 17669,50 pg/ml, IL-6 5,59 pg/ml i TNF- α 58,69 pg/ml. Nije bilo značajnije razlike u koncentracijama ispitivanih biomarkera između CD-a i UC-a. Prosječne vrijednosti leptina su značajno više u kontrolnoj skupini (29490,76, p = 0,01), a vrijednosti TNF- α niže u kontrolnoj skupini (19,70 pg/ml, p = 0,02).

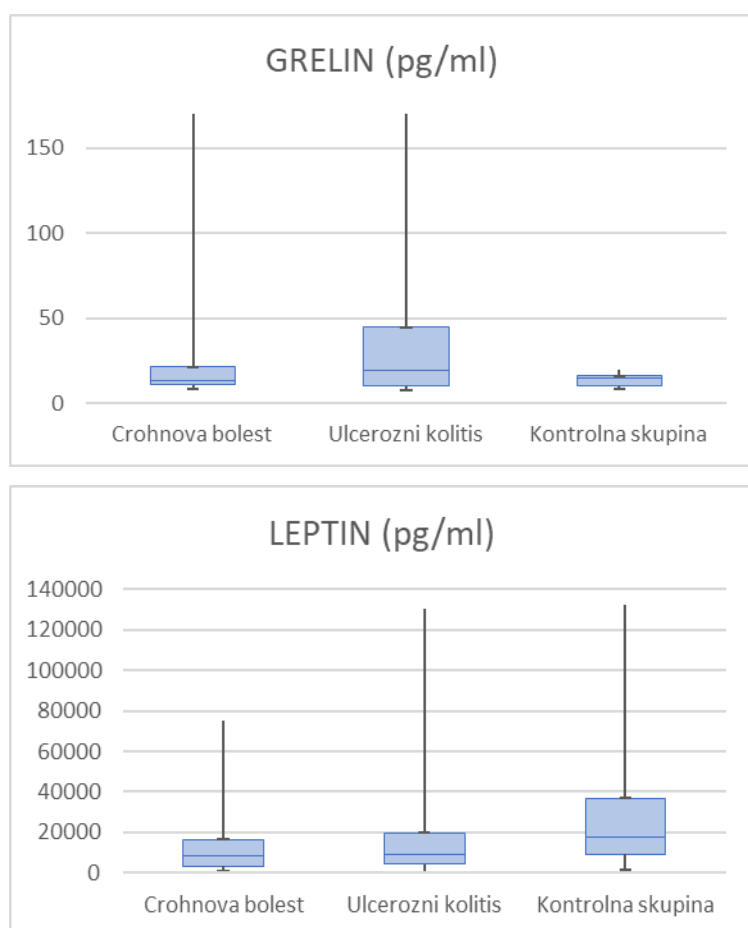
Tablica 6. Koncentracije biomarkera grelina, leptina, IL-6 i TNF- α u serumu

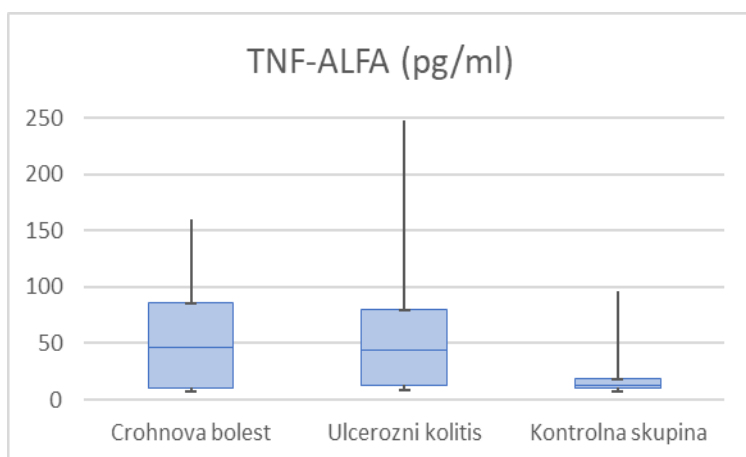
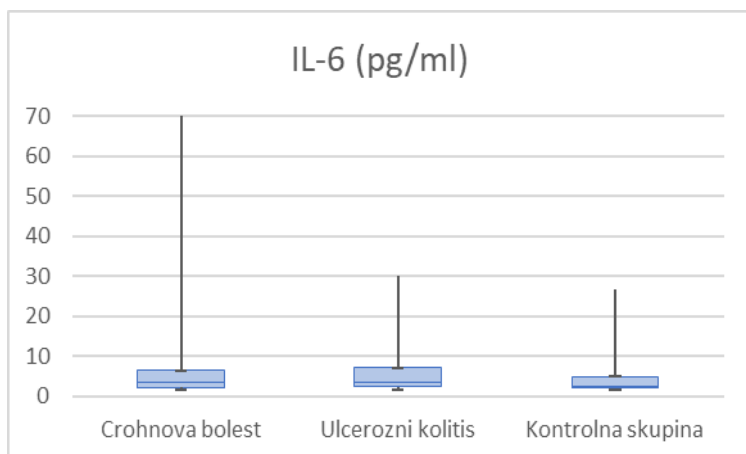
Parametar	Crohnova bolest			Ulcerozni kolitis			p	Kontrolna skupina			p
	Srednja vrijednost \pm SD	Medijan (IQR)	KS test	Srednja vrijednost \pm SD	Medijan (IQR)	KS test		Srednja vrijednost \pm SD	Medijan (IQR)	KS test	
GRELIN (pg/ml)	26,26 \pm 41,37	13,61 (10,57)	<0,0 1	45,55 \pm 72,42	19,45 (34,61)	<0,0 1	0,71	13,78 \pm 3,90	14,82 (6,19)	>0,1 5	0,62
LEPTIN (pg/ml)	12566,53 \pm 12774,37	8526,75 (13335)	<0,0 1	17669,50 \pm 24400,48	9275,20 (15475)	<0,0 1	0,39	29490,76 \pm 33284,57	17628,10 (27456)	<0,0 1	0,01*
IL-6 (pg/ml)	5,76 \pm 8,63	3,54 (4,29)	<0,0 1	5,59 \pm 5,55	3,42 (4,69)	<0,0 1	0,74	5,58 \pm 7,27	2,52 (2,77)	<0,0 1	0,49
TNF-α (pg/ml)	52,59 \pm 42,16	46,26 (75,02)	<0,0 1	58,69 \pm 57,31	43,42 (66,91)	<0,0 1	0,61	19,70 \pm 21,87	12,95 (7,88)	<0,0 1	0,03*

IL-6- interleukin-6, TNF- α - Čimbenik tumorske nekroze alfa (*Tumor necrosis factor α* , engl.)

*p<0.05

Graf 1. Koncentracije biomarkera grelina, leptina, IL-6 i TNF- α u serumu





TNF- α - Čimbenik tumorske nekroze alfa (*Tumor necrosis factor α* , engl.),
IL-6- interleukin-6

Učinjena je i dodatna statistička analiza korelacija razina TNF- α sa koncentracijama grelina i leptina. Rezultati su pokazali da ne postoji TNF- α vrijednost sa serumskim razinama grelina niti leptina (Tablica 7).

Tablica 7. Korelacija između TNF- α i koncentracija grelina i leptina

	GRELIN	LEPTIN
TNF α		
R	0,12	-0,06
p	0,53	0,54
n	29	101

TNF- α - Čimbenik tumorske nekroze alfa (*Tumor necrosis factor α* , engl.)

Budući se radi o neparametrijskim varijablama računat je Spearmanov koeficijent korelacije (samo na opservacijama s detektabilnim serumskim vrijednostima).

5.3. Povezanost koncentracije ispitivanih biomarkera s laboratorijskim markerima aktivnosti bolesti

Tablica 8 prikazuje povezanost ispitivanih biomarkera sa serumskim laboratorijskim markerima upalne aktivnosti bolesti (CRP, SE, leukociti, trombociti i kalprotektin).

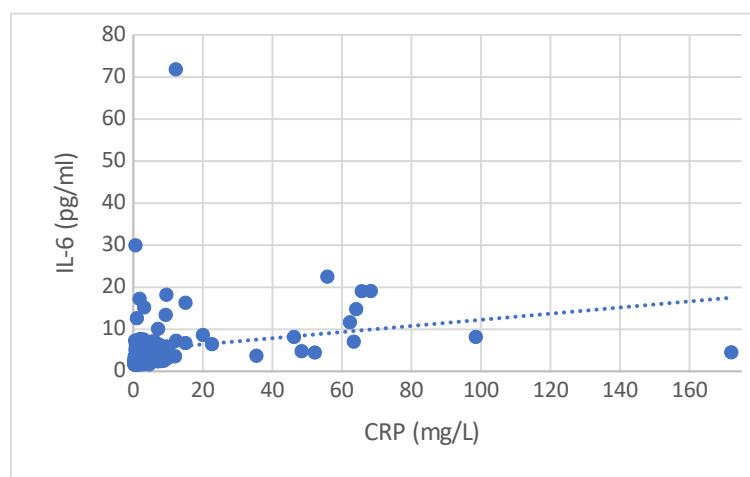
Postoji statistički značajna pozitivna korelacija vrijednosti IL-6 sa svim ispitivanim laboratorijskim pokazateljima upalne aktivnosti: s razinom CRP-a ($r = 0,56$, $p < 0,0001$), SE ($0,51$, $p < 0,0001$), leukocitima ($r = 0,34$, $p < 0,0001$), trombocitima ($r = 0,29$, $p = 0,003$), te fekalnim kalprotektinom ($r = 0,48$, $p < 0,0001$) (Graf 2). Dokazana je statistički značajna negativna korelacija razina grelina ssa razinama CRP-a ($r = -0,47$, $p = 0,003$), trombocita ($r = -0,32$, $p = 0,047$) te fekalnog kalprotektina ($r = -0,38$, $p = 0,03$). Također je dokazana negativna korelacija vrijednosti TNF- α sa razinama CRP-a ($-0,27$, $p = 0,01$). Za leptin nije dokazana značajna korelacija s razinama CRP-a, SE, leukocita, trombocita i fekalnog kalprotektina.

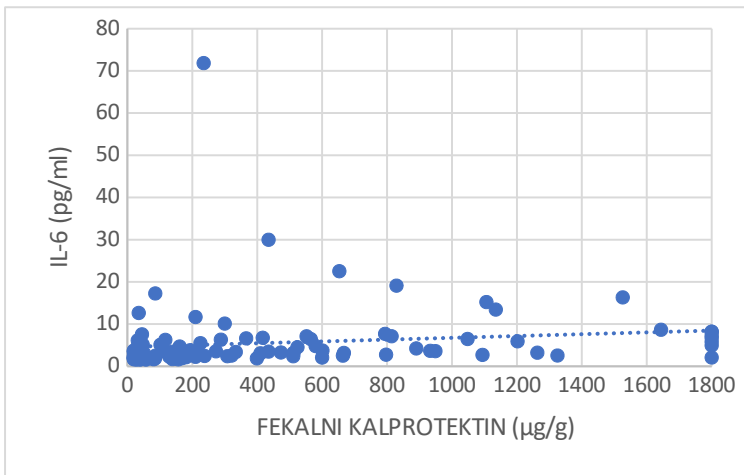
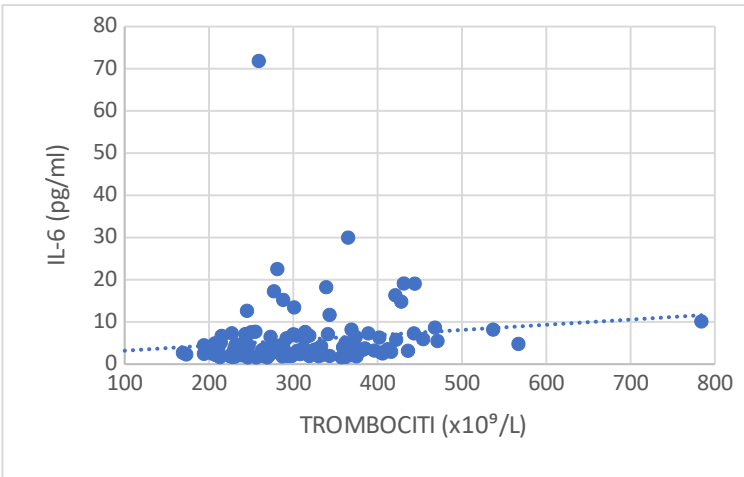
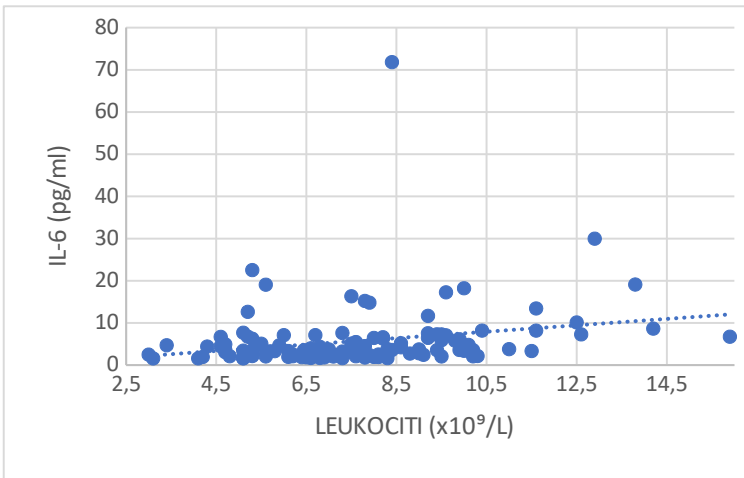
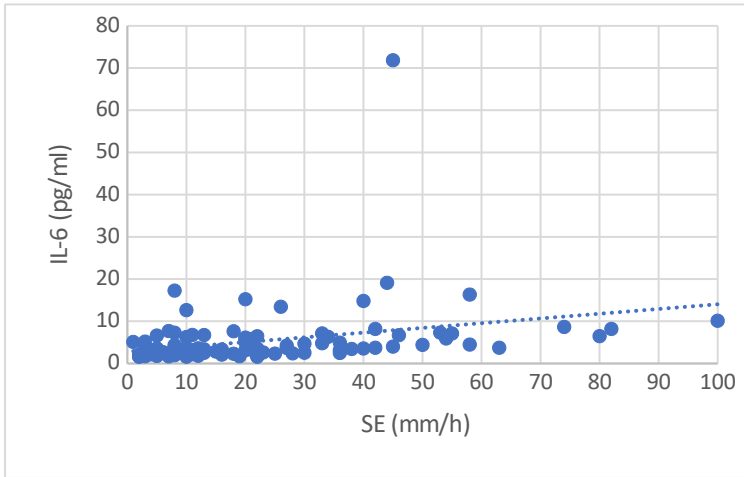
Tablica 8. Povezanost koncentracija ispitivanih biomarkera s pojedinima laboratorijskim markerima aktivnosti bolesti

	CRP	SE	LEUKOCITI	TROMBOCITI	KALPRO
GRELIN					
R	-0,47	-0,25	-0,20	-0,32	-0,38
p	0,003*	0,16	0,23	0,047*	0,03*
n	38	33	38	38	32
LEPTIN					
R	-0,08	0,04	-0,03	0,05	-0,11
p	0,37	0,69	0,73	0,57	0,21
n	144	127	144	148	128
IL-6					
R	0,56	0,51	0,34	0,29	0,48
p	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,003*	<0,0001*
n	124	109	124	124	105
TNF-α					
R	-0,27	0,13	-0,08	-0,001	-0,08
p	0,01*	0,19	0,40	0,99	0,45
n	109	98	109	109	91

CRP - C-reaktivni protein, **SE** - sedimentacija eritrocita, **KALPRO**- fekalni kalprotektin
 Budući se radi o neparametrijskim varijablama računat je Spearmanov koeficijent korelacije (samo na opservacijama s detektabilnim serumskim vrijednostima); ***p < 0.05**

Graf 2. Korelacija IL-6 s razinama CRP-a, SE, leukocita, trombocita i fekalnog kalprotektina





Dodatnom analizom povezanosti laboratorijskih markera upale i vrijednosti IL-6 u CD-u i UC-u dokazana je pozitivna korelacija IL-6 sa svim ispitivanim markerima upale u obje bolesti, osim korelacije IL-6 s trombocitima u UC-u (Tablica 9).

