CD83+ dendritične stanice u ulceroznom i Crohn kolitisu

Rošić Despalatović, Bruna

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:595253

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

BRUNA ROŠIĆ DESPALATOVIĆ

$CD83^+$ DENDRITIČNE STANICE U ULCEROZNOM I CROHN KOLITISU

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2021. godine

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

BRUNA ROŠIĆ DESPALATOVIĆ

$CD83^+$ DENDRITIČNE STANICE U ULCEROZNOM I CROHN KOLITISU

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2021. godine

Doktorska disertacija je izrađena u Poliklinici za internu medicinu J&J MEDICI i Zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Katarina Vilović, specijalist patolog

Zahvaljujem mentorici Katarini Vilović na vjeri, podršci i strpljenju.

Zahvaljujem kolegici Mariji Babić koja mi je nesebično pomagala u prikupljanju i unošenju podataka.

Zahvaljujem Jasminki Božiković, Jeleni Joki Gašpić, Mihajlu Lojpuru, Anti Tonkiću, mojim medicinskim sestrama Vinki, Milji, Nini i Ružici i tehničaru Ivanu na pomoći u ostvarivanju mojih ideja.

Zahvaljujem svom ocu, svojoj obitelji i prijateljima na nesebičnoj podršci.

I nakraju najiskrenije sam sretna što sam dijelila vrijeme s mojoj majkom i barba Mirom koji su uvijek od mene očekivali više.

POPIS OZNAKA I KRATICA

IBD	upalne bolesti crijeva, engl. ***I**nflamatory **B**owel **D**isease*
MHC	glavni kompleks tkivne podudarnosti, engl. ***M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex*
Th	T pomagački limfociti, engl. ***H**elper **T** cells*
CD	diferencijacijski biljeg, engl. ***C**luster of **D**ifferentiation*
TNF	faktor nekroze tumora, engl**. *T**umor **N**ecrosis **F**actor***
IL	interleukin, engl. ***I**nterleukin*
IFN	interferon, engl. ***Interferon***
HLA-DR	humani leukocitni antigen-DR, engl. ***H**uman **L**eukocyte **A**ntigen- **DR** isotype*
CCL	kemokinski ligand, engl. ***C**-C **C**hemokine **L**igand*
CCR	kemokinski receptor, engl. ***C**-C **C**hemokine Ligand **R**eceptor*
PAMP	molekularni obrasci povezani s patogenima, engl. ***P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**atterns*
PRR	receptori koji prepoznaju molekularne obrasce, engl. ***P**attern **R**ecognition **R**eceptors*
TLR	receptori slični Tollu, engl. ***T**oll- **L**ike **R**eceptor*
TGF β	transformirajući faktor rasta β, engl. ***T**ransforming **G**rowth **F**actor beta*
DNA	deoksiribonukleinska kiselina, engl. ***D**eoxyribo**n**ucleic **A**cid*
NOD	engl. ***N**ucleotid binding **O**ligomerisation **D**omain*
ATP	adenozin trifosfat, engl. ***A**denosine **Trip**hosphate*
CX3CR1	engl. *Chemokine receptor (**C-X3**-C Motif **C**hemokine **R**eceptor 1)*
TSLP	engl. ***T**hymic **S**tromal **Lymp**hopoietin*
RA	retinoična kiselina, engl. ***R**etinoic **A**cid*
MMP	matriks metaloproteinaza, engl. ***M**atrix **M**etalloproteinase*

MAdCAM1	engl. ***M**ucosal Vascular **Ad**dressin **C**ell **A**dhesion **M**olecule 1*
DC-SIGN	engl. ***D**endritic **C**ell-**S**pecific **I**ntercellular Adhesion Molecule-3-**G**rabbing **N**on-Integrin*
MIF	faktor inhibicije migracije makrofaga, engl. ***M**acrophage Migration **I**nhibitory **F**actor*
EBI-3	engl. ***E**pstein-**B**arr virus **I**nduced gene 3*
NKT	engl. ***N**atural **K**iller **T**-cells*
CARD	engl. ***Ca**spase **R**ecruitment **D**omain*
GWAS	engl. ***G**enome-Wide **A**ssociation **S**tudy*
NLR	receptori slični NOD-u, engl. ***NOD-L**ike **R**eceptors*
LRR	engl. ***L**eucin–rich **R**epeat-containg **P**rotein*
NF-kB	engl. ***N**uclear **F**actor **K**appa B*
MAP	protein aktiviran mitogenom, engl. ***M**itogen-**A**ctivated **P**rotein*
MDP	muramil dipeptid, engl. ***M**uramyl **Dip**eptide*
ATG16L1	engl. ***A**utophagy related 16 **L**ike 1*
IRGM	engl. ***I**mmunity-**R**elated **G**TPase family **M** protein*
UPR	engl. ***U**nfolded **P**rotein **R**esponse*
TNF SF	obitelj tumor-nekrotizirajućeg faktora, engl. ***T**umor **N**ecrosis **F**actor **S**uper**f**amily*
DR3	engl. ***D**eath **R**eceptor 3*
TL1A	engl. ***T**NF-like **L**igand 1A*
SNP	pojedinačni nukleotidni polimorfizam, engl. ***S**ingle-**N**ucleotide **P**olymorphism*
CLEC7A	engl. *C-type **L**ectin domain **C**ontaining 7A*
RNA	ribonukleinska kiselina, engl. ***R**ibo**n**ucleic **A**cid*
MES	engl. ***M**ayo **E**ndoscopic **S**core*

SES-CD	engl. ***S**imple **E**ndoscopic **S**core for **C**rohn **D**isease*
CDES	engl. ***C**rohn's **D**isease **E**ndoscopic **S**core*
ECCO	Europska organizacija za Crohn i kolitis, engl. ***E**uropean **C**rohn`s and **C**olitis **O**rganisation*
CRP	**C**-**r**eaktivni **p**rotein
RELB	engl. *V-Rel Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog B*

Sadržaj

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD ... 1

1.1. DENDRITIČNA STANICA ... 2

1.2. CRIJEVNA DENDRITIČNA STANICA ... 5

1.3. ULOGA DENDRITIČNE STANICE U EKSPERIMENTALNIM MODELIMA KOLITISA ... 7

1.4. DENDRITIČNA STANICA U UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA ... 9

1.5. FUNKCIJA DENTRITIČNE STANICE U PATOGENEZI UPALNIH BOLESTI CRIJEVA I GENETIČKA PODLOŽNOST ... 13

1.6. UTJECAJ MIKROBIOTE NA DENDRITIČNU STANICU ... 17

1.7. ENDOSKOPSKI INDEKSI U DIJAGNOSTICIRANJU ULCEROZNOG KOLITISA I CROHOVE BOLESTI ... 19

1.8. FEKALNI KALPROTEKTIN ... 21

1.9. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE PATOHISTOLOŠKOG NALAZA U UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA ... 22

1.9.1. OSOBITOSTI PATOHISTOLOŠKOG NALAZA U ULCEROZNOM KOLITISU ... 23

1.9.2. OSOBITOSTI PATOHISTOLOŠKOG NALAZA U CROHNOVOJ BOLESTI ... 25

1.10. TERAPIJSKI PRISTUP LIJEČENJU IBD-a ... 26

1.10.1. MOGUĆI TERAPIJSKI UTJECAJI NA DENDRITIČNU STANICU ... 29

2. CILJ ISTRAŽIVANJA ... 32

3. HIPOTEZA ... 34

4. ISPITANICI I METODE ... 36

4.1. ISPITANICI ... 37

4.1.1. DIJAGNOZA ULCEROZNOG KOLITISA I CROHNOVE BOLESTI ... 38

4.2. METODE ... 38

4.2.1. ENDOSKOPSKA PRETRAGA ... 38

4.2.2. FEKALNI KALPROTEKTIN ... 38

4.2.3. BIOPTIČKI UZORCI SLUZNICE DEBELOG CRIJEVA ... 39

4.2.3.1. Histološka analiza ... 39

4.2.3.2. Imunohistokemijska analiza ... 39

4.3. IZRAČUN VELIČINE UZORKA ... 40

4.4. STATISTIČKI TESTOVI ... 40

5. REZULTATI ... 41

5.1. ANALIZA SVIH ISPITANIKA ... 42

5.1.1. ANALIZA SVIH ISPITANIKA PREMA PHD NALAZU ... 48

5.1.2. UNIVARIJATNA I MULTIVARIJATNA ANALIZA SVIH ISPITANIKA PREMA POJAVNOSTI INTRAEPITELNE $CD83^{+}DS$ ... 50

5.2. ANALIZA ISPITANIKA S ULCEROZNIM KOLITISOM ... 54

5.2.1. ANALIZA ISPITANIKA S UC PREMA PHD NALAZU ... 54

5.2.1. ANALIZA ISPITANIKA S UC PREMA POJAVNOSTI INTRAEPITELNE $CD83^{+}DS$ ... 56

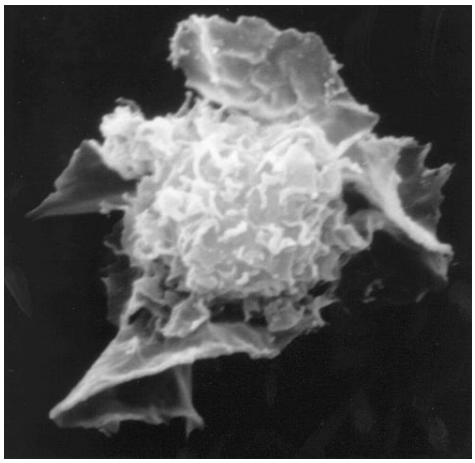
5.2.1. ANALIZA ISPITANIKA S UC PREMA PRIMJENJENOJ TERAPIJI I POJAVNOSTI INTRAEPITELNE CD83^{+}DS U ODNOSU NA KONTROLNU SKUPINU 60
5.3. ANALIZA ISPITANIKA S CROHNOVOM BOLEŠĆU 61
5.3.1. ANALIZA ISPITANIKA S CD PREMA PHD NALAZU 61
5.3.1. ANALIZA ISPITANIKA S CD PREMA BROJU INTRAEPITELNE CD83^{+}DS 63
5.3.1. ANALIZA ISPITANIKA S CD PREMA PRIMJENJENOJ TERAPIJI I BROJU INTRAEPITELNE CD83^{+}DS U ODNOSU NA KONTROLNU SKUPINU 67
6. DISKUSIJA 68
7. ZAKLJUČAK 75
8. SAŽETAK 78
9. ABSTRACT 80
10. LITERATURA 82
11. ŽIVOTOPIS 106

1. UVOD

Crohnova bolest (CD) i ulcerozni kolitis (UC) predstavljaju dva glavna fenotipa idiopatskih upalnih bolesti crijeva (IBD, engl. *Inflamatory bowel disease*) koje karakterizira kronična upala cijelog ili dijelova probavnog sustava. Oba fenotipa dijele sličan patofiziološki mehanizam i kliničku sliku. Etiopatogeneza ovih bolesti još uvijek nije do kraja razjašnjena (1). Zna se da genetska predispozicija uz mikrobiološke čimbenike u lumenu crijeva te čimbenike okoliša, uvjetuje početak bolesti (2, 3). Mehanizam početka i tijeka kronične upale regulira dendritična stanica crijeva (DS) (4). Ona stražari, „opipava“ i hvata intraluminalni antigen te ga transportira do limfatičnog tkiva (4). Stoga DS ima ulogu u održavanju ravnoteže imunološkog odgovora na luminalni antigen (4). Narušavanje ravnoteže između tolerabilnosti i aktivnog imunološkog odgovora ključni su u patogenezi IBD-a (5).

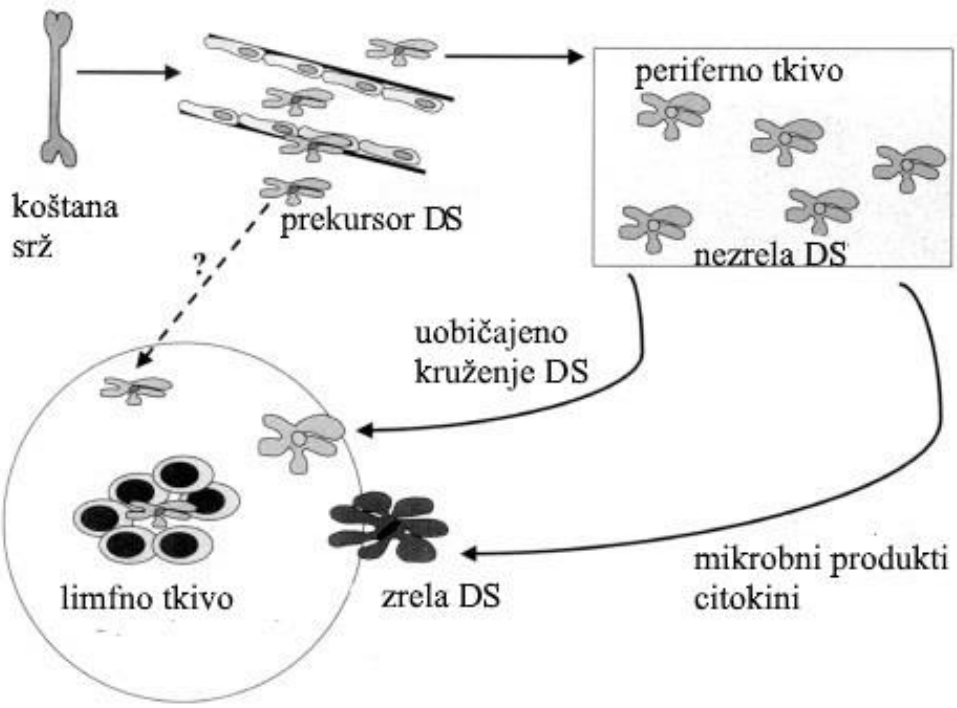
1.1. DENDRITIČNA STANICA

Od otkrića DS od strane Steinmana i Cohna 1973. godine pa sve do Steinmanova dobivanja Nobelove nagrade 2011. godine iz fiziologije za otkriće iste, naša saznanja o ovoj stanici i njenoj ulozi u imunološkom sustavu eksponencijalno rastu (Slika1) (6).



Slika 1. Elektronskomikroskopska slika humane DS (7).

DS pripada obitelji antigen prezentirajućih stanica koštane srži koja je sposobna potaknuti diferencijaciju T naivnih limfocita (8). DS predstavljaju kariku između prirođene i stečene imunosti te između osnovnih regulacijskih mehanizama u oba oblika imunosti (9). Većinom obitava u prostorima u kojima dolazi do kontakta između tijela i okoline (koža, sluznica respiratornog i probavnog sustava) neprekidno nadgledajući okolinu, hvatajući i procesuirajući strane i vlastite antigene (10, 11). Kao nezrela, DS prisutna je u svim vaskularnim prostorima (Slika 2) (7). U isto vrijeme, osim što uzorkuje antigen iz okoliša, ona reagira i na upalne citokine i unutarstanične spojeve iz tkivnog mikrookoliša. Zajedničko djelovanje svih ovih signala završava sazrijevanjem DS i pretvaranjem iz stanice koja uzorkuje antigen u stanicu koja ga prezentira (8). Procesom sazrijevanja DS gubi receptore za endocitozu i fagocitozu, a dodatnom regulacijom kostimulatornih molekula dolazi do pružanja dendrita što povećava površinu stanice (8). Izražava receptore za kemokine što potiče odlazak stanice u sekundarno limfatično tkivo (8). Na tom putu DS na svojoj površini izražava molekulu glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC, engl. *Major histocompatibility complex*) klase II (8). Dolaskom u sekundarno limfno tkivo ulazi u interakciju s T naivnim limfocitom (8). Potiče diferencijaciju i proliferaciju klona T limfocita s posebnim funkcijama. prvenstveno diferencijaciju i proliferaciju klona pomagačkih limfocita (Th, engl. *Helper T cell*) poznatih i kao $CD4^+$ stanice (12). Najviše potiče stvaranje Th1 i Th17 stanica koje sudjeluju u aktivnom imunološkom odgovoru. Aktivan imunološki odgovor potiču i tvari iz mikrookoliša kao što su faktor nekroze tumora-α (TNF-α, engl. *Tumor necrosis factor*), interleukin-1 (IL-1, engl. *Interleukin*) ili prepoznavanje intracelularnih spojeva kao što je urična kiselina (13 - 18). To sve za posljedicu ima privlačenje neutrofila i makrofaga te poticanje upale (8, 12). Uz citokine iz okoliša, kao što je interferon (*IFN,* engl. *Interferon*) ili mikrobicidalne enzime, kao što je nitrit-oksid sintetasa, DS potiče i diferencijaciju i proliferaciju regulatornih T limfocita (Treg) te se tako ostvaruje imunološka tolerancija (8, 11, 19, 20, 21, 22, 23).



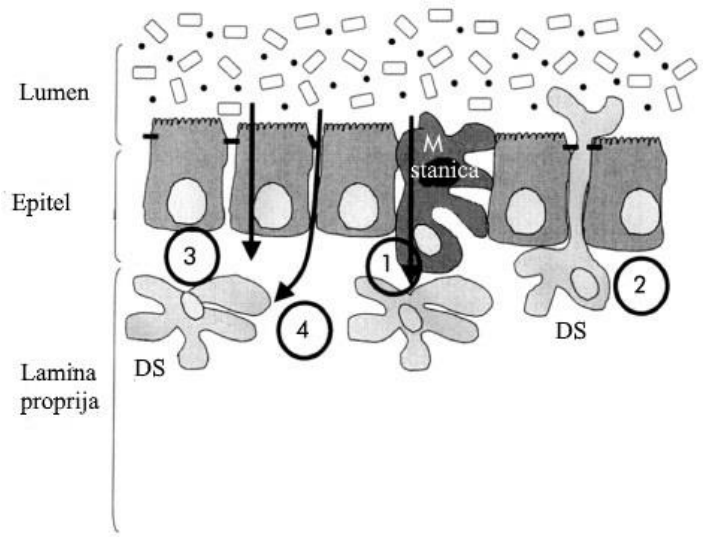
Slika 2. Preteča DS nastaje u koštanoj srži i putuje kroz perifernu krv do tkiva gdje kao nezrela stanica „opipava" okolinu. Neke DS potiču toleranciju, dok druge putuju u limfne čvorove i sazrijevaju u imunostimulatornu stanicu koja sudjeluje u imunološkom odgovoru (7).

Daljnja otkrića kompliciraju naizgled jednostavni proces sazrijevanja i funkcije DS. Nezrela DS boravi u perifernim tkivima te u primarnim i sekundarnim limfnim tkivima. Tako može procesuirati i sistemske, u krvi topljive antigene, te stanične, kako strane tako i vlastite antigene (23 - 25). Nije stacionarna stanica, ne čeka da bi bila aktivirana i da sazrije. DS putuje kroz nelimfna tkiva te primarna i sekundarna limfna tkiva kao nezrela ili dijelom aktivirana stanica, prezentirajući i vlastite antigene, vjerojatno od apoptotskih stanica, te sazrijeva (Slika 2) (7).

U ljudi i miševa je nađeno više različitih podvrsta DS (26, 27). Osim podjele DS na dvije osnovne subpopulacije, plazmacitoidne i konvencionalne DS, postoji bar još jedna podjela na dvije subpopulacijske linije po načinu funkcioniranja i tipu T limfocita koje aktivira (28). Čitav je spetkar različitih DS ovisno o trenutnoj funkciji, lokaciji, migraciji, aktivnom statusu i zrelosti (29).

1.2. CRIJEVNA DENDRITIČNA STANICA

DS je glavna populacija antigen prezentirajućih stanica u crijevima (29 - 31). To je oblikom nepravilna stanica koja izražava molekulu MHC klase II (8). U ljudi, DS je prisutna intraepitelno te u limfoidnim agregatima crijeva (32). Protočnom citometrijom u biopsijama kolona i rektuma identificirana je nezrela $HLA^{-}DR^{+}lin^{-}$ DS subpopulacije $CD11c^{+}$ koja maturacijom nakon uzgoja u kulturi stanica poprima fenotip $CD83^{+}$ zrele DS (33, 34). CD83 je protein, član superporodice Ig gena, koji je prvo identificiran u aktiviranim limfocitima, a potom u zrelim DS. CD83 se smatra važnim markerom za definiranje aktiviranih ljudskih DS (33, 34).



Slika 3. Prikaz načina uzorkovanja sadržaja u lumenu od strane DS: 1 - uzorkovanje antigena preko epitelne M stanice; 2 - uzorkovanje antigena direktno u lumenu; 3 - uzorkovanje antigena preko epitelne stanice; 4 - uzorkovanje antigena nakon oštećenja epitelne barijere (7).

Intraepitelna DS uzorkuje antigen u lumenu crijeva na više načina (Slika 3) (7, 35, 36). Može otvoriti čvrste spojeve između epitelnih stanica, slati „pipke„ u lumen i tako direktno uzorkovati antigen (36). Također, može uzorkovati materijal zaostao apoptozom epitelnih stanica i pristupiti antigenu kada je narušena cjelovitost epitelne barijere (7, 37, 38, 39). Nakon što uzorkuje antigen, odlazi do primarnog i sekundarnog limfnog tkiva crijeva (Peyerove ploče

tankog crijeva, limfatični folikuli kolona i mezenterični limfni čvorovi). Ova migracija je popraćena i potaknuta citokinskim receptorima za T zonu limfnog čvora kao što je CCR7. Pojačano izražavanje CCR6 u nezreloj DS suprimira aktivaciju, za razliku od pojačanog izražavanja CCR7 koji je potiče (7, 40, 41).

Citokini koji su odgovorni za migraciju DS u laminu propiju u pripravnom nezrelom stanju još uvijek nisu do kraja istraženi. Najviše je prihvaćen patofiziološki model prema kojem nezrela DS kontinuirano ulazi između epitelnih stanica sluznice crijeva, u Peyerove ploče tankog crijeva i limfne folikule kolona. Postaje zrelija i smješta se u različitim dijelovima sluznice kolona što je prikazano u istraživanjima IBD-a u ljudi i miševa (42, 43). Migracija „spremne“, DS može stimulirati diferencijaciju i proliferaciju T stanica s posebnim funkcijama (9).

Utjecaj na DS imaju imunološke i neimunološke stanice (12). U tankom crijevu epitelne stanice izražavaju kemokinski receptor CCR9 i CCR10 (engl. *C-C Chemokine ligand* r*receptor)* za ligand CCL25 (engl. *C-C Chemokine ligand*), što je potencijalni citokin u tankom crijevu, te kemokinski receptor CCR3 i CCR10 za ligand CCL28 koji je citokin u debelom crijevu (40, 42, 44). Tijekom upale, epitelne stanice produciraju veliki broj upalnih citokina (CCL20/CCR6, CCL2/CCR2, CCL5/CCR5 ili CCR1, CXCL-12/CXCR4) koji mogu djelovati na DS (40, 45, 46). Povišena razina CCL20 je nađena u epitelu upalno promijenjene sluznice ljudskog kolona (47). Zbog toga, nezrela DS može biti privučena u sluznicu i tamo aktivirana.

Osim direktnog uzorkovanja antigena, funkcijom DS upravlja i tkivni mikrookoliš (12). Funkcionalne studije o crijevnoj DS u ljudi i životinja potvrđuju da je ova stanica induktor miješane limfoidne reakcije (30, 31, 48). U prirođenom imunološkom odgovoru početni susret patogena sa staničnim komponentama mukozne barijere uključuje aktivaciju epitelnih i makrofagnih receptora PPR (engl. *Pattern recognition receptors*) koji prepoznaju klasu molekula PAMP (engl. *Pathogen-associated molecular patterns*). U PPR spadaju receptori

slični Toll-u, (TLR, engl. *Toll- like receptor*) (13, 49, 50, 51). TLR signalni put epitelnih stanica rezultira stvaranjem upalnih citokina i kemokina kao što su IL-1, IL-8, IL-6, TNFα, CCL5 i CCL20 koji nakupljaju i aktiviraju neutrofile, makrofage i DS. Uz ovaj posrednički put, DS mogu direktno aktivirati patogeni aktivacijom TLR i drugih površinskih receptora (52).

Osim toga, intestinalne stromalne stanice stvaraju supresivni okoliš koji potiče DS na usmjeravanje diferencijacije i proliferaciju naivnog Th limfocita u Treg limfocit (9). Smatra se da su DS prvenstveno regulirane citokemijskim mehanizmom uključujući transformirajući faktor rasta β (TGFβ, engl. *Transforming growth factor beta*), IL-10 i moguće IL-4 stvoren iz subpopulacije Th limfocita (53 - 55). Subpopulacija DS koja sudjeluje u ovim procesima još uvijek nije definirana.

Kada intraluminalni antigeni pokrenu aktivni lokalni i sistemski imunološki odgovor, dolazi do potpune aktivacije DS koja na putu do sekundarnog limfnog tkiva izražava MHC kompleks, koji omogućava vezivanje na receptor TLR te stvaranje TLR kompleksa koji pokreće signalnu kaskadu (12). To ima za posljedicu aktivaciju gena koji upravlja diferencijacijom i proliferacijom određenog fenotipa naivnog T limfocita. Signali koje DS primi direktno od antigena, tkivni signali na mjestu susreta, utjecaj neimunoloških i imunoloških stanica aktivirat će određenu subpopulaciju DS koja onda određuje i vrstu odgovora na patogen bilo toleranciju ili aktivni obrambeni odgovor (17, 18, 28, 56).

1.3. ULOGA DENDRITIČNE STANICE U EKSPERIMENTALNIM MODELIMA KOLITISA

U različitim mišjim modelima crijevne upale nalik IBD-u nađena je moguća patogena uloga DS u uspostavljanju i održavanju kolitisa. U modelu kolitisa koji uključuje prijenos $CD45RBhiCD4^+$ T stanica od imunodostatnih miševa na imunodeficijentne miševe SCID (engl. *severe immunodeficiency genetic disorder*), veći broj $CD11c^+$ DS izražava aktivacijski

membranski protein OX40 u mezenteričnim limfnim čvorovima i formira agregate $CD11c^+$ DS u mukozi crijeva (57, 58). Blokiranje OX40-OX40L interakcije prevenira nastanak kolitisa (59).

