

Inhibitor plazminogen aktivatora-1 (PAI-1) u bolesnika s upalnim bolestima crijeva

Pekić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:512654>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Pekić

**INHIBITOR PLAZMINOGEN AKTIVATORA-1 (PAI-1) U BOLESNIKA S
UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA**

Diplomski rad

Akadska godina:

2022./2023.

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Joško Božić, dr. med.

Split, srpanj 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Pekić

INHIBITOR PLAZMINOGEN AKTIVATORA-1 (PAI-1) U BOLESNIKA S
UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA

Diplomski rad

Akadska godina:

2022./2023.

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Joško Božić, dr. med.

Split, srpanj 2023.

Zahvala

Velike zahvala mentoru izv. prof. dr. sc. Jošku Božiću na posvećenom vremenu i trudu pri izradi ovog diplomskog rada, uz njega je bilo puno lakše savladati izazove.

Velike zahvale mojoj djevojci Lari na velikoj potpori u teškim trenucima.

Također, zahvaljujem mojoj obitelji, prijateljima na pruženoj podršci tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Upalne bolesti crijeva	2
1.1.1. Epidemiologija i okolišni čimbenici	2
1.1.2. Genetski čimbenici	3
1.1.3. Patofiziologija.....	4
1.1.3.1. Ulcerozni kolitis	5
1.1.3.2. Crohnova bolest	8
1.1.4. Patologija	8
1.1.4.1. Ulcerozni kolitis	8
1.1.4.2. Crohnova bolest	9
1.1.5. Kliničke manifestacije	9
1.1.5.1. Ulcerozni kolitis	9
1.1.5.2. Crohnova bolest	10
1.1.6. Dijagnostika	10
1.1.7. Liječenje	11
1.1.7.1 Ulcerozni kolitis	11
1.1.7.2. Crohnova bolest	13
1.2. Inhibitor plazminogen aktivatora -1 (PAI-1)	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	17
2.1. Cilj istraživanja	18
2.2. Hipoteze	18
3. ISPITANICI I METODE	20
3.1. Ustroj istraživanja	20
3.2. Ispitanici.....	20
3.3. Klinička i laboratorijska mjerenja.....	20
3.4. Statistička obrada podataka.....	21
4. REZULTATI.....	20
5. RASPRAVA.....	22
6. ZAKLJUČCI.....	28
7. LITERATURA.....	32
8. SAŽETAK	34
9. SUMMARY	41
10. ŽIVOTOPIS	Error! Bookmark not defined.

1. UVOD

1.1. Upalne bolesti crijeva

Zajednički naziv za idiopatske kronične upalne bolesti gastrointestinalnog sustava je upalne bolesti crijeva. Upalne bolesti crijeva dijele se na ulcerozni kolitis, Crohnovu bolest i nedeterminirani kolitis. Dijagnoza upalnih bolesti crijeva može se postaviti na temelju kliničkih, endoskopskih i histoloških parametara zajedno, dok svaki od njih zasebno nije dovoljan za postavljanje dijagnoze. Crohnova bolest karakterizirana je transmuralnom upalom koja može zahvatiti bilo koji dio probavnog trakta, od usne šupljine do anusa. Jedno od glavnih obilježja ulceroznog kolitisa je upalna promjena sluznice i u manjoj mjeri submukoze koja zahvaća rektum i kolon. Termin nedeterminirani kolitis označava one upalne promjene kolona koje se ne mogu svrstati ni u ulcerozni kolitis ni u Crohnov kolitis (1).

1.1.1. Epidemiologija i okolišni čimbenici

Ulcerozni kolitis češći je u SAD-u (Sjedinjene Američke Države) i razvijenim zemljama Europe. Niža učestalost zabilježena je u zemljama Srednje i Južne Europe s incidencijom 2-3 slučaja na 100000 stanovnika. Pojavnost Crohnove bolesti veća je u bijelaca, Židova i stanovnika Sjeverne Amerike (2).

Upalne bolesti crijeva karakterizira bimodalna distribucija s visokom incidencijom u dobnoj skupini od 20. do 40. godine s mogućim porastom incidencije od 60. do 80. godine. Zabilježena je veća pojava ulceroznog kolitisa u muškaraca, dok je Crohnova bolest učestalija u žena (1).

Okolišni čimbenici igraju važnu ulogu u patogenezi upalnih bolesti crijeva. Velik broj okolišnih čimbenika smatra se čimbenicima rizika za upalne bolesti crijeva, uključujući pušenje, prehranu, droge, zemljopis, društveni stres i psihološke elemente (3,4,5,6). Pušenje je najčešće proučavan čimbenik okoliša za upalne bolesti crijeva. Od prve opisane povezanosti između ulceroznog kolitisa i pušenja 1982., kasnije studije potvrdile su zaštitni učinak intenzivnog pušenja na razvoj ulceroznog kolitisa s nižom stopom recidiva (7,8). Utjecaj pušenja na Crohnovu bolest bitno se razlikuje. Osobe koje puše imaju dvostruki rizik od nastanka Crohnove bolesti (2).

Smatra se da vitamin D ima ulogu u metabolizmu kalcija i zdravlju kostiju, a danas je sve veća spoznaja njegove imunološke uloge (10). Najnovija literatura pokazuje da je uloga vitamina D multifaktorijalna i asocirana s raznim bolestima, uključujući i upalne bolesti

crijeva (11). Leslie i sur. su otkrili da su prisutne niske razine vitamina D u bolesnika kojima je dijagnosticirana upalna bolest crijeva te ističu da njegova niska koncentracija povećava rizik od nastanka upalnih bolesti crijeva (12).

Učinak aspirina i nesteroidnih protuupalnih lijekova na gastrointestinalni trakt dobro je poznat. Ananthakrishnan i sur. nisu pronašli povezanost između doze, trajanja ili učestalosti uzimanja aspirina i rizika za Crohnovu bolest ili ulcerozni kolitis; no visoka doza, produljena uporaba i česta uporaba nesteroidnih protuupalnih lijekova bili su povezani s povećanim rizikom od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa (13). Dokazan je povećan rizik za kardiovaskularna oboljenja u bolesnika s upalnim bolestima crijeva (16,17).

Nedavna studija otkrila je da je uporaba antibiotika važan okolišni čimbenik koji utječe na rizik od upalnih bolesti crijeva svojim učinkom na mikrobiom. Upotreba antibiotika unutar prve godine života češća je među pedijatrijskim slučajevima upalnih bolesti crijeva u usporedbi s kontrolnom skupinom (14).

Bitton i sur. sugeriraju da osobe s nižim razinama stresa imaju smanjeni rizik od pojave bolesti (10). Komponente raspoloženja percipiranog stresa, uključujući depresiju i anksioznost, igraju snažnu ulogu u pogoršanju upalne bolesti crijeva (15). Dokazan je povećan rizik za kardiovaskularna oboljenja u bolesnika s upalnim bolestima crijeva (16,17).

Ekološki i epidemiološki dokazi upućuju na to da onečišćenje zraka može pridonijeti riziku od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa. Rastuća učestalost Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa u zemljama u razvoju usporedna je s razvojem industrijalizacije (18). U drugoj studiji, ukupna emisija onečišćujućih tvari povezana je s povećanim stopama hospitalizacija i za Crohnovu bolest i za ulcerozni kolitis, što sugerira da onečišćenje okolnog zraka također može utjecati na ove utvrđene bolesti (19).