Tablica 9. Korelacija laboratorijskih markera upale i vrijednosti IL-6 u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu

		CRP	SE	LEUKOCITI	TRC	KALPRO
Crohnova bolest	IL-6					
	R	-0,57	0,47	0,27	0,33	0,48
	p	< 0,0001*	< 0,0001*	0,02*	0,003*	<0,0001*
	n	79	75	79	79	32
Ulcerozni kolitis	IL-6					
	R	0,55	0,63	0,47	0,28	0,45
	p	< 0,0001*	< 0,0001*	0,001*	0,06	0,003*
	n	45	34	45	45	43

CRP - C-reaktivni protein, **SE** - sedimentacija eritrocita, **TRC** – trombociti, **KALPRO** – fekalni kalprotektin

Budući se radi o neparametrijskim varijablama računat je Spearmanov koeficijent korelacije (samo na opservacijama s detektabilnim serumskim vrijednostima), ***p < 0.05**

5.4. Povezanost koncentracije ispitivanih biomarkera s kliničkim indeksima aktivnosti bolesti

Kako je udio nedetektibilnih vrijednosti ispitivanih biomarkera bio visok, učinjena je i statistička analiza povezanosti broja nedetektibilnih uzoraka s pojedinim kategorijama kliničke aktivnosti bolesti (Tablica 10). Učinjenom analizom, nije nađena statistički značajna razlika u udjelu nedetektibilnih serumskih razina grelina, leptina i protuupalnih citokina među različitim kategorijama kliničke aktivnosti bolesti.

Tablica 10. Nedetektabilne vrijednosti ispitivanih biomarkera prema različitim kategorijama kliničke aktivnosti bolesti

		GRELIN			LEPTIN		
		Nedetektabilno	ostalo	p	Nedetektabilno	ostalo	p
Crohnova bolest	HBI						
	Remisija	60 (82,2 %)	25 (83,33 %)	1,0	2 (100,0 %)	83 (82,18 %)	1,0
	Blaga bolest	7 (9,59 %)	2 (6,67 %)		0 (0,00 %)	9 (8,91 %)	
	Umjereni bolest	6 (8,22 %)	3 (10,00 %)		0 (0,00 %)	9 (8,91 %)	
	Teška bolest	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)		0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	
	CDAI						
	Remisija	59 (80,82 %)	26 (86,67 %)	0,63	1 (50,00 %)	84 (83,17 %)	0,32
	Blaga bolest	8 (10,96 %)	1 (3,33 %)		1 (50,00 %)	8 (7,92 %)	
Umjereni bolest	5 (6,85 %)	3 (10,00 %)	0 (0,00 %)		8 (7,92 %)		
Teška bolest	1 (1,37 %)	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)		1 (0,99 %)		
Ulcerozni kolitis	TW						
	Remisija	8 (22,22 %)	3 (21,43 %)	1,0	0 (0,00 %)	11 (22,92 %)	0,46
	Blagi kolitis	12 (33,33 %)	5 (35,71 %)		2 (100,00 %)	15 (31,25 %)	
	Umjereni kolitis	12 (33,33 %)	5 (35,71 %)		0 (0,00 %)	17 (35,42 %)	
	Teški kolitis	4 (11,11 %)	1 (7,14 %)		0 (0,00 %)	5 (10,42 %)	
	PMS						
	Remisija	15 (41,67 %)	7 (50,00 %)	0,96	2 (100 %)	20 (41,67 %)	0,55
	Blagi kolitis	11 (30,56 %)	3 (21,43 %)		14 (29,17 %)		
Umjereni kolitis	8 (22,22 %)	3 (21,43 %)	11 (22,92 %)				
Teški kolitis	2 (5,56 %)	1 (7,14 %)	3 (6,25 %)				
		IL-6			TNF- α		
		Nedetektabilno	ostalo	p	Nedetektabilno	ostalo	p
Crohnova bolest	HBI						
	Remisija	16 (94,12 %)	69 (80,23 %)	0,58	27 (90,00 %)	58 (79,45 %)	0,41
	Blaga bolest	1 (5,88 %)	8 (9,30 %)		2 (6,67 %)	7 (9,59 %)	
	Umjereni bolest	0 (0,00 %)	9 (10,47 %)		1 (3,33 %)	8 (10,96 %)	
	Teška bolest	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)		0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	
	CDAI						
	Remisija	15 (88,24 %)	70 (81,40 %)	0,58	28 (93,33 %)	57 (78,08 %)	0,15
	Blaga bolest	2 (11,76 %)	7 (8,14 %)		0 (0,00 %)	9 (12,33 %)	
Umjereni bolest	0 (0,00 %)	8 (9,30 %)	2 (6,67 %)		6 (8,22 %)		
Teška bolest	0 (0,00 %)	1 (1,16 %)	0 (0,00 %)		1 (1,37 %)		
Ulcerozni kolitis	TW						
	Remisija	3 (42,86 %)	8 (18,60 %)	0,56	3 (33,33 %)	8 (19,51 %)	0,74
	Blagi kolitis	2 (28,57 %)	15 (34,88 %)		3 (33,33 %)	14 (34,15 %)	
	Umjereni kolitis	2 (28,57 %)	15 (34,88 %)		3 (33,33 %)	14 (34,15 %)	
	Teški kolitis	0 (0,00 %)	5 (11,63 %)		0 (0,00 %)	5 (12,20 %)	
	PMS						
	Remisija	6 (85,61 %)	16 (37,21 %)	0,15	5 (55,56 %)	17 (41,46 %)	0,94
	Blagi kolitis	1 (14,29 %)	13 (30,23 %)		2 (22,22 %)	12 (29,27 %)	
Umjereni kolitis		11 (25,58 %)	2 (22,22 %)		9 (21,95 %)		
Teški kolitis		3 (6,98 %)			3 (7,32 %)		

HBI - Harvey-Bradshaw indeks, **CDAI** - *The Crohn's Disease Activity Index*, **TW**- Truelove i Witts kriteriji, **PMS** - *Partial Mayo Score*, **TNF- α** - Čimbenik tumorske nekroze alfa (*Tumor necrosis factor α* , engl.), **IL-6**- interleukin-6

U Tablici 11 je prikaz povezanosti koncentracija ispitivanih biomarkera s kliničkim indeksima aktivnosti bolesti. Postoji statistički značajna razlika u vrijednosti IL-6 ovisno o kliničkoj aktivnosti bolesti. U CD-u, vrijednosti IL-6 su više u skupini

ispitanika s aktivnom bolesti mjereno kliničkim indeksima HBI ($p = 0,02$) i CDAI ($p = 0,03$). U UC-u zabilježene su više vrijednosti IL-6 u ispitanika s aktivnom bolesti mjereno TW kriterijima ($p = 0,02$) i PMS ($p = 0,008$). Koncentracije IL-6 u pojedinim kategorijama težina bolesti, prema kliničkim indeksima korištenim u istraživanju prikazane su grafički na Grafu 3. Kod ostalih ispitivanih biomarkera nije dokazana povezanost njihovih razina s kliničkom aktivnosti bolesti.

Tablica 11. Povezanost koncentracija ispitivanih biomarkera s kliničkim indeksima aktivnosti bolesti

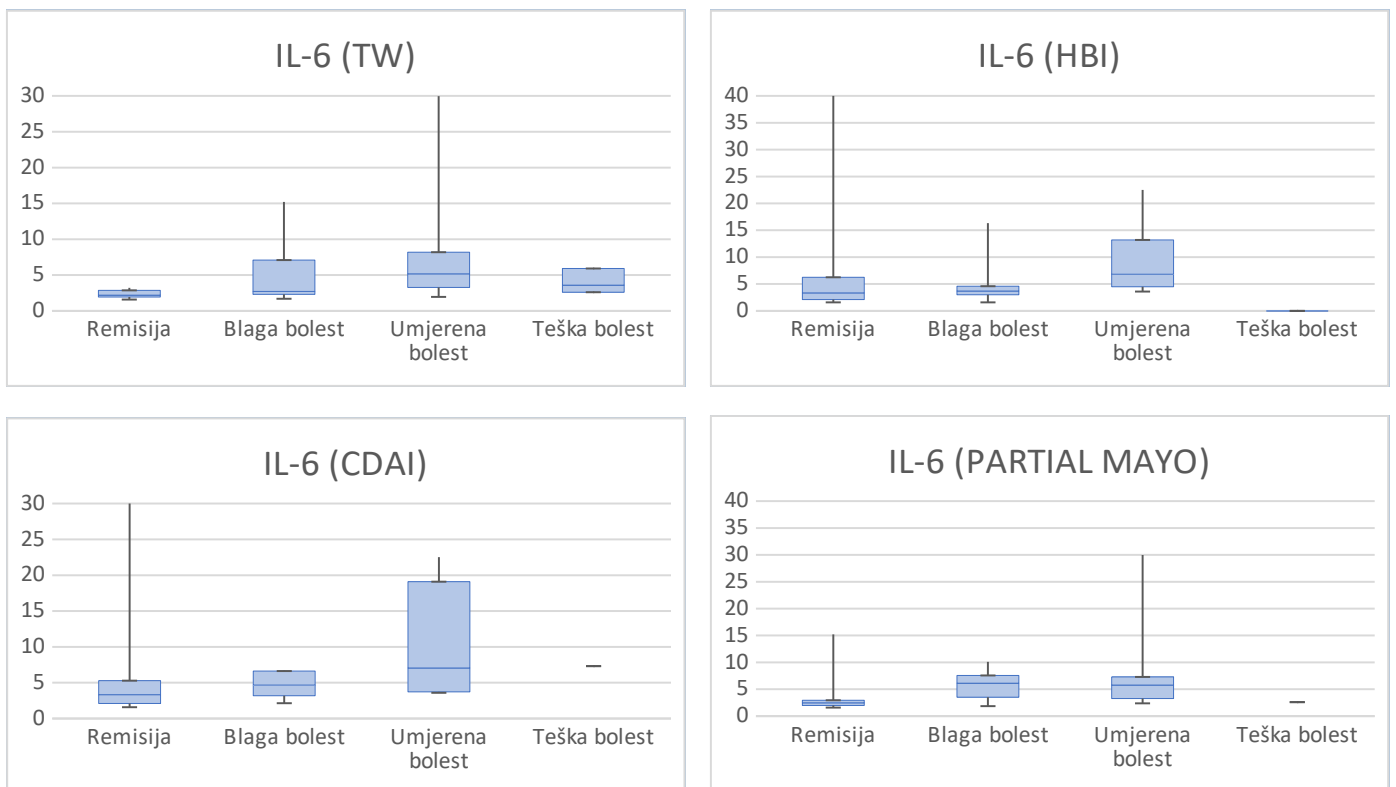
		GRELIN (p)	LEPTIN (p)	IL-6 (p)	TNF-α (p)
Crohnova bolest	HBI (p)	0,15	0,17	0,02*	0,88
	Remisija	28,16 \pm 42,01	14002,45 \pm 15710,23	5,65 \pm 9,14	50,78 \pm 40,21
	Blaga bolest	9,79 \pm 1,37	7844,97 \pm 9628,74	5,06 \pm 4,65	58,18 \pm 44,76
	Umjereni bolest	12,65 \pm 2,85	10198,27 \pm 12154,47	9,40 \pm 7,23	50,93 \pm 55,35
	Teška bolest	-	-	-	-
	CDAI (p)	0,22	0,70	0,03*	0,29
	Remisija	27,37 \pm 41,17	13484,25 \pm 15441,96	5,57 \pm 9,08	48,92 \pm 39,99
	Blaga bolest	-	12368,00 \pm 14310,12	4,54 \pm 1,70	51,53 \pm 41,45
	Umjereni bolest	12,66 \pm 2,85	11008,48 \pm 12736,89	10,93 \pm 8,13	60,34 \pm 47,14
	Teška bolest	-	-	-	-
Ulcerozni kolitis	TW (p)	0,72	0,68	0,02*	0,68
	Remisija	09,96 \pm 161,13	16133,79 \pm 11630,35	2,34 \pm 0,60	69,29 \pm 78,21
	Blaga bolest	45,86 \pm 45,82	15778,31 \pm 14304,73	4,99 \pm 3,84	49,44 \pm 38,83
	Umjereni bolest	28,85 \pm 28,56	20530,14 \pm 34351,87	7,10 \pm 6,88	57,89 \pm 56,05
	Teška bolest	-	11794,48 \pm 13421,35	4,03 \pm 1,70	108,03 \pm 96,34
	PMS (p)	0,41	0,82	0,008*	0,40
	Remisija	79,49 \pm 111,71	13526,38 \pm 11303,79	3,28 \pm 3,26	64,79 \pm 59,97
	Blaga bolest	28,85 \pm 26,68	15295,51 \pm 13272,83	5,66 \pm 2,70	50,15 \pm 37,26
	Umjereni bolest	31,36 \pm 39,70	25521,35 \pm 42322,70	7,59 \pm 7,89	52,52 \pm 66,28
	Teška bolest	-	18159,90 \pm 14416,07	-	-

HBI - Harvey-Bradshaw indeks, **CDAI** - *The Crohn's Disease Activity Index*, **TW** - Truelove i Witts kriteriji, **PMS** - *Partial Mayo Score*

Vrijednosti biomarkera izražene u pg/ml

p-vrijednosti testa za detektibilne vrijednosti (za svaku kategoriju je dana srednja vrijednost \pm standardna devijacija); * $p < 0.05$

Graf 3. Vrijednosti IL-6 u pojedinim kategorijama ovisno o kliničkoj aktivnosti bolesti



HBI - Harvey-Bradshaw indeks, **CDAI** - *The Crohn's Disease Activity Index*, **TW**- Truelove i Witts kriteriji, **TNF- α** - Čimbenik tumorske nekroze alfa (*Tumor necrosis factor α* , engl.), **IL-6**- interleukin-6

5.5. Povezanost koncentracije ispitivanih biomarkera s endoskopskom aktivnosti bolesti

Tablica 12 prikazuje povezanost koncentracija ispitivanih biomarkera s endoskopskim pokazateljima upalne aktivnosti. Promatrajući različite kategorije endoskopske aktivnosti, nije uočena razlika u koncentracijama ni jednog od ispitivanih biomarkera.