DS također ima patogenu ulogu u modelu kolitisa s T-nezavisnim stanicama. Aktivacija DS preko kostimulatorne molekule CD40 uzrokuje upalu crijeva u odsutnosti B i T stanica putem otpuštanja upalnih citokina, uključujući IL-23 i IL-12 (60).

Neki eksperimentalni modeli ukazuju na zaštitnu ulogu DS tijekom iniciranja kolitisa. $CD103^+$ DS potrebne su za suzbijanje T stanica koje potiču kolitis, a glavnu ulogu ima sposobnost induciranja diferencijacije Treg limfocita. Nakupine DS i Treg limfocita su opisane u mukozi kolona miševa u smirivanju aktivnosti kolitisa (61). Miševi koji nemaju integrin αvβ8 na DS imaju smanjeni broj Treg limfocita u debelom crijevu i razvijaju kolitis (62). Osim toga, diferencijacija i proliferacija Treg limfocita se događa kroz antigen-specifičnu interakciju enterocit-T stanica, što ukazuje da višu razinu kontrole vrši intestinalna epitelna stanica (63).

U transgeničnih miševa tg-DTR koji imaju receptor za toksin difterije, smanjenje broja DS uzrokovano davanjem ovog toksina dovest će do ublažavanja kolitisa ako se primjeni natrijev dekstran-sulfat, koji inače uzrokuje akutni oblik kolitisa. Ako su miševi prije davanja natrijev-dekstran sulfata bili tretirani imunostimulirajućim sekvencama DNA, prisutnost DS je zaštitna, dijelom i zbog toga što oslobađanje IFN-1 regulira neutrofile i monocite te njihove upalne procese u upaljenom debelom crijevu. Ako se DS uništi ablacijom prije liječenja kolitisa uzrokovanog natrijev-dekstran sulfatom, kolitis se pogoršava. Rezultati ovog istraživanja upućuju na mogućnost da DS imaju zaštitnu ulogu u početnim fazama kolitisa, a patogenu u kasnijem u tijeku bolesti (64).

Uključenost DS u kasnije faze razvoja kolitisa može biti uzrokovana aktivacijom aberantnih rezidentnih DS. DS koje nisu bile izložene lokalnom tolerogenom mikrookolišu postaju imunogene ili nastaje neravnoteža između tolerogenih i imunogenih DS (65).

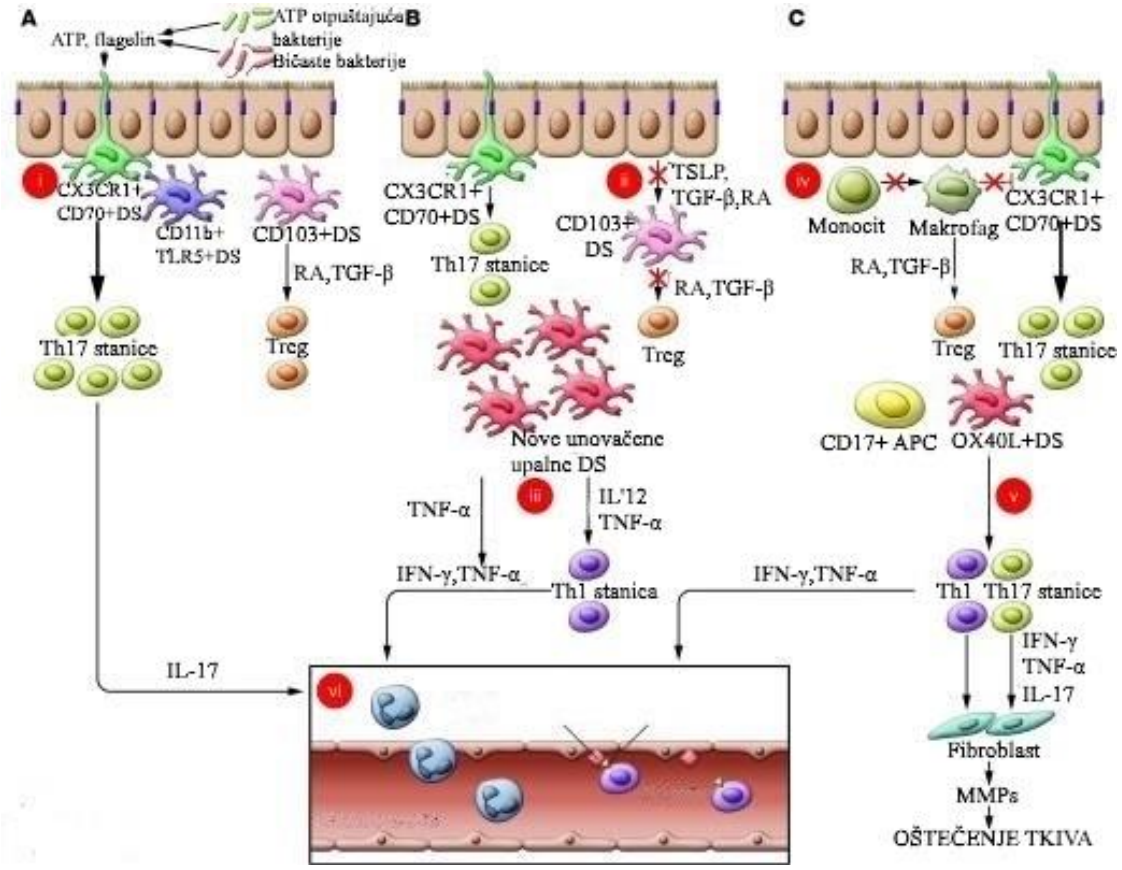
Analiza fenotipa DS u mišjem modelu pokazala je povećanje broja zrelih DS koje izražavaju kostimulatorne molekule CD40, CD80, i CD86 i povećanje količine IL-12p40 i IL-23p19. Zajedno, IL-12p40 i IL-23p19 oblik IL-23, važni su za rast i stabilizaciju Th17 stanice u miša i njihovu diferencijaciju u ljudi (66, 67). U transgeničnih miševa pod kontrolom promotora IL-12p40, $CD8\alpha^{-}CD11^{-}CD11c^{+}$DS nalaze se u terminalnom ileumu i stanični su izvor proteina p40 koji dovodi do povećane lokalne razine IL-23 (68). Interleukini IL-23/IL-17 uključeni su u nekoliko modela eksperimentalnog kolitisa (69). Indukcija IL-23 posredovana receptorom TLR pojačava ekspresiju gena NOD2 (engl. *Nucleotid binding oligomerisation domain*), što rezultira time da DS potiče oslobađanje IL-17 od strane T-stanica. Mutacije gena NOD2 su opisane kao predisponirajući faktor za CD u ljudi (70).

Dakle, brojni eksperimentalni modeli kolitisa ukazuju na ključnu ulogu crijevnih DS bilo u indukciji Treg ili razvoju Th17 stanica, a što ovisi o aktivaciji različitih podskupina DS. Vrlo je vjerojatno da promijenjena regulacija broja ili funkcije podvrsta DS, bilo od intrinzične DS ili ekstrinzično zbog nedostatka imunomodulatornih signala iz mikrookoliša, može rezultirati neuravnoteženim imunološkim odgovorom i poremećajem crijevne homeostaze (71).

1.4. DENDRITIČNA STANICA U UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA

CD i UC su kronične upalne bolesti gastrointestinalnog trakta. Imunopatologija IBD-a je neprikladan i pretjeran imunološki odgovor na sastav crijevne flore u genetski predisponiranih osoba (57). DS ima ulogu u patogenezi ovih bolesti u ljudi, ali je točan mehanizam djelovanja DS i njenih subpopulacija i dalje nepoznat. Bolje razumijevanje uloge DS u patogenezi IBD-a doprinijelo bi boljem razumijevanju mehanizama koji dovode do ovih bolesti, ali i informacije o čimbenicima koji ograničavanju upalu crijeva i imaju zaštitnu ulogu.

Funkciju mukozne DS i njenih subpopulacija regulira lokalni mikrookoliš koji uključuje imunološke stanice, neimunološke stanice i luminalne bakterije. Svi ovi čimbenici sudjeluju u očuvanju crijevne homeostaze (Slika 4) (71).



Slika 4. Prikaz mehanizama utjecaja DS u nastanku IBD-a: A - direktno djelovanje intraluminalnog antigena; B - utjecaj tkivnog mikrookoliša; C - utjecaj drugih imunoloških stanica (71).

U patogenezi IBD do sada su poznata tri moguća mehanizma u kojima sudjeluje DS. Oni dovode do neravnoteže u između Th17/Th1 i Treg limfocita. Prvi mehanizam uključuje direktno djelovanje intraluminarnog antigena (mikrobiota). Neočekivano povećanje broja bakterija koje otpuštaju adenozin trifosfat (ATP, engl. *Adenosine triphosphate*) ili imaju flagelin može dovesti do aktivacije $CX3CR1^{+}CD70^{+}DS$ koje favoriziraju diferencijaciju i proliferaciju Th17 limfocita (Slika 4A) (71). Drugi mehanizam uključuje lokalni tkivni

mikrookoliš. Defekt u oslobađanju imunomodulatornih faktora npr. TGF-β i retinoične kiseline (RA) od strane crijevne epitelne stanice može dovesti do smanjenja broja Treg limfocita što je posljedica neuspjele aktivacije tolerogenih $CD103^{+}$DS. Lokalna upala može dovesti do regrutacije subpopulacije upalnih DS oslobađajući IL-12 i TNF-α. Upalne DS upravljaju diferencijacijom Th1 limfocita uz pomoć IFN-ɤ i TNF-α (Slika 4B) (71). Treći mehanizam uključuje imunološku stanicu. Upala može utjecati na diferencijaciju tolerogenih makrofaga iz regrutiranih monocita, što uzrokuje smanjenu diferencijaciju i proliferaciju Treg limfocita. To dovodi do nemogućnosti kontroliranja aktivnosti $CX3CR1^{+}CD70^{+}$DS i Th17 ili do snažne restimulacije Thl limfocita pomoću $CD70^{+}$DS ili $OX40L^{+}$ DS (Slika 4C) (71). Opisani mehanizmi mogu sudjelovati u indukciji bolesti generiranjem neravnoteže između Treg i Thl ili Th17 limfocita. Thl/Th17 stanice oslobađaju IFN-ɤ, TNF-α, ili IL-17, što doprinosi destrukciji tkiva kroz oslobađanje enzima matriks metaloproteinaze (MMP, engl. *Matrix MetalloProteinase*) iz aktiviranih fibroblasta i regrutiranih neutrofila. Endotelnu ekspresiju molekule MAdCAM-1 (engl. *Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule*) još dodatno mogu povećati sami Th1 limfociti i TNF iz DS čime se favorizira regrutiranje $\alpha4\beta7^{+}$ Thl limfocita. Gubitak regulacije na bilo kojoj od opisanih razina može utjecati na funkciju DS i izazvati IBD (71).

Disfunkcionalne DS u sekundarnom limfnom tkivu posreduju nepravilan T-stanični odgovor na crijevnu floru tako što održavaju reaktivnost T limfocita u upalno promijenjenoj sluznici kroz međudjelovanje s T stanicama ili putem oslobađanja proupalnih citokina (126). Nadalje, neravnoteža između Th17 limfocita u odnosu na Treg-inducirajuću subpopulaciju DS dovodi do favoriziranja diferencijacije i proliferacije Th17 limfocita i tako produžuje upalnu reakciju (71).

U bolesnika sa IBD-om DS se nakupljaju na mjestima upale. To je posljedica izražavanja mukoznih kemokina kao što su CCL20 ili MAdCAM-1 (72 - 76). DS imaju i

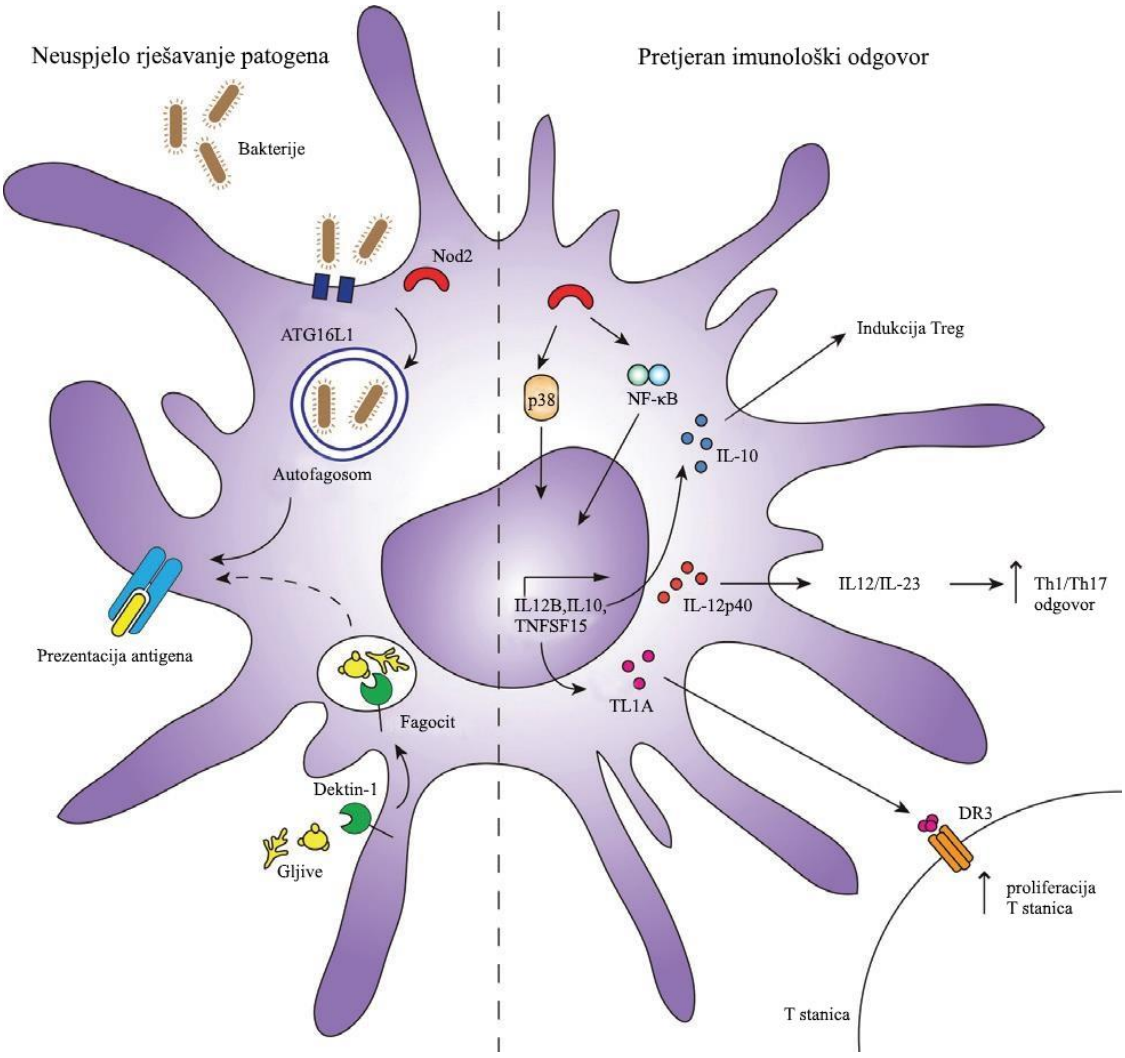
receptore za molekule CCR6 i integrin $\alpha_4\beta_7$ koje se izražavaju u crijevu (47,77). Povećanu aktivaciju DS u crijevima nadopunjuje i dokaz da je broj plazmocitoidnih i mijeloidnih DS u perifernoj krvi bolesnika s aktivnim IBD snižen (77). Imunohistokemijskim bojenjima crijevnih lezija u bolesnika s CD uočilo se da su $CD83^+$DS raspoređene kao pojedinačne stanice u lamini propriji i u nakupinama u limfoidnom tkivu, dok su stanice DC-$SIGN^+$ (engl. *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-Grabbing non-integrin*) ravnomjerno raspoređene kroz cijelu mukozu (33). Zrele $CD83^+$DS mogu producirati IL12 i IL18 tijekom upale u CD (33). Istraživanja su pokazala pojačano izražavanje TLR2, TLR4, te CD40 u DS izoliranoj iz upalno promijenjene sluznice (73). Osim toga, zrele mijeloidne DS, regrutirane kao posljedica prekomjernog izražavanja limfoidnih kemokina, oblikuju nakupine s T limfocitima u području zahvaćenog dijela debelog crijeva (78).

Iako je uloga DS u bolesnika s UC manje istražena, postoje neki dokazi koji podupiru njihovu patogenu ulogu u ovoj bolesti. Brojni bazalni agregati limfocita i $CD80^+$ dendritiformnih stanica nalik aktiviranoj DS prisutni su u mukozi kolona kod pacijenata s UC (79). Dokazano je i povećanje sluzničkih $CD83^+$DS i $CD86^+$DS koji proizvode čimbenik inhibicije migracije makrofaga (MIF, engl. *Macrophage migration inhibitory factor*), za koji se smatra da doprinosi novačenju i aktivaciji neutrofila u UC (80). Osim toga, DS koje su nastale iz perifernih monocita u bolesnika s ulceroznim kolitisom su sposobne povećati imunostimulirajuće djelovanje u sluznici (81). Poznato je da DS može biti izvor IL-27 i IL-12-vezanog citokina za kojeg se pretpostavlja da je uključen u patogenezu UC (81). U bioptičkim uzorcima kolona bolesnika s UC nađena je povećanja ekspresija proteina EBI3 (engl. *Epstein-Barr virus induced gene 3*), koji kodira proizvodnju podjedinice IL12 (82). U mišjem modelu za UC ovisom o NKT stanicama (engl. *Natural killer T-cells*) jedinke koje nemaju NKT stanica ili ne mogu prezentirati antigen NKT stanicama otporne su na kolitis uzrokovan oksazolonom. Takve jedinke imaju i dodatno smanjenu proizvodnju IL3(83).

1.5. FUNKCIJA DENTRITIČNE STANICE U PATOGENEZI UPALNIH BOLESTI CRIJEVA I GENETIČKA PODLOŽNOST

Genetička podložnost za IBD ima važnu ulogu u funkciji DS i patogenezi IBD-a. Prvi protein imunološkog sustava povezan s IBD je CARD15 *(*engl. *Caspase recruitment domain-containing protein 15*), poznat i kao NOD2 ili IBD1 (engl. *inflammatory bowel disease protein 1*), a identificiran je 2001. godine u bolesnika s CD. NOD2 je intracelularni receptor koji ima ulogu u imunološkoj reakciji i prepoznavanju bakterijskih molekula (56, 84). Tijekom godina, zahvaljujući studiji GWAS (engl. *Genome-wide association study*) ogroman napredak je ostvaren u otkrivaju genskog polimorfizma povezanog s osjetljivošću na UC ili CD. Trenutno postoji više od 160 genskih lokusa za IBD, kako zajedničkih tako i pojedinačnih. To sugerira da postoje zajednički i različiti mehanizmi u patogenezi UC i CD (85). Iako je funkcija brojnih lokusa ili određenog pojedinačnog nukleotidnog polimorfizma tek dijelom razjašnjena, većina ovih gena povezana je s raznim aspektima imunosti sluznice, uključujući i imunološki odgovor na mikrobni patogen (85). Od svih je najbolje objašnjena mutacija gena NOD2. Važnost prepoznavanja mikrobiote i odgovor urođenog imunološkog sustava prepoznata je u Crohnovoj bolesti. Protein NOD2 je član obitelji međustaničnih receptora za prepoznavanje molekula patogena (PRR, engl. *Pattern recognition receptors*) (86, 87). Ova povezanost uključuje tri NOD2 polimorfizma koji se javljaju s najvećom učestalošću u pojedinaca europskog podrijetla. Približno 30% pacijenata europskog podrijetla ima jednu ili više mutacija. Ovi pacijenti imaju povećan rizik za nastanak Crohnove bolesti fibrostenozirajućeg tipa i ilealne lokalizacije (88, 89). NOD2 je izražen u različitim imunološkim i neimunološkim tipovima stanica, što uključuje i DS (90). U bolesnika s Crohnovom bolesti nađene su mutacije u području regije gena NOD2 s ponavljajućim sljedovima leucina, što dovodi do izmijenjenog prepoznavanja bakterijskog PAMP-a (91, 92). Crijevni trakt je kontinuirano izložen bakterijama i kronična aktivacija NOD2 signalnog puta trebala bi rezultirati manjom osjetljivošću imunih stanica na

pojedinu stimulaciju ligandima za NOD2 ili TLR (93, 94). Također, mehanizmi posredovani proteinom NOD2 smanjuju produkciju proupalnih citokina tijekom izlaganja komenzalnim bakterijama. Ovaj mehanizam kod bolesnika s CD koji imaju polimorfizam gena NOD nije funkcionalan (94). Hipoteza je da protein NOD2 djeluje na signalni put receptora TLR, što rezultira smanjenom aktivnošću proteinskog kompleksa NF-kB (engl. *Nuclear factor kappa B*), pa se time spriječava prekomjerna aktivacija DS i posljedični patogeni odgovor T-stanica (Slika 5) (95, 96).



Slika 5. Utjecaj polimorfizma gena na funkciju DS; polimorfizam genskih lokusa ATG16L1 i/ili NOD2, polimorfizama genskih lokusa IL23R/IL12B, polimorfizam genskih lokusa TNFSF15, polimorfizam genskih lokusa IL10 (96).

Od nedavno je poznata interakcija proteina NOD2 i autofagocitoze (97, 98). Autofagocitoza je proces kojim se citoplazmatske komponente izdvajaju u vakuole s dvostrukom membranom i spajaju s lizosomom (99). U ljudskim DS autofagocitoza je inducirana preko proteina NOD2. Također, gen ATG16L1 (engl. ***A**utophagy related 16 **l**ike 1*) kodira protein koji je dio kompleksa nužnog za proces autofagocitoze (96). Polimorfizam gena ATG16L1 povezan je sa povećanim rizikom od Crohnove bolesti (100). DS bolesnika s Crohnovom bolešću koji imaju polimorfizam gena ATG16L1 i/ili NOD2, imaju izmijenjenu prezentaciju antigena i neispravnu indukciju autofagocitoze (Slika 5) (96, 97).

Polimorfizam još jednog promotora autofagocitoze, gena IRGM (engl. *Immunity-related GTPase family M protein*) je također povezan s povećanim rizikom od razvoja CD (101).

Studije GWAS su pokazale povezanost polimorfizama genskih lokusa IL23R i IL12B s Crohnovom bolešću i ulceroznim kolitisom. Navedeni geni kodiraju proteinske komponente IL-12 i IL- 23 (102). Poznato je da IL-23 inducira DS i preko signalnog puta za prepoznavanje molekula patogena može potaknuti širok raspon patoloških odgovora u crijevu. Takav odgovor može biti posredovan putem T-stanice ili prekomjernom aktivacijom urođenog imunog odgovora (Slika 5) (96). Proizvodnja IL-23 u DS se povećava u endoplazmatskom retikularnom stresu pri staničnom odgovoru na stres (UPR engl. *Unfolded protein response*) i važna je komponenta antimikrobne obrane koja povezivanje urođeni i stečeni imunološki odgovor (103). Takva prekomjerna ili neprikladna proizvodnja IL-23 u DS potiče proupalni odgovor T-stanice, uključujući proliferaciju izvršnih T-stanica, smanjuje diferencijaciju Treg stanica i pojavljuju se stanice koje proizvode IL-17 i IFN-ɤ što je povezano s kroničnom upalom crijeva (104).

Također, polimorfizam gena TNFSF15 (engl. *Tumor necrosis factor superfamily*) dokazano sudjeluje u riziku za UC i Crohnovu bolesti. Aktivirane DS izražavaju protein TL1A (engl. *TNF-like ligand 1A*) koji je citokin iz obitelji TNF i koji djeluje preko receptora DR3

(engl. *Death receptor 3*) na staničnoj membrani limfocita (Slika 5) (96). U tkivu bolesnika s Crohnovom bolešću nađena je povećana produkcija proteina TL1A, a antitijela na TL1A sprječavaju razvoj kolitisa (105). Osim toga, u mišjim modelima s povećanim izražajem gena TL1A, jedinke spontano razviju upalu crijeva (106, 107).

Uloga IL-10 u patogenezi upalnih bolesti crijeva prvi put je identificirana u mišjim modelima u kojima nedostaje IL-10 ili receptor za IL-10. Ovi miševi razviju spontani kolitis (108). U novije vrijeme, istraživanja u ljudi potvrđuju povezanost između nedostatka IL-10 ili receptora za IL-10 i vrlo ranog početaka IBD-a (109). U pacijenata s mutacijom gena za IL-10 ili receptor IL10, a koja dovodi do potpunog gubitka funkcije ovih proteina, dolazi do teškog i progresivnog kolitisa uz kompliciranu perianalnu bolest u prva 3 mjeseca života (109). Na sreću ove mutacije su rijetkost. Također, pojedinačni nukleotidni polimorfizam (SNP, engl. *Single-nucleotide polymorphism*) gena IL-10 je povezan s nastankom ulceroznog kolitisa i CD u djece i odraslih (110). IL-10 luče razni tipovi imunoloških stanica uključujući DS i on ima važnu protuupalnu ulogu kroz interakcije sa regulacijskim T-stanicama, što dovodi do inhibicije odgovora T-stanica (111). Ovaj učinak IL-10 na T stanicu posredovan je prvenstveno stanicama koje predstavljaju antigen kao što su DS i makrofagi (112).

Teški ulcerozni kolitis koji ne odgovara na medikamentoznu terapiju i zahtjeva kolektomiju je povezan s polimorfizmom gena CLEC7A (engl. *C-type lectin domain containing 7A*). Gen kodira receptor na DS i makrofagima koji prepoznaje beta -1,3 –glukan, sastojak gljivične stanične stijenke, pa je nedostatak ovog proteina povezan s povećanom osjetljivošću na gljivične bolesti u ljudi i miševa. Mehanizmi djelovanja i povezanost s patogenezom upalnih bolesti crijeva još uvijek nisu poznati (113).