1.1.2. Genetski čimbenici

Istraživanja provedena na etničkim skupinama, obiteljskom nasljeđivanju, blizancima i epidemiološke studije uvelike su pridonijela u razumijevanju povezanosti genetike i upalnih bolesti crijeva (20). Priroda genske susceptibilnosti djelomično je razjašnjena, a smatra se da su ulcerozni kolitis i Crohnova bolest poligenski poremećaji koji se ne nasljeđuju mendelovskim načinom nasljeđivanja. Utjecaj genskih faktora u odnosu na faktore okoliša na razvoj ulceroznog kolitisa je oko 40 % ,dok je kod Crohnove bolesti oko 60 % (1,21).

Dokazana je povezanost ulceroznog kolitisa i alela 1502 HLA-DR2 antigena kod Japanaca i Židova, dok je u bijelaca na sjeveru Europe taj alel vrlo rijedak. Studije koje su uspoređivale fenotipove i genotipove bolesti dokazale su da prediktivnu vrijednost za proširenu bolest ima haplotip DQ2 TNF- α 2 (1,22).

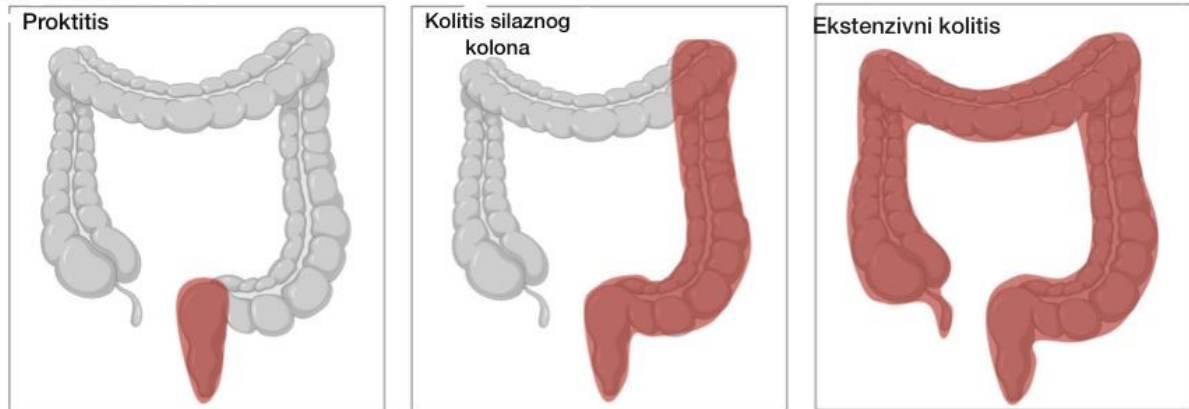
Uočena je povezanost Crohnove bolesti s pojedinim genski determiniranim bolestima kao što su tirozin-pozitivni albinizam, ankilozirajući spondilitis, Turnerov sindrom i cistična fibroza. U Japanaca s Crohnovom bolešću otkrivena je povećana citotoksičnost prema intestinalnom epitelnom antigenu ECAC. Kod genski osjetljivog domaćina uočeno je da neregulirani imuni odgovor potiče kroničnu upalu. Crijevo u bolesnika s Crohnovom bolesti ne može suprimirati imuni odgovor na konstantan tijek luminalnih antigena, za razliku od zdravog crijeva koji može isključiti aktivaciju imunog sustava (1,23,24).

Gen susceptibilnosti za Crohnovu bolest u pericentromeričkoj regiji na kromosomu 16 (IBD1 lokus) važan je u interakciji monocita i bakterija. Dokazano je da više od dvije mutacije tog gena ima utjecaj na pojavu striktura (1).

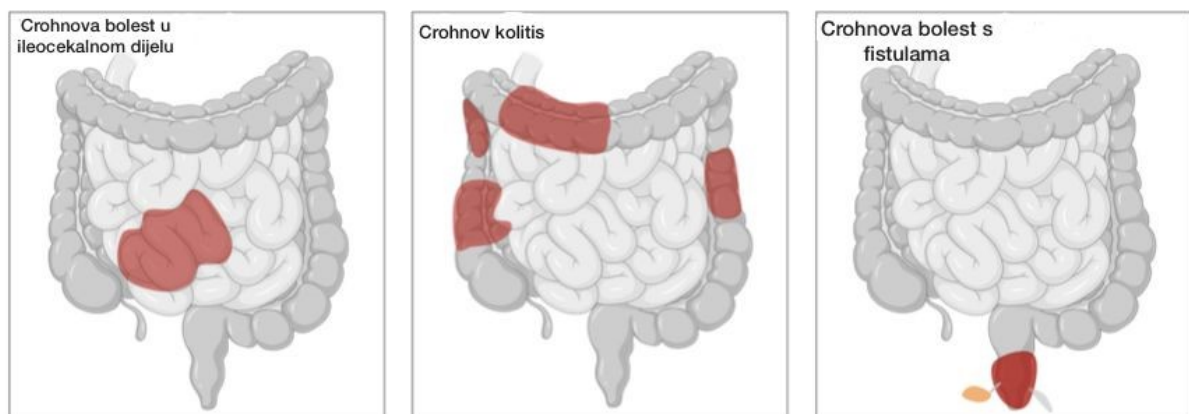
1.1.3. Patofiziologija

Crohnova bolest kao i ulcerozni kolitis pokazuju heterogenost u mnogim kliničkim i patološkim karakteristikama. Razlikuju se po lokaciji i prirodi upale (Slika 1). Za razliku od ulceroznog kolitisa koji napada sluznicu kolona, Crohnova bolest može utjecati na bilo koji dio probavnog trakta. Obje bolesti dijele kliničke karakteristike poput ekstraintestinalnih manifestacija, ali krvarenje iz crijeva i prolazak sluzi ili gnoja su česti samo kod ulceroznog kolitisa. Fistule, perianalna bolest, opstrukcija debelog crijeva i tankog crijeva su česti kod Crohnove bolesti. Upala kripti i kriptični apscesi se javljaju i kod ulceroznog kolitisa i kod Crohnove bolesti, dok je arhitektura kripte više izobličena u slučaju ulceroznog kolitisa (9).

A) Ulcerozni kolitis



B) Crohnova bolest



Slika 1. Različite vrste upalnih bolesti crijeva. (A) Ulcerozni kolitis: proktitis, kolitis silaznog kolona i ekstenzivni kolitis; (B) Crohnova bolest: Crohnova bolest u ileocekalnom dijelu, kolitis kod Crohnove bolesti i fistulirajuća Crohnova bolest. Crvena boja označava područje upale. (Preuzeto i prilagođeno prema: Yeshi K, Ruscher R, Hunter L, Daly NL, Loukas A, Wangchuk P. Revisiting inflammatory bowel disease: Pathology, treatments, challenges and emerging therapeutics including drug leads from natural products. *J Clin Med.* 2020;9:1273.)