Tablica 12. Koncentracije biomarkera prema pojedinim kategorijama endoskopske aktivnosti bolesti

	GRELIN (p)	LEPTIN (p)	IL-6 (p)	TNF- α (p)
SES-CD (p)	0,24	0,27	0,56	0,37
Remisija	16,37 \pm 7,32	16180,65 \pm 12240,49	5,16 \pm 5,16	51,96 \pm 33,49
Blaga bolest	-	12961,10 \pm 14401,86	7,36 \pm 4,54	42,56 \pm 49,03
Umjereni bolest	10,34 \pm 0,33	6589,84 \pm 11324,57	7,30 \pm 4,75	8,90 \pm 1,36
Teška bolest	-	-	-	36,45 \pm 38,07
MES (p)	0,14	0,41	0,87	0,86
Remisija	160,04 \pm 192,04	7295,44 \pm 5161,79	14,22 \pm 28,24	59,89 \pm 73,16
Blaga bolest	61,18 \pm 42,83	17109,17 \pm 13102,44	6,78 \pm 8,27	57,01 \pm 37,73
Umjereni bolest	9,85 \pm 1,28	10865,23 \pm 10412,13	3,13 \pm 0,97	51,42 \pm 35,67
Teška bolest	-	13292,21 \pm 14214,90	6,19 \pm 6,85	57,53 \pm 83,59

SES-CD - Simple Endoscopic Score for Crohn's disease, **MES** - Mayo Endoscopic score
Vrijednosti biomarkera izražene u pg/ml

5.6. Povezanost koncentracije ispitivanih biomarkera s nutritivnim statusom

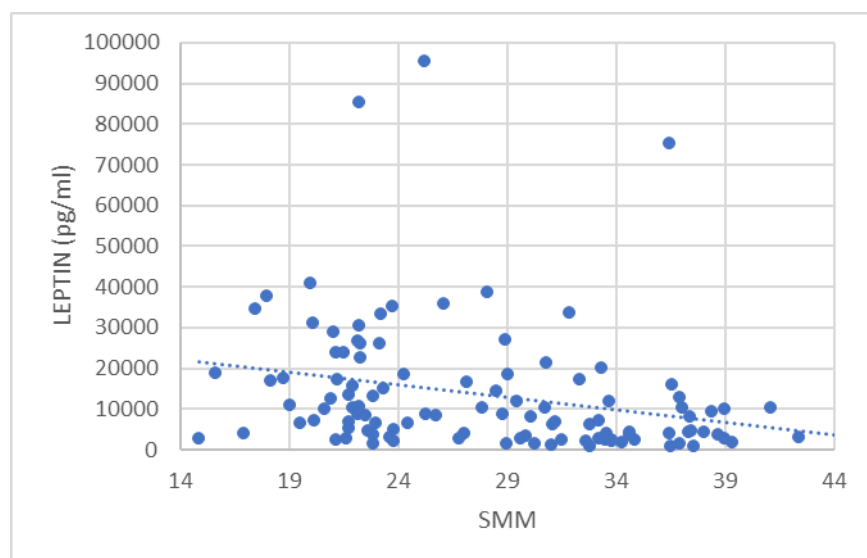
U Tablici 13 prikazana je povezanost koncentracije ispitivanih biomarkera sa skeletnom mišićnom masom, masom masnog tkiva, stopom visceralnog masnog tkiva i indeksom tjelesne mase. Postoji statistički značajna negativna korelacija leptina sa skeletnom mišićnom masom ($r = 0,40$, $p < 0,0001$), odnosno pozitivna korelacija s masom masnog tkiva ($r = 0,71$, $p < 0,0001$) i stopom visceralnog masnog tkiva ($r = 0,26$, $p = 0,007$) te indeksom tjelesne mase ($r = 0,33$, $p < 0,0001$) kod svih ispitanika (Graf 4). Korelacija drugih ispitivanih biomarkera s parametrima nutritivnog statusa nije dokazana.

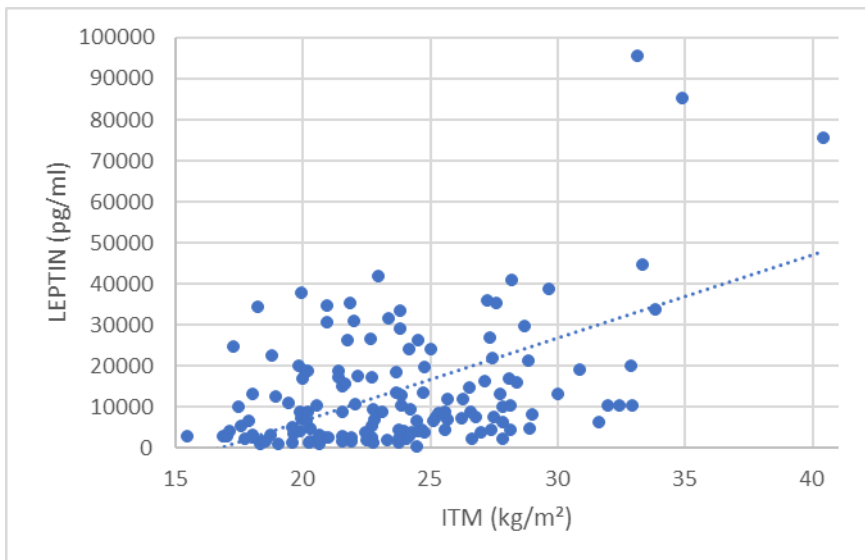
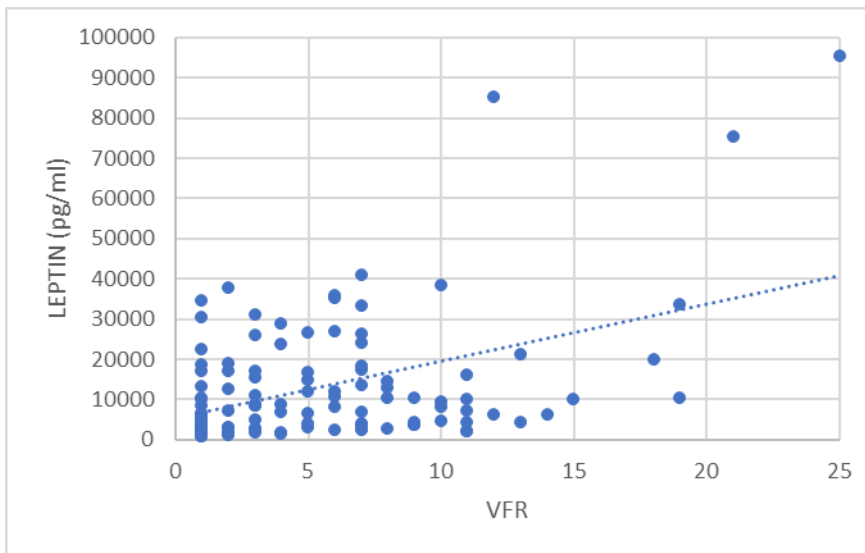
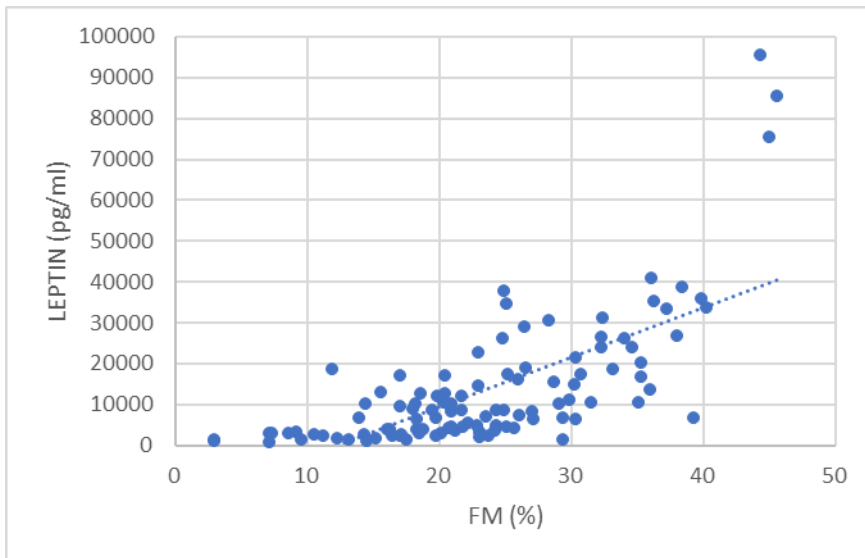
Tablica 13. Povezanost koncentracije ispitivanih biomarkera s nutritivnim statusom bolesnika s upalnim bolestima crijeva

	SMM	FM (%)	VFR	ITM
GRELIN				
R	-0,33	0,12	0,08	-0,04
p	0,08	0,51	0,68	0,80
n	29	29	29	38
LEPTIN				
R	-0,40	0,71	0,26	0,34
p	<0,0001	<0,0001	0,007	< 0,0001
n	108	107	108	144
IL-6				
R	0,01	-0,05	-0,17	-0,04
p	0,93	0,66	0,11	0,64
n	94	93	94	124
TNF-α				
R	0,09	-0,01	-0,05	0,04
p	0,43	0,95	0,68	0,71
n	80	79	80	109

SMM - skeletna mišićna masa (*skeletal muscle mass*, engl.), **FM** - masa masnog tkiva (*fat mass*, engl.), **VFR** - stopa visceralnog masnog tkiva (*visceral fat rate*, engl.), **ITM** – indeks tjelesne mase; Budući se radi o neparametrijskim varijablama računat je Spearmanov koeficijent korelacije (samo na opservacijama s detektabilnim serumskim vrijednostima); * $p < 0.05$

Graf 4. Korelacija leptina s nutritivnim statusom





SMM - skeletna mišićna masa (*skeletal muscle mass*, engl.), **FM** - masa masnog tkiva (*fat mass*, engl.), **VFR** - stopa visceralnog masnog tkiva (*visceral fat rate*, engl.), **ITM** – indeks tjelesne mase;

U Tablici 14 prikazana je povezanost koncentracija leptina s parametrima nutritivnog statusa u pojedinim skupinama ispitanika. Pa tako koncentracije leptina negativno koreliraju sa skeletnom mišićnom masom u bolesnika s CD-om ($r = -0,43$, $p = 0,0001$) i UC-om ($r = -0,36$, $p = 0,04$) ali ne i kod ispitanika u kontrolnoj skupini. Pozitivna korelacija između razina leptina i stope visceralnog masnog tkiva uočena je u kontrolnoj skupini ($r = 0,71$, $p < 0,007$) i u CD-u ($r = 0,25$, $p = 0,03$), ali ne i u UC-u. Pozitivna korelacije leptina i postotka mase masnog tkiva te ITM, uočena je u sve tri skupine ispitanika.

Tablica 14. Povezanost koncentracija leptina s parametrima nutritivnog statusa u pojedinim skupinama ispitanika

		SMM	FM (%)	VFR	ITM
Kontrolna skupina	LEPTIN				
	R	-0,32	0,85	0,71	0,70
	p	0,13	< 0,0001	0,007	< 0,0001
	n	24	24	24	27
Crohnova bolest	LEPTIN				
	R	-0,43	0,60	0,25	0,34
	p	0,0001	<0,0001	0,03	0,0009
	n	75	74	75	92
Ulcerozni kolitis	LEPTIN				
	R	-0,36	0,46	0,26	0,33
	p	0,04	0,0064	0,14	0,02
	n	33	33	33	52

SMM - skeletna mišićna masa (*skeletal muscle mass, engl.*), **FM** - masa masnog tkiva (*fat mass, engl.*), **VFR** - stopa visceralnog masnog tkiva (*visceral fat rate, engl.*), **ITM** – indeks tjelesne mase; Budući se radi o neparametrijskim varijablama računat je Spearmanov koeficijent korelacije (samo na opservacijama s detektabilnim serumskim vrijednostima); * $p < 0.05$

5.7. Koncentracije serumskih razina grelina, leptina i proupalnih citokina kod bolesnika koji primaju različite modalitete terapije

U većini slučajeva nema statistički značajne razlike u udjelu nedetektabilnih serumskih razina grelina, leptina i protuupalnih citokina među bolesnicima koji primaju različite modalitete terapije (Tablica 15). Razlika je prisutna u udjelu nedetektabilnih serumskih razina TNF- α među:

- 1) ispitanicima koji primaju biološku terapiju, te onih koji ne primaju – kod onih koji ne primaju terapiju veći je udio nedetektabilnih ($p = 0,003$)

- 2) ispitanicima koji primaju infliksimab, te onih koji ne primaju – kod onih koji ne primaju infliksimab veći je udio nedetektabilnih ($p < 0,0001$)
- 3) ispitanicima koji primaju adalimumab, te onih koji ne primaju – kod onih koji ne primaju adalimumab manji je udio nedetektabilnih ($p = 0,0015$)

Tablica 15. Nedetektabilne vrijednosti biomarkera kategorizirane prema medikamentoznoj terapiji koju bolesnici primaju