1.6. UTJECAJ MIKROBIOTE NA DENDRITIČNU STANICU

Crijevnu mikrobiotu čine mikroorganizmi koji uključuju bakterije, arheje, viruse i gljivice koji žive u crijevima čovjeka. Ljudski probavni sustav sadrži 10^{14} bakterija različitih sojeva i koncentracija ovisno o lokalizaciji duž čitavog probavnog sustava (114). Ta crijevna mikrobiota je evoluirala skupa s domaćinom putem simbioze. Ona je svakodnevno prepoznata od strane imunološkog sustava crijeva, prvenstveno DS (114). Istraživanja pokazuju važnost sudjelovanja crijevne mikrobiote u fiziologiji crijeva i ljudskom zdravlju (114). Nakon bakterijske kolonizacije u dojenčadi, crijevni mikrobni sastav jedinstven je za svakog pojedinca, ali se više od 95% mikrobiote može podijeliti 4 velike podvrste (114 - 116). Osim biološke raznolikosti, glavne karakteristike crijevne mikrobiote su stabilnost i otpornost. Odnos domaćina i mikrobiote olakšava sloj crijevne sluzi koja predstavlja fizičku barijeru, smanjuje aktivaciju imunološkog sustava i njegov direktni utjecaj na mikrobitu. (115, 116).

Godine 2007. Američki nacionalni institut za zdravlje započeo je „*Human Microbiome Project*“ s ciljem identificiranja svih mikroorganizama s 5 različitih područja ljudskog tijela: usta, nosa, spolnih organa, crijeva i kože. Zahvaljujući projektu dobiven je prikaz crijevnog mikrobnog sastava i opis kombiniranih genoma mikroorganizama prisutnih u crijevima. Ukupni mikrobni metagenom svakog pojedinaca 150 puta nadmašuje veličinu ljudskog genoma. Osim funkcionalne jezgre, ljudsko crijevo sadrži važnu raznolikost i visok broj neponavljajućih bakterijskih gena (114). Taj je broj značajno smanjen u upalnim bolestima crijeva (114). Bolje razumijevanje dinamike mikrobiote ljudskog crijeva i interakcije mikrobi-domaćin omogućit će novi uvid u patofiziologiju crijevnih bolesti. To će dovesti do indentificiranja biomarkera, razvoja novih probiotika/prebiotika i nove terapije. U patološkim stanjima dolazi do disbioze, neravnoteže u crijevnom mikrobitnom sastavu, koja se vidi u ukupnoj raznolikosti (114).

Kod bolesnika s upalnom bolešću crijeva uz pomoć metode 16S rRNA sekvenciranja dobiveni su podatci o mikrobioti. Ove studije pokazuju da je kod bolesnika s Crohnovom

bolešću i ulceroznim kolitisom osiromašena mikrobiota, posebno *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Promjena je obično manja u bolesnika s Crohnovom bolešću, nego u onih s ulceroznim kolitisom, ali obje bolesti mikrobiota je siromašnija nego u zdravih pojedinaca (117, 118). Čak i unutar crijeva istog pacijenta, bakterijska raznolikost smanjena je u upalnim područjima u odnosu na područja koja nisu zahvaćena upalom (118). Ti podaci ukazuju da kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva domaćinov upalni odgovor nije samo pridonio gubitku raznolikosti, već on omogućava selektivnu prisutnost i prednost pojedinih podskupinama mikrobiota (119).

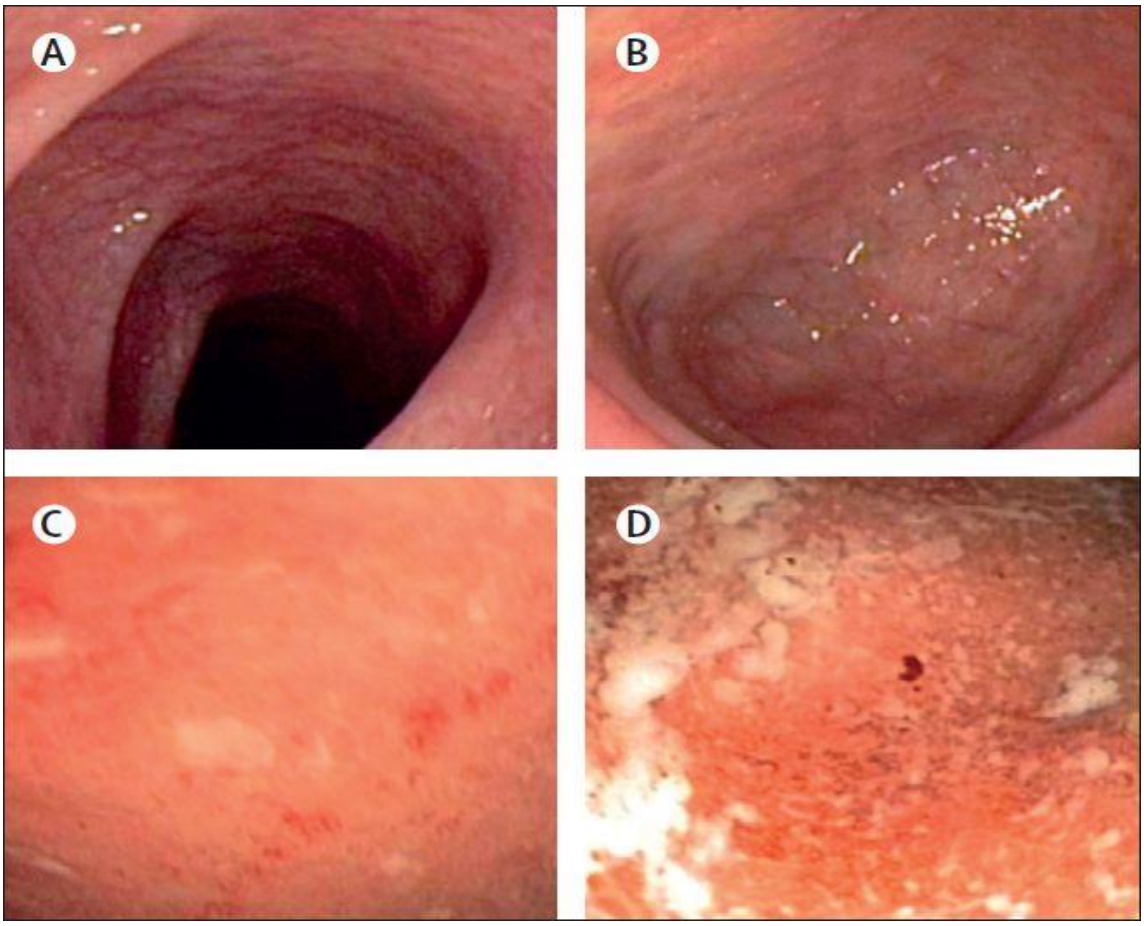
Ulogu mikrobiote u patogenezi IBD-a podržavaju studije koje pokazuju da je za endoskopsku i histološku manifestaciju bolesti potrebna izloženost fecesu i da fekalna transplantacija može imati terapijsku korist (120, 121). Osim toga, terapija antibioticima pokazala je djelotvornost u kliničkim ispitivanjima, pretežno simptomatsko poboljšanje, no kod nekih studija i endoskopsko poboljšanje te indukciju remisije, ovisno o dizajnu ispitivanja (122). Eksperimentalani modeli kolitisa podržavaju tvrdnju da je mikrobiota ključna komponenta u patogenezi bolest, jer kao i u većini mišjih IBD modela, neophodna je prisutnost crijevne mikrobiote da bi se kolitis razvio (123).

Crijevna flora igra važnu ulogu u razvoju crijevne imune stanice uključujući DS. DS prave razliku između patogenih i nepatogenih bakterija pomoću PRR-a koji prepoznaje specifične molekularne uzorke patogena. To uključuje TLR i C-tip lektina kao što su manoza receptori i ne-integrinski hvatači na $SIGN^{+}$DS (124). Mikrobni može određivati sposobnost zrele DS da upravlja diferencijacijom i proliferacijom T-stanica (125,126). To čini DS ključnim čimbenikom u određivanju aktivnog ili tolerantnog imunološkog odgovora na površini sluznice, kao odgovor na specifični mikrobiot (20).

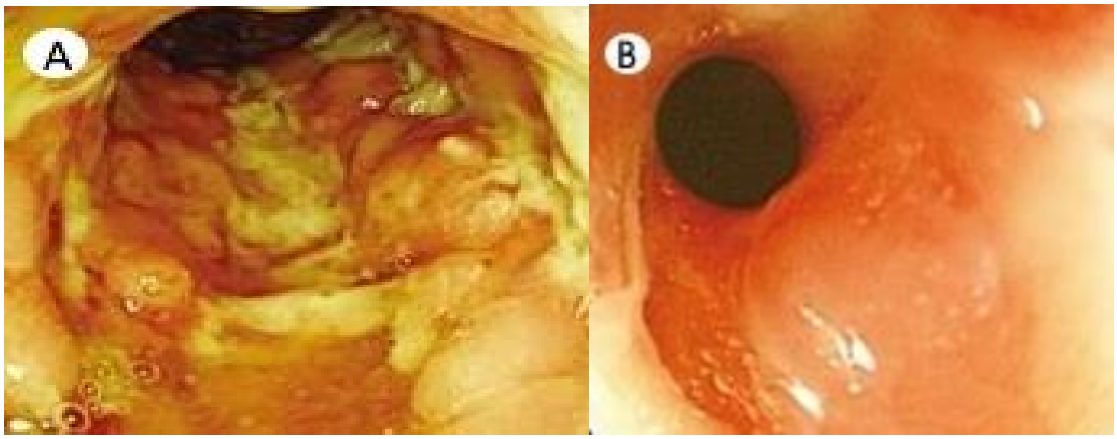
1.7. ENDOSKOPSKI INDEKSI U DIJAGNOSTICIRANJU ULCEROZNOG KOLITISA I CROHOVE BOLESTI

Endoskopija je jedna od najvažnijih metoda za dijagnosticiranje i praćenje IBD-a. Endoskopske promjene kod UC počinju u analnom ili rektalnom dijelu crijeva i šire se proksimalno, kontinuirano i koncentrično. Prijelaz iz upalno promijenjene sluznice u zdravu sluznicu je nagao i jasan posebno kod distalne bolesti (127). Ponekad, kod ljevostranog kolitisa imamo manje promjene u cekumu tzv. *patch*. (128). Kod teških pankolitisa promjene mogu zahvaćati i terminalni ileum tzv. *backwash ileitis* (129). Endoskopske karakteristike CD su preskačuće lezije (afte, ulkusi). Ulkusi su uzdužni s okolnim crvenilom. Sluznica može biti kaldrmasto izmijenjena uz suženja i fistule. Između upalno promijenjenih područja vidi se zdrava sluznica (127).

Mjerenje endoskopske aktivnosti bolesti u UC u dnevnoj rutini rijetko se koristi. U randomiziranim kontroliranim pokusima za procjenu i indeksiranje endoskopskog nalaza za UC najčešće se koristi Mayo endoskopski indeks (MES, engl. *Mayo endoscopic score*) (127). MES su razvili 1987. Schroeder i suradnici tijekom placebo-kontroliranog ispitivanja kojim se procjenjuje djelotvornost oralnog mesalamina u liječenju UC (130). Stupanj endoskopske upale temelji se na procjeni izgleda sluznice. Postoje 4 stupnja: 0 - uredan izgled, 1 - eritem, smanjen vaskularni crtež, blaga fragilnost sluznice, 2 - izražen eritem, nestanak vaskularnog crteža, fragilnost, erozije i 3 - ulceracije, spontano krvarenje (Slika 6).



Slika 6. MES: A - uredan nalaz MES 0; B - eritem, smanjen vaskularni crtež MES 1; C - eritem, gubitak vaskularnog crteža, erozije MES 2; D - spontana krvarenja, ulceracije MES 3.



Slika 7. Crohnova bolest: A - inflamirajući oblik; B - strikturirajući oblik.

Endoskopski indeks aktivnosti CD prvenstveno indeksira luminalnu bolest (Slika 7). Izvješćivanje o endoskopskoj aktivnosti uključuje točne opise svih abnormalnosti u svakom

segmentu stoga je njihova uporaba ograničena na pojedinačnu primjenu u studijama i ne koristi se u rutinskim kliničkim ispitivanjima ni praksi (127). SES-CD (engl. *Simple Endoscopic Score for Crohn Disease*) je razvijen s ciljem pojednostavljenja endoskopske varijable (127). U svakom pregledanom segmentu (ileum, uzlazni kolon, poprečni kolon, silazni kolon, sigmoidni kolon, rektum) procjenjuje se i boduje:

- veličina ulkusa (0 - nema ulceracije; 1 - aftozne promjene manje od 0,5; 2 - ulkusi od 0,5 do 2 cm; 3 - ulkusi veći od 2 cm)
- površina crijeva zahvaćena s ulceracijama (0 - nema ulceracija; 1 - <10% površine; 2 - 10-30% površine; 3 - >30% površine)
- površina crijeva zahvaćena s upalnim promjenama (0 - nema upale; 1 - <50% površine; 2- 50-75% površine; 3 - >75% površine)
- prisutnost i tip suženja (1 - nema suženja; 1 - jedno suženje prohodno za endoskop; 2 - multipla suženja prohodan za endoskop; 3 - suženje neprohodno za endoskop)

Izračun ukupnog SES-CD indeksa je zbroj svih varijabli -1,4x n (broj zahvaćenih segmenata).

1.8. FEKALNI KALPROTEKTIN

Fekalni biomarkeri gastrointestinalne upale pojavili su se u proteklom desetljeću. Fekalni kalprotektin, citosolni protein neutrofila, je u najširoj upotrebi. To je kalcij-vezujući protein, član obitelji S100 proteina koji vežu cink heterodimer S100A8/A9. Prvi put je otkriven 1980. godine. Predstavlja 60% sadržaja proteina citosola u neutrofilima (131). Otkriven je u monocitima i makrofagima, iako u nižim koncentracijama nego u neutrofilima, i ima antimikrobna svojstva (132). U prisutnosti aktivne intestinalne upale, neutrofili migriraju iz cirkulacije u crijevnu sluznicu. Svaki poremećaj u arhitekturi sluznice zbog upalnog procesa rezultira pojavom neutrofila, a time i kalprotektina, u lumenu uz njegovo naknadno izlučivanje u feces (133). Pokazalo se da koncentracija fekalnog kalprotektina u izmetu dobro korelira s

testom leukocita označenim indijem i težinom upale crijeva (134). Homogeno je raspodijeljen u izmetu i stabilan je do 7 dana na sobnoj temperaturi (135). Pokazalo se da njegovim mjerenjem možemo razlikovati aktivnu i neaktivnu bolest (136). Brojne studije fekalnog kalprotektina u UC potvrđuju da korelira s endoskopskom aktivnošću bolesti bolje nego C-reaktivni protein (CRP), Spearmanov koeficijent korelacije iznosio je ρ=0,821 (137). U CD, fekalni kalprotektin je povezan s endoskopskim indeksom aktivnosti bolesti CDES i SES-CD, Spearmanov koeficijent korelacije fekalnog kalprotektina i SES-CD iznosio je ρ=0,75 (138,139). Ukupna točnost otkrivanja endoskopski aktivne bolesti u CD iznosila je 87% za kalprotektin granične vrijednosti 70 μg/g (138).

Fekalni kalprotektin najosjetljiviji je marker crijevne upale u IBD-u (140). Vrijednosti kalprotektina dobro koreliraju s endoskopskim pokazateljima aktivnosti bolesti i stoga su važne u različitim kliničkim uvjetima, uključujući početnu dijagnozu, dijagnozu relapsa i odgovor na liječenje (141,142). Uključen je u smjernice ECCO-a za dijagnozu i praćenje IBD (140).

1.9. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE PATOHISTOLOŠKOG NALAZA U UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA

Patohistološka analiza endoskopskih bioptičkih uzoraka ključan je element u dijagnostičkoj obradi pacijenta sa sumnjom na IBD. Konačna dijagnoza bolesti temelji se na kliničkom nalazu, endoskopom nalazu i morfološkim značajkama sluznice crijeva u bioptičkom uzorku. Za preciznu analizu endoskopskih bioptičkih uzoraka, neophodne su detaljne kliničke informacije. Najbolje je histološki pregled provesti prije početka liječenja, jer lijekovi mogu izazvati morfološke promjene.

Konačna patohistološka dijagnoza se postavlja iz kirurškog uzorka, jer patolog može pregledati makroskopski i mikroskopski sve slojeve stijenke crijeva. Bioptički uzorak nije dovoljan za konačnu dijagnozu, ali se povećavanjem broja uzoraka (iz svakog segmenta crijeva

po najmanje dva uzorka bez obzira je li bolest endoskopski prisutna) povećava preciznost dijagnoze (143-145).

U patohistološkom nalazu obavezno mora biti naznačena aktivnost bolesti koja je definirana prisutnošću neutrofilnih granulocita između epitelnih stanica. Kod UC treba razlikovati uredno građenu sluznicu, kroničnu bolest i kroničnu aktivnu bolest, pogotovo u praćenju učinka lijeka (146). U bolesnika s CD nalaz uredno građene sluznice može biti odraz diskontinuiranog i transmuralnog karaktera bolesti, zbog čega je potrebno imati više bioptičkih uzorka (147).

1.9.1. OSOBITOSTI PATOHISTOLOŠKOG NALAZA U ULCEROZNOM KOLITISU

Patohistološka dijagnoza UC temelji se na opisu četiri glavne kategorije: celularnost lamine proprije, neutrofilna (granulocitna) infiltracija, arhitektura sluznice i epitelne abnormalnosti (148).

Procjena stanične celularnosti lamine proprije u UC odnosi na povećanu i/ili promijenjenu distribuciju tipova upalnih stanica normalno prisutnih u kolorektalnoj sluznici. Osim u područjima dubokih ulceracija, upalni infiltrat u neliječenoj bolesti je ograničen na sluznicu, difuzan ili kontinuiran, bez bilo koje promjene u intenzitetu ili preskakanju lezija (148). Njegov intenzitet karakteristično se povećava prema rektumu (147). Homogeno povećanje celularnosti pojavljuje se u cijeloj lamini propriji (transmukoza) i može se najbolje procijeniti u donjoj trećini koja normalno ima najmanju gustoća upalnih stanica u normalnoj sluznici (148). Plazma stanice se nakupljaju između baze kripta i muskularne lamine sluznice, tzv. bazalna plazmacitoza (147).

Neutrofili koji odražavaju aktivnost bolesti, prisutni su u lamini propriji i između epitelnih stanica. Nakupljanje neutrofila u epitelnim kriptama rezultira kriptitisom ili kriptalnim apscesima (148). Broj eozinofila je varijabilan dok se granulomi vrlo rijetko nalaze (147).

Promjene u arhitekturi sluznice zbog kronične upale prvenstveno se vide u arhitektonskoj abnormalnostima (vijuganje, grananje i atrofija), smanjenoj gustoći kripti i površinskim nepravilnostima (148). Uredno građene kripte su ravne, paralelne i pružaju se odmah iznad muskularne lamine sluznice.

Epitelne abnormalnosti uključuju površinsko oštećenje epitela, gubitak mucina i metaplastične promjene (147). Oštećenje površinskog epitela, kao što je izravnavanje, fokalni gubitak stanica, erozije i ulkusi odražavaju aktivnost bolesti. Nedostatak mucina definiran je smanjenjem broja vrčastih stanica i/ili smanjenom količinom intracelularnog mucina (145, 149). Metaplazija Panethovih stanica, upalni pseudopolipi, hipertrofija muskularne lamine sluznice, submukozna fibroza su dodatne značajke kroničnosti upale (150).

U ranoj fazi bolesti, patohistološka dijagnoza UC može biti pravi izazov. Očuvana arhitektura kripti i odsutnost upalnog infiltrata ne isključuje ranu bolest. Fokalna ili difuzna bazalna plazmacitoza je najranija dijagnostička značajka s najvećom prediktivnom vrijednošću za dijagnozu i može identificirati u 38% bolesnika unutar 2 tjedna nakon početka bolesti (151).

U dugogodišnjoj bolesti dolazi do široko rasprostranjene promjene arhitekture sluznice, prvenstveno do izobličenja kripti i povećanja celularnosti imunih stanica lamine proprije (147). S vremenom, uz terapiju, stupanj zahvaćenosti debelog crijeva upalom se smanjuje, što u konačnici rezultira potpunim obnavljanjem sluznice rektuma u 34-44% bolesnika (147). Istovremeno, uz terapiju i bez nje, distribucijski uzorak upale može se promijeniti iz difuznog (kontinuiranog) u sporadični (diskontinuirani) (152). Ovaj tip histološke evolucije može rezultirati u dijagnostičkim dilemama, osobito kada kliničke informacije o bolesti nisu dostupne (147).

U klinički i endoskopski neaktivnoj bolesti, sluznica još uvijek može pokazivati značajke koje odražavaju pretrpljenu štetu, kao što su arhitekturalne abnormalnosti i smanjena gustoća kripti (153). Tijekom regeneracije, sadržaj mucina u stanicama se obnavlja, upalni infiltrat u lamini propriji je promjenjive gustoće, a bazalno nestaje plazmacitoza. Histološki nalazi koji predviđaju klinički recidiv u bolesnika s neaktivnom bolešću su postojanost bazalne plazmacitoze, blago aktivna bolest ili veliki broj eozinofila (151).

1.9.2. OSOBITOSTI PATOHISTOLOŠKOG NALAZA U CROHNOVOJ BOLESTI

Diskontinuirana kronična upala, žarišne arhitektonske promjene epitela u obliku distorzije kripti i granulomi koji nisu povezani s oštećenjem kripti su značajke s najvišom dijagnostičkom vrijednošću u patohistološkoj analizi bioptičkog uzorka koje podržavaju dijagnozu CD (147).

Diskontinuirana kronična upala podrazumijeva povećanu celularnost imunih stanica lamine proprije (limfociti i plazma stanice) i varijabilnost gustoće upalnog infiltrata u različitim bioptičkim uzorcima. Promjene nisu ograničene na sluznicu, ali to nije moguće utvrditi u bioptičkom uzorku. Obično se nađe jedno ili više okruglih žarišta s povećanim brojem mononukleara te s ili bez neutrofilne infiltracije, okruženo sluznicom uredne građe ili uzorci sluznice imaju promjenjiv intenzitet upale (147). Limfoidni agregati se ne smatraju fokalnom upalom (147). Procjena razlike u celularnosti između višestrukih bioptičkih uzoraka je reproducibilnija od razlika u jednom uzorku biopsije. U bioptičkom uzorku upala se može širiti u submukozu. Kao u UC, prisutnost neutrofila u lamini proprija ili u epitelu (kriptitis i kriptalni abscesi) ukazuju na aktivnu bolest i označavaju oštećenje epitela (147).

Granulomi su nakupina najmanje pet epiteloidnih stanica (aktivirani histiociti s homogenom, blago eozinofilnom citoplazmom) s ili bez multinuklearnih orijaških stanica

(148). U CD granulomska masa je često slabo ograničena. Multinuklearne orijaške stanice mogu biti odsutne i nekroza nije uobičajena. Samo granulome koji nisu povezani s oštećenjem kripti treba smatrati značajnim u dijagnozi CD (154). Kada je prisutna samo jedna patohistološka značajka, to se ne smatra dovoljnim za pouzdanu dijagnozu CD (154). Većina patologa se slaže da je prisutnost granuloma i barem još jedna druga značajka (upala ili arhitektonske abnormalnosti epitela) potrebna za potvrdu dijagnoze CD (155).

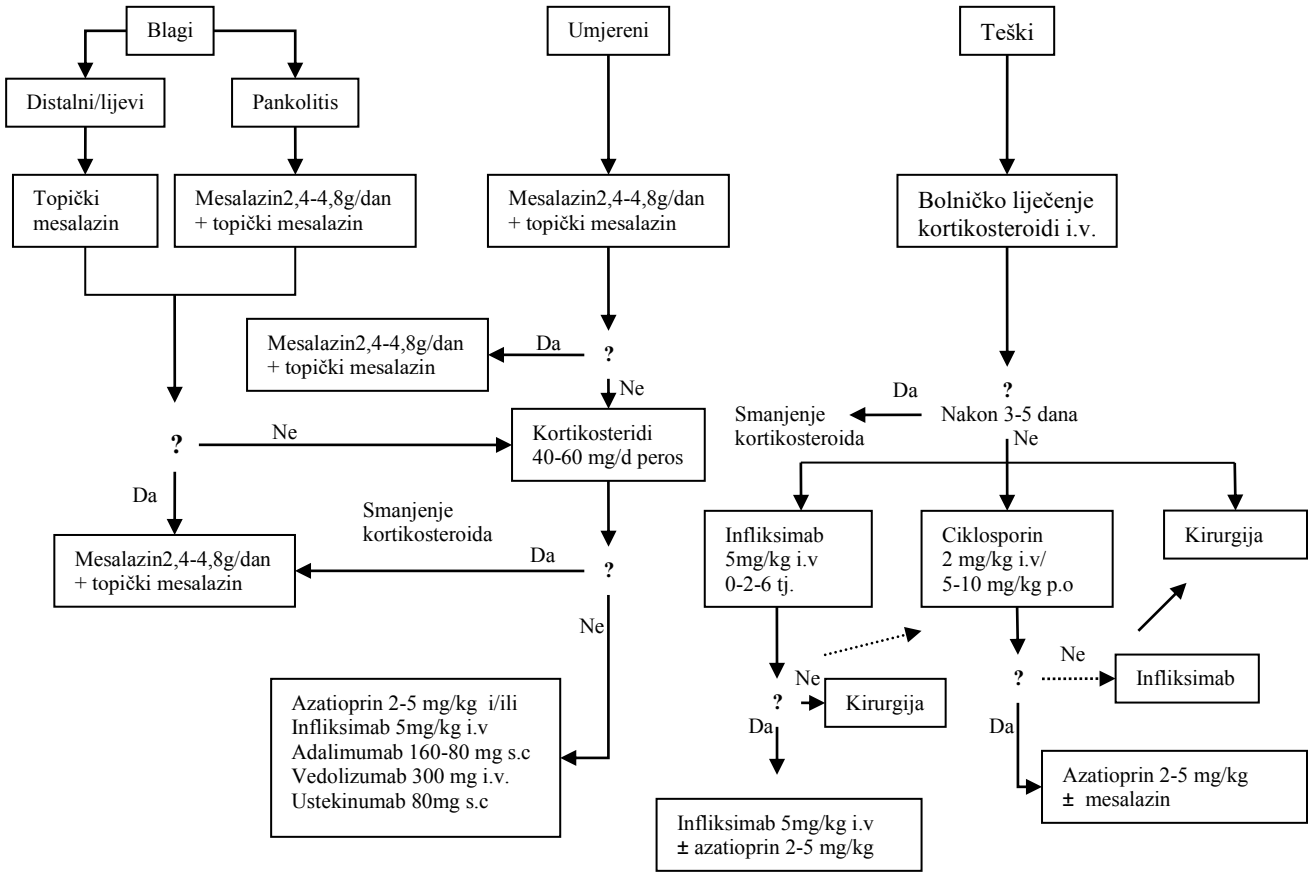
Dodatna korisna patohistološka obilježja su fokalna kronična upala bez atrofije kripti, fokalni kriptitis, aftozni ulkusi, nesrazmjerna submukozna upala, neuralna hiperplazija i povećan broj intraepitelnih limfocita (147).