1.1.3.1. Ulcerozni kolitis

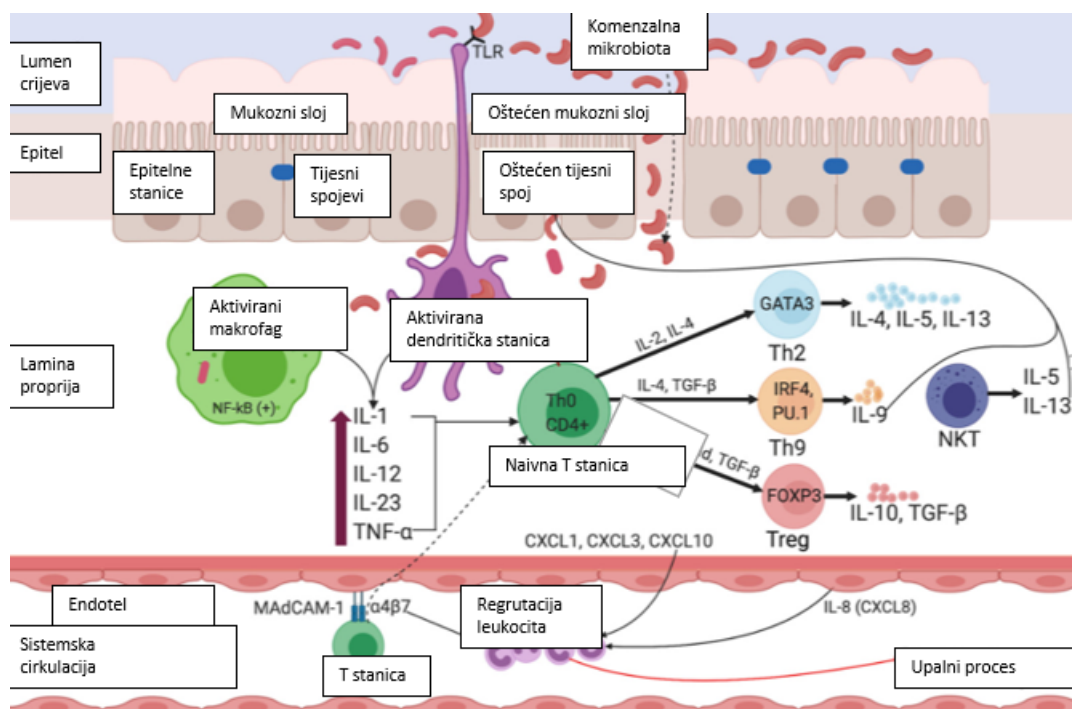
Ulcerozni kolitis uzrokuje upalu i ulceroznu promjenu sluznice debelog crijeva i rektuma. Ne postoji pretežitost spola kod ulceroznog kolitisa, a vrhunac početka bolesti javlja se između 30. i 40. godine života. Simptomi uključuju proljev, bol u trbuhu, umor, gubitak apetita i tjelesne težine te anemiju. Ozbiljnost simptoma ovisi o tome koliko je debelog crijeva zahvaćeno ili upaljeno. Upala kod ulceroznog kolitisa je nespecifična i može se pojaviti u rektumu (proktitisu), lijevom dijelu debelog crijeva (kolitisu lijeve strane) ili cijelom debelom

crijevu (ekstenzivnom kolitisu ili pankolitisu). Trenutno ne postoji "zlatni standard" testa za dijagnosticiranje ulceroznog kolitisa. Dijagnoza ulceroznog kolitisa se temelji na rezultatima testova dobivenih kolonoskopijom, histopatologijom, krvnom slikom, ispitivanjem stolice i radiološkim studijama. Pacijenti koji su dijagnosticirani s ulceroznim kolitisom u starijoj dobi imaju manji rizik od kolektomije u odnosu na one koji su dijagnosticirani u mlađoj dobi (ispod 16 godina) (9).

Patogeneza ulceroznog kolitisa i Crohnove znatno se razlikuju. Promjena raznolikosti luminalne mikrobiote, oštećenje epitela i sluzničkog sloja putem poremećaja tijesnih spojeva mukozne membrane snažno su povezani s patogeneza ulceroznog kolitisa. Slika 2. prikazuje pregled patofiziologije ulceroznog kolitisa. Abnormalna imuna reakcija na crijevni autoantigen može potvrditi mnoga zapažanja (2). Iako pacijenti s ulceroznim kolitisom pokazuju manju raznolikost Firmicutesa i veći udio Gamma-proteobakterija i Enterobakterija, te smanjenje sulfat-reducirajućih deltaproteobakterija, jesu li takve promjene potaknute upalom crijeva, ostaje kontroverzno (9). Povećana proizvodnja IL-1, IL-2 i alfa tumorskog faktora nekroze prethodi aktivaciji upalnih promjena (2). Interleukin (IL)-13 koji proizvode T-pomagačke stanice tipa 2 (Th2 stanice) i prirodno ubilačke T stanice (NKT stanice) također posreduje u ulceroznom kolitisu, jer zajedno s faktorom tumorske nekroze alfa (TNF- α) djeluje na regulaciju izražavanja gena odgovornih za stvaranje tijesnih spojeva enterocitnih stanica. IL-13 također narušava integritet membrane povećavajući stopu apoptoze stanica (koja se pojačava izloženosti TNF- α), te mijenja proteinski sastav tijesnih spojeva. Oštećenje tijesnih spojeva povećava propusnost crijeva, što dovodi do povećanog ulaska luminalnih antigena. Stanice koje prezentiraju antigene, poput makrofaga i dendritičkih stanica, aktiviraju se prepoznavanjem nepatogenih bakterija (komezalna mikrobiota) putem receptora sličnih Tollu (npr. Toll-slični receptor 2 (TLR2) i TLR4) (9,25,26). Aktivirane APC stanice potom pokreću diferencijaciju naivnih CD4⁺ T-stanica u različite podskupove efektorskih T-pomagačkih stanica poput Th2, Th9 i regulatornih T stanica (Treg) kod ulceroznog kolitisa (9). Regrutiranje cirkulirajućih leukocita iz sistemske cirkulacije u upaljenu sluznicu otpuštanjem kemoatraktanata, kao što je CXCL8 (koji je pojačan u bolesnika s ulceroznim kolitisom), važan je za pojačavanje upalnog odgovora (27). U lamini propriji zahvaćenoj upalom kod pacijenata s ulceroznim kolitisom, izražavanje IL-4, koji je karakteristični citokin Th2 stanica, dominira visokim izražavanjem drugih Th2-povezanih citokina poput IL-5 i IL-13 te Th2 transkripcijskog faktora GATA vezivnog proteina 3 (GATA3) (9,28,29). Prirodno ubilačke T

stanice povećane su u lamini propriji upaljenog debelog crijeva i sposobne su proizvesti mnoge Th2 citokine; prvi interleukin 4, koji je zatim brzo zamijenjen interleukinom 13 (30,31).

Stoga je ulcerozni kolitis pretežno Th2-posredovani imunološki poremećaj, ali s obzirom na nisku razinu izražavanja IL-4, uloga Th2 stanica u cjelini u ulceroznom kolitisu ostaje neodređena. Th9 stanice koje proizvode IL-9 također su povezane s ulceroznim kolitisom jer sprječavaju zacjeljivanje sluznice i narušavaju zaštitne funkcije sluzničkog sloja (9.). Kortikosteroidna učinkovitost može potkrijepiti tezu o imuno posredovanoj patogenezi koja je karakteristična za ovu bolest (2).



Slika 2. Patofiziologija ulceroznog kolitisa. (Preuzeto i prilagođeno prema: Yeshi K, Ruscher R, Hunter L, Daly NL, Loukas A, Wangchuk P. Revisiting inflammatory bowel disease: Pathology, treatments, challenges and emerging therapeutics including drug leads from natural products. J Clin Med. 2020;9:1273.)