	GRELIN			LEPTIN		
	Nedetektabilno	ostalo	p	Nedetektabilno	ostalo	p
MEDIKAMENTOZNA TERAPIJA						
NE	16 (14,68%)	3 (6,82%)	0,28	0 (0,00%)	19(12,75%)	1,0
DA	91 (85,32%)	41 (93,18%)		4 (100,00%)	130(87,25%)	
AMINOSALICILATI						
NE	61 (55,96%)	26 (59,09%)	0,86	2 (50,00%)	85 (57,05 %)	1,0
DA	48 (44,04%)	18 (40,91 %)		2 (50,00 %)	64 (42,95 %)	
GLUKOKORTIKOIDI						
NE	102 (93,58%)	40 (90,91%)	0,73	4 (100,00%)	138(92,62%)	1,0
DA	7 (6,42%)	4 (9,09%)		0 (0,00%)	11(7,38%)	
IMUNOMODULATOR						
NE	75 (68,81%)	27 (61,36 %)	0,45	3 (75,00 %)	99 (66,44 %)	1,0
NE	34 (31,19%)			1 (25,00 %)	50 (33,56 %)	
DA		17 (38,64 %)				
BIOLOŠKA TERAPIJA						
NE	46 (42,20%)	16 (36,36%)	0,59	3 (75,00%)	59 (39,60%)	0,30
DA	63 (57,80%)	28 (63,64%)		1 (25,00%)	90 (60,40%)	
INFLIKSIMAB						
NE	75 (68,81%)	25 (56,82%)	0,19	3 (75,00%)	97 (65,10%)	1,0
DA	34 (31,19%)	19 (43,18%)		1 (25,00%)	52 (34,90%)	
ADALIMUMAB						
NE	94 (87,04%)	34 (77,27%)	0,15	4 (100,00%)	124	1,0
DA	14 (12,96%)	10 (22,73%)		0 (0,00%)	(83,78%) 24 (16,22%)	
GOLIMUMAB						
NE	103 (95,37%)	42 (95,45%)	1,0	4 (100,00%)	141	1,0
DA	5 (4,63%)	2 (4,55%)		0 (0,00%)	(95,27%) 7 (4,73%)	
VEDOLIZUMAB						
NE	104 (96,30%)	44(100,00%)	0,32	4 (100,00%)	144	1,0
DA	4 (3,70%)	0 (0,00%)		0 (0,00%)	(97,30%) 4 (2,63%)	
USTEKINUMAB						
NE	105 (97,22%)	44(100,00%)	0,56	4 (100,00%)	145	1,0
DA	3 (2,78%)	0 (0,00%)		0 (0,00%)	(97,97%) 3 (2,03%)	

* $p < 0.05$

	IL-6			TNF- α		
	Nedetektabilno	ostalo	p	Nedetektabilno	ostalo	p
MEDIKAMENTOZNA TERAPIJA						
NE	1 (4,17%)	18 (13,95%)	0,31	7 (17,95%)	12 (10,53%)	0,26
DA	23 (95,83%)	111(86,05%)		32 (82,05%)	102(89,47%)	
AMINOSALICILATI						
NE	14 (58,33 %)	73 (56,59%)	1,0	21 (53,85%)	66 (57,89%)	0,71
DA	10 (41,67 %)	56 (43,41%)		18 (46,15%)	48 (42,11%)	
GLUKOKORTIKOIDI						
NE	23 (95,83%)	119(92,25%)	1,0	35 (89,74%)	107(93,86%)	0,47
DA	1 (4,17%)	10 (7,75%)		4 (10,26%)	7 (6,14%)	
IMUNOMODULATOR						
NE	18 (75,00 %)	84 (65,12 %)	0,48	31 (79,49 %)	71 (62,28 %)	0,05
DA	6 (25,00 %)	45 (34,88 %)		8 (20,51 %)	43 (37,72 %)	
BIOLOŠKA TERAPIJA						
NE	6 (25,00%)	56 (43,41%)	0,11	24 (61,54%)	38 (33,33%)	0,003*
DA	18 (75,00%)	73 (56,59%)		15 (38,46%)	76 (66,67%)	
INFLIKSIMAB						
NE	14 (58,33%)	86 (66,67%)	0,49	38 (97,44%)	62 (54,39%)	<0,000
DA	10 (41,67%)	43 (33,33%)		1 (2,56%)	52 (45,61%)	1*
ADALIMUMAB						
NE	18 (78,26%)	110(85,27%)	0,37	26 (66,67%)	102(90,27%)	0,0015
DA	5 (21,74%)	19 (14,73%)		13 (33,33%)	11 (9,73%)	*
GOLIMUMAB						
NE	21 (91,30%)	124(96,12%)	0,29	39 (100,00%)	106 (93,81%)	0,19
DA	2 (8,70%)	5 (3,88%)		0 (0,00%)	7 (6,19%)	
VEDOLIZUMAB						
NE	23 (100,00%)	125(96,90%)	1,0	39 (100,00%)	109 (96,46%)	0,57
DA	0 (0,00%)	4 (3,10%)		0 (0,00%)	4 (3,54%)	
USTEKINUMAB						
NE	23 (100,00%)	126(97,67%)	1,0	39 (100,00%)	110 (97,35%)	0,57
DA	0 (0,00%)	3 (2,33%)		0 (0,00%)	3 (2,65%)	

*p < 0.05

U Tablici 16 prikazane su vrijednosti pojedinih biomarkera, prema različitim farmakoterapijama koje su bolesnici primali u trenutku istraživanja. Našim istraživanjem smo dokazali da postoji statistički značajna razlika u vrijednosti IL-6 ovisno o terapiji. Vrijednosti IL-6 su niže kod pacijenata koji primaju medikamentoznu terapiju ($5,31 \pm 7,63$) u odnosu na pacijente koji ne primaju medikamentoznu terapiju ($8,11 \pm 7,42$) ($p = 0,04$). Nadalje, vrijednosti IL-6 su statistički značajno niže među pacijentima koji primaju biološku terapiju ($5,11 \pm 8,70$) u odnosu na pacijente koji ne primaju biološku terapiju ($6,49 \pm 5,89$) ($p = 0,02$). Vrijednosti TNF- α značajno su niže među ispitanicima koji primaju biološku terapiju ($55,55 \pm 51,20$) u odnosu na ispitanike koji ne primaju biološku terapiju ($29,83 \pm 36,56$) ($p = < 0,0001$). Vrijednostima TNF- α među ispitanicima koji primaju infliksimab značajno su više ($73,89 \pm 36,90$) u odnosu na ispitanike koji ne primaju infliksimab ($38,88 \pm 51,37$) (<

0,0001). Pacijenti koji primaju adalimumab ($12,25 \pm 7,27$) imaju statistički značajno niže vrijednosti TNF- α u odnosu na one koji ne primaju adalimumab ($59,60 \pm 48,94$) ($p < 0,0001$). Dodatno, vrijednosti TNF- α među pacijentima koji primaju golimumab statistički su značajno više ($133,68 \pm 66,28$) u odnosu na pacijente koji ne primaju golimumab ($49,30 \pm 42,39$) ($p = 0,001$). Za ostale biomarkere nije uočena statistički značajna razlika u koncentracijama u pojedinim terapijskim skupinama.

Tablica 16. Vrijednosti biomarkera u ispitanika kategorizirano prema medikamentoznoj terapiji koju primaju

	GRELIN (p)	LEPTIN (p)	IL-6 (p)	TNF- α (p)
MEDIKAMENTOZNA TERAPIJA (p)	0,12	0,05	0,04	0,22
NE	$10,30 \pm 1,19$	$8847,02 \pm 9950,11$	$8,11 \pm 7,42$	$45,12 \pm 53,84$
DA	$36,44 \pm 58,45$	$15254,73 \pm 18755,69$	$5,31 \pm 7,63$	$56,04 \pm 47,93$
AMINOSALICILATI(p)	0,26	0,53	0,10	0,62
NE	$27,21 \pm 42,09$	$14944,70 \pm 19966,21$	$5,75 \pm 5,25$	$52,78 \pm 44,06$
DA	$45,38 \pm 73,73$	$13701,13 \pm 15005,06$	$5,63 \pm 9,96$	$57,89 \pm 54,13$
GUKOKORTIKOIDI(p)	0,35	0,28	0,23	0,60
NE	$35,78 \pm 59,19$	$14016,41 \pm 18153,53$	$5,65 \pm 7,84$	$55,29 \pm 48,74$
DA	$22,36 \pm 24,39$	$19159,37 \pm 15198,92$	$6,26 \pm 4,21$	$48,90 \pm 45,64$
IMUNOMODULATOR(p)	0,78	0,22	0,22	0,07
NE	$36,84 \pm 61,42$	$13641,07 \pm 18915,19$	$6,25 \pm 8,86$	$53,15 \pm 55,98$
DA	$30,61 \pm 49,79$	$15945,68 \pm 15925,35$	$4,64 \pm 4,38$	$57,90 \pm 32,58$
BIOLOŠKA TERAPIJA(p)	0,12	0,07	0,02	<0,0001
NE	$23,14 \pm 27,01$	$12135,88 \pm 15525,28$	$6,49 \pm 5,89$	$29,83 \pm 36,56$
DA	$40,94 \pm 67,82$	$15898,73 \pm 19318,01$	$5,11 \pm 8,70$	$66,82 \pm 48,96$
INFLIKSIMAB(p)	0,98	0,54	0,07	<0,0001
NE	$37,35 \pm 62,84$	$14516,17 \pm 19395,22$	$6,62 \pm 9,03$	$38,88 \pm 51,37$
DA	$30,29 \pm 48,09$	$14208,31 \pm 15045,62$	$3,83 \pm 2,54$	$73,89 \pm 36,90$
ADALIMUMAB(p)	0,48	0,28	0,17	0,0001
NE	$29,78 \pm 40,68$	$14179,43 \pm 18406,94$	$5,98 \pm 8,10$	$59,60 \pm 48,94$
DA	$49,20 \pm 92,96$	$15430,03 \pm 16115,08$	$4,13 \pm 3,96$	$12,25 \pm 7,27$
GOLIMUMAB(p)	0,17	0,20	0,94	0,001
NE	$33,22 \pm 56,81$	$13401,24 \pm 15203,23$	$5,75 \pm 7,77$	$49,30 \pm 42,39$
DA	-	$36742,27 \pm 47950,10$	$4,32 \pm 2,61$	$133,68 \pm 66,28$
VEZOLIDUMAB(p)	-	1	0,27	0,07
NE	$34,38 \pm 56,49$	$14405,51 \pm 18130,89$	$5,17 \pm 4,80$	$56,42 \pm 48,77$
DA	-	$13514,15 \pm 15218,55$	$21,28 \pm 33,76$	$12,00 \pm 2,96$
USTEKINUMAB(p)	-	0,16	0,58	0,75
NE	$34,38 \pm 56,49$	$14595,40 \pm 18137,80$	$5,64 \pm 7,63$	$54,93 \pm 48,92$
DA	-	$4355,57 \pm 3630,88$	$8,16 \pm 8,71$	$49,24 \pm 43,02$

p-vrijednosti testa za detektabilne vrijednosti; * $p < 0.05$

Vrijednosti biomarkera izražene u pg/ml

6 RASPRAVA

IL-6 je glavni induktor proizvodnje C-reaktivnog proteina te su rezultati ranijih istraživanja pokazali kako njegova razina pozitivno korelira s razinama CRP-a u bolesnika s UBC-om (227-229). Čitav niz drugih istraživanja je pokazao kako serumske razine IL-6 koreliraju s pojedinim parametrima aktivnosti bolesti u bolesnika s upalnim bolestima crijeva (230-233).

Naše istraživanje je obuhvatilo laboratorijske, kliničke i endoskopske markere upalne aktivnosti i u CD-u i UC-u te njihovu povezanost s IL-6.

Našim istraživanjem potvrdili smo da bolesnici s većom laboratorijskom i kliničkom aktivnosti CD-a imaju više razine IL-6, međutim povezanost razina IL-6 s endoskopskom aktivnosti CD-a nismo dokazali, što objašnjavamo malom veličinom uzorka bolesnika koji su imali rezultate endoskopske pretrage. U našem istraživanju dokazali da vrijednosti IL-6 u UC-u pozitivno koreliraju s vrijednostima CRP-a, sedimentacije, leukocita i fekalnog kalprotektina ali i kliničkom aktivnošću bolesti. Dodatno, povezanost vrijednosti IL-6 s endoskopskom aktivnosti UC-a nismo dokazali, što je ponovno uvjetovano veličinom uzorka.

Prospektivno opservacijsko istraživanje Mavropoula i suradnika pokazalo je kako su u usporedbi sa serumskim razinama CRP-a i fekalnog kalprotektina, samo razine IL-6 neovisno udružene s kliničkom remisijom u bolesnika s CD-om, dok su u istom istraživanju razine IL-6 i fekalnog kalprotektina bile udružene s endoskopskom remisijom (234). Grupa hrvatskih autora je dokazala pozitivnu korelaciju SE, leukocita i CRP-a kod bolesnika s ulceroznim kolitisom, te pozitivnu korelaciju razina IL-6 s kliničkim indeksima UBC (235). U njihovom istraživanju dokazano je da su vrijednosti IL-6 više u skupini bolesnika s CD-om i UC-om u odnosu na kontrolnu skupinu, što našim istraživanjem nije potvrđeno, kao ni nekim od prijašnjih istraživanja (236).

Za razliku od CD, u istraživanju Mavropoula i suradnika kao ni u istraživanju Mahida i suradnika, u UC-u nije dokazana povezanost razina IL-6 s kliničkom i endoskopskom remisijom (234, 236). Suprotno rezultatima navedenih istraživanja, Mitsuyama i suradnici pokazali su kako su serumske razine IL-6 povišene kod bolesnika s

endoskopski aktivnim UC-om te da navedene vrijednosti koreliraju s ekstenzijom bolesti (237).

Ranije spomenuto prospektivno opservacijsko istraživanje je pokazalo kako su serumske razine IL-6 značajno više u kohorti bolesnika s CD-om u usporedbi s kohortom bolesnika s UC-om, što nije potvrđeno u našem istraživanju.

Caviglia i suradnici su pokazali kako razine IL-6, osim s vrijednostima CRP-a i fekalnog kalprotektina u bolesnika s UBC-om, koreliraju i s godinama duljine trajanja bolesti (236).

U istom istraživanju dokazano je kako razina IL-6 značajno reagira tijekom liječenja biološkim lijekovima te da pad razina IL-6 u 10. tjednu terapije, u odnosu na početne razine, predstavlja neovisni prediktor kliničkog odgovora nakon 12 mjeseci biološke terapije. Stoga se postavlja pitanje može li IL-6 biti koristan biomarker u predikciji odgovora na biološku terapiju (236).

Kada smo naše bolesnike podijelili prema farmakoterapiji koju primaju, uočili smo da su vrijednosti IL-6 su niže kod pacijenata koji primaju bilo kakvu medikamentoznu terapiju (u odnosu na pacijente koji ne primaju medikamentoznu terapiju te da su vrijednosti IL-6 su statistički značajno niže među pacijentima koji primaju biološku terapiju u odnosu na pacijente koji ne primaju biološku terapiju.

U našem istraživanju, od svih ispitivanih biomarkera, IL-6 se pokazao najboljim markerom za procjenu laboratorijske i kliničke aktivnosti UBC, što ne iznenađuje, s obzirom da postoji sve više dokaza da upravo IL-6 ima ključnu ulogu u nekontroliranom upalnom procesu crijeva, što je glavna karakteristika UBC (238).