1.10. TERAPIJSKI PRISTUP LIJEČENJU IBD-a

Zbog nepoznatog uzroka bolesti terapijski postupci su usmjereni na postizanje i održavanje remisije. To uključuje postizanje cijeljenja sluznice, remisiju bez kortikosteroida, odgađanje kirurškog liječenja, smanjenje broja hospitalizacija, poboljšanje kvalitete života i izbjegavanje invaliditeta (156,157). Terapijski postupci ovise o aktivnosti bolesti (Slika 6) (158). Iako terapijski pristup prvenstveno uključuje medikamentoznu terapiju, 20-30% bolesnika u konačnici zahtjeva kirurško liječenje (159).

U liječenju blagog ili umjereno aktivnog UC prvi lijek izbora uključuje mesalazin bilo topički i/ili oralni (160, 161). U slučaju perzistiranja simptoma treba započeti s primjenom kortikosteroida (160). Više od 70% bolesnika odgovori na prvo davanje ovog lijeka, ali samo 50% njih zadrži remisiju bez kortikosteroida, a 22% bolesnika razvije bolest ovisnu o kortikosteroidima (162). Takvim bolesnicima preporuča se u terapiju uvesti azatioprin, a potom infliksimab, adalimumab, golimumab kao monoterapiju ili u kombinaciji s azatioprinom ili ovisno o odgovoru na terapiju, vedolizumab i ustekinumab (Slika 8) (163). Za sve bolesnike koji imaju teški oblik bolesti prvi lijek izbora je parenteralna primjena kortikosteroida. Ako

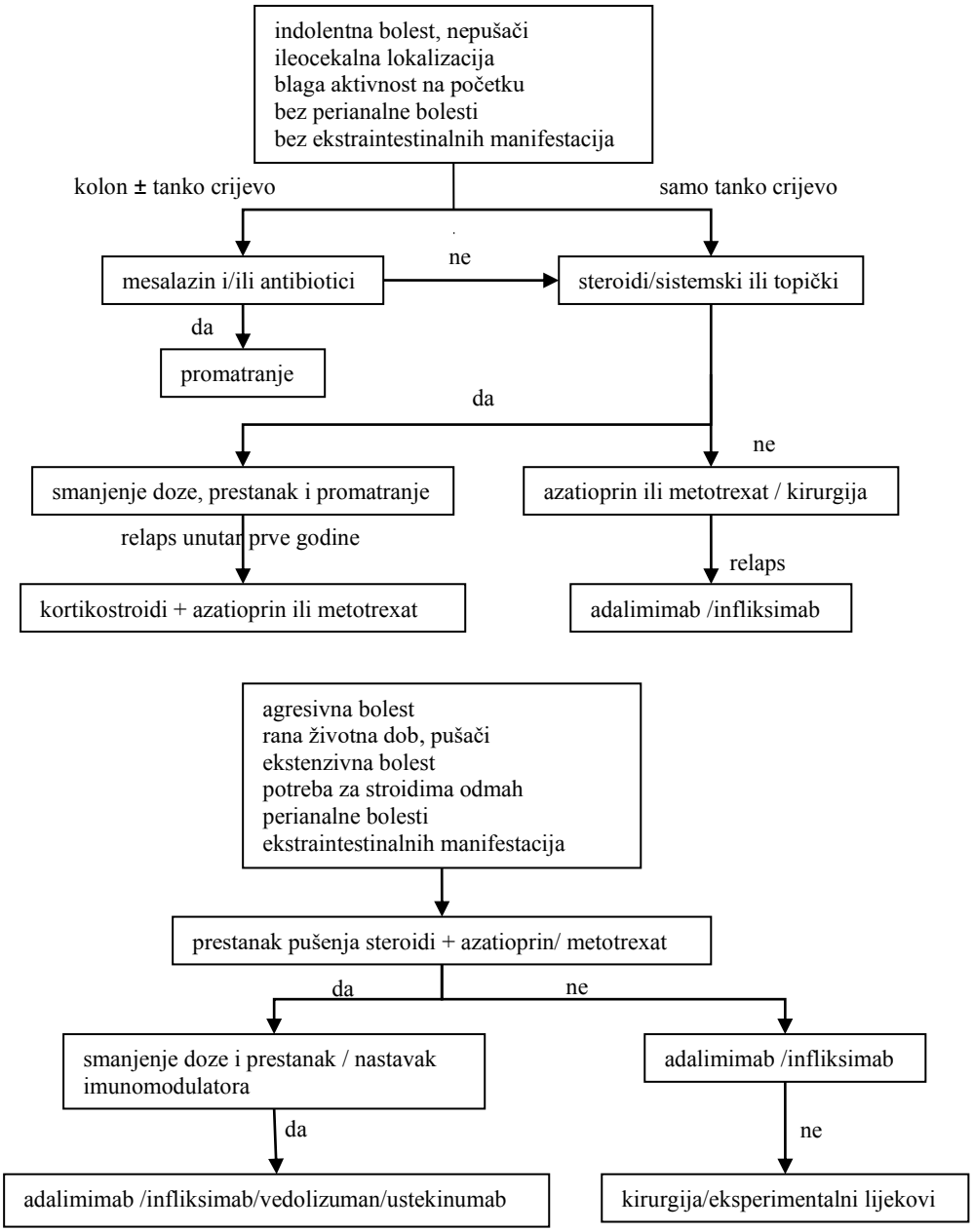
izostane njihov učinak, lijekovi izbora postaju ciklosporin ili infliksimab (163). Strategiju liječenja treba prilagoditi pacijentu, njegovim godinama, pridruženim bolestima i prethodnim terapijskim postupcima (Slika 8) (163). Održavanje remisije jedan je od ključnih ciljeva liječenja. Remisija bolesti definira se kao potpuno odsustvo simptoma uz endoskopski potvrđeno cijeljenje sluznice (156). Odabir pravog lijeka za održavanje remisije prvenstveno ovisi o prethodnoj terapiji, proširenosti i aktivnosti bolest. Kod bolesnika koji su imali teški oblik bolesti, bolest ovisnu o kortikosteroidima i bolest s čestim relapsima, lijekovi izbora su azatioprin, antiTNF, vedolizumab i ustekinumab (160, 164, 165).



Slika 8. Terapijski algoritam u liječenju ulceroznog kolitisa.

U liječenju CD ispravan terapijski pristup uzima u obzir aktivnost, lokalizaciju i fenotip bolesti, te pojavu izvancrijevnih manifestacija. Također uključuje ravnotežu između

potencijalnog učinka lijeka i neželjenih pojava te odgovora na prethodne terapijske postupke (Slika 9) (166). Cilj terapije je uvođenje i održavanje remisija bolesti. Remisijom bolesti se smatra odsustvo simptoma bolesti ili CDAI<150. Lijekovi izbora u održavanju remisije su azatioprin/merkaptopurin, metotreksat, infliksimab, adalimumab, vedolizumab, ustekinumab (160, 167, 168). Unutar prve godine dana od postizanja remisije, bilo medikamentozno ili kirurški, 40-70% bolesnika ima relaps bolesti (169, 170). Kirurško liječenje je integrirano u medikamentozni pristup liječenja Crohnove bolesti. Prvenstveno obuhvaća liječenje striktura bez upalne komponente, akutne opstrukcije i apscesa koji nisu dostupni drenaži (160).



Slika 9. Algoritam liječenja Crohnove bolesti.

1.10.1. MOGUĆI TERAPIJSKI UTJECAJI NA DENDRITIČNU STANICU

U brojnim studijama je dokazana sposobnost DS da izazove toleranciju na imunološku reakciju, što je onda moguće koristiti za terapijsku kontrolu neželjenog imunološkog odgovora, primjerice u modelima odbacivanja alografta, bolesti transplantata i autoimunih poremećaja (20, 171). Razni pristupi su dizajnirani da se dobije selektivno poboljšanje tolerogenih svojstava

DS. Cilj ovih strategija je bio spriječavanje sazrijevanja DS i slabljenje njene sposobnosti simuliranja T stanica (172). Jedan od modela liječenja biološkim agensima je primjena IL-10, ali za sada s ograničenim uspjehom. DS tretirana s IL-10 aktivno regulira kostimulatorne molekule, inhibira izlučivanje IFN-γ iz aktiviranih T-stanica i smanjuje proizvodnju antitijela u aktiviranim B stanicama (173).

Potencijalni terapijski učinak kroz promicanje tolerogenosti DS ima 1α-25-dihidroksivitamin D3, aktivni oblik vitamina D3. On inducira diferencijaciju tolerogenih DS kontrolirajući ekspresiju inhibitornog receptora za ILT3, povećava izlučivanje IL-10 i indukciju Treg-a (174). Imunosupresivna ili imunomodulatorna sredstva, kao što su kortikosteroidi, estrogen, rapamicin, klorokin i takrolimus imaju sposobnost poticanja tolerogenosti DS inhibicijom diferencijacije i sazrijevanja, smanjenjem proizvodnje kostimulatornih molekula i IL-12, te inhibicijom T-staničnog kostimulatornog kapaciteta (175). Zajednički svojstvo lijekova koje ciljaju DS je njihova sposobnost inhibiranja NF-κB, put prijenosa signala za koji je poznato da igra ključnu ulogu u upalnom odgovoru. Protein RelB, član obitelji NF-κB, potreban je za mijeloidnu diferencijaciju DS. Antigenom aktivirana DS inhibicijom funkcije proteina RelB inducira $CD4^{+}$T reg limfocite koji stvaraju IL-10 i tako potiču tolerabilnost (176). Ova saznanja otvaraju nove mogućnosti u području liječenja IBD s ciljem upotrebe tolerogenog potencijala DS.

Neki procesi identificirani su kao potencijalni terapijski ciljevi. Primjerice blokiranje interakcije između DS i T-stanica predloženo je kao sredstvo za smanjenje aktivnosti IL- 23/IL- 17 proupalnog puta, važnog u patogenezi IBD-a (177). Jedan od predloženih modela liječenja u bolesnika s IBD je i modificiranje funkcije DS pomoću *in vivo* ili *in vitro* primjene probiotičkih bakterija (178). Tolerogena svojstva DS su potencijalno atraktivna kao terapijski cilj prvenstveno u probiotičkoj terapiji. Na primjer, probiotici potencijalno mogu pomoći u vraćanju normalne mikrobne populacije crijeva (179). Međutim, do danas ti napori nisu

ostvarili dosljedno obećavajuće rezultate, posebno kod Crohnove bolesti (180). Zbog toga su se mnogi istraživači okrenuli istraživanju imunomodulatornih učinaka određenih bakterija i bakterijskih komponenti, ali za sada još uvijek na mišjim modelima (181). Nađeno je da promjena površine stanične komponente laktobacila može promijeniti imunoregulacijski odgovor DS i postavljene su osnove za korištenje genetski modificiranih bakterija kao potencijalnog terapijskog sredstva (181).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. odrediti pojavnost i broj zrelih intraepitelnih $CD83^+$ DS u sluznici debelog crijeva ispitanika s UC i CD u odnosu na zdravu populaciju,
2. odrediti utjecaj aktivnosti upale u patohistološkom nalazu ispitanika na broj i pojavnost zrelih intraepitelnih $CD83^+$ DS u sluznici debelog crijeva,
3. utvrditi odnos pojavnosti i broja zrelih intraepitelnih $CD83^+$ DS u sluznici debelog crijeva i razine fekalnog kalprotektina,
4. odrediti odnos pojavnosti i broja zrelih intraepitelnih $CD83^+$ DS u sluznici debelog crijeva i u istraživanju korištenih endoskopskih indeksa aktivnosti bolesti,
5. procijeniti utjecaj azatioprina i anti TNF lijekova na pojavnost i broj zrelih intraepitelnih $CD83^+$ DS u sluznici debelog crijeva u ispitanika s UC i CD.

3. HIPOTEZA

1. Pojavnost i broj zrelih intraepitelnih $CD83^+$ DS u sluznici debeloga crijeva ovisi o tipu IBD.
2. Pojavnost i broj zrelih intraepitelnih $CD83^+$ DS ovisi o stupnju aktivnost upale u PHD nalazu.
3. Biokemijski pokazatelji aktivnosti upale povezani su s promjenom pojavnosti i broja zrelih intraepitelnih $CD83^+$ DS u sluznici debeloga crijeva.
4. Endoskopski indeksi aktivnosti povezani su s promjenom pojavnosti i broja zrelih intraepitelnih $CD83^+$ DS u sluznici debeloga crijeva.
5. Liječenje azatioprinom i anti TNF lijekovima utječe na pojavnost i broj zrelih intraepitelnih $CD83^+$ DS u sluznici debeloga crijeva.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. ISPITANICI

Uzorak u istraživanju je bio prigodni. Svi ispitanici su bili punoljetni i potpisali su informativni pristanak. Ispitivanje je provedeno u Poliklinici za internu medicinu, ginekologiju i psihijatriju J&J MEDICI.

Ispitanici su podijeljeni u tri skupine.

1. Naivni ispitanici: neliječeni bolesnici kojima je klinički, biokemijski, endoskopski i patohistološki potvrđena dijagnoza UC i CD.

2. Liječeni ispitanici: bolesnici s UC i CD koji se u trenutku uzorkovanja liječe monoterapijom azatiopriom ili antiTNF lijekom najmanje 6 mjeseci.

3. Zdravi ispitanici: dragovoljci bez kliničkih i patohistoloških pokazatelja bolesti crijeva.

Ukupan broj svih ispitanika je bio 219 (UC - 100 ispitanika, CD - 44, kontrolna skupina - 75 ispitanika).

U skupini ispitanika s UC, 50 je bilo žena, a 50 muškaraca. Srednja životna dob ispitanika je bila 42 godine, u rasponu od 20 do 79 godina. Bez terapije je bilo 68 ispitanika, na terapiji azatioprinom je bilo 15 ispitanika, a na antiTNF terapiji 17 ispitanika.

U skupini ispitanika s CD, 20 je bilo žena, a 24 muškaraca. Srednja životna dob ispitanika je bila 36 godina, u rasponu od 18 do 80 godina. Bez terapije je bilo 19 ispitanika, na terapiji azatioprinom je bilo 13 ispitanika, a na antiTNF terapiji 12 ispitanika.

Kontrolnu skupinu je činilo 75 zdravih ispitanika bez kliničkih simptoma te s urednim patohistološkim nalazom biopsije sluznice kolona.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split (Klasa odobrenja 500-03/18-01/73; Broj odobrenja 2181-147-01/06/m.S.-19-3, KBC Split, Hrvatska).

4.1.1. DIJAGNOZA ULCEROZNOG KOLITISA I CROHNOVE BOLESTI

Svim ispitanicima kojima je temeljem kliničkog pregleda postavljena sumnja na UC i CD, dijagnoza bolesti je postavljena na osnovu smjernica Europske organizacije za Crohn i kolitis (ECCO).

Dijagnoza UC postavljena je na temelju smjernica ECCO-a iz 2008. godine, 2012. godine i 2018. godine (140, 182, 183). Ispitanici su imali najmanje tri pozitivna kriterija za dijagnozu.

Za dijagnozu CD ispitanici su imali dva od četiri dijagnostička kriterija po ECCO smjernicama iz 2010. godine, 2016. godine i 2018. godine (140, 184, 185).

Istraživanje nije utjecalo na planirani dijagnostički i terapijski postupak u ispitanika.

4.2. METODE

4.2.1. ENDOSKOPSKA PRETRAGA

Svim ispitanicama učinjena je kolonoskopija na endoskopskom video procesoru VP 3500HD s izvorom svjetla XL 4450 i endoskopom EC530 i/ili EC600 (Fujinon, Japan).

Ispitanicima s UC za indeks procjene endoskopske aktivnosti bolest korišten je MES po preporuci Referentnog centra za kronične upalne bolesti crijeva Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske i ECCO-a (127, 130).

Ispitanicima s CD za indeks procjene endoskopske aktivnosti bolest korišten je SES-CD po preporuci Referentnog centra za kronične upalne bolesti crijeva Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske i ECCO-a (127, 186, 187).

4.2.2. FEKALNI KALPROTEKTIN

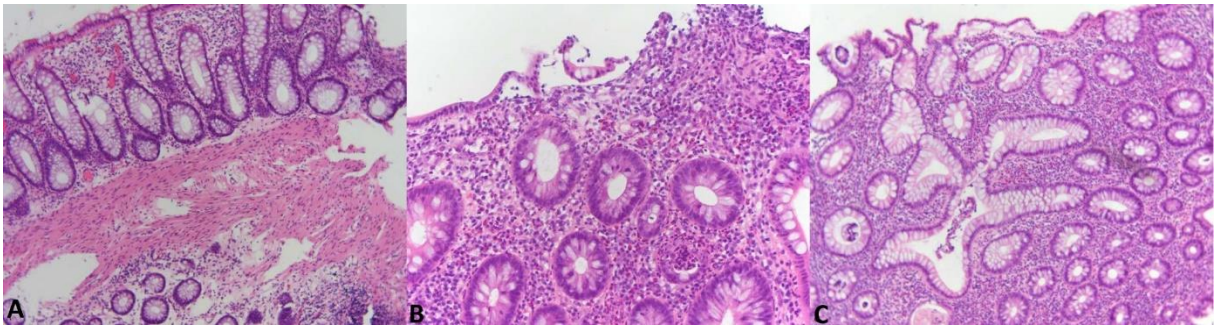
Fekalni kalprotektin je mjeren iz uzorka stolice u najkraćem periodu prije kolonoskopije, a najkasnije u periodu do deset dana. Uzorci su analizirani u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC Split. Određivana je koncentracija kalprotektina

imunoturbidimetrijskom metodom (Buhlmann laboratories AG,Schonenbuch, Švicarska) na uređaju Beckman-Coulter AU 168 (Beckman Coulter Inc, SAD).

4.2.3. BIOPTIČKI UZORCI SLUZNICE DEBELOG CRIJEVA

4.2.3.1. Histološka analiza

Uzorci tkiva su fiksirani u 4 % puferiranom formaldehidu tijekom 24 sata, a potom ispirani u 0,1 M fosfatnom puferu. Nakon dehidracije u uzlaznim koncentracijama alkohola i ksilolu, uklopljeni su u parafin na 56° C. Izrezani su na rezove debljine 4 mikrometra i prilijepljeni na pozitivno nabijena predmetna stakalca (Superftost plus, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD). Bojeni su standardnim hemalaun-eozinskim (HE) bojenjem u automatskom bojaču HE 600 (Ventana, Tucson, Arizona, SAD). Obojeni uzorci analizirani su svjetlosnim mikroskopom Olympus BX41. Sukladno patohistološkom nalazu podijeljeni u tri skupine: kronične upalne promjene, kronične aktivne upalne promjene i uredne građe (Slika 10).



Slika 10. A - Sluznica debelog crijeva uredne građe: pravilne kripte i lamina proprija s limfocitima, plazma stanicama i eozinofilima; B - Kronična aktivna upala u kolitisu: oštećenje epitela posredovano neutrofilima u obliku kriptalnih apscesa i reparatornih promjena epitela; C - Kronična upala kod kolitisa: grananje kripti i upalni infiltrat u lamini propriji.

4.2.3.2. Imunohistokemijska analiza

Uzorci su izrezani na rezove debljine 4 mikrometra i prilijepljeni na pozitivno nabijena predmetna stakalca (Superftost plus, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD). Imunohistokemijski postupak je proveden u uređaju Bench Mark ULTRA IHC/ISH Staining

Module (Ventana, Tucson, Arizona, SAD) uz pozitivnu kontrolu. Nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidracije kroz alkohole silazne koncentracije, rezovi su kuhani u puferu EDTA pH 8,2 tijekom 10-30 min. Inkubacijom u 3 % H_2O_2 (30 min na sobnoj temperaturi) inaktivirana je endogena peroksidaza. Nakon toga, presjeci su isprani u otopini fosfatnog pufera (PBS) i inkubirani primarnim protutijelom Anti-CD83 antibody ab205343 (Abcam, Cambridge, UK) u vlažnoj atmosferi tijekom 32 minute. Nakon ispiranja u PBS-u, rezovi su inkubirani sustavom za sekundarnu detekciju Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana, Tucson, Arizona, SAD). Obojeni uzorci analizirani su svjetlosnim mikroskopom Olympus BX41 (Slika 11). U području najveće gustoće obojenosti izbrojene su intraepitelne $CD83^+$ DS na 100 enterocita.

4.3. IZRAČUN VELIČINE UZORKA

Temeljen pilot studije dobiven je udio intraepitelnih zrelih $CD\ 83^+$ DS u ispitanika s CD 90%, a u skupini ispitanika s UC 64%. Da bi se dokazala razlika ovih proporcija χ^2 testom uz α=0,05 i snagu istraživanja od 80%, bilo je potrebno imati 24 ispitanika u svakoj skupini.

4.4. STATISTIČKI TESTOVI

Normalnost razdiobe kvantitativnih podataka ispitana je Kolmogorov-Smirnov testom. Podatci su prikazani aritmetičkim sredinama i standardnom devijacijom, te ako su normalno distribuirani u obradi su korišteni parametrijski testovi (T test, ANOVA test). Ako ne sijede normalnu distribuciju u prikazu su korišteni medijani, kvartile, minimum, maksimum, a u obradi podataka Mann-Whitney test i Kolmogorov-Smirnov test.

Za analizu kvalitativnih podatka korištene su tablice kontigencije i χ^2 test. U obradi podataka korištena je također i logistička regresiju. Rezultati su interpretirati na razini značajnosti $p<0,005$.

5. REZULTATI

5.1. ANALIZA SVIH ISPITANIKA

Istraživanjem je obuhvaćeno 219 ispitanika starijih od 18 godina.

Medijan životne dobi bio je 40 godina (Q1-Q3:31-55 god; min-maks:15-80 god). Od ukupnog broja bilo je 113 muškaraca (51%) medijana životne dobi 42 god (Q1-Q3:31-55 god; min-maks:15-80 god) i 106 žena (49%) medijana životne dobi 43 godine (Q1-Q3:31-56,5 god; min-maks:18-79 god). Muškarci i žene se nisu statistički značajno razlikovali prema dobi (Z=0,400;p=0,689).

Postoji statistički značajna razlika životne dobi između ispitivanih skupina (χ^2=7,3; p=0,026). Medijan životne dobi u ispitanika s CD za 9 godina je bio manji nego u kontrolnoj skupini (p=0,034). Ispitivane skupine su bile usklađene prema spolu (χ^2=1,75;p=0,416).

Razdioba ispitanika prema PHD nalazu u odnosu na skupine ispitanika s UC i CD nije se statistički značajno razlikovala (χ^2=2,5;p=0,291).

Postojala je statistički značajna razlika broja intraepitelnih $CD83^+DS$ (n $CD83^+DS$/ 100 e) između ispitivanih skupina (χ^2=15,9;p<0,001). Medijan broja intraepitelnih $CD83^+DS$ za 2 je bio veći u ispitanika s CD nego u kontrolnoj skupini (p=0,031) i skupini ispitanika s UC (p<0,001) (Slika 11).

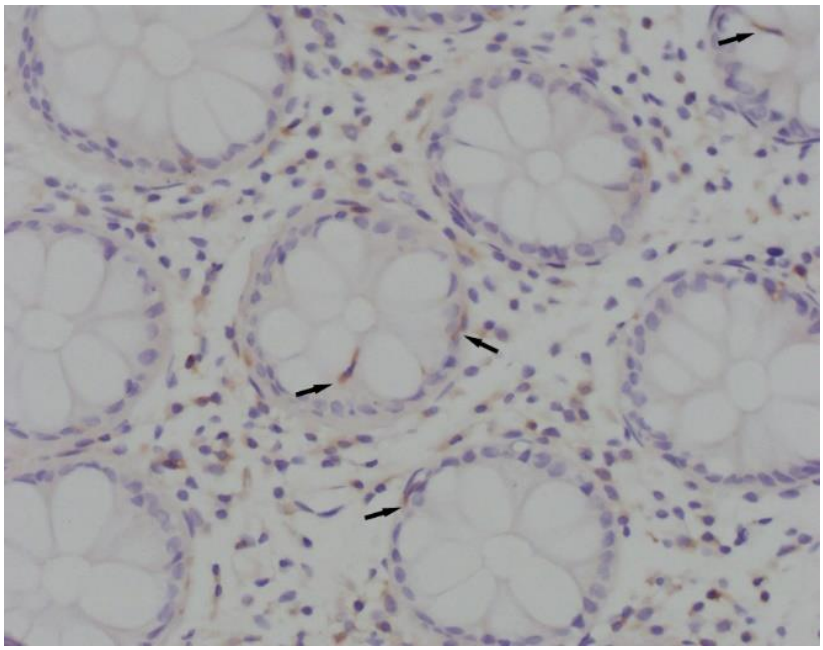
Vrijednosti kalprotektina između skupina ispitanika s UC i CD nisu se statistički značajno razlikovale (Z=0,446; p=0,565).