1.1.3.2. Crohnova bolest

Crohnova bolest najčešće zahvaća terminalni ileum, slijepo crijevo, perianalno područje i debelo crijevo. Simptomi Crohnove bolesti često su postupni, što otežava dijagnozu. Međutim, simptomi poput kronične ili noćne dijareje, abdominalne boli, opstrukcije crijeva, gubitka tjelesne težine, vrućice ili noćnih znojenja ključni su parametri za početnu dijagnozu, uz druge endoskopske ili patološke karakteristike (9).

Patogeneza Crohnove bolesti temelji se na upalnom procesu tkiva koji je uzrokovan nekontroliranom imunološkom reakcijom protiv luminalnih bakterijskih antigena. U ovom procesu sudjeluju imunološke stanice poput CD4 T-stanica, CD8 T-stanica, B-stanica, monocita CD14 i prirodnih ubojica, koje infiltriraju crijeva pacijenata s Crohnovom bolešću. Patogeneza se također održava interakcijom ovih stanica s integrinima, molekulama adhezije i višestrukim kemokinima, odgovornim za proizvodnju povišenih razina upalnih citokina, koji predstavljaju cilj imunih i neimunih stanica te potiču sluznicu upale. U sluznici pacijenata s Crohnovom bolešću, nalazi se niz nepravilnosti u različitim komponentama imunološkog sustava. Najizraženija promjena je hiperaktivnost T-stanica s pretjeranom proizvodnjom citokina, među kojima su IL-12 i IFN- γ , što promovira fenotip TH1 limfocita (15).

1.1.4. Patologija

1.1.4.1. Ulcerozni kolitis

Glavna karakteristika ulceroznog kolitisa je upala sluznice i submukoze, a lokalizacija je ograničena na rektum i proksimalni kolon. Sluznica bolesnika s ulceroznim kolitisom crvena je i granulirana s kontaktnim ili spontanom krvarenjem, dok je u fazi remisije blijeda i ravna. Ulcerozni kolitis karakteriziran je oštrom granicom zahvaćenog i nezahvaćenog dijela sluznice, a između ulceracija uvijek se nalazi upalno promijenjena sluznica. Pseudopolipi regeneracijska su posljedica opetovanih akutnih upala u području sluznice. Ostali dijelovi sluznice hipertrofično su promijenjeni. Stanjenje sluznice i submukoze kao i skraćenje crijeva rezultat su ponavljanih akutnih upala (1).

Teška upala koja zahvaća mišićni sloj stijenke crijeva može zahvatiti krvne žile i neuralne elemente. Takva upala uzrokuje dilataciju kolona s nakupljanjem gnoja i krvi, što se naziva toksični megakolon. Rizik od perforacije znatno je viši kod bolesnika s toksičnim megakolonom i zahtijeva hitnu kiruršku obradu. Karcinom karakterizira endoskopski

prikazana promjena s minimalnim izdignućem poput plaka (2). Prema meta-analizi kohortnih studija na populacijskoj razini, rizik od razvoja kolorektalnog karcinoma je 2,4 puta veći u pacijenata s ulceroznim kolitisom, a taj rizik je veći kod muškaraca nego kod žena i kod onih koji su dijagnosticirani s ulceroznim kolitisom i ekstenzivnim kolitisom u mladoj dobi (9).

Histološke karakteristike ove bolesti su kriptalni apscesi, poremećaj kriptalne arhitekture i deplecija mucina (1). U dugotrajnoj bolesti obično postoji široko rasprostranjena arhitektonska distorzija kripe s metaplazijom Panethovih stanica u silaznom kolonu i rektumu te smanjena celularnost lamine proprije (16).

1.1.4.2. Crohnova bolest

Upalne promjene u bolesnika s Crohnovom bolesti slične su neovisno koji je segment gastrointestinalnog trakta zahvaćen. S obzirom da aktivnost bolesti utječe na izgled sluznice najraniji makroskopski znakovi su edem, hiperemija i vlažnost. Tijekom progresije bolesti javljaju se aftoidni ulkusi koji se stapaju oblikujući vertikalne ulkuse s dubokim fisurama. Zbog čvorastih zadebljanja koji okružuju duboke fisure izgled sluznice se opisuje kao "kaldrmast". Zahvaćeni segmenti zbog posljedične fibroze postaju rigidni. Radiografski „znak vrpce“ naziv je za znatno sužen lumen koji je nastao kao posljedica muralnog zadebljanja (2).

Histološke karakteristike jesu transmuralna upala s mikroskopski vidljivom infiltracijom limfocita, plazma stanica i histiocita. Neutrofilne stanice infiltriraju rubove ulceracija. Kod 40% do 60% pacijenata histološki nalaze se nekazeozni granulomi najčešće u upalnim područjima submukoze i subseroze. Displastične promjene javljaju se kod bolesnika s kroničnom upalom. Pojava karcinoma u bolesnika s Crohnovim kolitisom rijetka je s obzirom na bolesnike s ulceroznim kolitisom (2).

1.1.5. Kliničke manifestacije

1.1.5.1. Ulcerozni kolitis

Gubitak tjelesne težine, bol u trbuhu, krvavosluzavi proljevi i povišena tjelesna temperatura jedni su od glavnih simptoma u bolesnika s ulceroznim kolitisom. Powell-Tuckov indeks metoda je određivanja težine bolesti, a temelji se na nekoliko kriterija s obzirom na simptome koji obilježavaju navedenu bolest. Blaga bolest (60%) se opisuje u osoba s normalnom tjelesnom temperaturom, bez anemije i krvarenja i sedimentacijom manjom od 30

mm/sat. Prisutnost sustavnih komplikacija nije zabilježena, a dnevni broj stolica je manji od 4. Povišena tjelesna temperatura, anemija, tenezmi i sedimentacija iznad 30 mm/sat klinička su obilježja umjereno teške bolesti (25%). Od ekstraintestinalnih komplikacija najčešći je artritis, a broj proljevastih stolica je od 4 do 6. Smatra se da je 15% bolesnika s ulceroznim kolitisom koji imaju teški ili fulminanti tip bolesti. Općenito, ovaj tip bolesti karakterizira teška anemija s hipoalbuminemijom, vrućica s dehidracijom i više od 6 proljevastih stolica s velikim rizikom od razvoja toksičnog megakolona (2).

1.1.5.2. Crohnova bolest

Varijabilnost simptoma i krajnja nepredvidivost glavne su karakteristike Crohnove bolesti. Simptomi ovise o lokalizaciji, aktivnosti upale i proširenosti bolesti na okolne organe. Najčešći simptomi su gubitak tjelesne težine s umorom, proljevi bez primjesa krvi sluzi i gnoja te grčeviti bolovi u području abdomena. U bolesnika kod kojih upalne promjene zahvaćaju rektum pojavljuju se tenezmi. Mučnina i povraćanje prisutni su u manjeg broja bolesnika. Ovakvi simptomi javljaju se postupno, dok je u mlađih osoba klinička slika nagla i otkrije se operacijski prilikom sumnje na akutni apendicitis (2).

1.1.6. Dijagnostika

Standardna dijagnoza upalnih bolesti crijeva oslanja se na prikupljanje kliničkih, radioloških, endoskopskih i histopatoloških nalaza (2).