TNF- α je pleotropni citokin koji je uključen u brojne patološke procese, uključivo i u patofiziologiju upalnih bolesti crijeva. Serumske koncentracije TNF- α često su ispod granice detekcije konvencionalnim metodama poput ELISA testova, osobito u zdravih ispitanika. Istraživanje Komatsua i suradnika pokazalo je kako su koncentracije TNF α u serumu, određivane visoko osjetljivim imuno PCR-om otprilike 390 puta više u bolesnika s UBC-om nego u zdravih donora (239). U našem istraživanju nije dokazano da je razlika u koncentracijama toliko viša među kontrolnom skupinom i bolesnicima s UBC-om, međutim statistički značajno više koncentracije jesu

dokazane. U našem istraživanju dokazali smo negativnu korelaciju između TNF- α i razina CRP-a, dakle bolesnici s nižim vrijednostima TNF- α imaju više vrijednosti CRP-a. Međutim, s obzirom da je koeficijent korelacije $r = -0,27$, vjerojatno se ne radi o stvarno značajnoj korelaciji. Komatsu i suradnici su dokazali da bolesnici s aktivnim UC-om imaju povišene vrijednosti TNF- α u odnosu na serumske razine u bolesnika s inaktivnim UC-om, međutim navedena razlika nije detektirana i ELISA testovima. Dodatno, detektirane su više koncentracije TNF- α u neaktivnim fazama bolesti u odnosu na zdrave ispitanike (239). Rezultati pojedinih istraživanja u pedijatrijskoj populaciji također ukazuju da djeca u fazama relapsa ulceroznog kolitisa i Crohn kolitisa, imaju porast TNF- α (133). Naši rezultati kao i rezultati gore spomenutog istraživanja sugeriraju da bi TNF- α mogao biti koristan marker u dijagnostici upalnih bolesti crijeva, međutim za određivanje TNF- α vjerojatno je potrebna osjetljivija metoda.

Među 73 bolesnika koji su primali biološku terapiju, a imali su detektabilne vrijednosti TNF- α , zabilježene su značajno niže vrijednosti TNF- α u odnosu na one koji ne primaju biološku. Ono što na prvi pogled iznenađuje je da su bolesnici koji primaju infliksimab imali više vrijednosti TNF- α , međutim kad promotrimo koliki je postotak bolesnika među tim bolesnicima imao nedetektabilne vrijednosti, uočavamo da je on iznosi 41,67 %. Ukoliko su među tim bolesnicima vrijednosti TNF- α toliko niske da su ispod granica detektabilnosti, navedeno bi značajno moglo utjecati na konačni rezultat. Ispitanici koji primaju adalimumab imali su statistički značajno niže vrijednosti TNF- α u odnosu na one koji ne primaju adalimumab, a među tim bolesnicima manji je udio bolesnika koji su imali nedetektabilne vrijednosti u odnosu na ispitanike koji su primali infliksimab. Dodatno, vrijednosti TNF- α među pacijentima koji primaju golimumab pokazale su se statistički značajno više u odnosu na pacijente koji ne primaju golimumab, međutim treba istaknuti da je to uzorak od svega 7 ispitanika, stoga vjerojatno navedeni rezultat nije relevantan.

S obzirom da je TNF- α proupalni citokini s anoreksigenim i kataboličkim karakteristikama (240), očekivali smo da će imati utjecaj i na nutritivni status. Međutim u našem istraživanju nije dokazana povezanost razina TNF- α s bilo kojim parametrom nutritivnog statusa.

Grelin je hormon koji sudjeluje u povećanju apetita i tjelesne težine te ima protuupalne učinke. U brojnim upalnim stanjima, uključivo i aktivnu UBC, uočeno je da su njegove razine povišene, a smatra se da bi grelin u UBC-u mogao imati i ulogu u regulaciji imunološkog odgovora (241).

U našem istraživanju nije uočena razlika u koncentracijama grelina između bolesnika s upalnim bolestima crijeva i kontrolne skupine, kao ni između bolesnika s CD-om i UC-om. Kada smo promatrali povezanost cirkulirajućih koncentracija grelina s laboratorijskim markerima aktivnosti bolesti, dokazali smo da bolesnici s povišenim vrijednostima grelina imaju niže vrijednosti CRP-a, trombocita i fekalnog kalprotektina.

Suprotno našim rezultatima, istraživanje Ghomraouia i suradnika pokazalo je kako su razine grelina statistički značajno više u bolesnika s aktivnom upalnom bolesti crijeva u odnosu na neaktivne bolesnike, a razlika je dokazana i među skupinama bolesnika s UBC-om i kontrolne skupine (više vrijednosti u bolesnika s UBC-om). Očekivano, više vrijednosti u zdravih kontrola uočene su natašte, u odnosu na ispitanike koji nisu bili natašte (242). Perrachi i suradnici dokazali su da su razine grelina kod bolesnika s UC-om i CD-om više nego u kontrolnoj skupini. Osim toga, u navedenom istraživanju dokazana je pozitivna korelacija između serumskih razina grelina i aktivnosti bolesti, TNF- α i CRP-a (240). I druga istraživanja su pokazala da cirkulirajuće razine grelina u bolesnika s UCB-om dobro koreliraju s TNF- α , C reaktivnim proteinom, SE i fibrinogenom (243-245). Našom subanalizom nismo dokazali povezanost grelina s TNF- α .

U dosadašnjim istraživanjima uglavnom su uspoređivane vrijednosti serumskih koncentracija grelina s laboratorijskim parametrima ili kliničkim pokazateljima aktivnosti bolesti, dok do sada nije analizirana povezanost serumskih koncentracija grelina s endoskopskom aktivnošću bolesti. U našem istraživanju nije dokazana povezanost koncentracija grelina s endoskopskom aktivnosti bolesti, a razlog za to je vjerojatno mala veličina uzorka bolesnika koji su imali rezultate endoskopskih pretraga.

Ranija istraživanja su pokazala kako postoji negativna korelacija između razina grelina i nutritivnog stastusa (242, 246-247). Pa su tako Ates i suradnici dokazali kako razine grelina u bolesnika s CD-om i UC-om negativno koreliraju s tjelesnom

težinom, ITM, FM, FFM, a korelacija je jača u bolesnika s aktivnom upalnom bolesti u odnosu na bolesnika u remisiji (245). U našem istraživanju vrijednosti grelina nisu korelirale ni s parametrima nutritivnog statusa.

Razlog nepoklapanja naših rezultata s literaturnim podacima vjerojatno se nalazi u tome što je u većini naših uzoraka serumska koncentracija grelina nedetektabilna. U našem istraživanju određivali smo acilirani grelin, koji je nestabilan, te je potreban poseban oprez kod uzimanja uzorka, stoga je moguće da je i u samom procesu uzorkovanja došlo do greške.

Za mjerenje koncentracije grelina u različitim studijama upotrebljavane su dvije metode: RIA (*radioimmunoassay*, engl.) ili ELISA. Usporedba te dvije metode za acilirani grelin, pokazala je da su vrijednosti mjerene tim dvjema metodama ekvivalentne, stoga smo mišljenja da odabir metoda ipak nije čimbenik koji je utjecao na rezultate istraživanja (248).

Pojedine studije su pokazale kako postoje i značajne razlike u koncentracijama grelina i leptina između muškaraca i žena, dok druge studije ukazuju da navedena razlika među spolovima ne postoji (249, 250). Naša kontrolna skupina pretežito je uključivala žene i u svakom slučaju smatramo da je to jedno od ograničenja naše studije, no vjerojatno u slučaju grelina ipak nije značajno utjecalo na rezultate.

Što se tiče utjecaja medikamentozne terapije koju bolesnici primaju, istraživanja su pokazala da infuzija infliksimaba dovodi do porasta grelina za 25 % u bolesnika s CD-om (251). Porast koncentracije grelina nakon aplikacije anti TNF lijeka uočen je i u bolesnika s reumatoidnim artritismom (252). U našem istraživanju koncentracije biomarkera su mjerene prije same aplikacije parenteralnih lijekova, stoga navedeni porast nismo uočili. Pretraživanjem literature nismo našli istraživanje u kojem bi bila dokazana bilo kakva povezanost između koncentracija grelina i drugih farmakoterapija za UBC.

Leptin je hormon koji ima čitav niz uloga, a tijekom upale može davati lažan signal hipotalamusu o prekomjernoj masi masnog tkiva, te time potaknuti neadekvatan fiziološki odgovor i inducirati anoreksiju. Stoga bi mogao biti zanimljiv biomarker u upalnim bolestima, uključivo i UBC-u.

Našim istraživanjem smo potvrdili da ispitanici s UBC-om imaju niže vrijednosti leptina u odnosu na ispitanike u kontrolnoj skupini.

Dodatno, dokazana je značajna pozitivna korelacija između razina leptina i ITM-a. Međutim, kako među kontrolnom skupinom i ispitanicima s upalnim bolestima crijeva nije bilo značajne razlike u ITM-u, razlog za niže vrijednosti leptina u ispitanika s upalnim bolestima crijeva možemo tražiti i u upalnom zbivanju koje moguće utječe na razine hormona sitosti. Jedan od čimbenika koji je mogao utjecati na rezultate je to što je u kontrolnoj skupini bilo značajno više žena, a sekrecija leptina ima i naznačen seksualni dimorfizam pa su tako koncentracije leptina u žena s bilo kojom razinom adipoziteta više (183). Osim toga, ispitanici u kontrolnoj skupini imali su značajno više vrijednosti mase masnog tkiva, što je jedan od čimbenika koji je mogao utjecati na više razine leptina u kontrolnoj skupini.

Rezultati našeg istraživanja nisu dokazali da bi razine leptina mogle biti povezane s aktivnošću bolesti, kako laboratorijskom, tako ni endoskopskom ni kliničkom.

Biesiada i suradnici otkrili su da su serumske razine leptina u bolesnika s egzacerbacijom UC-a više od razina kod bolesnika u remisiji te da koreliraju pozitivno sa serumskim razinama proupalnih citokina IL-1 β and TNF- α - ali ne i sa težinom upalnih lezija (253). I drugi autori su pokazali kako su razine leptina povišene u akutnom stadiju UC-a i to neovisno o ITM-u (254). Ukoliko pogledamo rezultate istraživanja koja su uspoređivala razine leptina u bolesnika s UBC-om u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, rezultati su različiti. Primjerice, Kahraman i suradnici su pokazali kako su razine leptina više u bolesnika s UC-om i CD-om (255). S druge strane, Karmiris i suradnici su uočili da su serumske razine leptina snižene u bolesnika s upalnim bolestima crijeva (176). Nije uočena razlika između bolesnika s CD-om i UC-om ili između bolesnika s aktivnom i inaktivnom bolesti. Navedeno se podudara s rezultatima našeg istraživanja. U drugim istraživanjima nisu uočene razlike između razina leptina u bolesnika s upalnim bolestima crijeva i kontrolne skupine (256-258).

Male kohorte, različite kontrolne skupine i različite terapije u ispitanika su vjerojatno uzrok inkonzistentnih rezultata dosadašnjih istraživanja.

Utječe li terapija za UBC na serumske vrijednosti lepina, istraživala je Trejo-Vazquez, koja je dokazala da su u UC razine leptina niže u bolesnika koji su primali aminosalicilate, bilo u monoterapiji ili u kombinaciji s azatioprinom, dok kod bolesnika s CD-om nije uočena nikakva razlika u razinama leptina, kada se bolesnici stratificiraju prema terapijama koje primaju (259). Postoje istraživanja koja su pokazala da bolesnici s CD-om koji su liječeni infliksimabom, imaju više vrijednosti leptina što bi govorilo u prilog tome da TNF- α zaista ima ulogu u regulaciji otpuštanja leptina iz adipocita (260). Waluga i suradnici su dokazali kako tromjesečna terapija glukokortikoidima sa ili bez azatioprina, dovodi do porasta koncentracije leptina u plazmi u bolesnika s CD-om (261).

Kada smo stratificirali bolesnike prema terapija koje primaju, nismo dokazali značajnije razlike u razinama leptina. Razlog tome možemo tražiti u veličini uzroka, ali i duljini primanja medikamentozne terapije kod ispitanika.

U našem istraživanju pokazali smo da leptin negativno korelira sa skeletnom mišićnom masom kod bolesnika s UBC-om, a dokazana je pozitivna korelacija leptina s masom masnog tkiva, stopom visceralnog masnog tkiva te indeksom tjelesne mase. Kad smo stratificirali bolesnike prema skupinama, uočili smo kako u kontrolnoj skupini nije uočena negativna korelacija sa skeletnom mišićnom masom. Od ranije je poznato da je količina leptina, koja se luči, proporcionalna masi masnog tkiva te da razine leptina predstavljaju važan marker energetske zaliha (181).

Aurangzeb i suradnici dokazali su da koncentracije leptina pozitivno koreliraju s BMI u pedijatrijskoj populaciji bolesnika s UBC-om, a na slična istraživanja na odrasloj populaciji bolesnika s UBC-om pretraživanjem literature nismo naišli.

Pronalazak markera koji bi nam bio koristan u dijagnostici, subklasificiranju, monitoriranju aktivnosti bolesti i predviđanju komplikacija i odgovora na terapiju, predstavlja izazov u zbrinjavanju bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Kako pojedinačni biomarkeri nemaju dovoljnu specifičnosti ni osjetljivost, kombiniranje različitih biomarkera bi moglo biti učinkovito u evaluaciji tijeka bolesti. Ovim istraživanjem nismo dokazali da bi grelin i/ili leptin mogli biti potencijalni biomarkeri u praćenju aktivnosti bolesti, međutim rezultati su pokazali kako bi upravo IL-6 mogao biti dobar surogat marker kliničkim i biokemijskim indeksima koji se koriste u upalnim

bolestima crijeva. Nepostojanje pretpostavljenih korelacija odnosno negativna korelacija razina grelina i upalnih parametara, moguće je uzrokovana i heterogenošću ispitivane skupine ali i u metodološkim greškama.

U naše istraživanje je uključeno 153 bolesnika, što predstavlja do sada najveći uzorak bolesnika s upalnim bolestima crijeva kod kojih je uspoređivana koncentracija dva hormona, grelina i leptina te dva proupalna citokina (IL-6 i TNF- α) s laboratorijskim, endoskopskim i kliničkim pokazateljima upale, što danas predstavlja zlatni standard u praćenju bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Potencijalnu ulogu ispitivanih biomarkera u kliničkoj praksi potrebno je evaluirati dodatnim istraživanjima na većem broju ispitanika.