U skupini ispitanika s UC, 32% je bilo na terapiji (azatioprin 15% i antiTNF 17%), a u skupini ispitanika s CD, 57% je bilo na terapiji (azatioprin 30% i antiTNF 27%) (Tablica 1)

Tablica 1. Prikaz demografskih podataka, PHD nalaza, broja intraepitelnih $CD83^+DS$ (n $CD83^+DS$/ 100 e), kalprotektina (μg/g) i terapije ispitanika u odnosu na ispitivane skupine (UC, CD, kontrola).

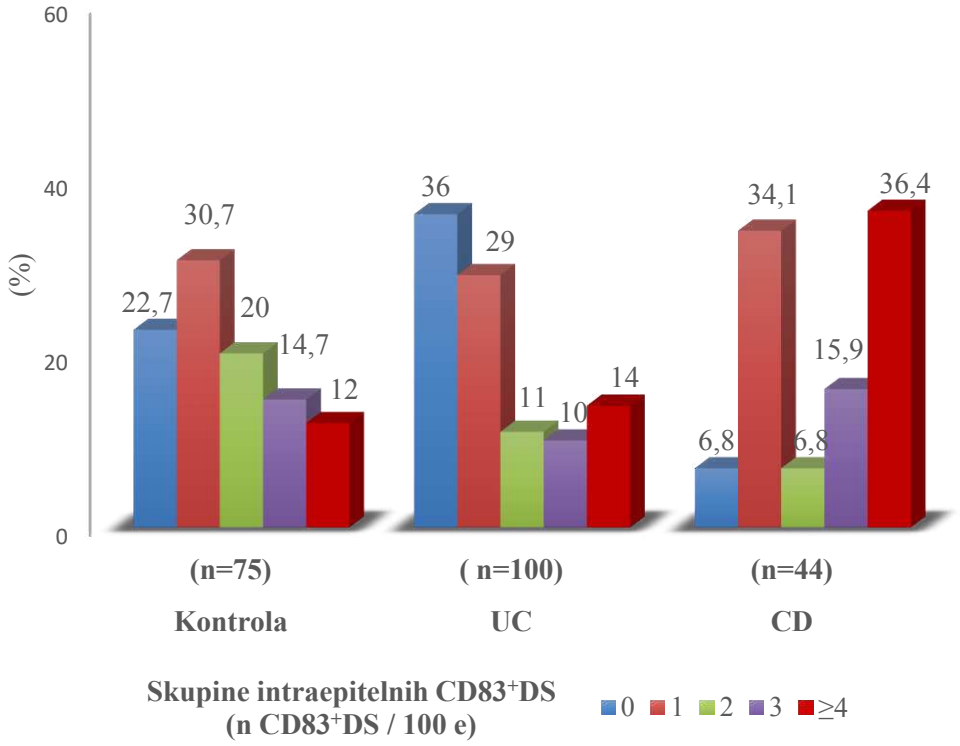
	Skupina			
	Kontrola (n=75)	UC (n=100)	CD (n=44)	p
Dob (god) medijan (Q1-Q3; min-maks)	45 (32-59; 20-79)	42 (32-59,8; 15-79)	36 (28,2-47,7; 18-80)	0,026*
Spol; n(%)				0,416**
Muškarci	43 (57)	50 (50)	20 (45)	
Žene	32 (43)	50 (50)	24 (54)	
PHD				0,291††
bez upale	75 (100)	15 (15)	10 (22,7)	
Aktiv. kr. upala		52 (52)	17 (38,6)	
kronična upala		33 (33)	17 (38,6)	
n $CD83^+DS$/ 100 e medijan (Q1-Q3; min-maks)	1(1-3; 0-10)	1 (0-2; 0-9)	3 (1-4; 0-10)	<0,001*
Kalprotektin medijan (Q1-Q3; min-maks)		540 (143-1800; 12-1800)	449(157-1700; 3-1800)	0,656††
Terapija n (%)				0,018††
bez terapije	75 (100)	68(68)	19(43)	
azatioprin		15(15)	13(30)	
antiTNF (adalimumab,infliximab)		17(17)	12(27)	

*Kruskal Wallis test;** χ^2 test; †Mann Whitney U test; ††χ^2 test između ispitanika s UC i CD



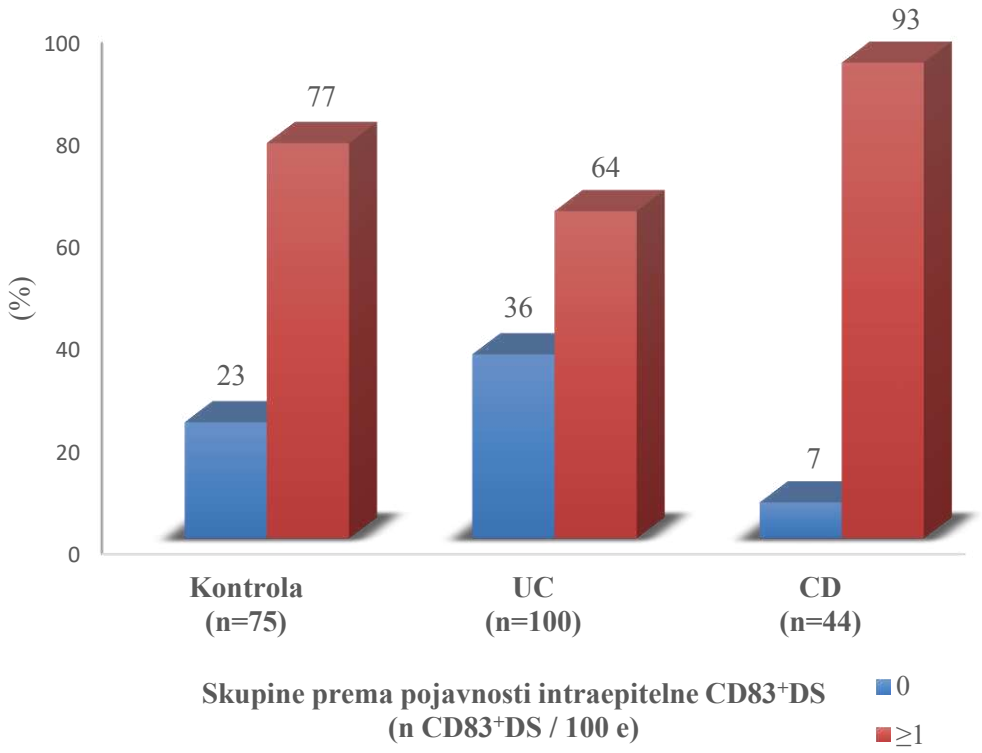
Slika 11. Svjetlosnomikroskopska slika $CD83^{+}$DC u sluznici debelog crijeva. Između epitelnih stanica crijevnih kripti vide se smeđe obojene citoplazme dendritičnih stanica (strelice) (Olympus BX41, 40x).

Razdioba ispitanika prema brojčanim skupinama intraepitelnih $CD83^{+}$DS (n $CD83^{+}$DS/ 100 e = 0,1,2,3,≥4) statistički se značajno razlikovala u odnosu na ispitivane skupine (χ^2=27;p=0,001;Cramer´s V=0,249). Za 5 puta je manji udio ispitanika s n $CD83^{+}$DS/ 100 e = 0 u skupini ispitanika s CD u odnosu na ispitanike s UC i za 3,3 puta je manji nego u kontrolnoj skupini. Za 2,4 puta je veći udio ispitanika s n $CD83^{+}$DS/ 100 e ≥4 u skupini ispitanika CD nego u skupini ispitanika UC i za 3,2 puta veći nego u kontrolnoj skupini (Slika 12)



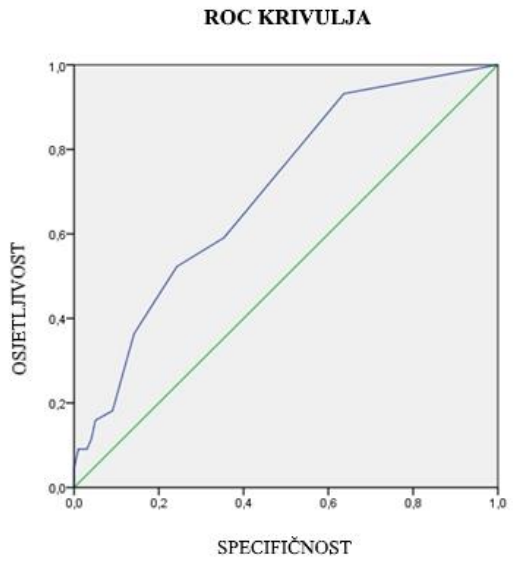
Slika 12. Razdioba ispitanika prema brojčanim skupinama intraepitelnih $CD83^+DS$ (n $CD83^+DS$ / 100 e = 0,1,2,3,≥4) u odnosu na ispitivane skupine (UC, CD, kontrola).

Razdioba ispitanika prema pojavnosti interepitelne $CD83^+DS$ (n $CD83^+DS$ / 100 e = 0; ≥1) u odnosu na ispitivane skupine statistički se značajno razlikovala (χ^2=14,2; p=0,001;CramersV=0,258). Za 5 puta je manji udio ispitanika s n $CD83^+DS$/ 100 e = 0 u skupini ispitanika s CD u odnosu na ispitanike s UC i za 3,3 puta je manji nego u kontrolnoj skupini. Za 1,4 puta je veći udio ispitanika s n $CD83^+DS$/ 100 e ≥1 u skupini ispitanika s CD nego u skupini s UC i za 1,2 puta veći nego u kontrolnoj skupini (Slika 13)



Slika 13. Razdioba ispitanika prema pojavnosti intraepitelne $CD83^+$DS (n $CD83^+$DS/ 100 e =0, ≥1) u odnosu na ispitivane skupine (UC, CD, kontrola).

Upotrebom Roc analize testne varijable broja intraepitelnih $CD83^+$DS (n $CD83^+$DS/ 100 e) u odnosu na tip bolesti (UC prema CD) pronađeno je da se kao granična vrijednost za razgraničenje UC prema CD može koristiti n $CD83^+$DS/ 100 e = 0,5 (Slika 14).



Slika 14. Prikaz krivulje Roc analize n CD83+DS/ 100 e u odnosu na tip bolesti (UC u odnosu na CD) (area = 0,699;SE 0,046;p<0,001;95%CI:0,609-0,788).

Razdioba ispitanika n (%) prema broju intraepitelnih $CD83^+DS$ (n $CD83^+DS$/ 100 e = ≤0,5;>0,5) statistički se značajno razlikovala između ispitanika s CD i UC (χ^2=11,9; p=0,001). Iz tablice 2. je razvidno da je svega 7% ispitanika u skupini s CD imalo n $CD83^+DS$/ 100 e ≤0,5.

Tablica 2. Prikaz povezanosti intraepitelne $CD83^+DS$ na 100 enterocita i tipa bolesti.

	CD (n=44)	UC (n=100)	p*
	n (%)		
n $CD83^+DS$>0,5/100e	41(93)	64(64)	0,001
n CD83+DS≤0,5/100e	3(7)	36(36)	

*χ^2 test

5.1.1. ANALIZA SVIH ISPITANIKA PREMA PHD NALAZU

Nije bilo statistički značajne razlike ispitanika prema dobi (χ^2=1,36; p=0,506) ni prema spolu u odnosu na PHD nalaz (χ^2=1,63; p=0,443).

Postoji statistički značajna razlika ispitanika prema broju intraepitelne $CD83^+$DS (n $CD83^+$DS/ 100 e) u odnosu na PHD nalazu (χ^2=11,8; p=0,003). Razliku čine ispitanici koji u PHD nalazu imaju aktivnu kroničnu upalu čiji medijan je za 1 manji nego u skupini ispitanika bez upale (p=0,006) i za 1 manji nego u skupini ispitanika s kroničnom upalom (p=0,014).

Razdioba ispitanika prema brojčanim skupinama intraepitelne $CD83^+$DS (n $CD83^+$DS/ 100 e = 0,1,2,3,≥4) statistički se nije značajno razlikovala u odnosu na PHD nalaz (χ^2=14,3; p=0,076).

Razdioba ispitanika prema pojavnosti intraepitelne $CD83^+$DS (n $CD83^+$DS/ 100 e = 0;≥1) statistički se značajno razlikovala u odnosu na PHD nalaz (χ2=6,0; p=0,049). U ispitanika s aktivnom kroničnom upalom za 1,7 puta je veći broj ispitanika s n $CD83^+$DS/ 100 e = 0 nego u ispitanika bez upale i za 1,8 puta je veći nego u ispitanika s kroničnom upalom.

Postoji statistički značajna razlika vrijednosti kalprotektina (μg/g) u odnosu na PHD nalaz u ispitanika s UC i CD (χ2=35,7; p<0,001). Medijan kalprotektina u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom za 1660 je veći nego u skupini ispitanika bez upale (p<0,001) i za 1543 je veći u skupini ispitanika s kroničnom upalom (p<0,001).

Razdioba ispitanika prema terapiji u odnosu na PHD nalaz u skupini ispitanika s UC i CD statistički se značajno razlikovala (χ^2=15,4; p=0,004)(Tablica 3)

Tablica 3. Prikaz povezanosti demografskih podataka, intraepitelne $CD83^+$DS / 100 e, kalprotektina (μg/g) i terapije s PHD nalazom.

	PHD nalaz			
	Bez upale (n=100)	Aktiv. kr. upala (n=69)	Kronična upala (n=50)	p
Spol; n(%)				0,443*
muškarci	55 (55)	36 (52)	22 (44)	
žene	45 (45)	33 (48)	28 (56)	
Dob (god)				0,506**
medijan (Q1-Q3; min-maks)	42(31-57; 20-80)	41(31-59; 15-78)	38(30-50; 21-79)	
n $CD83^+$DS/100 e medijan (Q1-Q3; min-maks)	2(1-3; 0-10)	1(0-2; 0-8)	2(1-3; 0-10)	<0,001*
Brojčane skupine n $CD83^+$DS/100e				0,076**
0	21 (21)	25 (36,2)	10 (20)	
1	27 (27)	26 (37,7)	14 (28)	
2	16 (16)	5 (7,2)	8 (16)	
3	16 (16)	6 (8,7)	6 (12)	
≥4	20 (20)	7 (10,1)	12 (24)	
Skupine pojavnosti n $CD83^+$DS/100 e				0,049**
0	21 (21)	25 (36)	10 (20)	
≥1	79 (79)	44 (64)	40 (80)	
Kalprotektin medijan (Q1-Q3; min-maks)	140(30-363; 12-1800)	1800(545-1800; 3-1800)	257(99-549; 30-1800)	<0,001*
Terapija n (%)				0,004**
bez terapije	9 (36)	52 (75,4)	27 (54)	
azatioprin	7 (28)	11(15,9)	10 (20)	
anti TNF	9 (36)	6 (9,7)	13 (26)	

**χ^2 test;*Kruskal Wallis test

NAPOMENA: vrijednosti kalprotektina (μg/g) i broj ispitanika prema terapiji odnose se na ispitanike s UC i CD

5.1.2. UNIVARIJATNA I MULTIVARIJATNA ANALIZA SVIH ISPITANIKA PREMA POJAVNOSTI INTRAEPITELNE CD83$^+$DS

Istražen je mogući utjecaj terapije na pojavnost intraepitelne CD83$^+$DS (n CD83$^+$DS/ 100 e = 0;≥1) upotrebom univarijatne i multivarijatne logističke regresije kao i određivanje snage povezanosti (OR) pojavnosti intraepitelne CD83$^+$DS s ove tri ispitivane varijable.

Skupine ispitanika prema pojavnosti intraepitelne CD83$^+$DS (n CD83$^+$DS/ 100 e = 0;≥1) usklađene su prema spolu (χ^2=0,652;p=0,419) i dobi (Z=0,139; p=0,889).

Razdioba ispitanika prema ispitivanim skupinama (kontrolna, UC, CD) statistički se značajno razlikovala u odnosu na pojavnost intraepitelne CD83$^+$DS (n CD83$^+$DS/ 100 e = 0;≥1) (χ^2=14,2; p=0,001; Cramers V=0,258). Za 4,7 puta je veći udio ispitanika s CD u skupini n CD83$^+$DS/ 100 e ≥1 nego u skupini n CD83$^+$DS/ 100 e = 0. Za 1,6 puta je manji udio ispitanika s UC u skupini n CD83$^+$DS/ 100 e ≥1 nego u skupini n CD83$^+$DS/ 100 e = 0. Izgled za pojavnost intraepitelne n CD83$^+$DS/ 100 e ≥1 za 4 puta je veća u skupini CD u odnosu na kontrolnu skupinu (OR:4; 95%CI: 1,1-14,6; p=0,035).

Razdioba ispitanika prema skupinama ispitanika (UC;CD) statistički se značajno razlikovala u odnosu na pojavnost intraepitelne CD83$^+$DS (n CD83$^+$DS/ 100 e = 0;≥1) (χ^2=11,7; p<0,001; Cramers V=0,306). U skupini bolesnika s CD bilo je samo 8% bolesnika kod kojih nisu pronađene intraepitelne CD83$^+$DS. Izgled za pojavnost intraepitelne n CD83$^+$DS/ 100 e ≥1 za 7,8 puta je veća u skupini CD u odnosu na skupinu UC (OR:7,8; 95% CI:2,2-27; p<0,001).

S obzirom na to da je kod ispitanika s CD nađena veća pojavnosti intraepitelne CD83$^+$DS nego u kontrolnoj skupini i u skupini ispitanika s UC u slijedećoj analizi uspoređena je pojavnost intraepitelne CD83$^+$DS (n CD83$^+$DS/ 100 e = 0;≥1) u skupini ispitanika s CD u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu ispitanika s UC zajedno. Razdioba ispitanika prema skupinama ispitanika (kontrola i UC;CD) statistički se značajno razlikovala u odnosu na pojavnost intraepitelne CD83$^+$DS (n CD83$^+$DS/ 100 e = 0;≥1) (χ^2=8,9; p=0,003). U skupini

ispitanika s CD za 4,2 puta je veći udio ispitanika intraepitelnom n $CD83^+$DS / 100 e ≥1 nego u skupini n $CD83^+$DS /100 e =0. Izgled za pojavnost intraepitelne n $CD83^+$DS/ 100 e ≥1 za 5,9 je puta veći u skupini ispitanika s CD nego u skupini ispitanika s UC i kontrolnoj skupini zajedno (OR=5,9; 95% CI:1,8-20; p=0,004).

Razdioba ispitanika prema PHD nalazu (aktivna kronična upala; kronična upala; bez upale) statistički se značajno razlikovala u odnosu na pojavnost intraepitelne $CD83^+$DS (n $CD83^+$DS/ 100 e = 0;≥1) (χ^2=6,0; p=0,049; Cramers V=0,171). Za 1,7 puta je manji udio ispitanika s aktivnom kroničnom upalom u skupini n $CD83^+$DS/ 100 e ≥1 nego u skupini n $CD83^+$DS/ 100 e = 0. Izgled za pojavnost intraepitelne n $CD83^+$DS/ 100 e ≥1 u skupini ispitanika bez upale za 2,1 puta je veći u odnosu na ispitanike s aktivnom kroničnom upalom (OR=2,1; 95%CI:1,1-4,3; p=0,030).

Razdioba ispitanika između aktivne kronične upale i kronične upale u PHD nalazu nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na pojavnost intraepitelne $CD83^+$DS (n $CD83^+$DS / 100 e = 0;≥1) (χ^2=2,9; p=0,086).

S obzirom na gore dobivene rezultate u slijedećoj analizi uspoređena je pojavnost intraepitelne $CD83^+$DS (n $CD83^+$DS/ 100 e = 0;≥1) u skupini ispitanika s aktivnom kroničnom upalom u odnosu na ispitanike bez upale i s kroničnom upalom zajedno. Razdioba ispitanika prema PHD nalazu (aktivna kronična; kronična upala i bez upale) statistički se značajno razlikovala u odnosu na pojavnost intraepitelne $CD83^+$DS (n $CD83^+$DS/ 100 e = 0;≥1) (χ^2=5,2; p=0,022). Udio intraepitelne n $CD83^+$DS/ 100 e = 0 u aktivnoj kroničnoj upali za 1,7 puta je veći nego udio intraepitelne n $CD83^+$DS/ 100 e ≥1. Izgled za pojavnost intraepitelne n $CD83^+$DS/ 100 e ≥1 za 2,2 puta je veći u ispitanika bez upale i s kroničnom upalom zajedno nego u skupini ispitanika s aktivnom kroničnom upalom (OR=2,2; 95%CI:1,2-4,1; p=0,015).

Razdioba ispitanika prema terapiji (bez terapije, s terapijom) u odnosu na pojavnost intraepitelne $CD83^+$DS (n $CD83^+$DS/ 100 e = 0;≥1) statistički se značajno razlikovala (χ^2=10,3;

p=0,001). Udio ispitanika s intraepitelnom n $CD83^+DS$/ 100 e ≥1 za 3,6 puta je veći nego s n $CD83^+DS$/ 100 e = 0 u skupini ispitanika koji su dobili terapiju. Izgled za pojavnost intraepitelne n $CD83^+DS$/ 100 e ≥1 za 4,8 puta je veći u ispitanika s terapijom u odnosu na one bez terapije (OR=4,8; 95%CI:1,8-12,7; p=0,002) (Tablica 4).

Tablica 4. Prikaz broja (%) ispitanika prema istraživanim varijablama u odnosu na pojavnosti intraepitelne $CD83^+DS$ (0,≥1)/100 e i rezultata univarijatne logističke regresije.

		n $CD83^+DS$ / 100 e				
		0	≥1	p	OR (95%CI)	p**
Spol; n (%)	muškarci	32 (57)	81 (50)	0,419*		
	žene	24 (43)	82 (50)			
Dob (god)				0,889++		
Medijan (Q1-Q3; min-maks)		39,5(30-59; 15-79)	40(31-54; 18-80)			
Skupina				0,001*		
	kontrolna†	17 (30,4)	58 (35,6)			0,002
	UC	36 (64,3)	64 (39,3)		0,513 (0,26-1,0)	0,059
	CD	3 (5,4)	41 (25,3)		4 (1,1-14,6)	0,035
Skupina				<0,001*		
	UC†	36 (92)	64 (61)		7,8 (2,2-27)	0,001
	CD	3 (8)	41 (39)			
Skupina				0,003*		
	kontrolna,UC†	53 (94)	122 (75)		5,9 (1,8-20)	0,004
	CD	3 (6)	41 (25)			
PHD				0,049*		
	aktiv.kr upala†	25 (44,6)	44 (27)			0,052
	bez upale	21 (37,5)	79 (48,5)		2,1(1,1-4,3)	0,030
	kronična upala	10 (17,9)	40 (24,5)		2,3 (0,97-5,3)	0,058
PHD				0,086*		
	aktiv.kr upala†	25(71)	44 (52)			
	kronična upala	10 (29)	40 (48)			
PHD				0,022*		
	bez,kronična	31 (55)	119 (73)		2,2 (1,2-4,1)	0,015
	aktiv.kr upala†	25 (45)	44 (27)			
Terapija				0,001*		
	bez terapije†	51 (91)	111 (68)		4,8 (1,8-12,7)	0,002
	s terapijom	5 (9)	52 (32)			

*χ^2 test; ++Mann Whitney U test; **logistička regresija; †referentni nivo

Izgled za pojavnost intraepitelne n $CD83^{+}DS$/ 100 e ≥1 za 5,2 puta je veći u skupini ispitanika s CD nego u skupini ispitanika kontrolne skupina i ispitanici s UC zajedno. Izgled za pojavnost n $CD83^{+}DS$/ 100 e ≥1 za 2,6 puta je veći u skupini ispitanika bez upale i ispitanika s kroničnom upalom zajedno u odnosu na ispitanike s aktivnom kroničnom upalom i za 3,7 puta je veći u skupini ispitanika s terapijom nego u skupini bez terapije (Tablica 5).

U tablici 5. prikazana je multipla logistička regresija. Zavisna varijabla je $CD83^{+}DS$ (n $CD83^{+}DS$/ 100 e = 0;≥1), a nezavisne varijable su skupina bolesnika (kontrola i UC zajedno; CD), PHD nalaz (bez upale i kronična upala zajedno; aktivna kronična upala) i terapija (bez terapije; s terapijom). Sve tri varijable su pokazale statistički značajnu povezanost s pojavnosti intraepitelne $CD83^{+}DS$ (n $CD83^{+}DS$/ 100 e = 0;≥1) u univarijatnoj i multivarijatnoj logističkoj regresiji.

Tablica 5. Rezultati multivarijatne logističke regresije za pojavnost n $CD83^{+}DS$ ≥1 u odnosu na n $CD83^{+}DS$ = 0.

Nezavisne varijable		OR (95%CI)	p*
Skupine	kontrola i UC† CD	5,2 (1,4-18,6)	0,011
PHD nalaz	bez upale i kronična upala aktiv.kr upala†	2,6 (1,3-5,2)	0,005
Terapija	bez terapije† s terapijom	3,7 (1,3-10,2)	0,012

***** logistička regresija; †referentni nivo

5.2. ANALIZA ISPITANIKA S ULCEROZNIM KOLITISOM

5.2.1. ANALIZA ISPITANIKA S UC PREMA PHD NALAZU

Nema statistički značajne razlike ispitanika s UC prema spolu (χ^2=1,13; p=0,568) ni prema dobi ispitanika u odnosu na PHD nalaz (χ^2=0,976; p=0,614).

Postoji statistički značajna razlika kalprotektina (μg/g) u odnosu na PHD nalaz (χ^2=28,8; p<0,001). Medijan kalprotektina za 1745 je veći u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom u odnosu na ispitanike bez upale (p<0,001) i za 1588 je veći nego u ispitanika s kroničnom upalom u PHD nalazu (p<0,001).