U ranoj fazi bolesti klinički pregled je uglavnom uredan. Patološki se može zamijetiti distenzija trbuha. Kada je riječ o bolesniku s terminalnim ileitisom, palpira se tumefakcija fiksirana uz okolinu, možebitno bolna na palpaciju, a lokalizirana u ileocekalnom području. Klinički pregled u bolesnika s upalnim bolestima crijeva u uznapredovalom stadiju obuhvaća bljedilo, bolnost, vrućicu i tahikardiju (2,32).

U bolesnika s ulceroznim kolitisom rektoskopija je metoda izbora u akutnoj fazi bolesti, a nakon smirivanja upale kolonoskopija ili kontrastni rendgenski pregled dobiva na značaju. Totalna kolonoskopija koristi se za procjenu proširenosti bolesti te razlikovanje benignih i malignih tvorbi. Obzirom da je rektum zahvaćen samo kod polovice bolesnika s Crohnovom bolesti preporučuje se totalna kolonoskopija s retrogradnom ileoskopijom. Teški upalni proces, toksični megakolon i opsežne fistule kontraindikacija su za izvedbu kolonoskopije (2,33).

Anemija kao posljedica krvarenja i poremećaja apsorpcije željeza dokazuje se laboratorijskim pretragama. U bolesnika s Crohnovom bolesti u uznapredovaloj fazi karakteristična je hipokalemija, hipomagnezijemija, hipoalbuminemija i hipokalcemija. Sklerozirajući kolangitis karakteriziran je povišenjem alkalne fosfataze, a perikolangitis i hepatitis povišenjem transaminaza. Potrebno je napraviti bakteriološku i parazitološku obradu stolice kako bi se isključilo postojanje specifične upale probavnog trakta (2,34). Za praćenje aktivnosti bolesti koristi se CRP (C- reaktivni protein) i fekalni kalprotektin (35).

U nastojanju da se razvije endoskopska metoda za bodovanje s manjom varijabilnošću među promatračima, razvijen je UCEIS (Endoskopski indeks ozbiljnosti ulceroznog kolitisa, engl. Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity). Studija je pokazala da su samo 3 endoskopski vidljiva čimbenika (vaskularni uzorak, krvarenje te erozije i ulkusi) dovoljni za izradu modela koji predstavlja 90% ukupne procjene ozbiljnosti ulceroznog kolitisa (36).

SES-CD (Endoskopski indeks za procjenu aktivnosti Crohnove bolesti, engl. Simple Endoscopic Score-Crohn's disease) jednostavna je metoda praćenja aktivnosti Crohnove bolesti. Ovaj se rezultat temelji na procjeni pet definiranih segmenata crijeva (rektum, sigma i silazni kolon, poprečni kolon, uzlazni kolon i terminalni ileum), a u tim se segmentima procjenjuju prisutnost i veličina ulceracija te opseg upalnog područja i stenoze, a zatim klasificiraju prema težini kao rezultat od 0–3. Bodovi za svaki pojedinačni segment zbrajaju se kao zbroj bodova (37,38).

U bolesnika s Crohnovom bolesti za otkrivanje apscesa, fistula kao i ekstraintestinalnih manifestacija koriste se magnet, CT i ultrazvuk (1).

1.1.7. Liječenje

1.1.7.1 Ulcerozni kolitis

Način liječenja bolesnika s ulceroznim kolitisom ovisi o kliničkoj slici, aktivnosti i proširenosti bolesti. S obzirom u kojem se stadiju bolesti nalazi bolesnik odabire se optimalna vrsta liječenja. Ambulantni oblik liječenja prikladan je za bolesnike s blagim oblikom bolesti. Ulcerozni kolitis u uznapredovaloj fazi liječi se bolnički, a cilj je spriječiti daljnu aktivnost upalnog procesa i nadomjestiti nutritivne gubitke(2).

Potrebno je uvesti prehranu bez s celuloze i vlakana s velikim količinama proteina i ugljikohidrata. Dnevne količine prehrane trebaju se rasporediti s više količinski manjih obroka. Obroci trebaju biti uravnoteženi vitaminom E, folnom kiselinom i ribljim uljem (2).

Liječenje simptoma sastoji se od nadoknade elektrolita i tekućine i kontrole učestalih stolica antidijaroidima. Anemija u bolesnika s kroničnim tijekom bolesti liječi se transfuzijama i preoralnom naknadom željeza. Hipoalbuminemija s poremećajem elektrolita liječi se paralelno s liječenjem anemije. Terapiju čine transfuzije krvi, plazma i albumini s učestalom kontrolom koncentracije natrija i kalija. S obzirom na kompleksnost bolesti bolesnicima je često potrebno psihijatrijsko liječenje zbog sklonosti razvitka depresije i samoubojstva (2).

Profilaktično uzimanje sulfasalazina terapija je izbora u bolesnika s ulceroznim kolitisom u remisiji (2). Primjena aminosalicilata i kortikosteroida u klizmi koristi se kod bolesnika s proktitisom i proktosigmoiditisom (2,39). Takvi bolesnici najčešće imaju blagi oblik akutnog ulceroznog kolitisa. Kod 20% bolesnika s blagim oblikom ne dolazi do poboljšanja nakon primjene ovog načina liječenja. Peroralno uzimanje prednizolona tijekom 2-3 tjedna metoda je izbora za takve bolesnike. Prednizolon (0,25-0,75 mg/kg/dan) lijek je izbora za osobe s umjereno teškim oblikom ulceroznog kolitisa (2,40). Uz prednizolon za pojačavanje učinka prednizolona koriste se kortikosteroidne klizme i sulfasalazin. U bolesnika koji ne reagiraju na ovakvu vrstu terapije preporuča se parenteralno korištenje kortikosteroida s postupnim smanjenjem i peroralnim uzimanjem lijeka. Parenteralna prehrana koristi se za bolesnike s teškim oblikom ulceroznog kolitisa (41). Za bolesnike s ovim tipom bolesti optimalna terapija je parenteralna primjena prednizolona (60 mg/dan) (2).

Kirurško liječenje nužno je u bolesnika s komplikacijama ove bolesti (42). Hitan kirurški zahvat indiciran je u osoba s teškim krvarenjem, perforacijom kolona i toksičnim megakolonom. Elektivno kirurško liječenje indicirano je za bolesnike s karcinomom i strikturama, a standardno kao elektivni zahvat koristi se proktokolektomija s trajnom ileostomom. Dokazano je da totalna proktokolektomija s ileo-pouch analnom anastomozom olakšava problem pražnjenja stolice. Metronidazol antibiotik je izbora u bolesnika koji razviju pouchitis, najčešću komplikaciju ovog zahvata (2).

1.1.7.2. Crohnova bolest

Odabir optimalne terapije za bolesnike s Crohnovom bolesti ovisi o simptomima, proširenosti i aktivnosti bolesti. CDAI (indeks aktivnosti Crohnove bolesti, eng. Crohn`s disease activity indeks) indeks je procjene kliničke aktivnosti Crohnove bolesti (slika 4.). Nadoknada nutritivnih gubitaka i smanjenje aktivnosti upale glavni su ciljevi u liječenju bolesnika s Crohnovom bolesti. Remisija bolesti može se postići kvalitetnom i uravnoteženom prehranom (2).