7 ZAKLJUČAK

- Vrijednosti leptina, polipeptida koji se većinom proizvodi u masnom tkivu, a važnu funkciju ima u inhibiciji apetita i moduliranju upalnih i imunoloških reakcija, niže su u bolesnika s upalnim bolestima crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, korelacija između koncentracije leptina i razina laboratorijskih parametara upale, kliničke aktivnosti bolesti, u ovom istraživanju nije dokazana. Ispitanici s višom koncentracijom leptina imaju višu masu masnog tkiva i stopu visceralnog masnog tkiva te indeks tjelesne mase, dok ispitanici s nižom koncentracijom leptina imaju višu skeletnu mišićnu masu.
- Vrijednosti TNF- α , važnog regulatora upalnog odgovora, koji je uključen u patogenezu upalnih bolesti crijeva, niže su u kontrolnoj skupini u odnosu na skupinu ispitanika s upalnim bolestima crijeva. Korelaciju razina TNF- α s ispitivanim laboratorijskim pokazateljima upale, kao ni s markerima kliničke aktivnosti, nismo dokazali.
- U našem istraživanju nije dokazana statistički značajna razlika koncentracija grelina, peptida koji također ima ulogu u moduliranju imunoloških odgovora i upalnih procesa, među kontrolnom skupinom i ispitanicima s upalnim bolestima crijeva. Međutim, rezultati našeg istraživanja su pokazali kako ispitanici s višim vrijednostima grelina imaju niže vrijednosti CRP-a, trombocita te fekalnog kalprotektina.
- Koncentracije proupalnog citokina IL-6, koji ima važnu ulogu u nekontroliranom upalnom procesu crijeva, pozitivno koreliraju s vrijednostima laboratorijskih parametara upale. U Crohnovoj bolesti, vrijednosti IL-6 su više u skupini ispitanika s aktivnom bolesti mjereno kliničkim indeksima HBI i CDAI. U ulceroznom kolitisu su također zabilježene više vrijednosti IL-6 u ispitanika s aktivnom bolesti mjereno TW kriterijima i PMS. U našem istraživanju nije dokazana značajna razlika u koncentracijama grelina i IL-6 između ispitanika s upalnim bolestima crijeva i kontrolne skupine.

8 SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva (UBC) kronične su bolesti čiji se porast incidencija prati u posljednjih nekoliko godina. Stoga ne čudi da je velik broj istraživanja u UBC-u usmjeren ka otkrivanju biomarkera koji bi bio koristan u praćenju aktivnosti bolesti. Kako u upalnim bolestima crijeva dolazi do čitavog niza metaboličkih promjena, moguće su fluktuacije proizvodnje grelina i leptina, te bi upravo njihove serumske razine mogle predstavljati potencijalne biomarkere u UBC-u. Osim toga, citokini su često istraživani biomarkeri u UBC-u, s obzirom da su upravo oni ključne komponente u upalnim putevima važnima u patogenezi UBC-a. Cilj našeg istraživanja bio je odrediti serumske koncentracije grelina, leptina, TNF- α i IL-6 u UBC-u te istražiti povezanost njihovih razina s aktivnosti bolesti i nutritivnim statusom. Rezultati istraživanja su pokazali da bolesnici s UBC-om imaju niže vrijednosti leptina, a više vrijednosti TNF- α u odnosu na kontrolnu skupinu. Dokazana je pozitivna korelacija IL-6 s laboratorijskim pokazateljima upalne aktivnosti, te s kliničkom aktivnosti UBC-a. Osim toga, dokazali smo pozitivnu korelaciju leptina s masom masnog tkiva, stopom visceralnog masnog tkiva te indeksom tjelesne mase te njegovu negativnu korelaciju sa skeletnom mišićnom masom u UBC-u. Razine grelina u većini naših uzoraka bile su nedetektabilne, što smo objasnili greškom u metodologiji. U našem istraživanju IL-6 se pokazao kao potencijalni biomarker u praćenju aktivnosti bolesti, a leptin kao dobar pokazatelj nutritivnog statusa. Međutim, potencijalnu ulogu ispitivanih biomarkera u upalnim bolestima crijeva potrebno je reevaluirati na većem i homogenijem uzorku ispitanika.

Ključne riječi: upalne bolesti crijeva, grelin, leptin, faktor tumorske nekroze- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6)

9 SUMMARY

Cross sectional study of serum ghrelin, leptin and proinflammatory cytokines levels in inflammatory bowel disease

Ana Barišić (2022)

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic disease with an increasing incidence in the past few years. Much research in the IBD field has focused on finding reliable serum biomarkers for assessing disease activity. IBD is associated with several metabolic changes that may lead to fluctuation of ghrelin and leptin production. Therefore, serum ghrelin and leptin levels may represent potential biomarkers in IBD. Furthermore, cytokines are commonly researched biomarkers in IBD, due to the fact they have been identified as the key players in intestinal inflammation. Our research has aimed to investigate serum ghrelin, leptin, TNF- α , and IL-6 concentrations in IBD and the association between their levels and activity of the disease and nutritional status. Our results suggest that patients with IBD have lower levels of leptin, and higher levels of TNF- α in comparison with the control group. It has been shown that IL-6 positively correlates with laboratory and clinical markers of disease activity. In addition, leptin levels have been found to exhibit a positive correlate with levels of fat mass, visceral fat mass, and body mass index. A negative correlation between leptin levels and skeletal muscle mass in IBD patients has been proven. Systematic measurement errors are a probable cause of undetectable levels of ghrelin in our research. Finally, IL-6 has been shown as a potential biomarker of disease activity. However, additional studies with larger homogenous cohorts may be needed to validate the value of tested biomarkers as non-invasive biomarkers of IBD activity.

Keywords: inflammatory bowel disease, Ghrelin, Leptin, Tumor necrosis factor α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6)

10 LITERATURA

1. Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2017 Feb;152(2):313-321.e2.
2. Khalili H. The Changing Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: What Goes Up May Come Down. *Inflamm Bowel Dis*. 2020 Mar 4;26(4):591-592.
3. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, i sur. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2017 Dec 23;390(10114):2769-2778.
4. Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL; ECCO -EpiCom. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis*. 2013 May;7(4):322-37.
5. GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020 Jan;5(1):17-30.
6. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1785-94.
7. Lakatos L, Kiss LS, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Mester G, i sur. Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in Western Hungary, 2002-2006. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Dec;17(12):2558-65.
8. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, i sur. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*. 1996 Nov;39(5):690-7.
9. Loftus CG, Loftus EV Jr, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ 3rd, i sur. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Mar;13(3):254-61.
10. Mak WY, Zhao M, Ng SC, Burisch J. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Mar;35(3):380-389.

11. Shah SC, Khalili H, Gower-Rousseau C, Olen O, Benchimol EI, Lyngé E, i sur. Sex-Based Differences in Incidence of Inflammatory Bowel Diseases-Pooled Analysis of Population-Based Studies From Western Countries. *Gastroenterology*. 2018 Oct;155(4):1079-1089.e3.
12. Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res*. 2019 Dec 1;2019:7247238.
13. de Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, Lamb CA, Luo Y, Kennedy NA, i sur. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2017 Feb;49(2):256-261.
14. Mirkov MU, Verstockt B, Cleynen I. Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017 Mar;2(3):224-234.
15. Huang H, Fang M, Jostins L, Umićević Mirkov M, Boucher G, Anderson CA, i sur. Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single-variant resolution. *Nature*. 2017 Jul 13;547(7662):173-178.
16. Shaw MH, Kamada N, Warner N, Kim YG, Nuñez G. The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. *Trends Immunol*. 2011 Feb;32(2):73-9.
17. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, i sur. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):599-603.
18. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, i sur. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):603-6.
19. Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, i sur. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*. 2002 Apr;70(4):845-57.
20. Weiss B, Shamir R, Bujanover Y, Waterman M, Hartman C, Fradkin A, i sur. NOD2/CARD15 mutation analysis and genotype-phenotype correlation in Jewish pediatric patients compared with adults with Crohn's disease. *J Pediatr*. 2004 Aug;145(2):208-12.

21. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, i sur. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002 Sep;123(3):679-88.
22. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1704-12.
23. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol*. 2018 Feb;11(1):1-10.
24. Richard ML, Sokol H. The gut mycobiota: insights into analysis, environmental interactions and role in gastrointestinal diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Jun;16(6):331-345.
25. Saleh M, Elson CO. Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. *Immunity*. 2011 Mar 25;34(3):293-302.
26. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*. 2017 Sep;279(1):70-89.
27. Ahmed I, Roy BC, Khan SA, Septer S, Umar S. Microbiome, Metabolome and Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms*. 2016 Jun 15;4(2):20.
28. van der Waaij LA, Harmsen HJ, Madjipour M, Kroese FG, Zwiers M, van Dullemen HM, i sur. Bacterial population analysis of human colon and terminal ileum biopsies with 16S rRNA-based fluorescent probes: commensal bacteria live in suspension and have no direct contact with epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 Oct;11(10):865-71.
29. Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, Tytgat GN, Dankert J. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology*. 1999 Nov;117(5):1089-97.
30. Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, i sur. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol*. 2010 Nov;105(11):2420-8.
31. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Fuchs CS, i sur. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2014 May;63(5):776-84.

32. Lakatos PL. Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? *Dig Dis*. 2009;27(3):215-25.
33. Ho SM, Lewis JD, Mayer EA, Plevy SE, Chuang E, Rappaport SM, i sur. Challenges in IBD Research: Environmental Triggers. *Inflamm Bowel Dis*. 2019 May 16;25(Suppl 2):S13-S23. Erratum in: *Inflamm Bowel Dis*. 2019 Nov 14;25(12):e171.
34. Garg M, Lubel JS, Sparrow MP, Holt SG, Gibson PR. Review article: vitamin D and inflammatory bowel disease-established concepts and future directions. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012 Aug;36(4):324-44.
35. Leslie WD, Miller N, Rogala L, Bernstein CN. Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. *Am J Gastroenterol*. 2008 Jun;103(6):1451-9.
36. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:141–153.
37. Kaistha A, Levine J. Inflammatory bowel disease: the classic gastrointestinal autoimmune disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2014;44:328–334.
38. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*. 2014 Jan;13(1):3-10.
39. Anderson CA, Boucher G, Lees CW. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*. 2011;43:246–252.
40. UK IBD Genetics Consortium, Barrett JC, Lee JC, Lees CW, Prescott NJ, Anderson CA, Phillips A, i sur. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet*. 2009 Dec;41(12):1330-4.
41. Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N, i sur. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001 Jul;281(1):G216-28.
42. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, i sur. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2003 Jul;9(4):215-23.

43. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, i sur. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007 Jan;56(1):61-72..
44. Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest*. 2008 Oct;88(10):1110-20.
45. Klag T, Stange EF, Wehkamp J. Defective antibacterial barrier in inflammatory bowel disease. *Dig Dis*. 2013;31:310–316.
46. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):637-50.
47. Dinarello CA. Interleukin-1beta and the autoinflammatory diseases. *N Engl J Med* 2009;360:2467-2470.
48. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Ishida O, Ikeda H, Tsuruta O, i sur. Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut*. 1995 Jan;36(1):45-9.
49. Reinisch W, Gasché C, Tillinger W, Wyatt J, Lichtenberger C, Willheim M, i sur. Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse. *Am J Gastroenterol*. 1999 Aug;94(8):2156-64.
50. Li Y, de Haar C, Chen M, Deuring J, Gerrits MM, Smits R, i sur. Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut*. 2010 Feb;59(2):227-35.
51. Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 1993 Dec;34(12):1705-9.
52. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2014 May;14(5):329-42.
53. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:4280-4288.

54. Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;108:1434-1444.
55. Melgar S, Yeung MM, Bas A, Forsberg G, Suhr O, Oberg A, i sur. Over-expression of interleukin 10 in mucosal T cells of patients with active ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol.* 2003 Oct;134(1):127-37.
56. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 2008;134:392-404.
57. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 2001 Aug;108(4):601-9.
58. Del Zotto B, Mumolo G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Boirivant M. TGF-beta1 production in inflammatory bowel disease: differing production patterns in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol.* 2003 Oct;134(1):120-6. Erratum in: *Clin Exp Immunol.* 2003 Nov;134(2):365.
59. Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, Majima T, Kagiya M, Kikuchi K. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol.* 2001 Mar;96(3):822-8.
60. Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis.* 2001 Feb;7(1):16-26.
61. Gu FM, Li QL, Gao Q, Jiang JH, Zhu K, Huang XY, i sur. IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer.* 2011 Dec 15;10:150.
62. Wruck CJ, Fragoulis A, Gurzynski A, Brandenburg LO, Kan YW, Chan K, i sur. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Ann Rheum Dis.* 2011 May;70(5):844-50.
63. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, i sur. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2003 Jan;52(1):65-70.
64. Krummel MF, Bartumeus F, Gérard A. T cell migration, search strategies and mechanisms. *Nat Rev Immunol.* 2016 Mar;16(3):193-201.

65. Imam T, Park S, Kaplan MH, Olson MR. Effector T Helper Cell Subsets in Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol*. 2018 Jun 1;9:1212.
66. Kaplan MH. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev*. 2013 Mar;252(1):104-15.
67. Gerlach K, Hwang Y, Nikolaev A, Atreya R, Dornhoff H, Steiner S, i sur. TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nat Immunol*. 2014 Jul;15(7):676-86. Erratum in: *Nat Immunol*. 2015 Feb;16(2):214.
68. Xu XR, Liu CQ, Feng BS, Liu ZJ. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 28;20(12):3255-64.
69. Himmel ME, Hardenberg G, Piccirillo CA, Steiner TS, Levings MK. The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. *Immunology*. 2008 Oct;125(2):145-53.
70. Turner D, Ricciuto A, Lewis A, D'Amico F, Dhaliwal J, Griffiths AM, i sur. International Organization for the Study of IBD. STRIDE-II: An Update on the Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE) Initiative of the International Organization for the Study of IBD (IOIBD): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target strategies in IBD. *Gastroenterology*. 2021 Apr;160(5):1570-1583.
71. Lewis JD, Chuai S, Nessel L, Lichtenstein GR, Aberra FN, Ellenberg JH. Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Dec;14(12):1660-6.
72. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J*. 1955 Oct 29;2(4947):1041-8.
73. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976 Mar;70(3):439-44
74. Levesque BG, Sandborn WJ, Ruel J, Feagan BG, Sands BE, Colombel JF. Converging goals of treatment of inflammatory bowel disease from clinical trials and practice. *Gastroenterology*. 2015 Jan;148(1):37-51.e1.
75. Irvine EJ. Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index. McMaster IBD Study Group. *J Clin Gastroenterol*. 1995;20:27-32.

76. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980 Mar 8;1(8167):514.
77. Annese V, Daperno M, Rutter MD, Amiot A, Bossuyt P, East J, i sur. European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013 Dec; 7(12):982-1018
78. Boris Vucelić. Današnja strategija liječenja upalnih bolesti crijeva: važnost mukoznog cijeljenja. *MEDICUS* 2012. Vol. 21, No. 2, 171 – 178
79. Travis SP, Schnell D, Krzeski P, Abreu MT, Altman DG, Colombel JF, i sur. Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut*. 2012 Apr;61(4):535-42.
80. Koutroumpakis E, Katsanos KH. Implementation of the simple endoscopic activity score in crohn's disease. *Saudi J Gastroenterol*. 2016 May-Jun;22(3):183-91.
81. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, i sur. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc*. 2004 Oct;60(4):505-12.
82. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1990 Oct;99(4):956-63.
83. Sachar DB; Biomarkers Task Force of the IOIBD. Role of biomarkers in the study and management of inflammatory bowel disease: a "nonsystematic" review. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Dec;20(12):2511-8.
84. Fagan EA, Dyck RF, Maton PN, Hodgson HJ, Chadwick VS, Petrie A, i sur. Serum levels of C-reactive protein in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest*. 1982 Aug;12(4):351-9.
85. Suk Danik J, Chasman DI, Cannon CP, Miller DT, Zee RY, Kozlowski P, i sur. Influence of genetic variation in the C-reactive protein gene on the inflammatory response during and after acute coronary ischemia. *Ann Hum Genet*. 2006 Nov;70(Pt 6):705-16.
86. Walsh AJ, Bryant RV, Travis SP. Current best practice for disease activity assessment in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 Oct;13(10):567-79.

87. von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, Reese GE, Darzi AW, Teare JP, i sur. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol*. 2007 Apr;102(4):803-13.
88. Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Jan;14(1):40-6.
89. Sipponen T, Björkesten CG, Färkkilä M, Nuutinen H, Savilahti E, Kolho KL. Faecal calprotectin and lactoferrin are reliable surrogate markers of endoscopic response during Crohn's disease treatment. *Scand J Gastroenterol*. 2010 Mar;45(3):325-31.
90. Waugh N, Cummins E, Royle P, Kandala NB, Shyangdan D, Arasaradnam R, i sur. Faecal calprotectin testing for differentiating amongst inflammatory and non-inflammatory bowel diseases: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2013 Nov;17(55):xv-xix, 1-211.
91. Suárez Ferrer C, Abadía Barno M, Martín Arranz E, Jochems A, García Ramírez L, Poza Cordon J, i sur. The use of serum calprotectin as a biomarker for inflammatory activity in inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig*. 2019 Oct;111(10):744-749.
92. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*. 2006 Mar;55(3):426-31.
93. Papp M, Lakatos PL. Serological studies in inflammatory bowel disease: how important are they? *Curr Opin Gastroenterol*. 2014 Jul;30(4):359-64.
94. Mitsuyama K, Niwa M, Takedatsu H, Yamasaki H, Kuwaki K, Yoshioka S, i sur. Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan 21;22(3):1304-10.
95. Jansen A, Mandić AD, Bennek E, Frehn L, Verdier J, Tebrügge I, i sur. Anti-food and anti-microbial IgG subclass antibodies in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2016 Dec;51(12):1453-1461.
96. Rump JA, Schölmerich J, Gross V, Roth M, Helfesrieder R, Rautmann A, i sur. A new type of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) in active ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Immunobiology*. 1990 Nov;181(4-5):406-13.

97. Schulte-Pelkum J, Radice A, Norman GL, López Hoyos M, Lakos G, Buchner C, i sur. Novel clinical and diagnostic aspects of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Immunol Res.* 2014;2014:185416.
98. Vasiliauskas EA, Kam LY, Karp LC, Gaiennie J, Yang H, Targan SR. Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. *Gut.* 2000 Oct;47(4):487-96.
99. Norouzinia M, Chaleshi V, Alizadeh AHM, Zali MR. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: insight into diagnosis, prognosis and treatment. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2017 Summer;10(3):155-167.
100. Desai D, Faubion WA, Sandborn WJ. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Feb 1;25(3):247-55
101. Tiaka EK, Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Potamianos SP. Unraveling the link between leptin, ghrelin and different types of colitis. *Ann Gastroenterol.* 2011;24(1):20-28.
102. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995;86(4):1243-54.
103. Scheller J, Rose-John S. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol.* 2006;195(4):173-83.
104. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1237-47.
105. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011 May;1813(5):878-88.
106. Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat Rev Drug Discov.* 2018 Jun;17(6):395-412.
107. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Sep 4;6(10):a016295.
108. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990 Feb 1;265(3):621-36.

109. Fielding CA, Jones GW, McLoughlin RM, McLeod L, Hammond VJ, Uceda J, i sur. Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. *Immunity*. 2014 Jan 16;40(1):40-50.
110. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The Role of IL-6 in Skin Fibrosis and Cutaneous Wound Healing. *Biomedicines*. 2020;8(5):101.
111. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, i sur. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*. 1988 Mar 3;332(6159):83-5.
112. Horii Y, Muraguchi A, Iwano M, Matsuda T, Hirayama T, Yamada H, i sur. Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol*. 1989 Dec 15;143(12):3949-55.
113. Stenlof K, Wernstedt I, Fjallman T, Wallenius V, Wallenius K, Jansson J. Interleukin6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4379-4383.
114. Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, i sur. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med*. 2011 Oct 30;17(11):1481-9.
115. Rose-John S. Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000Res*. 2020 Aug 20;9:F1000 Faculty Rev-1013.
116. Boyce EG, Rogan EL, Vyas D, Prasad N, Mai Y. Sarilumab: Review of a Second IL-6 Receptor Antagonist Indicated for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Ann Pharmacother*. 2018 Aug;52(8):780-791.
117. Tanaka T, Kishimoto T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1227-36.
118. Narazaki M, Kishimoto T. The Two-Faced Cytokine IL-6 in Host Defense and Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 9;19(11):3528.
119. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Sep;72(9):3666-70.

120. Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, McDermott M. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res*. 2019 Jan 28;8:F1000 Faculty Rev-111.
121. Maini RN, Elliott MJ, Brennan FM, Feldmann M. Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) blockade in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*. 1995 Aug;101(2):207-12. Erratum in: *Clin Exp Immunol* 1995 Nov;102(2):443.
122. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett*. 2008;582(1):117-131.
123. Feinberg B, Kurzrock R, Talpaz M, Blick M, Saks S, Gutterman JU. A phase I trial of intravenously-administered recombinant tumor necrosis factor-alpha in cancer patients. *J Clin Oncol*. 1988 Aug;6(8):1328-34.
124. Creaven PJ, Plager JE, Dupere S, Huben RP, Takita H, Mittelman A, i sur. Phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1987;20(2):137-44.
125. Seymour HE, Worsley A, Smith JM, Thomas SH. Anti-TNF agents for rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol*. 2001 Mar;51(3):201-8.
126. Ghosh S. Anti-TNF therapy in Crohn's disease. *Novartis Found Symp*. 2004;263:193-205; discussion 205-18.
127. Coates LC, Marzo-Ortega H, Bennett AN, Emery P. Anti-TNF Therapy in Ankylosing Spondylitis: Insights for the Clinician. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2010 Feb;2(1):37-43.
128. Kircik LH, Del Rosso JQ: Anti-TNF agents for the treatment of psoriasis. *J Drugs Dermatol*. 2009;8(6):546–59.
129. Robak T, Gladalska A, Stepień H. The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Eur Cytokine Netw*. 1998 Jun;9(2):145-54. .
130. Nürnberger W, Platonov A, Stannigel H, Beloborodov VB, Michelmann I, von Kries R, i sur. Definition of a new score for severity of generalized *Neisseria meningitidis* infection. *Eur J Pediatr*. 1995 Nov;154(11):896-900.
131. Waage A, Halstensen A, Espevik T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet*. 1987 Feb 14;1(8529):355-7.

132. Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, i sur. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Lancet*. 1990 Nov 17;336(8725):1201-4.
133. Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 1991 Aug;32(8):913-7.
134. Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet*. 1992 Jan 11;339(8785):89-91.
135. Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, i sur. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1994 Jun;106(6):1455-66.
136. Maeda M, Watanabe N, Neda H, Yamauchi N, Okamoto T, Sasaki H, i sur. Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1992;14(3):451-61.
137. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*. 2005 Apr;85(2):495-522.
138. Sangiao-Alvarellos S, Cordido F. Effect of ghrelin on glucose-insulin homeostasis: therapeutic implications. *Int J Pept*. 2010;2010:234709.
139. Tong J, Dave N, Mugundu GM, Davis HW, Gaylinn BD, Thorner MO, i sur. The pharmacokinetics of acyl, des-acyl, and total ghrelin in healthy human subjects. *Eur J Endocrinol*. 2013 May 2;168(6):821-8.
140. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001 Aug;50(8):1714-9.
141. Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, i sur. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*. 2001 Jun;24(6):RC19-21.
142. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, i sur. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 2000 Nov;141(11):4255-61.

143. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, i sur. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jan;87(1):240-4.
144. Dzaja A, Dalal MA, Himmerich H, Uhr M, Pollmächer T, Schuld A. Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 Jun;286(6):E963-7.
145. Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML, McCann SM, Licinio J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 13;101(28):10434-9.
146. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach, *Nature*, 1999, vol. 402 (pg. 656-660)
147. Peino R, Baldelli R, Rodriguez-Garcia J, Rodriguez-Segade S, Kojima M, Kangawa K, i sur. Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur J Endocrinol.* 2000 Dec;143(6):R11-4.
148. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, i sur. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Dec;85(12):4908-11.
149. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niiijima A, Matsuo H, i sur. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology.* 2002 Oct;123(4):1120-8.
150. Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology.* 2003 Dec;144(12):5184-7.
151. Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, i sur. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Mar;86(3):1169-74.
152. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Dec;86(12):5992.

153. Zhang W, Lin TR, Hu Y, Fan Y, Zhao L, Stuenkel EL, i sur. Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Physiol.* 2004 Sep 15;559(Pt 3):729-37.
154. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, i sur. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron.* 2003 Feb 20;37(4):649-61.
155. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, i sur. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Oct 5;276(3):905-8.
156. Edholm T, Levin F, Hellström PM, Schmidt PT. Ghrelin stimulates motility in the small intestine of rats through intrinsic cholinergic neurons. *Regul Pept.* 2004 Sep 15;121(1-3):25-30.
157. Tebbe JJ, Mronga S, Tebbe CG, Ortmann E, Arnold R, Schäfer MK. Ghrelin-induced stimulation of colonic propulsion is dependent on hypothalamic neuropeptide Y1- and corticotrophin-releasing factor 1 receptor activation. *J Neuroendocrinol.* 2005 Sep;17(9):570-6.
158. Khatib MN, Simkhada P, Gode D, Tebbe JJ, Mronga S, Tebbe CG, i sur. Ghrelin-induced stimulation of colonic propulsion is dependent on hypothalamic neuropeptide Y1- and corticotrophin-releasing factor 1 receptor activation. *J Neuroendocrinol.* 2005 Sep;17(9):570-6.
159. Yang C, Wang Y, Liu H, Li N, Sun Y, Liu Z, i sur. Ghrelin protects H9c2 cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis through the endoplasmic reticulum stress pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2012 May;59(5):465-71.
160. Ledderose C, Kreth S, Beiras-Fernandez A. Ghrelin, a novel peptide hormone in the regulation of energy balance and cardiovascular function. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2011 Jan;5(1):1-6.
161. Zhang GG, Cai HQ, Li YH, Sui YB, Zhang JS, Chang JR, i sur. Ghrelin protects heart against ERS-induced injury and apoptosis by activating AMP-activated protein kinase. *Peptides.* 2013 Oct;48:156-65.
162. Yano Y, Nakazato M, Toshinai K, Inokuchi T, Matsuda S, Hidaka T, i sur. Circulating des-acyl ghrelin improves cardiovascular risk prediction in older hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2014 May;27(5):727-33.

163. Yang D, Liu Z, Luo Q. Plasma ghrelin and pro-inflammatory markers in patients with obstructive sleep apnea and stable coronary heart disease. *Med Sci Monit.* 2013 Apr 8;19:251-6.
164. Adeghate E, Ponery AS. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol.* 2002 Jul;14(7):555-60.
165. Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH Jr. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology.* 2002 Jan;143(1):185-90.
166. Reimer MK, Pacini G, Ahrén B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology.* 2003 Mar;144(3):916-21.
167. Choi HJ, Ki KH, Yang JY, Jang BY, Song JA, Baek WY, i sur. Chronic central administration of Ghrelin increases bone mass through a mechanism independent of appetite regulation. *PLoS One.* 2013 Jul 2;8(7):e65505.
168. van der Velde M, van der Eerden BC, Sun Y, Almering JM, van der Lely AJ, Delhanty PJ, i sur. An age-dependent interaction with leptin unmasks ghrelin's bone-protective effects. *Endocrinology.* 2012 Aug;153(8):3593-602. Epub 2012 Jun 14. Erratum in: *Endocrinology.* 2013 Oct;154(10):3951.
169. McLarnon A. Metabolism: age-dependent balance of leptin and ghrelin regulates bone metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2012 Sep;8(9):504
170. Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, Nogueiras R, Perez-Tilve D, Pfluger P, i sur. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1983-93.
171. Perez-Tilve D, Heppner K, Kirchner H, Lockie SH, Woods SC, Smiley DL, i sur. Ghrelin-induced adiposity is independent of orexigenic effects. *FASEB J.* 2011 Aug;25(8):2814-22.
172. Davies JS, Kotokorpi P, Eccles SR, Barnes SK, Tokarczuk PF, Allen SK, i sur. Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention. *Mol Endocrinol.* 2009 Jun;23(6):914-24.
173. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. *Gastroenterology.* 2006 May;130(6):1707-20.
174. Waseem T, Duxbury M, Ito H, Ashley SW, Robinson MK. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines

- in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Surgery*. 2008 Mar;143(3):334-42.
175. Di Giovangiulio M, Stakenborg N, Bosmans G, Meroni E, Farro G, Gomez-Pinilla PJ, i sur. Ghrelin receptor modulates T helper cells during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil*. 2015 Nov;27(11):1542-52.
 176. Karmiris K, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin-implications for inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res*. 2008 Aug;52(8):855-66.
 177. Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, i sur. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1169-74.
 178. Broglio F, Benso A, Castiglioni C, Gottero C, Prodam F, Destefanis S, i sur. The endocrine response to ghrelin as a function of gender in humans in young and elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:1537-42.
 179. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dec 1;372(6505):425-32. Erratum in: *Nature* 1995 Mar 30;374(6521):479.
 180. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26:1407-1433.
 181. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, i sur. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996 Feb 1;334(5):292-5.
 182. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004;50:1511- 525.
 183. Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R, i sur. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:579-584.
 184. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med*. 2010 Jan 19;152(2):93-100.

185. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83:1263-1271.
186. Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*. 2003 Feb 20;421(6925):856-9.
187. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996 Jul 18;382(6588):250-2.
188. Ramos-Lobo AM, Donato J Jr. The role of leptin in health and disease. *Temperature (Austin)*. 2017 May 26;4(3):258-291.
189. Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J, et al. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest*. 1996 May 1;97(9):2152-7.
190. Finck BN, Kelley KW, Dantzer R, Johnson RW. In vivo and in vitro evidence for the involvement of tumor necrosis factor-alpha in the induction of leptin by lipopolysaccharide. *Endocrinology*. 1998 May;139(5):2278-83.
191. Papathanassoglou E, El-Haschimi K, Li XC, Matarese G, Strom T, Mantzoros C. Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. *J Immunol*. 2006 Jun 15;176(12):7745-52.
192. 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 Sep 1;6(9):1170-80.
193. Sánchez-Margalet V, Martín-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Najib S, Gonzalez-Yanes C. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol*. 2003 Jul;133(1):11-9.
194. Deem JD, Muta K, Ogimoto K, Nelson JT, Velasco KR, Kaiyala KJ, et al. Leptin regulation of core body temperature involves mechanisms independent of the thyroid axis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2018 Oct 1;315(4):E552-E564.

195. Simonds SE, Pryor JT, Ravussin E, Greenway FL, Dileone R, Allen AM, i sur. Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity. *Cell*. 2014 Dec 4;159(6):1404-16.
196. Liberale L, Bonaventura A, Vecchiè A, Casula M, Dallegri F, Montecucco F, i sur. The Role of Adipocytokines in Coronary Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017 Feb;19(2):10. Erratum in: *Curr Atheroscler Rep*. 2017 May;19(5):21.
197. Scheja L, Heeren J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2019 Sep;15(9):507-524.
198. Denroche HC, Huynh FK, Kieffer TJ. The role of leptin in glucose homeostasis. *J Diabetes Investig*. 2012 Mar 28;3(2):115-29.
199. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Maymó J, Dueñas JL, Varone C, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in female reproduction. *Clin Chem Lab Med*. 2015 Jan;53(1):15-28.
200. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. Role of Leptin in Inflammation and Vice Versa. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 16;21(16):5887.
201. Hazel K, O'Connor A. Emerging treatments for inflammatory bowel disease. *Ther Adv Chronic Dis*. 2020 Feb 5;11:2040622319899297.
202. Desreumaux P, Ghosh S. Review article: mode of action and delivery of 5-aminosalicylic acid - new evidence. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Sep;24 Suppl 1:2-9.
203. Harbord M, Eliakim R, Bettenworth D, Karmiris K, Katsanos K, Kopylov U, i sur. European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO]. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management. *J Crohns Colitis*. 2017 Jul 1;11(7):769-784.. Erratum in: *J Crohns Colitis*. 2017 Dec 4;11(12):1512
204. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T, i sur. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment. *J Crohns Colitis*. 2020 Jan 1;14(1):4-22.
205. Katz JA. Treatment of inflammatory bowel disease with corticosteroids. *Gastroenterol Clin North Am*. 2004;33:171-189.

206. Schroll S, Sarlette A, Ahrens K, Manns MP, Goke M. Effects of azathioprine and its metabolites on repair mechanisms of the intestinal epithelium in vitro. *Regul Pept.* 2005;131:1–11.
207. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, i sur. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest.* 2003;111:1133–1145.
208. Pierik M, Rutgeerts P, Vlietinck R, Vermeire S. Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12:3657–3667
209. Jani N, Regueiro MD. Medical therapy for ulcerative colitis. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002;31:147–166.
210. Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, i sur. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2010;362(15):1383–95.
211. Jovani M, Danese S. Vedolizumab for the treatment of IBD: a selective therapeutic approach targeting pathogenic a4b7 cells. *Curr Drug Targets* 2013;14:1433-1443.
212. Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel JF, Sandborn WJ, i sur. GEMINI 1 Study Group. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2013 Aug 22;369(8):699-710.
213. Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel JF, Sands BE, i sur. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2013 Aug 22;369(8):711-21.
214. Sands BE, Marano C. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. Reply. *N Engl J Med.* 2020 Jan 2;382(1):91.
215. Sandborn WJ, Su C, Sands BE, D'Haens GR, Vermeire S, Schreiber S, i sur. OCTAVE Induction 1, OCTAVE Induction 2, and OCTAVE Sustain Investigators. Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med.* 2017 May 4;376(18):1723-1736.
216. Krznarić Ž, Vranešić Bender D, Ljubas Kelečić D, Tonkić A, Čuković-Čavka S, Mijandrušić-Sinčić B, i sur. Smjernice za kliničku prehranu kod upalnih bolesti crijeva. *Liječ Vjesn* 2018;140:106–119.
217. Weisshof R, Chermesh I. Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015 Nov;18(6):576-81.

218. Capristo E, Mingrone G, Addolorato G, Greco AV, Gasbarrini G. Metabolic features of inflammatory bowel disease in a remission phase of the disease activity. *J Intern Med.* 1998 May;243(5):339-47.
219. Rocha R, Santana GO, Almeida N, Lyra AC. Analysis of fat and muscle mass in patients with inflammatory bowel disease during remission and active phase. *Br J Nutr.* 2009 Mar;101(5):676-9.
220. Valentini L, Schaper L, Buning C, Hengstermann S, Koernicke T, Tillinger W, i sur. Malnutrition and impaired muscle strength in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis in remission. *Nutrition.* 2008 Jul-Aug;24(7-8):694-702.
221. Bryant RV, Trott MJ, Bartholomeusz FD, Andrews JM. Systematic review: body composition in adults with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013 Aug;38(3):213-25.
222. Flores A, Burstein E, Cipher DJ, Feagins LA. Obesity in Inflammatory Bowel Disease: A Marker of Less Severe Disease. *Dig Dis Sci.* 2015 Aug;60(8):2436-45.
223. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, i sur. European Working Group on Sarcopenia in Older People. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing.* 2010 Jul;39(4):412-23.
224. Weisshof R, Chermesh I. Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015 Nov;18(6):576-81.
225. Kondrup J, Allison SP, Elia M, Vellas B, Plauth M; Educational and Clinical Practice Committee, European Society of Parenteral and Enteral Nutrition (ESPEN). ESPEN guidelines for nutrition screening 2002. *Clin Nutr.* 2003 Aug;22(4):415-21.
226. Scaldaferri F, Pizzoferrato M, Lopetuso LR, Musca T, Ingravalle F, Sicignano LL, i sur. Nutrition and IBD: Malnutrition and/or Sarcopenia? A Practical Guide. *Gastroenterol Res Pract.* 2017;2017:8646495.
227. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Ishida O, Ikeda H, Tsuruta O, i sur. Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut.* 1995 Jan;36(1):45-9.

228. Gustot T, Lemmers A, Louis E, Nicaise C, Quertinmont E, Belaiche J, i sur. Profile of soluble cytokine receptors in Crohn's disease. *Gut*. 2005 Apr;54(4):488-95.
229. Wine E, Mack DR, Hyams J, Otley AR, Markowitz J, Crandall WV, i sur. Interleukin-6 is associated with steroid resistance and reflects disease activity in severe pediatric ulcerative colitis. *J Crohns Colitis*. 2013 Dec;7(11):916-22.
230. Mahida YR, Kurlac L, Gallagher A, Hawkey CJ. High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gut*. 1991 Dec;32(12):1531-4.
231. Hyams JS, Fitzgerald JE, Treem WR, Wyzga N, Kreutzer DL. Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1993 May;104(5):1285-92.
232. Reinisch W, Gasché C, Tillinger W, Wyatt J, Lichtenberger C, Willheim M, i sur. Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse. *Am J Gastroenterol*. 1999 Aug;94(8):2156-64.
233. Gustot T, Lemmers A, Louis E, Nicaise C, Quertinmont E, Belaiche J, i sur. Profile of soluble cytokine receptors in Crohn's disease. *Gut*. 2005 Apr;54(4):488-95.
234. Mavropoulou E, Mechie NC, Knoop R, Petzold G, Ellenrieder V, Kunsch S, i sur. Association of serum interleukin-6 and soluble interleukin-2-receptor levels with disease activity status in patients with inflammatory bowel disease: A prospective observational study. *PLoS One*. 2020 May 29;15(5):e0233811.
235. Takac B, Mihaljević S, Stefanić M, Glavas-Obrovac L, Kibel A, Samardzija M. Importance of interleukin 6 in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Coll Antropol*. 2014 Jun;38(2):659-64.
236. Caviglia GP, Rosso C, Stalla F, Rizzo M, Massano A, Abate ML, i sur. On-Treatment Decrease of Serum Interleukin-6 as a Predictor of Clinical Response to Biologic Therapy in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *J Clin Med*. 2020 Mar 15;9(3):800.
237. Mitsuyama K, Sata M, Tanikawa K. Significance of interleukin-6 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Jpn*. 1991 Feb;26(1):20-8.

238. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2005 Jun;28(3):187-96.
239. Komatsu M, Kobayashi D, Saito K, Furuya D, Yagihashi A, Araake H, i sur. Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clin Chem*. 2001;47(7):1297-301.
240. Peracchi M, Bardella MT, Caprioli F, Massironi S, Conte D, Valenti L, i sur. Circulating ghrelin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2006 Mar;55(3):432-3.
241. Eissa N, Ghia JE. Immunomodulatory effect of ghrelin in the intestinal mucosa. *Neurogastroenterol Motil*. 2015;27:1519–1527.
242. Ghomraoui FA, Alotaibi ST, Alharthi MA, Asiri SS, Almadi MA, Alharbi OR, i sur. Plasma ghrelin and leptin in patients with inflammatory bowel disease and its association with nutritional status. *Saudi J Gastroenterol*. 2017 May-Jun;23(3):199-205.
243. Karmiris K, Koutroubakis IE, Xidakis C, Polychronaki M, Voudouri T, Kouroumalis EA. Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:100–105.
244. Alexandridis E, Zisimopoulos A, Liratzopoulos N, Katsos I, Manolas K, Kouklakis G. Obestatin/ghrelin ratio: a new activity index in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Oct;15(10):1557-61.
245. Ates Y, Degertekin B, Erdil A, Yaman H, Dagalp K. Serum ghrelin levels in inflammatory bowel disease with relation to disease activity and nutritional status. *Dig Dis Sci*. 2008;53:2215–2221.
246. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, Okumura H, i sur. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation*. 2001 Oct 23;104(17):2034-8.
247. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, i sur. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med*. 2002 May 23;346(21):1623-30. doi: 10.1056/NEJMoa012908. PMID: 12023994.

248. Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Nakai Y, i sur. Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jan;90(1):6-9.
249. Kasacka I, Arciszewski M, Janiuk I, Lebkowski W. Comparative evaluation of gastric ghrelin cells and levels of hormone in the serum of healthy women and men. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2013 Jan-Mar; 27(1):69-78.
250. Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC. Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology.* 2006 Jan; 147(1):23-30.
251. Sung EZ, Da Silva NF, Goodyear S, McTernan PG, Sanger GJ, Nwokolo CU. Increased plasma ghrelin following infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009 Jan;29(1):83-9.
252. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Vazquez-Rodriguez TR, Gonzalez-Juanatey C, de Matias JM, i sur. Antitumour necrosis factor alpha therapy modulates ghrelin in patients with severe rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:1644–1646.
253. Biesiada G, Czepiel J, Ptak-Belowska A, Targosz A, Krzysiek-Maczka G, Strzalka M, i sur. Expression and release of leptin and proinflammatory cytokines in patients with ulcerative colitis and infectious diarrhea. *J. Physiol. Pharmacol.* 2012;63:471–481.
254. Tuzun A, Uygun A, Yesilova Z, Ozel AM, Erdil A, Yaman H, i sur. Leptin levels in the acute stage of ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004 Apr;19(4):429-32.
255. Kahraman R, Calhan T, Sahin A, Ozdil K, Caliskan Z, Bireller ES, i sur. Are adipocytokines inflammatory or metabolic mediators in patients with inflammatory bowel disease? *Ther Clin Risk Manag.* 2017 Sep 30;13:1295-1301.
256. Rodrigues VS, Milanski M, Fagundes JJ, Torsoni AS, Ayrisono ML, Nunez CE, i sur. Serum levels and mesenteric fat tissue expression of adiponectin and leptin in patients with Crohn's disease. *Clin Exp Immunol.* 2012 Dec;170(3):358-64.
257. Valentini L, Wirth EK, Schweizer U, Hengstermann S, Schaper L, Koernicke T, i sur. Circulating adipokines and the protective effects of

- hyperinsulinemia in inflammatory bowel disease. *Nutrition*. 2009 Feb;25(2):172-81.
258. Nishi Y, Isomoto H, Ueno H, Ohnita K, Wen CY, Takeshima F, i sur. Plasma leptin and ghrelin concentrations in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2005 Dec 14;11(46):7314-7.
259. Trejo-Vazquez F, Garza-Veloz I, Villela-Ramirez GA, Ortiz-Castro Y, Mauricio-Saucedo P, Cardenas-Vargas E, i sur. Positive association between leptin serum levels and disease activity on endoscopy in inflammatory bowel disease: A case-control study. *Exp Ther Med*. 2018 Apr;15(4):3336-3344.
260. Franchimont D, Roland S, Gustot T, Quertinmont E, Toubouti Y, Gervy MC, i sur. Impact of infliximab on serum leptin levels in patients with Crohn's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:3510–3516.
261. Waluga M, Hartleb M, Boryczka G, Kukla M, Zwirska-Korczala K. Serum adipokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20:6912–6917.
262. Aurangzeb B, Leach ST, Lemberg DA, Day AS. Assessment of nutritional status and serum leptin in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011 May;52(5):536-41.

11 ŽIVOTOPIS

Pristupnica je rođena u Zagrebu, gdje je završila srednju školu, V. gimnaziju. Godine 2003. upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, diplomirala je 2009. godine. Pripravnički staž obavljala je od 2009. do 2010. godine u Domu zdravlja Zagrebačke županije te je položila državni ispit. Od studenog 2010. do siječnja 2011. godine radila je u Hitnoj medicinskoj pomoći, u sklopu Doma zdravlja Vrbovec. Specijalizaciju iz interne medicine započela je u ožujku 2011. godine u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutrašnje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod mentorstvom prof. dr. sc. Željka Krznarića. Specijalistički ispit položila je u lipnju 2015. godine. Godine 2016. započela je subspecijalizaciju iz gastroenterologije i hepatologije pod mentorstvom prof. dr. sc. Željka Krznarića, a subspecijalistički ispit položila je u ožujku 2019. godine. U listopadu 2018. izabrana je u suradničko zvanje na radnom mjestu asistenta u kumulativnom radnom odnosu na Katedri za internu medicinu Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2010. upisala je poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te je položila sve propisane ispite. Sudjelovala je aktivno na više stručnih usavršavanja i znanstvenih skupova u inozemstvu i Hrvatskoj. Autor je nekoliko znanstvenih članaka te više znanstvenih i kongresnih sažetaka. Sudjeluje u više međunarodnih kliničkih ispitivanja kao glavni ispitivač ili podispitivač. Član je nekoliko domaćih i inozemnih stručnih društava.