Postoji statistički značajna razlika broja intraepitelnih $CD83^+$DS (n / $CD83^+$DS /100 e) u odnosu na PHD nalaz (χ^2=8,23; p=0,016;). Medijan broja intraepitelne $CD83^+$DS za 1 je manji u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom u odnosu na ispitanike bez upale u PHD nalazu (p<0,05) (Tablica 6).

Tablica 6. Prikaz demografskih podataka, MES, kalprotektina (μg/g), intraepitelne $CD83^+DS$ (n / $CD83^+DS$ /100 e) u odnosu na PHD nalaz u skupini ispitanika s UC.

	PHD nalaz			
	Bez upale (n=15)	Aktiv kr.upala (n=62)	Kronična upala (n=33)	p
Spol; n (%)				0,568**
muškarci	8 (53)	28 (53)	14 (42)	
žene	7 (47)	24 (47)	19 (58)	
Dob (god)				0,614*
medijan (Q1-Q3; min-maks)	39 (30-60; 23-66)	45,5 (32-60; 15-78)	40 (32-52; 21-79)	
MES; n (%)				
0	8(53,3)	1(1,9)	11(33,3)	
1	6 (40)	5 (9,6)	10 (30,3)	
2	0	22 (42,3)	9 (27,3)	
3	1(6,7)	24 (49,6)	3 (9,1)	
Terapija; n(%)				
bez terapije	7(46,7)	41(78,8)	20(60,6)	
azatioprin1	3 (20)	6 (11,5)	6 (18,2)	
antiTNF	5 (33,3)	5 (9,6)	7 (21,2)	
Kalprotektin				0,001*
medijan (Q1-Q3; min-maks)	55(30-212; 12-1800)	1800(545-1800; 14-1800)	212(85-701; 14-1800)	
n $CD83^+DS$/100e				0,016*
medijan (Q1-Q3; min-maks)	2(1-4,5; 0-9)	1(0-2; 0-8)	1(0-3; 0-8)	

*Kruskal Wallis test; **χ^2 test
MES: 0 - inaktivna bolest;1 - blaga bolest; 2 - umjerena aktivnost bolesti; 3 - teška aktivnost bolesti

5.2.1. ANALIZA ISPITANIKA S UC PREMA POJAVNOSTI INTRAEPITELNE CD83^{+}DS

Nema statistički značajne razlike ispitanika prema spolu (χ^2=0.391; p=0,532) ni prema dobi (Z=0,629; p=0,530) u odnosu na pojavnost intraepitelne CD83^{+}DS (n CD83^{+}DS /100 e = 0;≥1)

Za 2,8 puta je veći udio ispitanika s MES 0 i MES 1 zajedno u skupini s n CD83^{+}DS/ 100 e ≥1 u odnosu na skupinu n CD83^{+}DS/ 100 e = 0 (χ^2=9,5; p=0,002). Izgled za pojavnost intraepitelne n CD83^{+}DS/ 100 e ≥1 4,7 puta je veći u skupini ispitanika s MES 0,1 u odnosu na skupinu ispitanika s MES 2,3 (OR: 4,7; 95%CI=1,8-12,2; p=0,002).

Razdioba ispitanika prema vrijednostima kalprotektina (µg/g) (podijeljenog u 4 skupine temeljem medijana i kvartila) nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na pojavnost intraepitelne CD83^{+}DS (n CD83^{+}DS /100 e = 0;≥1) (χ^2=2,11; p=0,555).

Zbog malog broja bolesnika s n CD83^{+}DS/ 100 e = 0 u skupini ispitanika s PHD nalazom bez upale i s kroničnom upalom u daljnjoj analizi ispitana je razdioba ispitanika s aktivnom kroničnom upalom prema ispitanicima bez upale i kroničnom upalom zajedno u odnosu na pojavnost intraepitelne CD83^{+}DS (n CD83^{+}DS /100 e = 0;≥1) i dokazana je statistički značajna razlika (χ^2=3,97; p=0,046). Izgled za pojavnost intraepitelne n CD83^{+}DS/ 100 e ≥1 na za 2,6 puta je veći u skupini ispitanika bez upale i kroničnom upalom zajedno u odnosu na skupinu ispitanika s aktivnom kroničnom upalom (OR:2,6; 95%CI=1,1-6; p=0,030).

U skupini ispitanika s intraepitelnom n CD83^{+}DS/ 100 e ≥1 tri puta je više ispitanika s terapijom (azatioprin;antiTNF) (χ^2=7,2; p=0,007). Izgled za pojavnost intraepitelne n CD83^{+}DS/ 100 e ≥1 za 4,5 puta je veći u skupini ispitanika s terapijom (azatioprin; antiTNF) u odnosu na skupinu ispitanika bez terapije (OR: 4,5; 95%CI=1,6-13; p=0,006) (Tablica 7).

Tablica 7. Prikaz demografskih i ispitivanih varijabli (MES; PHD; kalpotektin; terapija) u odnosu na pojavnost intraepitelne $CD83^+DS$ (n $CD83^+DS$ /100 e = 0;≥1) u skupini ispitanika s UC.

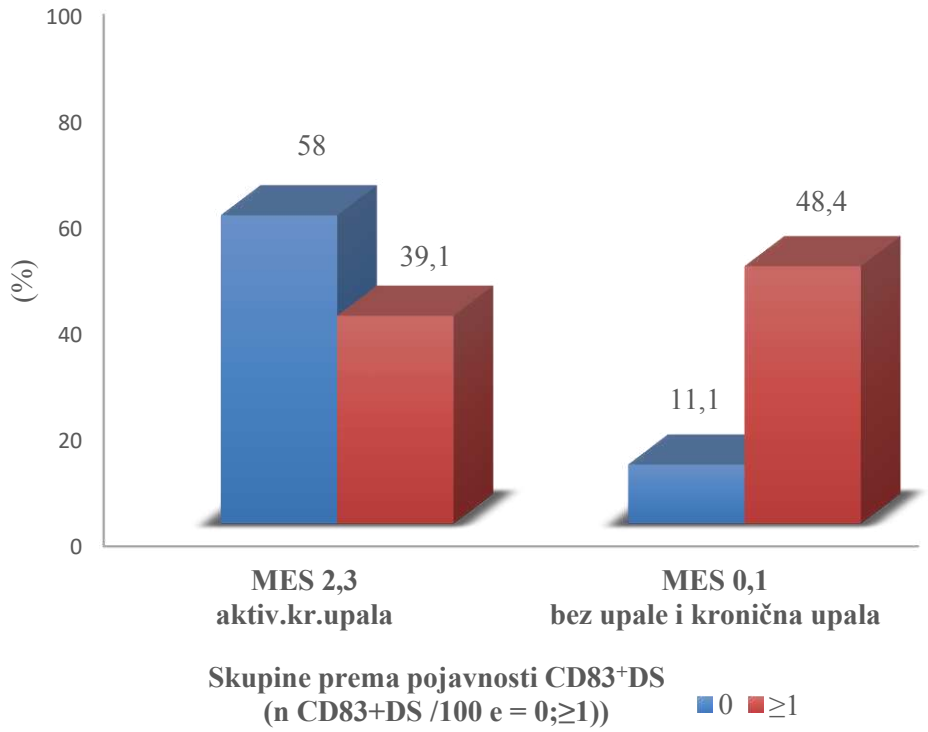
	n $CD83^+DS$/ 100 e				
	0	≥1	p	OR (95%CI)	p††
Spol; n (%)					
muškarci	20 (55)	30 (47)	0,532**		
žene	16 (44)	34 (54)			
Dob (god) medijan (Q1-Q3; min-maks)	44 (31-61,5; 15-79)	40 (32-55; 19-75)	0,530*		
Skupine MES; n (%)			0,002**		
0,1	7 (19,4)	34 (53)		4,7 (1,8-12,2)	0,002
2,3†	29 (81)	30 (47)			
Kalprotektin (µg/g); n(%)			0,555**		
12-14	6 (16,7)	19 (29,7)			
147-550	10 (27,8)	15 (23,4)			
551-1799	6 (16,7)	9 (14,1)			
>1800	14 (38,9)	21 (32,8)			
PHD nalaz; n (%)			0,079**		
bez upale†	3 (8,3)	12 (18,8)			
kronična	9 (25)	24 (37,5)			
aktiv.kr.upala	24 (66,7)	28 (43,8)			
PHD nalaz; n (%)			0,046**		
bez upale, kronična upala	12(33)	28(44)		2,6 (1,1-6)	0,030
aktiv.kr.upala †	24(67)	36(50)			
Terapija; n (%)			0,007**		
bez terapije†	31 (86)	37 (58)		4,5 (1,6-13)	0,006
s terapijom	5 (14)	27 (42)			

*Mann Whitney U test; **χ^2 test; †Referentni nivo; †† Logistička regresija
MES: 0-inaktivna bolest;1-blaga bolest;2-umjerena aktivnost bolesti;3-teška aktivnost bolesti

Kako je od 41 ispitanika s MES 0,1 njih 35 (85%) pripadalo skupini kronične upale i bez upale, a od 59 ispitanika s MES 2,3 njih 47 (78%) imalo aktivnu kroničnu upalu formirana je varijabla MES-PHD (Tablica 6):

- ispitanici s MES 0,1 s kroničnom upalom i bez upale (n=35)
- ispitanici s MES 2,3 s aktivnom kroničnom upalom (n=46)

Analizirane su ove dvije skupine ispitanika u odnosu na pojavnost intraepitelne CD83^{+}DS (n CD83+DS /100 e = 0;≥1). Varijabla MES-PHD nalaz statistički je značajno povezana s pojavnosti intraepitelne CD83^{+}DS (n CD83^{+}DS /100 e = 0;≥1) (χ^2=9,4;p=0,002). Udio ispitanika s MES 0,1-PHD bez upale i kronična upala u skupini s n CD83^{+}DS/ 100 e ≥1 za 4 puta je veći nego u skupini n CD83^{+}DS/ 100 e = 0 (χ^2=9,4; p=0,002). Izgled za pojavnost intraepitelne n CD83^{+}DS/ 100 e ≥1 za 6,5 puta veći je u skupini MES 0,1-PHD bez upale i kronična upala u odnosu na skupinu MES 2,3-PHD aktivna kronična upala (OR:6,5; 95%CI 1,9-21,4; p=0,002) (Slika 15).



Slika 15. Razdioba ispitanika prema MES-PHD nalazu u odnosu na pojavnost intraepitelne CD83^{+}DS (n CD83^{+}DS /100 e = 0;≥1) u ispitanika s UC.
MES: 0-inaktivna bolest; 1-blaga bolest; 2-umjerena aktivnost bolesti; 3-teška aktivnost bolesti.

U multivarijatnoj logističkoj regresiji zavisna varijabla je intraepitelna CD83^{+}DS (n CD83^{+}DS /100 e = 0;≥1), a nezavisne varijable su terapija i MES-PHD. Multivarijatnom logističkom regresijom potvrđen je utjecaj djelovanja MES-PHD nalaza na pojavnost

intraepitelne $CD83^{+}DS$ (n $CD83^{+}DS$ /100 e = 0;≥1). Izgled za pojavnost intraepitelne n $CD83^{+}DS$/ 100 e ≥1 za 5 puta je veći u skupini MES 0,1-PHD bez upale i kronična upala zajedno u odnosu na MES 2,3- PHD aktivna kronična upala usklađeno za terapiju (OR:5; 95%CI 1,4-17,5; p=0,012). Nije potvrđena povezanost pojavnosti $CD83^{+}DS$ (n $CD83^{+}DS$ /100 e = 0;≥1) s terapijom. (Tablica 8).

Tablica 8. Rezultati multivarijatne logističke regresije za pojavnost intraepitelne n $CD83^{+}DS$ ≥1 / 100 e u odnosu na intraepitelnu n $CD83^{+}DS$= 0 /100 e.

Nezavisne varijable	OR (95%CI)	p*
MES-PHD		
MES 2,3 aktiv.kr.upala † MES 0,1 bez upale i kronična upala	5 (1,4-17,5)	0,012
Terapija		
Ne†	2,2 (0,61-8,5)	0,229
Da		

***** logistička regresija; †referentni nivo

5.2.1. ANALIZA ISPITANIKA S UC PREMA PRIMJENJENOJ TERAPIJI I POJAVNOSTI INTRAEPITELNE CD83$^+$DS U ODNOSU NA KONTROLNU SKUPINU

Postoji statistički značajna razlika u pojavnosti intraepitelne CD83$^+$DS (n CD83$^+$DS /100 e = 0;≥1) u odnosu na ispitivane skupine (kontrola; UC bez terapije; UC na azatioprinu; UC na anti TNF-u) (χ^2=13,4;p<0,004; Cramer`s V=0,278). U skupini ispitanika s UC bez terapije broj ispitanika s n CD83$^+$DS/ 100 e = 0 je 46% i n CD83$^+$DS/ 100 e ≥1 je 54%. Udio ispitanika s pojavnošću intraepitelne n CD83$^+$DS/ 100 e ≥1 za 1,4 puta je veći u kontrolnoj skupini u odnosu na ispitanike s UC bez terapije. Pojavnost intraepitelne n CD83$^+$DS/ 100 e ≥1 za 1,6 puta je veći u skupini ispitanika s UC na azatioprinu i za 1,5 puta je veći u skupini ispitanika na anti TNF terapiji nego u skupini ispitanika bez terapije s UC. Iz tablice 9 je vidljivo da se udio ispitanika s intraepitelne n CD83$^+$DS/ 100 e ≥1 u skupini ispitanika na azatiopinu i anti TNF-u gotovo izjednačio s udjelom istih u kontrolnoj skupini.

Tablica 9. Prikaz povezanosti pojavnosti intraepitelne CD83$^+$DS (n CD83$^+$DS /100 e = 0;≥1) u kontrolnoj skupini i skupinama ispitanika s UC u odnosu na primijenjenu terapiji.

	Kontrola	Ispitanici s UC			
		Terapija			
n CD83$^+$DS/100e		bez th	azatioprin	anti TNF	p*
0	17 (23)	31 (46)	2 (13)	3 (18)	0,004
≥1	58 (77)	36 (54)	13 (87)	14 (82)	

* χ^2 test

5.3. ANALIZA ISPITANIKA S CROHNOVOM BOLEŠĆU

5.3.1. ANALIZA ISPITANIKA S CD PREMA PHD NALAZU

Ispitanici s CD nisu se statistički značajno razlikovali prema dobi (χ^2=0,067; p=0,967) ni prema spolu u odnosu na PHD nalaz (χ^2=0,156; p=0,925).

Nije dokazana statistički značajna razlika broja intraepitelnih $CD83^+$DS (n $CD83^+$DS /100 e) u odnosu na PHD nalaz u ispitanika s CD (χ^2=5,5;p=0,064).

Ispitanici s CD statistički su se značajno razlikovali prema SES-CD u odnosu na PHD nalaz (χ^2=11,7;p=0,003). Medijan SES-CD u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom za 5,6 je veći nego u ispitanika bez upale (p=0,003) i za 2 je veći u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom nego kod ispitanika s kroničnom upalom (p=0,056).

Postoji statistički značajna razlika vrijednosti kalprotektina (µg/g) u odnosu na PHD nalaz (χ^2=7,95;p=0,019). Medijan kalprotektina u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom za 910 je veći nego u ispitanika s kroničnom upalom (p=0,033) (Tablica 10).

Tablica 10. Prikaz demografskih varijabli, broja intraepitelne $CD83^+DS$ (n $CD83^+DS$ /100 e), SES-CD, kalprotektina (μg/g) u odnosu na PHD nalaz u ispitanika s CD.

	PHD nalaz			
	bez upale (n=10)	Aktiv.kr.upala (n=17)	kronična upala (n=17)	p
Spol; n (%)				0,952**
muškarci	4 (40)	8 (47)	8 (47)	
žene	6 (60)	9 (53)	9 (53)	
Dob (god) medijan (Q1-Q3; min-maks)	32 (28-46; 25-80)	36 (30-47; 18-64)	37 (25-50; 21-64)	0,967*
n $CD83^+DS$/ 100 e medijan (Q1-Q3; min-maks)	3,5 (3-4,5; 0-9)	2,1 (1-3,5; 0-7)	3 (1-4,5; 0-10)	0,064*
SES-CD medijan (Q1-Q3; min-maks)	1,6 (1,2-6,1; 0-11)	7,2 (6,2-14,5; 1,6-26)	5,2 (3,4-6,8; 0-12)	0,003**
Kalprotektin medijan (Q1-Q3; min-maks)	257 (84-925; 30-1800)	1230 (541-1800; 3-1800)	320 (130-538; 30-1800)	0,019
Terapija; n(%)				
bez terapije	2(20)	11(64,7)	6(35,3)	
azatioprin1	4(40)	5(29,4)	4(23,5)	
antiTNF	4(40)	1(5,9)	7(41,2)	

**χ^2 test; *Kruskal Wallis test

5.3.1. ANALIZA ISPITANIKA S CD PREMA BROJU INTRAEPITELNE CD83$^+$DS

U ispitanika s CD bilo je:

- 3 ispitanika s intraepitelnom CD83$^+$DS/ 100 e = 0
- 15 ispitanika s intraepitelnom CD83$^+$DS/ 100 e = 1
- 26 ispitanika intraepitelnom CD83$^+$DS/ 100 e = 2 - 10

Zbog gore navedene razdiobe ispitanika prema intraepitelnoj CD83$^+$DS podijelili smo ispitanike u dvije skupine:

- Intraepitelna CD83$^+$DS ≤ 1 (n CD83$^+$DS / 100 e) (n=18)
- Intraepitelna CD83$^+$DS > 1 (n CD83$^+$DS / 100 e) (n=26).

Skupine bolesnika s intraepitelnom CD83$^+$DS (n CD83$^+$DS / 100 e = ≤1;>1) nisu se statistički značajno razlikovale prema spolu (χ^2=0.176; p=0,675) ni prema dobi (Z=0,153; p=0,879) .

Medijan SES-CD je za 2,8 veći kod ispitanika s intraepitelnom n CD83$^+$DS/ 100 e ≤1 u odnosu na intraepitelnu n CD83$^+$DS/ 100 e >1 (Z=2,57; r=0,39; p=0,011).

Udio ispitanika s SES-CD ≤ 5.9 za 3 puta je veći u skupini intraepitelne n CD83$^+$DS/ 100 e >1 nego u skupini intraepitelnom n CD83$^+$DS/ 100 e ≤1. Udio ispitanika s SES-CD >5.9 za 2,5 puta je veći u onih s intraepitelnom n CD83$^+$DS/ 100 e ≤1 u odnosu na one s intraepitelnom n CD83$^+$DS/ 100 e >1 (χ^2=7,6; p=0,006). Izgled za intraepitelnu n CD83$^+$DS/ 100 e >1 odnosu intraepitelnu n CD83$^+$DS/ 100 e ≤1 za 7,9 puta je veći u skupini SES-CD ≤ 5,9 u odnosu na skupinu sa SES-CD >5,9 (OR=7,9; 95%CI:2-31; p=0,006).

Medijan kalprotektina (µg/g) je za 695 veći kod ispitanika s intraepitelnom n CD83$^+$DS/ 100 e ≤1 u odnosu na ispitanike s intraepitelnom n CD83$^+$DS/ 100 e >1 (Z=2,99; r=0,45; p=0,003). Udio ispitanika s kalprotektin ≤449 za 3 puta je veći u skupini ispitanika s intraepitelnom n CD83$^+$DS/ 100 e >1 u odnosu na skupinu ispitanika s intraepitelnom

n $CD83^+$DS/ 100 e ≤1. Udio ispitanika s kalprotektinom >449 za 2,5 puta je veći u ispitanika s intraepitelnom n $CD83^+$DS/ 100 e ≤1 u odnosu ispitanike s intraepitelnom n $CD83^+$DS/ 100 e >1 (χ^2=7,6; p=0,006). Izgled za intraepitelnu n $CD83^+$DS/ 100 e >1 u odnosu na intraepitelnu n $CD83^+$DS/ 100 e ≤1 za 7,9 puta je veći u skupini ispitanika s kalprotektinom ≤ 449 u odnosu na skupinu sa kalprotektina >449 (OR=7,9; 95%CI:2-31; p=0,006).

Razdioba ispitanika prema PHD nalazu statistički se značajno razlikovala u odnosu na skupine intraepitelne $CD83^+$DS (n $CD83^+$DS/ 100 e = ≤1;>1) (χ^2=11,1; p=0,004). Zbog malog uzorka analizirani su ispitanici s aktivnom kroničnom upalom u PHD nalazu u odnosu na ostale ispitanike (bez upale i kronična upala zajedno). Udio ispitanika s PHD nalazom bez upale i kronična upala zajedno za 2,4 puta je veći u skupini ispitanika s intraepitelnom n $CD83^+$DS/ 100 e >1 nego u skupini ispitanika s intraepitelnom n $CD83^+$DS/ 100 e ≤1. Udio ispitanika s aktivnom kroničnom upalom u PHD nalazu za 7,4 puta je veći u skupini ispitanika s intraepitelnom n $CD83^+$DS/ 100 e ≤1 u odnosu na skupinu ispitanika s intraepitelnom n $CD83^+$DS/ 100 e >1 (χ^2=8,2; p=0,004). Izgled za intraepitelnu n $CD83^+$DS/100 e >1 u odnosu na intraepitelnu n $CD83^+$DS/ 100 e ≤ 1 za 8,4 puta je veći u skupini ispitanika s kroničnom upalom i bez upale zajedno u odnosu na ispitanike s aktivnom kroničnom upalom u PHD nalazu (OR=8,4; 95%CI:2,1-33; p=0,003).

Gotovo svi ispitanici u skupini intraepitele n $CD83^+$DS/ 100 e >1 su dobili terapiju, a u skupini intraepitelne n $CD83^+$DS/ 100 e ≤ 1 nisu. Glede terapije ovo su potpuno različite skupine (Tablica 11)

Tablica 11. Prikaz povezanosti demografski i istraživanih varijabli (SES-CD;PHD nalaz; kalprotektin (μg/g); terapija) u odnosu na intraepitelne $CD83^+DS$ (n $CD83^+DS$/ 100 e = ≤1;>1) u skupini s CD.

	n $CD83^+DS$/ 100e				
	≤1	>1	p	OR (95%CI)	p††
Spol; n (%)			0,176**		
muškarci	7 (39)	13 (50)			
žene	11 (61)	13 (50)			
Dob (god.) medijan (Q1-Q3; min-maks)	36,5 (29-42; 15-79)	38,6 (27-52; 18-64)	0,879*		
SES-CD medijan (Q1-Q3; min-maks)	7,2 (5,8-9,5; 1,6-18,2)	4,4 (1,6-6,8; 0-26)	0,011*		
SES-CD; n (%)			0,006**		
≤5,9	4 (22)	18 (69)		7,9 (2-31)	0,004
>5,9†	14 (78)	8 (31)			
Kalprotektin medijan (Q1-Q3; min-maks)	985(445-1800; 30-1800)	290 (99-568; 3-1800)	0,003*		
Kalprotektin			0,006**		
≤449	4 (22)	18 (69)		7,9 (2-31)	0,004
>449†	14 (78)	8 (31)			
PHD; n (%)			0,004**		
bez upale†	1 (5,6)	9 (34,6)			
kronična upala	5 (27,8)	12 (46,2)			
aktiv.kr upala	12 (66,7)	5 (19,2)			
PHD; n (%)			0,004**		
bez upale, kronična upala	6 (33)	21 (81)		8,4 (2,1-33)	0,003
aktiv.kr upala †	12 (67)	5 (9)			
Terapija; n (%)					
bez terapije	15 (83)	4 (15)			
s terapijom	3 (17)	22 (85)			

**χ^2 test; *Mann Whitney U test; †Referentni nivo; †† Logistička regresija
NAPOMENA: SES-CD i kalprotektin smo podijelili u dvije skupine temeljen njihovih medijana

U skupini ispitanika s CD analizom SES-CD (≤5,9;>5,9) i kalprotektina (≤449;>449) utvrđeno je da među njima postoji velika statistička značajna povezanost. U skupini ispitanika sa SES-CD ≤ 5,9 njih 18 (82%) imalo je vrijednost kalprotektina ≤ 449, a u skupini ispitanika

sa SES-CD > 5,9 njih 18 (82%) je imalo vrijednost kalprotektina > 449 pa su napravljene dvije skupine ispitanika:

- Ispitanici sa SES-CD ≤ 5,9 i kalprotektinom ≤ 449 (n=18)
- Ispitanici sa SES-CD > 5,9 i kalprotektinom > 449 (n=18)

Ovako novoformirana varijabla upotrebljena je kao nezavisna varijabla u mulitivarijatnoj logističkoj regresiji. Osim ove varijable uzet je i PHD nalaz (aktivna kronična upala;bez upala i kronična upala zajedeno) kao druga nezavisna varijabla. Zavisna varijabla je intraepitelna $CD83^{+}DS$ (n $CD83^{+}DS$/ 100 e = ≤1;>1). Rezultati multivarijatne logističke regresije potvrđuju povezanost intraepitelne $CD83^{+}DS$ (n $CD83^{+}DS$/ 100 e = ≤1;>1) s PHD nalazom i prikazani su u tablici 12.

Tablica 12. Rezultati multivarijatne logističke regresije za pojavnost intraepitelne n $CD83^{+}DS$/ 100 e >1 u odnosu na intraepitelnu n $CD83^{+}DS$/ 100 e ≤1.

Nezavisne varijable	OR (95%CI)	P*
SES-CD ≤ 5,9 i kalprotektin ≤ 449	0,24 (0,051-1,1)	0,066
SES-CD > 5,9 i kalprotektin > 449†		
PHD nalaz		0,049
bez upale i kronična upala	4,6 (1-21)	
aktiv.kr upala †		

***** logistička regresija; †referentni nivo

5.3.1. ANALIZA ISPITANIKA S CD PREMA PRIMJENJENOJ TERAPIJI I BROJU INTRAEPITELNE CD83$^+$DS U ODNOSU NA KONTROLNU SKUPINU

Postoji statistički značajna razlika broja intraepitelne CD83$^+$DS (n CD83$^+$DS /100 e) u odnosu na ispitivane skupine (kontrola; CD bez terapije; CD na azatioprinu; CD na antiTNF-u) (χ^2=27,2;p<0,001).