Postoji sličnost u liječenju bolesnika s Crohnovom bolesti i onih s ulceroznim kolitisom. Liječenje aktivne bolesti i spriječavanje ponovne aktivacije bolesti postiže se sulfasalazinom (4-6 g/dan) (2,43). Prednizolon je optimalna terapija u bolesnika s Crohnovom bolesti koja je lokalizirana u području tankog crijeva . Ukoliko je zahvaćeno područje anusa s fistulama i apscesima lijekovi izbora su metronidazol, lokalna primjena kortikosteroida s toplim kupkama. Smanjenju upalne reakcije značajno pridonosi infliximab, monoklono protutijelo protiv TNF- alfa (2,44).

Kirurška intervencija indicirana je u liječenju bolesnika s komplikacijama Crohnove bolesti. Minimalna kirurgija danas je zamijenila radikalne resekcije koje su povezane s visokom stopom recidiva. Ukoliko medikamentna terapija ne poluči uspjeh, u bolesnika s Crohnovom bolesti kojima nije zahvaćen terminalni ileum, kolektomija je optimalni zahvat (2).

1.2. Inhibitor plazminogen aktivatora -1 (PAI-1)

Primarni fiziološki inhibitor serin proteaza tPA i uPA pripada obitelji gena serpina i naziva se PAI-1. Sprječava pretvorbu plazminogena u plazmin i aktivaciju MMP-a ovisnu o plazminu. Od više od 100 članova superobitelji serpina s očuvanim domenama, PAI-1 je onaj koji je prošao najviše istraživanja. Prisutan je u raznim organizmima, uključujući makrofage, biljke i viruse (45). Regulacija rasta fetusa i homeostaze tkiva posteljice može biti potpomognuta PAI-2, koji je obilniji u ekstraktima posteljice (46). Jetra proizvodi PAI-3, koji se nalazi u plazmi i urinu i inhibira uPA, tPA i aktivirani protein C. Moguće je da je PAI-3 fiziološki regulator tPA/uPA u muškom reproduktivnom tkivu jer njegove razine u sjemenoj plazmi viši su od onih za PAI-1 i njegov kompleks s tPA/uPA (47).

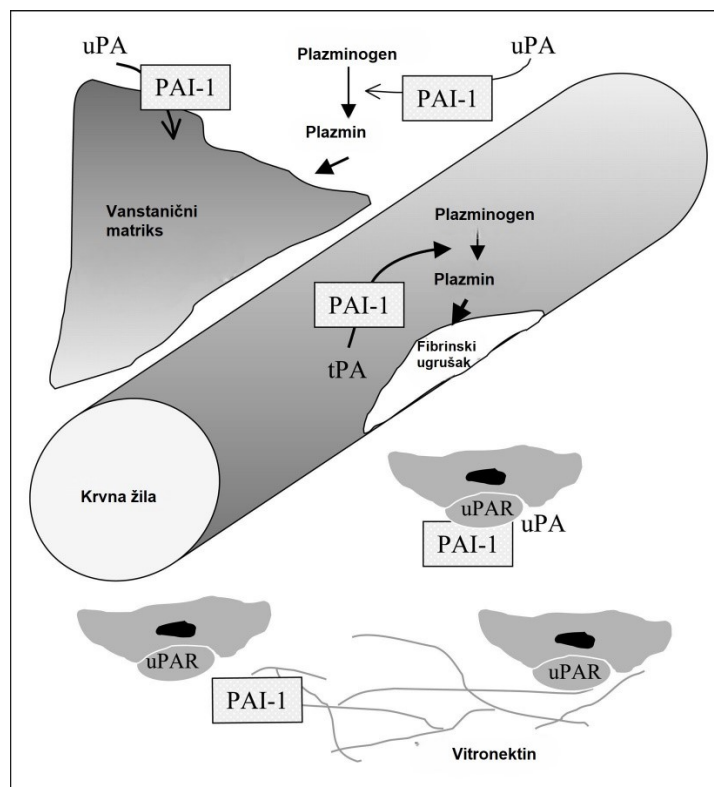
Protein obitelji serpina PAI-1, smješten na kromosomu 7q21.3-q22 kod ljudi polipeptid je od 48-50 kDa sintetiziran od strane različitih stanica, uključujući vaskularne endotelne stanice, adipocite, makrofage, kardiomiocite i fibroblaste (48). PAI-1 ima dvije funkcionalne domene, jednu kodiraju egzoni 3 i 4, a drugu egzon 8, koji su podvrgnuti konformacijskim promjenama i potrebni su za inhibiciju aktivnosti tPA/uPA (49). PAI-1 također prolazi kroz prijelaz iz prirodnog/aktivnog u latentno/neinhibicijsko stanje (50). Njegova interakcija s uPA/tPA blokira aktivaciju uPA/tPA, stvaranje plazmina i aktivaciju MMP-a ovisnu o plazminu, štiteći ekstracelularni matriks (Slika 3.) i proteine od proteolitičke degradacije i pomažući zacjeljivanje rana (51,52).

Međutim, kontinuirane aktivnosti PAI-1 mogu pridonijeti prekomjernom nakupljanju kolagena u tkivima, što dovodi do fibroze tkiva. Nedavna otkrića sugeriraju da PAI-1 izravno komunicira s α -3 podjedinicom proteasoma u vaskularnim endotelnim stanicama i sprječava degradaciju staničnih p53 i I κ B α . Povišeni PAI-1 u endotelnim stanicama povezan je s povećanom staničnom apoptozom što sugerira da modulacija aktivnosti proteasoma posredovana PAI-1 može biti novi mehanizam povišene apoptoze izazvane PAI-1. Dodatno, PAI-1 tvori stabilan kompleks s proprotein konvertazom furin i inhibira njezinu aktivnost, sprječavajući o furinu ovisno sazrijevanje i aktivaciju inzulinskih receptora i ADAM17, koji su uključeni u nastanak metaboličkog sindroma, uključujući dijabetes (53).

Povećane razine PAI-1 povezane su sa stanjima povezanima sa starenjem poput pretilosti, inzulinske rezistencije, dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti (54,55). Više razine PAI-1 također su povezane sa sjedilačkim načinom života, s pozitivnom korelacijom između PAI-1 i ukupnog kolesterola ili LDL-a ili triglicerida (56). PAI-1 kontrolira aktivnosti

tPA/uPA/plazmina, glavnih enzima serin proteaze u fibrinolitičkom sustavu, i igra ključnu ulogu u hemostazi (57). Mutacija u PAI-1 i drugim genima obitelji serpina povezana je s poremećajima kao što su abnormalno krvarenje, oštećenje zacjeljivanja rana, emfizem i ciroza (58). Polimorfizam 4G/4G u lokusu gena PAI-1 faktor je rizika za koronarnu arterijsku bolest (59).

Nefiziološki povećana aktivnost PAI-1 povezana je s razvojem bolesti kao što su tromboza, ateroskleroza, endometrioza, rak i fibroza više organa. Potpuni nedostatak PAI-1 povezan je sa srčano-selektivnom fibrozom u starih miševa. Razine PAI-1 u plazmi mogu se koristiti kao marker za fibrinolitičku i progresiju bolesti povezanu sa starenjem. C-reaktivni protein izravno je uključen u aterosklerotski proces i disfunkciju endotela, što sugerira da CRP potiče bolest koronarnih arterija putem indukcije PAI-1, glavnog inhibitora fibrinolize. PAI-1 je također uključen i u patofiziologiju endometrioze, gdje je koncentracija PAI-1 veća u usporedbi sa zdravim endometrijem (53).



Slika 3. Slikovni sažetak nekih bioloških funkcija inhibitora aktivatora plazminogena-1 (PAI-1). (Preuzeto i prilagođeno prema: Eddy AA. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;283:F209-20.)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Cilj istraživanja

Glavni cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti razliku u serumskoj koncentraciji PAI-1 između bolesnika s upalnim bolestima crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu. Sporedni ciljevi bili su ispitati razliku u serumskoj koncentraciji PAI-1 između bolesnika s ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolesti te istražiti povezanost PAI-1 s odabranim antropometrijskim, laboratorijskim i kliničkim pokazateljima u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

2.2. Hipoteze

- Serumske koncentracije PAI-1 bit će veće u bolesnika s upalnim bolestima crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu.
- Neće postojati razlika u serumskoj koncentraciji PAI-1 između bolesnika s ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolešću.
- Bit će pronađena značajna korelacija između serumske koncentracije PAI-1 i odabranih antropometrijskim, laboratorijskih i kliničkih pokazatelja.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

Ovo presječno istraživanje osmišljeno je na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, dok je prikupljanje relevantnih podataka o pacijentima, kao i uzorkovanje krvi provedeno na Zavodu za gastroenterologiju KBC-a Split. Studija je provedena u vremenskom razdoblju od rujna do prosinca 2022. godine, dok je informirani pristanak prikupljen od strane svih ispitanika. Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split je odobrilo provođenje ovog istraživanja, koje je napravljeno u skladu sa svim preporukama i etičkim principima Helsinške deklaracije.

3.2. Ispitanici

Istraživanje uključuje ukupno 60 ispitanika, i to 30 s upalnom bolesti crijeva (14 s dijagnozom Crohnove bolesti i 16 ulceroznog kolitisa) te 30 kontrolnih ispitanika. Dijagnoze navedenih bolesti su temeljene na svim anamnestičkim, kliničkim, radiološkim i endoskopskim obilježjima, prema smjernicama za dijagnozu Europskog društva za Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis (ECCO). Uključni kriteriji za bolesnike s upalnim bolestima crijeva bili su: stariji od 18 godina, a mlađi od 65 godina, da imaju upalnu bolest crijeva najmanje 2 godine, te da je bolest stabilna u posljednja 3 mjeseca. Isključni kriteriji su bili: aktivna maligna bolest, bolest bilo kojeg drugog organa/organskog sustava te bolesnici koji nisu suradljivi. Za kontrolne ispitanike vrijedili su isti isključni kriteriji kao i za ispitnu skupinu uz odsustvo upalnih bolesti crijeva.

3.3. Klinička i laboratorijska mjerenja

Svim ispitanicima je uzeta detaljna medicinska anamneza, te je obavljen klinički pregled, kao i uzimanje osnovnih antropometrijskih mjera. Za mjerenje tjelesne mase i visine korištena je medicinska vaga s visinomjerom (Seca, Birmingham, UK). Indeks tjelesne mase je izračunat prema omjeru tjelesne mase i kvadrirane visine (kg/m^2).

Klinički parametri ispitanika su uzeti iz medicinske anamneze i temeljem fizikalnog pregleda, dok je također uzet uzorak krvi iz kubitalne vene za analizu laboratorijskih parametara. Analiza biokemijskih parametara je napravljena od strane iskusnog specijaliste medicinske biokemije, prema svim standardnim principima dobre prakse. Serumaska koncentracija PAI-1 određena je korištenjem ProcartaPlex multiplex imunotesta (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, SAD). Nadalje, serumaska koncentracija visoko osjetljivog

CRP-a (hs-CRP) i koncentracija fekalnog kalprotektina određene su lateks turbidimetrijskom metodom, dok su ostali laboratorijski parametri određeni standardnim laboratorijskim postupcima.

3.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka napravljena je koristeći statistički paket MedCalc (MedCalc v. 19.4, Ostend, Belgija). Podatci su prikazi kao cijeli brojevi i postotci ili aritmetička sredina i standardna devijacija, odnosno medijan i interkvartilni raspon, ovisno o normalnosti distribucije podataka koja je testirana Shapiro-Wilkovim testom. Kategorijske varijable uspoređene su koristeći hi-kvadrat test ili Fisherov egzaktni test. Za usporedbu kvantitativnih parametrijskih varijabli korišten je Student t-test. Nadalje, korelacija između serumske koncentracije PAI-1 i odabranih parametara napravljena je koristeći Pearsonov koeficijent korelacija. Za sve analize p vrijednost manja od 0,05 smatrala se statički značajnom.

4. REZULTATI

U ovom istraživanju sudjelovalo je ukupno 60 ispitanika, od kojih je 30 bilo u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva i 30 u kontrolnoj skupini. U ispitivanoj skupini bilo je 16 (53,3%) muškaraca i 14 (46,7%) žena, dok je u kontrolnoj skupini bilo 17 (56,7%) muškaraca i 13 (43,3%) žena. U Tablici 1. prikazane su temeljne karakteristike obje skupine, a među navedenim parametrima skupine su se statistički razlikovale samo u pozitivnoj obiteljskoj anamnezi na upalne bolesti crijeva koja je bila značajno češća u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva ($p < 0,001$).

Tablica 1. Temeljne karakteristike ispitivane i kontrolne skupine.

Parametar	IBD skupina (N=30)	Kontrolna skupina (N=30)	<i>p</i>
Dob (god.)	38,1 ± 11,2	39 ± 10,4	0,748*
Muški spol (N, %)	16 (53,3%)	17 (56,7%)	0,912†
Tjelesna masa (kg)	74,1 ± 11,2	77,9 ± 14	0,251*
Tjelesna visina (cm)	175,2 ± 8,1	178,6 ± 10,1	0,156*
ITM (kg/m ²)	24,1 ± 3,1	24,4 ± 2,8	0,696*
Pozitivna obiteljska anamneza na IBD	7 (23,3%)	1 (3,3%)	<0,001‡
Pušenje (N, %)	7 (23,3%)	6 (20%)	0,875†
Trajanje bolesti (god.)	10,2 (6,1-15,2)	-	-

Parametrijske varijable su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, a neparametrijske varijable su prikazane kao medijan (interkvartilni raspon).

* Student t-test za nezavisne uzorke

† hi-kvadrat test

‡ Fisherov egzaktni test

U Tablici 2. prikazana je usporedba laboratorijskih parametara između bolesnika s upalnim bolestima crijeva i kontrolne skupine. Pronađena je statički značajno veća koncentracija hemoglobina u kontrolnoj skupini u odnosu na IBD skupinu ($p=0,005$) i značajno veća serumska koncentracija hsCRP u IBD skupini u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,001$). Nije pronađena značajna razlika u ostalim promatranim parametrima (Tablica 2).

Tablica 2. Laboratorijski parametri u ispitivanoj i kontrolnoj skupini.