U kontrolnoj skupini razdioba ispitanika prema intraepitelnoj CD83$^+$DS (n CD83$^+$DS/ 100 e = ≤1;>1) je uniformna. U skupini ispitanika s CD bez terapije udio ispitanika s intraepitelnom n CD83$^+$DS/ 100 e ≤1 za 1,5 puta je veći nego udio ispitanika s intraepitelnom n CD83$^+$DS/ 100 e ≤1 u kontrolnoj skupini. Razvidno je da su svih 12 ispitanika na terapiji s anti TNF imali intraepitelnu n CD83$^+$DS/ 100 e >1. U skupini ispitanika s azatioprinom udio ispitanika s intraepitelnom n CD83$^+$DS/ 100 e >1 za 3,7 puta je veći od udjela ispitanika s intraepitelnom n CD83+DS/ 100 e >1 u skupini bez terapije (Tablica 13).

Tablica 13. Prikaz povezanosti broja intraepitelne CD83+DS (n CD83+DS/ 100 e = ≤1;>1) u kontrolnoj skupini i skupinama ispitanika s CD u odnosu na terapiju.

	Kontrola	Ispitanici s CD			
		Terapija			
		bez terapije	azatioprin	anti-TNF	p*
n CD83$^+$DS/ 100e					<0,001
≤1	40 (53)	15 (79)	3 (23)	0 (0)	
>1	35 (47)	4 (21)	10 (77)	12 (100)	

* χ^2 test

6. DISKUSIJA

Crohnova bolest (CD) i ulcerozni kolitis (UC), kronične su upalne bolesti gastrointestinalnog trakta koje objedinjujemo pod nazivom upalne bolesti crijeva (IBD). Rastuće spoznaje u imunologiji značajno utječu na spoznaje o patofiziološkim mehanizmima nastanka IBD. Sve se više u centar patofiziološkog mehanizma nameće dendritična stanica (DS) kao centralna antigen prezentirajuća stanica u crijevu. Međutim, točna funkcija DS i njenih subpopulacija ostaje i dalje nepoznata. Spoznaja o njenim ulogama u upalnom procesu mukoze crijeva mogla bi osigurati informacije o mehanizmima koji dovode do upalnih bolesti crijeva i informacije o mehanizmina koji ograničavanju upalu crijeva i potiču zaštitni imuni odgovori.

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije utvrdili su da je u bioptičkom uzorku ispitanika s CD značajno veći udio intraepitelnih $CD83^{+}$DS u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu s UC. Ovi rezultati su bili neovisni o spolu, dobi, upali u PHD nalazu i vrijednostima kalprotektina. Dosadašnje objavljene studije s DS također pokazuju povećan broj stanica koji iskazuju kostimulatorne molekule kao što su CD40, CD80, CD83 i CD86 u mukoznom tkivu ispitanika s CD i UC (78). Istovremeno studije broja DS u krvi pokazuju značajno smanjenje broja nezrelih stanica što se objašnjava kao rezultat migracije stanica u upaljeno tkivo crijeva. U pojedinim studijama smanjenje broja stanica korelira s težinom i opsegom upalnog procesa (77, 188, 189). Baumgart i suradnici izvijestili su da je u bolesnika s IBD izražavanje kostimulirajuće molekule CD86 na DS periferne krvi nisko, a izražavanje molekule CD83 na DS povišeno (77). Identične rezultate prijavljuju Velde i suradnici te Middel i suradnici (33, 78). Bell i suradnici u svojoj studiji, također na bioptičkim uzorcima kolona, nisu dokazali statistički značajnu razliku broja DS bez obzira na razliku medijana broja DS (32).

U ovom istraživanju, analizom broja i pojavnosti zrelih intraepitelnih $CD83^{+}$DS u ispitanika s različitom aktivnosti bolesti u PHD nalazu, nađen je značajno manji broj i pojavnost intraepitelnih $CD83^{+}$DS u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom u PHD nalazu nego u ispitanika s kroničnom upalom i bez upale, neovisno o spolu i dobi ispitanika. U studiji Bella i

suradnika također je rađena usporedba po aktivnosti upale i broju DS u bioptičkim uzorcima kolona. U njihovim rezultatitama postoji razlika medijana, ali ona nije postigla traženu statističku značajnost (32). Studije rađene na uzorcima periferne krvi bolesnika s IBD ukazuju da smanjenje broja cirkulirajuće DS korelira s težinom i opsegom upalnog procesa (77, 188, 189).

Uspoređujući pojedine skupine naših ispitanika različitih aktivnosti bolesti u PHD nalazu prema vrijednostima kalprotektina, vrijednosti kalprotektina su statistički značajno veće u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom u PHD nalazu u odnosu na ispitanike s kroničnom upalom i onih bez upale. Ovu činjenicu inicijalno su je prikazali Roseth i suradnici 1997 godine uspoređujući razinu kalprotektina s endoskopskom i PHD aktivnosti bolesti u odraslih ispitanika s UC (133). Identične rezultate su potvrdili Bunn i Limburg i Costa kod bolesnika s UC i CD (190).

U ovom ispitivanju, uspoređujući skupine ispitanika različitog tipa upalne bolesti, postoji statistički značajna razlika. Izgled za pojavnost intraepitelne $CD83^{+}$DS značajno je veći u skupini ispitanika s CD u odnosu na ispitanike s UC i kontrolne skupine. Nema studija koje su uspoređivale tip upalne bolesti i pojavnost zrele intraepitelne $CD83^{+}$DS. Radwan i suradnici prvenstveno su uspoređivali obje upalne bolesti i kontrolnu skupinu zdravih određujući broj DS u perifernoj krvi. Uočena je značajno manja pojavnost DS u perifernoj krvi u obje skupine bolesnika, s UC i CD, u odnosu na kontrolnu skupinu, što autori objašnjavaju migracijom stanica u periferna tkiva, prvenstveno mukozu, u IBD (189). Middel i suradnici dokazali su povećan broj DS u reseciranom tkivu ispitanika s CD (78).

Uspoređujući pojavnost intraepitelne $CD83^{+}$DS u ispitanika različite aktivnosti bolesti u PHD nalazu, u ovom istraživanju je značajno manja pojavnost intraepitelne $CD83^{+}DS_{\geq 1}$ u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom, u odnosu na ispitanike bez upale ili s kroničnom upalom. Middel i suradnici, određujući broj DS i uspoređujući uzorke u istog ispitanika s mjesta

aktivne i neaktivne upale u CD, nalaze veći broj DS u uzorcima s aktivnom upalom. Promatrajući baš $CD^{+}83$ DS, Midel je uočio da se u ispitanika s CD te stanice većinom nakupljaju u lamini propriji i submukozi (78).

U analizi pojavnosti intraepitelne $CD83^{+}$DS u skupinama ispitanika različitih prema primjenjenoj terapiji, postoji statistički značajna razlika među skupinama. Izgled za pojavnost intraepitelne $CD83^{+}$DS značajno je veća u ispitanika s terapijom u odnosu na one bez terapije. Silva i suradnici su prikazali utjecaj terapije na broj DS kod bolesnika s CD. To istraživanje je pokazalo da se broj stanica statistički značajno promijenio samo u skupini ispitanika koji su uzimali sistemske kortikosteroide (193).

Uspoređujući ispitanike s UC i CD dobivena je granična vrijednost broja intraepitelnih $CD83^{+}$DS, koji bi moga biti značajna u razlučivanju CD od UC u bioptičkim uzorcima kolona. Do sada rađene studije nisu nikada uspoređivale ove dvije vrste bolesti niti mogućnosti njihovog međusobnog razlikovanja uz pomoć DS. Stoga su potrebna daljnja istraživanja koja bi potvrdila ulogu DS kao mogućeg markera u razlikovanju UC od CD.

U ovom istraživanju, među skupinama UC ispitanika različite aktivnosti upale u PHD nalazu, dobivena je statistički značajna razlika broja i pojavnosti intraepitelne $CD83^{+}$DS u odnosu na aktivnosti upale u PHD nalazu. Razliku čine ispitanici s aktivnom kroničnom upalom. Izgled za pojavnost intraepitelne $CD83^{+}DS\geq1$ značajno je veći u skupini ispitanika koji u PHD nalazu nemaju upale ili imaju kroničnu upalu nego u skupini ispitanika s aktivnom kroničnom upalom. Bates i suradnici objavili su rezultate na mišjem modelu kolitisa gdje su ispitivali funkciju DC stanice (194). U svom istraživanju pretpostavili su važnost CD83 molekule DS u regulaciji imunološke homeostaze, Dokazali su da bi gubitak CD83 u DS doveo do pogoršanja upale u modelu kolitisa (194). Potvrdili su da DS izolirane iz lamine proprije miševa s kolitisom imaju značajno smanjenu ekspresiju markera sazrijevanja CD83 (194). Ovaj mišji model kolitisa mogao bi dati objašnjenje kako DS u imunološkom rezervoaru kao

što je crijevna lamina proprija spriječava neprimjerenu upalu. Prekomjerna ekspresija CD83 na površini sluznice štiti od kolitisa, dok gubitak ekspresije CD83 na DS pogoršava kolitis. Po prvi put pokazuje se uloga $CD83^{+}$DC u imunološkoj homeostazi (194). U istraživanju Kawashima i suradnika na kirurškim uzorcima bolesnika s UC imunoflorescentnom metodom iz kulture stanica, izoliran je povećan broj DS, prvenstveno izoliran iz limfnih agregata u uzorcima s PHD aktivnom bolesti (195). Povišenu razinu DS dobio je Baumgart sa suradnicima, ali ovaj put izolacijom DS iz krvi imunocitokemijskom metodom (196).

U našem straživanju, uspoređujući pojavnost intraepitelne $CD83^{+}$DS u skupinama ispitanika s UC različitog indeksa procjene endoskopske aktivnosti MES, u skupini ispitanika s MES 0,1 značajno je veća pojavnost $CD83^{+}$DS. Duchmann i suradnici, indirektno određujući infiltaraciju lamine proprije T limfocitima u endoskopski upalno aktivnom djelu crijevne sluznice, došli su do zaključka o prisutnosti DS kao aktivatora istih (197).

U ovom istraživanju, u skupini ispitanika s UC multivarijatnom analizom potvrđena je povezanost kombiniranog djelovanja indeksa procjene endoskopske aktivnosti MES i PHD nalaza na pojavnost intraepitelne $CD83^{+}$DS. Izgled za pojavnost intraepitelne $CD83^{+}$DS značajno je veći u skupini MES 0,1-PHD bez upale ili s kroničnom upalom, u odnosu na MES 2,3- PHD aktivna kronična upala, usklađeno za terapiju. Do sada nema studije koja uspoređuje istovremeno endoskopsku i patohistološku aktivnost bolesti ispitanika s UC s pojavnošću intraepitelne $CD83^{+}$DS.

Ovo istraživanje je, nadalje, pokazalo, da je u skupini ispitanika s UC u kojoj se pojavljuje intraepitelna $CD83^{+}$DS značajno više ispitanika na terapiji (azatiprin, antiTNF) nego onih bez terapije. U istraživanju Bhandaru i suradnika in vitro je potvrđen utjecaj azatioprina na migraciju DS te otpuštanje TNF-L (198). Hart i suradnicu također su procjenjivali učinak azatioprina na DS kroz ekspresiju TLR i nisu dobili statistički značajnu razliku u skupinama bez obzira na histološki stupanj upale (73).

Među skupinama ispitanika s CD koji imaju različitu aktivnost upale u PHD nalazu, u ovojm istraživanju, nema statistički značajne razlike u broju intraepitelne $CD83^{+}$DS u odnosu na upalu u PHD nalazu. Zbog malog uzorka analizirani su ispitanici s PHD nalazom aktivne kronične upale u odnosu na ostale ispitanike (bez upale, kronična upala) i nađeno je da je udio tih ispitanika zajedno značajno veći u skupini bolesnika s CD koji imaju intraepitelnu $CD83^{+}DS>1$ nego u skupini intraepitelne $CD83^{+}DS\leq1$, te je multivarijatnom analizom potvrđena povezanost PHD nalaza s brojem intraepitelne $CD83^{+}$DS. Slične rezultate objavio je Silva sa suradnicima kada je uspoređivao uzorke tkiva s upalom i bez upale u bolesnika s CD (193). Bell i suradnici u ispitivanju na kulturi stanica uočavaju da odmah po uzimanju bioptičkog uzorka nije bilo statistički značajne razlike u broju DS između uzoraka s upalom i bez upale, iako u broju postoji razlika medijana (32). Middel i suradnici su u svom ispitivanju imali povišen broj DS u uzorcima koji u PHD-u imaju aktivnu upalu u odnosu na uzorke bez upale u bolesnika s CD (78).

Među ispitanicima s CD u ovom ispitivanju, medijan SES-CD značajno je veći kod skupine ispitanika gdje je broj intraepitelne $CD83^{+}DS \leq1$ u odnosu na intraepitelnu $CD83^{+}DS >1$. Do sada nema objavljene studije koja uspoređuje direktno endoskopski indeks aktivnosti bolest SES-CD s pojavnošću DS. Salim i suradnici su jedino analizirali klinički indeks aktivnosti bolesti CDAI i dobili pozitivnu korelaciju kliničkog indeksa s brojem DS (199).

Rezultati ove studije, također, pokazuju da je medijan vrijednosti kalprotektina značajno veći u skupini ispitanika s CD gdje je broj intraepitelne $CD83^{+}DS\leq1$ nego u skupini s intraepitelnom $CD83^{+}DS >1$. Do sada nema objavljene studije koja uspoređuje direktno fekalni kalprotektina i pojavnost DS. Većina dosadašnjih studija koja analizira medijan fekalnog kalprotektina u aktivnoj kroničnoj upali ukazuje na pozitivnu korelaciju fekalnog kalprotektina i aktivnosti bolesti kao endoskopski tako i u PHD nalazu (200 - 203).

U ovom istraživanju svi ispitanici na terapiji s antiTNF imali su intraepitelnu $CD83^{+}DS>1$. U skupini ispitanika s azatioprinom udio ispitanika s intraepitelnom $CD83^{+}DS>1$ je značajno veći od udjela ispitanika s intraepitelnom $CD83^{+}DS>1$ nego u skupini bez terapije. Hart i suradnicu također su procjenjivali učinak primjene antiTNF lijekova na DS kroz ekspresiju CD40 i dobili statistički značajnu razliku ekspresije CD40 na DS nakon primjene terapije u bioptičkim uzorcima (73). Silva i suradnici su prikazali rezultate učinka primjene kortikosteroida u odnosu na druge lijekove. Dokazali su značajno smanjen broj DS u bioptičkom uzorku crijeva skupine ispitanika na kortikostreoidnoj terapiju, dok u skupini ispitanika na azatioprinu nije dokazana ta razlika (193).

7. ZAKLJUČAK

1. Pojavnost $CD83^+$DS i broj intraepitelnih $CD83^+$DS u sluznici debeloga crijeva veća je u ispitanika s CD u odnosu na ispitanike s UC i kontrolne skupine. Vrijednost n $CD83^+$DS=0,5/ 100e mogla bi se koristiti kao granična vrijednost između UC prema CD i tako ukazati na tip IBD-a.
2. Pojavnost $CD83^+$DS i broj intraepitelnih $CD83^+$DS u sluznici debeloga crijeva manja je u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom u odnosu na ispitanike s kroničnom upalom i bez upale u PHD nalazu.
3. Multivarijatnom analizom dokazana je povezanost pojavnosti intraepitelnih $CD83^+$DS u sluznici debeloga crijeva s tipom bolesti, aktivnosti kronične upale u PHD nalazu i terapijom.
4. U ispitanika s UC:
    - Broj intraepitelnih $CD83^+$DS u sluznici debeloga crijeva manji je u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom u odnosu na ispitanike bez upale u PHD nalazu.
    - Pojavnost intraepitelnih $CD83^+$ DS u sluznici debeloga crijeva veća je u ispitanika s MES 0,1 u odnosu na ispitanike s MES 2,3 i nije ovisna o razini kalprotektina.
    - Multivarijatnom analizom dokazana je povezanost pojavnosti intraepitelne $CD83^+$DS u sluznici debeloga crijeva s varijablom MES-PHD nalaz.
    - Pojavnost intraepitelne $CD83^+$DS u sluznici debeloga crijeva veća je u ispitanika na azatioprinu i na anti TNF terapiji nego u ispitanika bez terapije. Pojavnost intraepitelne $CD83^+$DS u skupini ispitanika na azatiopinu i anti TNF-u gotovo se izjednačio s udjelom istih u kontrolnoj skupini.
5. U ispitanika s CD
    - broj intraepitelnih $CD83^+$DS veći u skupini ispitanika koji imaju u PHD nalazu kroničnu upalu ili bez upale u odnosu na ispitanike s aktivnom kroničnom upalom.
    - U ispitanika s CD postoji povezanost broja $CD83^+$DS sa SES-CD i kalprotektinom.

- Multivarijatnom analizom ispitanika s CD dokazana je povezanost broja $CD83^{+}DS$ u sluznici debeloga crijeva s PHD nalazom.
- Svi ispitanici na terapiji s antiTNF imali su n $CD83^{+}DS$/ 100 e >1, dok je u skupini ispitanika s CD na azatioprinu udio ispitanika veći u odnosu na skupini bez terapije.

8. SAŽETAK

UVOD: Crohnova bolest (CD) i ulcerozni kolitis (UC) predstavljaju dva fenotipa upalnih bolesti crijeva (IBD). Dendritična stanica (DS), glavna antigen prezentirajuća stanica mukoze crijeva, važan je čimbenik u patogenezi IBD-a.

ISPITANICI I METODE: U istraživanje je bilo uključeno 219 ispitanika (100-UC; 44-CD; 75-kontrolna skupina). Bioptički uzorci dobiveni kolonoskopijom obrađeni su histološki (određena je aktivnost upale) i imunohistokemijski primjenom primarnog protutijela za CD83 (određen je broj intraepitelnih $CD83^{+}$DS/ 100 enterocita). Određen je kalprotektin i endoskopski indeks aktivnost bolesti (MES i SES-CD).

REZULTATI: Broj i pojavnost intraepitelnih $CD83^{+}$DS najveća je u ispitanika s CD, a najmanja u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom. Logističkom regresijom potvrđena je povezanost pojavnosti intraepitelnih $CD83^{+}$DS s tipom bolesti, aktivnosti upale i terapijom. U ispitanika s UC broj intraepitelnih $CD83^{+}$DS najmanji je u ispitanika s aktivnom kroničnom upalom, a pojavnost je bila ovisna o MES-u i veća je u ispitanika na azatioprinu i antiTNF-u nego u ispitanika bez terapiji. U ispitanika s CD potvrđena je povezanost broja $CD83^{+}$DS sa SES-CD-om, kalprotektinom i patohistološkim nalazom. Svi ispitanici s CD na antiTNF-u imali su n$CD83^{+}$DS/100e>1.

ZAKLJUČAK: Pojavnost i broj intraepitelnih $CD83^{+}$DS u sluznici debeloga crijeva ovisi o tipu IBD bolesti, aktivnosti kronične upale, endoskopskim indeksima aktivnosti bolesti i primjenjenoj terapiji.

9. ABSTRACT

INRODUCTION: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are two phenotypes of the inflammatory bowel diseases (IBD). A dendritic cell (DC), the main antigen presenting cell in intestinal mucosa, is an important factor in pathogenesis of IBD.

SUBJECTS AND METHODS: Our study included 219 subjects (100 UC; 44 CD; 75 controls). Biopsy samples obtained by colonoscopy were analysed histologically (inflammation activity) and immunohistochemically by using primary antibodies for CD83 (intraepithelial $CD83^+$DS number / 100 enterocytes was counted). A calprotectin level and endoscopic index of disease activity (MES and SES-CD) were assessed.

RESULTS: The number and the presence of intraepithelial $CD83^+$DS was the highest in subjects with CD, and the lowest in subjects with active chronic inflammation. An association between the presence of intraepithelial $CD83^+$DS and the type of the disease, the inflammation activity and the therapy applied was confirmed by logistic regression. Among the UC subjects, the number of intraepithelial $CD83^+$DS was the lowest in subjects with active chronic inflammation, while its presence depended on MES, and it was also higher in subjects on azathioprine and anti-TNF than in those without therapy. Among the CD subjects, there is an association between the number of $CD83^+$DS and SES-CD, calprotectin levels and histopathology results. In all CD subjects who were on anti-TNF, the number of $CD83^+$DS/100 enterocytes was >1.

CONCLUSION: The presence and the number of colonic intraepithelial $CD83^+$DS depends on IBD phenotype, activity of chronic inflammation, endoscopic indexes of disease activity and applied therapy.

10. LITERATURA

1. De Preter V. Metabolomics in the Clinical Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease. Dig Dis. 2015;14(33):2-10.
2. Dupaul-Chicoine J, Dagenais M, Saleh M. Crosstalk between the intestinal microbiota and the innate immune system in intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2013;19(10):2227-37.
3. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. J Clin Invest. 2007;117(3):514-21.
4. Niess JH. Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2008;14(33):5138-48.
5. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. Annu Rev Immunol. 2010;28:573-621.
6. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med. 1973;137(5):1142-62.
7. Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. Gut. 2003;52(10):1522-9.
8. Leon F, Smythies LE, Smith PD, Kelsall BL. Involvement of dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Adv Exp Med Biol. 2006;579:117-32.
9. Banchereau J, Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998;392(6673):245-52.
10. Norbury CC. Drinking a lot is good for dendritic cells. Immunology. 2006;117(4):443-51.
11. Savina A. Amigorena S.Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. Immunol Rev. 2007;219:143-56.
12. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, ur. Osnove imunologije. Funkcije i poremećaji imunološkog sustava. Novi Sad: 5. izd. Svečilište u Splitu, 2016.

13. Honda K, Sakaguchi S, Nakajima C, Watanabe A, Yanai H, Matsumoto M, i sur. Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(19):10872-7.
14. ShiY, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. Nature. 2003;425(6957):516-21.
15. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, i sur. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2000;18:767-811.
16. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat Rev Immunol. 2003;3(12):984-93.
17. Reis e Sousa C, Diebold SD, Edwards AD, Rogers N, Schulz O, Spörri R. Regulation of dendritic cell function by microbial stimuli. Pathol Biol. 2003;51(2):67-8.
18. Rescigno M. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. Trends Microbiol. 2002;10(9):425-61.
19. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/NOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. Immunity. 2003;19(1):59-70.
20. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. Nature. 2007 Sep 27;449(7161):419-26.
21. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. J Leukoc Biol. 2007;82(6):1365-74.
22. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2003;21:685-711.

23. Wilson NS, El-Sukkari D, Villadangos JA. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. Blood. 2004 Mar 15;103(6):2187-95.

24. Larsson M, Fonteneau JF, Bhardwaj N. Cross-presentation of cell-associated antigens by dendritic cells. Curr Top Microbiol Immunol. 2003;276:261-75.

25. Belz GT, Carbone FR, Heath WR. Cross-presentation of antigens by dendritic cells. Crit Rev Immunol. 2002;22(5-6):439-48.

26. Ardavín C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. Nat Rev Immunol. 2003;3(7):582-90.

27. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol. 2002;2(3):151-61.

28. Maldonado-López R, Maliszewski C, Urbain J, Moser M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. J Immunol. 2001;167(8):4345-50.

29. Pavli P, Woodhams CE, Doe WF, Hume DA. Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cells from the mouse intestinal lamina propria. Immunology. 1990;70(1):40-7.

30. Liu LM, MacPherson GG. Rat intestinal dendritic cells: immunostimulatory potency and phenotypic characterization. Immunology. 995;85(1):88-93.

31. Pavli P, Hume DA, Van De Pol E, Doe WF. Dendritic cells, the major antigen-presenting cells of the human colonic lamina propria. Immunology 1993;78(1):132-41.

32. Bell SJ, Rigby R, English N, Mann SD, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Migration and maturation of human colonic dendritic cells. J Immunol. 2001;166(8):4958-67.

33. te Velde AA, van Kooyk Y, Braat H, Hommes DW, Dellemijn TA, Slors JF, i sur. Increased expression of DC-SIGN+IL-12+IL-18+ and CD83+IL-12-IL-18- dendritic cell populations in the colonic mucosa of patients with Crohn's disease. Eur J Immunol. 2003;33(1):143-51.

34. Liu LM, MacPherson GG. Lymph-borne (veiled) dendritic cells can acquire and present intestinally administered antigens. Immunology. 1991;73(3):281-6.

35. Kelsall BL, Strober W. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. J Exp Med. 1996;183(1):237-47.

36. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, i sur. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat Immunol. 2001;2(4):361-7.

37. Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD, i sur. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. J Exp. Med. 2000;191(3):435-44.

38. van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, i sur. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. Gastroenterology. 2001;121(2):337-49.

39. Karlsson M, Lundin S, Dahlgren U, Kahu H, Pettersson I, Telemo E. "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. Eur J Immunol. 2001;31(10):2892-900.

40. Kunkel EJ, Campbell DJ, Butcher EC. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. Microcirculation. 2003;10(3-4):313-23.

41. Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. J Exp Med. 2000;191(8):1381-94.

42. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Ait-Yahia S, Vaure C, Chemin K, i sur. Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. Transplantation. 2002;73(Suppl 1):S7-11.

43. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. J Exp Med. 1985;161(1):72-87.

44. Papadakis KA. Chemokines in inflammatory bowel disease. Curr Allergy Asthma Rep. 2004;4(1):83-9.

45. Ajuebor MN, Swain MG. Role of chemokines and chemokine receptors in the gastrointestinal tract. Immunology. 2002;105(2):137-43.

46. Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, Varki NM, Kagnoff MF. Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001;280(4):710-19.

47. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, A?t-Yahia S, i sur. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. J Exp Med. 1998;188(2):373-86.

48. Zhao X, Sato A, Dela Cruz CS, Linehan M, Luegering A, Kucharzik T, i sur. CCL9 is secreted by the follicle-associated epithelium and recruits dome region Peyer's patch CD11b+ dendritic cells. J Immunol. 2003;171(6):2797-803.

49. Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptors and their ligands. Curr Top Microbiol Immunol. 2002;270:81-92.

50. Gewirtz AT. Intestinal epithelial toll-like receptors: to protect and serve? Curr Pharm Des. 2003;9(1):1-5.

51. Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. J Clin Invest. 1997;100(1):6-10.

52. Mazzoni A, Segal DM. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. J Leukoc Biol. 2004;75(5):721-30.

53. Wu HY, Weiner HL. Oral tolerance. Immunol Res. 2003;28(3):265-84.

54. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. Microbes Infect. 2001;3(11):947-54.

55. Didierlaurent A, Sirard JC, Kraehenbuhl JP, Neutra MR. How the gut senses its content. Cell Microbiol. 2002;4(2):61-72.

56. 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;411(6837):599-603.

57. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. Science. 2005;307(5717):1920-5.

58. Malmström V, Shipton D, Singh B, Al-Shamkhani A, Puklavec MJ, Barclay AN, i sur. CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. J Immunol. 2001;166(11):6972-81.

59. Leithäuser F, Trobonjaca Z, Möller P, Reimann J. Clustering of colonic lamina propria CD4(+) T cells to subepithelial dendritic cell aggregates precedes the development of colitis in a murine adoptive transfer model. Lab Invest. 2001;81(10):1339-49.

60. Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, Thompson C, Joyce-Shaikh B, Stepankova R, i sur. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. Immunity.2006;25(2):309-18.

61. Annacker O, Coombes JL, Malmstrom V, Uhlig HH, Bourne T, Johansson-Lindbom B, i sur. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. J Exp Med. 2005;202(8):1051-61.

62. Travis MA, Reizis B, Melton AC, Masteller E, Tang Q, Proctor JM, i sur. Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. Nature. 2007;449(7160):361-5.

63. Westendorf AM, Fleissner D, Groebe L, Jung S, Gruber AD, Hansen W, i sur. CD4+Foxp3+ regulatory T cell expansion induced by antigen-driven interaction with intestinal epithelial cells independent of local dendritic cells. Gut. 2009;58(2):211-9.

64. Abe K, Nguyen KP, Fine SD, Mo JH, Shen C, Shenouda S, i sur. Conventional dendritic cell regulate the outcome of colonic inflammation independently of T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(43):17022-7.

65. Qualls JE, Tuna H, Kaplan AM, Cohen DA. Suppression of experimental colitis in mice by CD11c+ dendritic cells. Inflamm Bowel Dis. 2009;15(2):236-47.

66. Krajina T, Leithäuser F, Möller P, Trobonjaca Z, Reimann J. Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+T cell-induced colitis. Eur J Immunol. 2003; 33(4):1073-83.

67. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immuol. 2009;27:485-517.

68. Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, i sur. Consecutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. J Clin Invest. 2003;112(5):693-706.

69. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, i sur. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. J Clin Invest. 2006;116(5):1310-6.

70. Rescigno M, Nieuwenhuis EE. The role of altered microbial signaling via mutant NODs in intestinal inflammation. Curr Opin Gastroenterol. 2007;23(1):21-6.

71. Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. J Clin Invest. 2009;119(9):2441-50.

72. Vuckovic S, Florin TH, Khalil D, Zhang MF, Patel K, Hamilton I, i sur. CD40 and CD86 upregulation with divergent CMRF44 expression on blood dendritic cells in inflammatory bowel diseases. Am J Gastroenterol. 2001;96(10):2946-56.

73. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, i sur. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. Gastroenetrology. 2005;129(1):50-65.

74. Kaser A, Ludwiczek O, Holzmann S, Moschen AR, Weiss G, Enrich B, i sur. Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease. J Clin Immunol. 2004;24(1):74-85.

75. Souza HS, Elia CC, Spencer J, MacDonald TT. Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MAdCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease.Gut. 1999;45(6):856-63.

76. Arihiro S, Ohtani H, Suzuki M, Murata M, Ejima C, Oki M, i sur. Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease. Pathol Int. 2002;52(5-6):367-74.

77. Baumgart DC, Metzke D, Schmitz J, Scheffold A, Sturm A, Wiedenmann B, i sur. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. Gut. 2005;54(2):228-36.

78. Middel P, Raddatz D, Gunawan B, Haller F, Radzun HJ. Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism. Gut. 2006;55(2):220-7.

79. Yeung MM, Melgar S, Baranov V, Oberg A, Danielsson A, Hammarström S, i sur. Characterisation of mucosal lymphoid aggregates in ulcerative colitis: immune cell phenotype and TcR-gammadelta expression. Gut. 2000; 47(2):215-27.

80. Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horiike N, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. Clin Exp Immunol. 2002;128(3):504-10.

81. Ikeda Y, Akbar F, Matsui H, Onji M. Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2001;13(7):841-50.

82. Christ AD, Stevens AC, Koeppen H, Walsh S, Omata F, Devergne O, i sur. An interleukin 12- related cytokine is up-regulated in ulcerative colitis but not in Crohn's disease. Gastroenterology. 1998;115(2):307-13.

83. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. Immunity. 2002;17(5):629-38.

84. 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;411(6837):603-6.

85. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, i sur. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. Nature. 2012;491(7422):119-24.

86. Inohara N, Chamaillard M, McDonald C, Nu?ez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. Annu Rev Biochem. 2005;74:355-83.

87. Strober W, Watanabe T. NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease. Mucosal Immunol. 2011;4(5):484-95.

88. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol. 2008;8(6):458-66.

89. EPWG-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet. 2002;70(4):845-57.

90. Abraham C, Cho JH. Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. Inflamm Bowel Dis. 2006;12(7):641-50.

91. Girardin SE, Travassos LH, Hervé M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, i sur. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. J Biol Chem. 2003;278(43):41702-8.

92. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, i sur. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. J Biol Chem. 2003;278(8):5509-12.

93. Watanabe T, Asano N, Murray PJ, Ozato K, Tailor P, Fuss IJ, i sur. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. J Clin Invest. 2008;118(2):545-59.

94. Hedl M, Li J, Cho JH, Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(49):19440-5.

95. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. Nat Rev Immunol. 2006;6(1):9-20.

96. Bates J, Diehl L. Dendritic cells in IBD pathogenesis: an area of therapeutic opportunity?J Pathol. 2014; 232(2): 112-20.

97. Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, i sur. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. Nat Med. 2010;16(1):90-7.

98. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalh?es JG, i sur. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. Nat Immunol. 2010;11(1):55-62.

99. Deretic V. Autophagy: an emerging immunological paradigm. J Immunol. 2012;189(1):15-20.

100. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, i sur. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. Nat Genet. 2007;39(5):596-604.

101. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, i sur. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease Nat Genet. 2008;40(9):1107-12.

102. Wang K, Zhang H, Kugathasan S, Annese V, Bradfield JP, Russell RK, i sur. Diverse genome-wide association studies associate the IL12/IL23 pathway with Crohn Disease. Am J Hum Genet. 2009;84(3):399-405.

103. Goodall JC, Wu C, Zhang Y, McNeill L, Ellis L, Saudek V, i sur. Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(41):17698-703.

104. Ahern PP, Schiering C, Buonocore S, McGeachy MJ, Cua DJ, Maloy KJ, i sur. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. Immunity. 2010;33(2):279-88.

105. Takedatsu H, Michelsen KS, Wei B, Landers CJ, Thomas LS, Dhall D, i sur. TL1A (TNFSF15) regulates the development of chronic colitis by modulating both T-helper 1 and T-helper 17 activation. Gastroenterology. 2008;135(2):552-67.

106. Meylan F, Song YJ, Fuss I, Villarreal S, Kahle E, Malm IJ, i sur. The TNF-family cytokine TL1A drives IL-13-dependent small intestinal inflammation. Mucosal Immunol. 2011;4(2):172-85.

107. Taraban VY, Slebioda TJ, Willoughby JE, Buchan SL, James S, Sheth B, i sur. Sustained TL1A expression modulates effector and regulatory T-cell responses and drives intestinal goblet cell hyperplasia. Mucosal Immunol. 2011;4(2):186-96.

108. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell. 1993;75(2):263-74.

109. Kotlarz D, Beier R, Murugan D, Diestelhorst J, Jensen O, Boztug K i sur. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. Gastroenterology. 2012;143(2):347-55.

110. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, i sur. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. Nat Genet. 2008;40(11):1319-23.

111. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich JM, i sur. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. Immunity. 2011;34(4):566-78.

112. Grütz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. J Leukoc Biol. 2005;77(1):3-15.

113. Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Spriel AB, Venselaar H, i sur. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. N Engl J Med 2009;361(18):1760-7.

114. Seksik P, Landman C. Understanding microbiome data:A primer for clinicians. Dig Dis. 2015;33(Supp l):S11-16.

115. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, i sur. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108 (Suppl 1):S4578-85.

116. Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere MF. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. Trends Microbiol. 2013;21(4):167-73.

117. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(34):13780-5.

118. Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspith BN, Rayment N, i sur. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. BMC Microbiol. 2011;11:7-10.

119. Nagalingam NA, Lynch SV. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis. 2012;18(5):968-84.

120. Rutgeerts P, Goboes K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, i sur. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. Lancet. 1991;338(8770):771-4.

121. Borody TJ, Warren EF, Leis S, Surace R, Ashman OJ Clin. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. Gastroenterol. 2003;37(1):42-7.

122. Gionchetti P, Rizzello F, Ferrieri A, Venturi A, Brignola C, Ferretti M, i sur. Rifaximin in patients with moderate or severe ulcerative colitis refractory to steroid-treatment: a double-blind, placebo-controlled trial. Dig Dis Sci. 1999;44(6):1220-1.

123. Nell S, Suerbaum S, Josenhans C. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. Nat Rev Microbiol. 2010;8(8):564-77.

124. Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. Cell. 2002 Dec 27;111(7):927-30.

125. Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. Immunol Today. 1999;20(12):561-7.

126. De Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JH, Tanaka Y, Wierenga EA, Yazdanbakhsh M, i sur. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. J Immunol. 2002;168(4):1704-9.

127. Annese V, Daperno M, Rutter MD, Amiot A, Bossuyt B, East J, i sur. European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. Journal of Crohn's and Colitis. 2013;7:982-1018.

128. D'Haens G, Geboes K, Peeters M, Baert F, Ectors N, Rutgeerts P. Patchy cecal inflammation associated with distal ulcerative colitis: a prospective endoscopic study. Am J Gastroenterol. 1997;92:1275-9.

129. Goldstein N, Dulai M. Contemporary morphologic definition of backwash ileitis in ulcerative colitis and features that distinguish it from Crohn disease. Am J Clin Pathol 2006;126:365-76.

130. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. N Engl J Med 1987;317:1625-9.

131. Fagerhol M, Dale I, Andersson T. A radioimmunoassay for a granulocyte protein as a marker in studies on the turnover of such cells. Bull Eur Physiopathol Respir. 1980;16(Suppl 1):S273-282.

132. Hsu K, Champaiboon C, Guenther BD, Sorenson BS, Khammanivong A, Ross KF, i sur. Anti-infective protective properties of S100 calgranulins. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem. 2009;8:290-305.

133. Roseth A, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by fecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion. 1997;58:276-80.

134. Roseth A, Schmidt P, Fagerhol M. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol. 1999;34:50-4.

135. Roseth A, Fagerhol M, Aadland E, Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein in feces. A methodologic study. Scand J Gastroenterol. 1992;27:793-8.

136. Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, Rueffer A, Michalsen A, Dobos G. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP and clinical indices. Am J Gastroenterol. 2008;103:162-9.

137. Schoepfer AM, Beglinger C, Strauman A, Safroneeva E, Romero Y, Armstrong D, i sur. Fecal calprotectin more accurately reflects endoscopic activity of ulcerative colitis than the Lichtiger Index, C-reactive protein, platelets, hemoglobin and blood leukocytes. Inflamm Bowel Dis. 2013;19:332-41.

138. Schoepfer AM, Beglinger C, Strauman A, Trummler M, Vavricka SR, Bruegger LE, i sur. Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, leukocytes and the CDAI. Am J Gastroenterol. 2010;105:162-9.

139. Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Farkkila M. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. Inflamm Bowel Dis. 2008;14:40-6.

140. Maaser C, Sturm A, Vavricka SR, Kucharzik T, Fiorino G, Annese V i sur. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. Journal of Crohn's and Colitis. 2019;13(2):144-64.

141. Gisbert JP, Bermejo F, Pérez-Calle JL, Taxonera C, Vera I, McNicholl AG, i sur. Fecal calprotectin and lactoferrin for the prediction of inflammatory bowel disease relapse. Inflamm Bowel Dis. 2009;15:1190-8.

142. Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummler M, Renzulli P, Seibold F. Ulcerative colitis: correlation of the Rachmilewitz endoscopic activity index with fecal calprotectin, clinical activity, C-reactive protein, and blood leukocytes. Inflamm Bowel Dis. 2009;15:1851-8.

143. Surawicz CM, Meisel JL, Ylvisaker T, Saunders DR, Rubin CE. Rectal biopsy in the diagnosis of Crohn's disease: value of multiple biopsies and serial sectioning. Gastroenterology. 1981;80:66-71.

144. SurawiczCM. Serial sectioning of a portion of a rectal biopsy detects more focal abnormalities: a prospective study of patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 1982;27:434-6.

145. Surawicz CM, Belic L. Rectal biopsy helps to distinguish acute self-limited colitis from idiopathic inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 1984;86:104-13

146. Vilela EG, Torres HO, Martins FP, Ferrari ML, Andrade MM, Cunha AS. Evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease and ulcerative colitis. World J Gastroenterol. 2012;18:872-81.

147. Langner C, Magro F, Driessen A, Ensari A, Mantzaris GJ, Villanacci V, i sur. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide. Virchows Arch. 2014;464:511-27.

148. Jenkins D, Balsitis M, Gallivan S, Dixon MF, Gilmour HM, Shepherd NA, i sur. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. J Clin Pathol. 1997;50:93-105.

149. McCormick DA, Horton LW, Mee AS. Mucin depletion in inflammatory bowel disease. J Clin Pathol. 1990;43:143-6.

150. Gramlich T, Petras RE. Pathology of inflammatory bowel disease. Semin Pediatr Surg. 2007;16:154-63.

151. Schumacher G, Kollberg B, Sandstedt B. A prospective study of first attacks of inflammatory bowel disease and infectious colitis. Histologic course during the 1st year after presentation. Scand J Gastroenterol. 1994;29:318-32.

152. Moum B, Ekbom A, Vatn MH, Elgjo K. Changeintheextent of colonoscopic and histological involvement in ulcerative colitis over time. Am J Gastroenterol. 1999;94: 1564-9.

153. Rubio CA, Johansson C, Uribe A, Kock Y. A quantitative method of estimating inflammation in the rectal mucosa. IV. Ulcerative colitis in remission. Scand J Gastroenterol. 1984;19:525-30.

154. Mahadeva U, Martin JP ,Patel NK, Price AB. Granulomatous ulcerative colitis: a re-appraisal of the mucosal granuloma in the distinction of Crohn's disease from ulcerative colitis. Histopathology. 2002;41:50-5.

155. Lennard-Jones JE. Crohn's disease: Definition, pathogenesis and aetiology. U: Wright R, ur. Recent advances in gastrointestinal pathology. London: WB Saunders; 1980. Str 173-89.

156. Travis SP, Dinesen L. Remission in trials of ulcerative colitis:what does it mean? Pract Gastroenterol. 2010;30:17-20.

157. Peyrin-Biroulet L, Cieza A, Sandborn WJ, Coenen M, Chowers Y, Hibi T, i sur. International Programme to Develop New Indexes for Crohn's Disease (IPNIC) group. Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health. Gut. 2012;61:241-7.

158. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, Geboes K, Hanauer SB, Irvine EJ, i sur. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. Gastroenterology. 2007;132:763-86.

159. Leijonmarck CE, Persson PG, Hellers G. Factors affecting colectomy rate in ulcerative colitis: an epidemiologic study. Gut. 1990;31:329-33.

160. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF i sur. European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. J Crohns Colitis. 2010;4:28-62.

161. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R i sur. IBD Section of the British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. Gut. 2011;60:571-607.

162. Faubion WA, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. Gastroenterology. 2001;121:255-60.

163. Panaccione R, Ghosh S, Middleton S. Infliximab, azatioprine, or infliximab+azatioprine for treatment of moderate to severe ulcerative colitis : The UC success trial. J Crohn`s Colitis. 2011;5:3-12.

164. Ardizzone S, Maconi G, Russo A, Imbesi V, Colombo E, Bianchi Porro G. Randomised controlled trial of azathioprine and 5-aminosalicylic acid for treatment of steroid dependent ulcerative colitis. Gut. 2006;55:47-53.

165. Reinisch W, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Feagan BG, Rachmilewitz D, Hanauer SB i sur. Long-term infliximab maintenance therapy for ulcerative colitis: the ACT-1 and -2 extension studies. Inflamm Bowel Dis. 2012;18:201-11.

166. Gionchetti P, Calabrese C, Tambasco R, Brugnera R, Straforini G, Liguori G i sur. Role of conventional therapies in the era of biological treatment in Crohn's disease. World J Gastroenterol. 2011;17:1797-806.

167. Pearson DC, May GR, Fick G, Sutherland LR. Azathioprine for maintaining remission of Crohn's disease. Cochrane Database Syst Rev . 2000;(1):CD000067.

168. Prefontaine E, Sutherland LR, Macdonald JK, Cepoiu M. Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. Cochrane Database Syst Rev. 2009;(1): CD000067.

169. Hanauer SB, Sandborn W. Management of Crohn's disease in adults. Am J Gastroenterol. 2001;96:635-43.

170. Summers RW, Switz DM, Sessions JT, Becktel JM, Best WR, Kern F, i sur. National Cooperative Crohn's Disease Study: results of drug treatment. Gastroenterology. 1979;77:847-69.

171. van Duivenvoorde LM, van Mierlo GJ, Boonman ZF, Toes RE. Dendritic cells: vehicles for tolerance induction and prevention of autoimmune diseases. Immunobiology. 2006;211:627-32.

172. Xiao BG, Huang, YM, Link H. Tolerogenic dendritic cells: the ins and outs of outcome. J Immunother. 2006;29:465-71.

173. Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. J Immunol 2001;166:4312-8.

174. Penna G, Adorini L. 1-Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. J Immunol. 2000;164:2405-11.

175. Adorini L, Giarratana N, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. Semin Immunol. 2004;16:127-34.

176. MartinE, O'Sullivan B, Low P, Thomas R. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. Immunity 2003;18:155-67.

177. Fitzpatrick LR. Novel Pharmacological Approaches for Inflammatory Bowel Disease: Targeting Key Intracellular Pathways and the IL-23/IL-17 Axis. Int J Inflam. 2012;2012:389404.

178. Boirivant M, Strober W. The mechanism of action of probiotics. Curr Opin Gastroenterol. 2007;23:679-92.

179. Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. Nat Rev Microbiol. 2011;9(1):27-38.

180. De Greef E, Vandenplas Y, Hauser B, Devreker T, Veereman-Wauters G. Probiotics and IBD. Acta Gastroenterol Belg. 2013;76(1):15-9.

181. Klaenhammer TR, Kleerebezem M, Kopp MV, Rescigno M. The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. Nat Rev Immunol. 2012;12(10):728-34.

182. Sange EF, Travis SPL, Vermeire S, Reinisch V, Geboes K, Barakauskiene A, i sur. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. J Crohns Colitis. 2008;2:1-23.

183. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, i sur. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. J Crohns Colitis, 2012;6(10):965-90.

184. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, i sur. European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. J Crohns and Colitis. 2010;4:7-27.

185. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, i sur. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. J Crohns Colitis, 2017;11(1):3-25.

186. 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;60(4):505-12.

187. Sipponen T, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD. Inflamm Bowel Dis, 2010;16(12):2131-6.

188. Radwan-Kwiatek K, Tabarkiewicz J, Radwan P, Rolinski J. CD1c+/CD19- and CD303+/CD123+ dendritic cells in the peripheral blood in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. Pol J Environ Studies, 2007;16:526-9.

189. Radwan-Kwiatek K, Radwan P, Tatarkiewicz J, Rolinski J. Circulating dendritic cells as a novel disease activity marker in inflammatory bowel disease? Gut, 2009;58:A258.

190. Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Gray ES, Olson S, Golden BE. Fecal calprotectin: validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001;33:14-22.

191. Limburg PJ, Ahlquist DA, Sandborn WJ, Mahoney DW, Devens ME, Harrington JJ, i sur. Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. Am J Gastroenterol, 2000;95:2831-7.

192. Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, i sur. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. Dig Liver Dis, 2003;35:642-7.

193. Silva MA, López CB, Riverin F, Oligny L, Menezes J, Seidman EG. Characterization and distribution of colonic dendritic cells in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis, 2004;10(5):504-12.

194. Bates JM, Flanagan K, Mo L, Ota N, Ding J, Ho S, i sur. Dendritic cell CD83 homotypic interactions regulate inflammation and promote mucosal homeostasis. Mucosal Immunol, 2015;8(2):414-28.

195. Kawashima D, Oshitani N, Jinno Y, Watanabe K, Nakamura S, Higuchi K, i sur. Augmented expression of secondary lymphoid tissue chemokine and EBI1 ligand chemokine in Crohn's disease. J Clin Pathol, 2005;58(10):1057-63.

196. Baumgart DC, Thomas S, Przesdzing I, Metzke D, Bielecki C, Lehmann SM,i sur. Exaggerated inflammatory response of primary human myeloid dendritic cells to lipopolysaccharide in patients with inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol, 2009; 157(3):423-36.

197. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer KH, i sur. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD) Clin Exp Immunol, 1995;102(3):448-55.

198. Bhandaru M, Pasham V, Yang W, Bobbala D, Rotte A, Lang F. Effect of azathioprine on Na(+)/H(+) exchanger activity in dendritic cells. Cell Physiol Biochem, 2012;29(3):533-42.

199. Salim SY, Silva MA, Keita AV, Larsson M, Andersson P, Magnusson KE, i sur. CD83+CCR7- dendritic cells accumulate in the subepithelial dome and internalize translocated Escherichia coli HB101 in the Peyer's patches of ileal Crohn's disease. Am J Pathol, 2009;174(1):82-90.

200. Tibble JA, Sigthorsson G, Bridger S, Fagerhol MK, Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease, 2000;119(1):15-22.

201. Vieira A, Fang CB, Rolim EG, Klug WA, Steinwurz F, Rossini LG, i sur. Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes. BMC Res Notes, 2009;2:221.

202. D'Inca R, Dal Pont E, Di Leo V, Ferronato A, Fries W, Vettorato MG, i sur. Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. Int J Colorectal Dis, 2007;22:429-37.

203. Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, Becker K, Friedrich AW, Rueffer A, i sur. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome, Gut 2007;56:1706-13.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Bruna Rošić Despalatović

Adresa: Nazorov prilaz 2a, 21 000 Split

Telefon: +385 91 5795288

Elektronička pošta: bruna.rosicdespalatovic@gmail.com

Državljanstvo: Republike Hrvatske

Datum rođenja: 2.svibnja 1971.god

RADNO ISKUSTVO

- 1996-1998 KB SPLIT (doktor medicine – pripravnik)
- 1999-2003 Poliklinika za internu medicinu, ginekologiju i psihijatriju J&J Medici
- 2003-2015 KBC Split Klinika za unutarnje bolesti
- 2015- Poliklinika za internu medicinu, ginekologiju i psihijatriju J&J Medici

ŠKOLOVANJE

- 1976. -1985. god. - Osnovna škola "Ruđer Bošković" Split
- 1985. -1989. god. - Matematičko-informatički centar Split
- 1990-1996 Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu; Studij u Splitu
- 1999-2003 specijalizacija iz interne medicine; KB Split, KBC Dubrava
- 2006-2008 uža specijalizacija iz gastroenterologije; KBC Split, KBC Dubrava

USAVRŠAVANJE

- 1999-2001 poslijediplomski stručni studij „Ultrazvuk u kliničkoj medicini – gastroenterologija i hepatologija“; MF Zagreb
- 2002-2004 poslijediplomski znanstveni studij „ Klinička medicina“; MF Split
- 2014-2015 poslijediplomski znanstveni studij „ Biologija novotvorina“; MF Split

PUBLIKACIJE

1. PID during 1988-1994 in Split" –1st award on IV INTERNATIONAL STUDENTS' scientific conferrence, Łodz, 1995.
2. Rošić Despalatović B. Demographic characteristics of adult patients with ulcerative colitis and Crohn's disease in Split-Dalmatia County, Croatia, 2006-2012. (magistarski rad). Sveučilište u Splitu Medicinski fakultet, Split; 2013.
3. Simunic M, Perkovic N, Rosic-Despalatovic B, Tonkic A, Ardalic Z, Titlic M, Maras-Simunic M. Colonoscopic Polypectomies and Recommendations on the Colonoscopy Follow-up Intervals Depending on Endoscopic and Histopathological Findings. Acta Inform Med. 2013;21(3):166-9.
4. J Ajduković, I Salamunić, I Hozo, B Rošić Despalatović, M Šimunić, D Bonacin, Ž Puljiz, G Trgo, Ž Šundov, A Tonkić. Soluble P-selectin glycoprotein ligand - a possible new target in ulcerative colitis. Bratislava Medical Journal No. 3/2015
5. Despalatović BR, Bratanić A, Radić M, Jurišić Z, Tonkić A. Epidemiological trends of inflammatory bowel disease (IBD) in Split-Dalmatia County, Croatia from 2006 to 2014. European Journal of Internal Medicine. 2017;46: 17-9. doi: 10.1016/j.ejim.2017.08.026 PMID: 28882418
6. Despalatovic BR, Bratanic A, Puljiz Ž, Bozikovic J. Esophageal Stenosis in a Patient with Lichen Planus. Case Rep Gastroenterol. 2019; 13: 134–9. doi: 10.1159/000498907 PMID: 31011313
7. Despalatović BR, Babić M, Bratanić A, Tonkić A, Vilović K. Difference in Presence and Number of $CD83^+$ Dendritic Cells in Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. Sci Rep. 2020;10:10055. doi.org:10.1038/s41598-020-67149-5