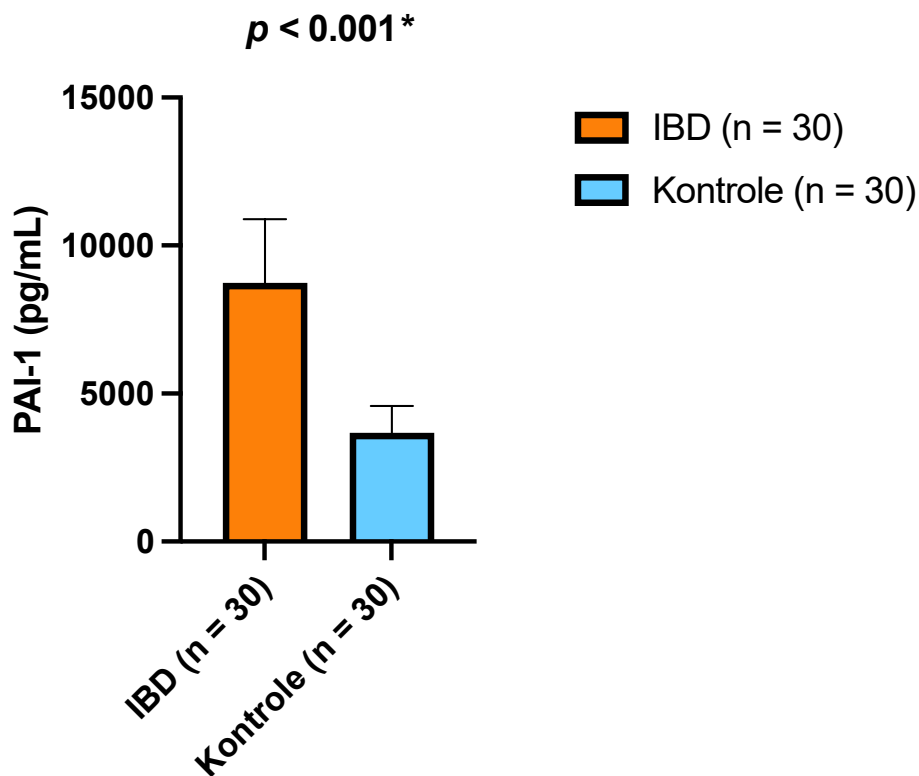
Parametar	IBD skupina (N = 30)	Kontrolna skupina (N = 30)	<i>p</i>*
Hemoglobin (g/L)	136,1 ± 16,5	149,2 ± 18,2	0,005
Ureja (mmol/L)	4,9 ± 1,7	5,1 ± 1,5	0,153
Kreatinin (μmol/L)	75,3 ± 16	71,2 ± 14	0,295
Ukupni bilirubin (μmol/L)	11,9 ± 6,1	13,3 ± 5,6	0,358
AST (U/L)	27,1 ± 14,9	26,1 ± 7,5	0,744
ALT (U/L)	24,7 ± 13,3	25,0 ± 8,9	0,919
GGT (U/L)	36,2 ± 12,5	34,9 ± 9,1	0,647
hs-CRP (mg/L)	8,4 ± 3,9	0,8 ± 0,5	<0,001
Fekalni kalprotektin (mg/kg)	550,1 ± 298,8	-	-

Podatci su prikazani kao srednja vrijednosti ± standardna devijacija.

Kratice: **hs-CRP** - visoko osjetljivi C-reaktivni protein, **AST** - aspartat aminotransferaza, **ALT** - alanin aminotransferaza, **GGT** - gama-glutamil transferaza.

* Student t-test za nezavisne uzorke

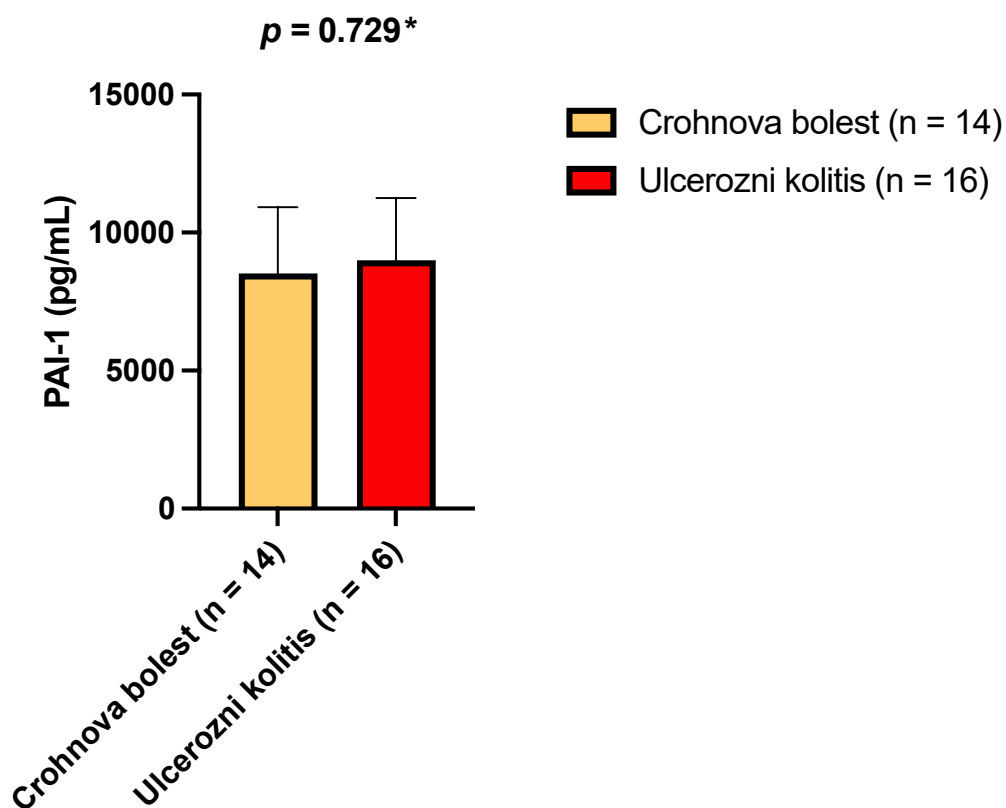
U bolesnika s upalnim bolestima crijeva pronađena je veća serumska koncentracija PAI-1 u odnosu na kontrolnu skupinu ($8741,5 \pm 2153$ pg/mL vs. $3687,2 \pm 896$ pg/mL, $p < 0,001$) (Slika 4.).



Slika 4. Usporedba serumskih koncentracija PAI-1 između bolesnika s IBD-om i zdravih kontrola.

Kratice: PAI-1: inhibitor aktivatora plazminogen-1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*); **IBD:** upalna bolest crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * Studentov t-test

Nije pronađena razlika u serumskim koncentracijama PAI-1 između bolesnika s Crohnovom bolesti i bolesnika s ulceroznim kolitisom ($8519,0 \pm 2396$ pg/mL vs. $8997,0 \pm 2250$ pg/mL, $p = 0,729$) (Slika 5.).



Slika 5. Usporedba serumskih koncentracija PAI-1 između bolesnika s ulceroznim kolitisom i bolesnika s Crohnovom bolesti.

Kratice: PAI-1: inhibitor aktivatora plazminogen-1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*).

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * Studentov t-test

U Tablici 3. prikazani su korelacija serumske koncentracije PAI-1 s odabranim antropometrijskim, laboratorijskim i kliničkim parametrima u bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Pronađena je pozitivna linearna korelacija ($r = 0,416$, $p = 0,022$) između razine fekalnog kalprotektina i serumske koncentracije PAI-1 u bolesnika s upalnim bolestima crijeva, dok nije pronađena povezanost drugim promatranim parametrima.

Tablica 3. Odabrani antropometrijski, laboratorijski i klinički parametri u bolesnika s upalnim bolestima crijeva i njihova korelacija sa serumskom koncentracijom PAI-1.

Parametar	r*	p
Dob (godine)	0,114	0,548
ITM (kg/m ²)	0,108	0,569
hs-CRP (mg/L)	0,246	0,190
Ukupni kolesterol (mmol/L)	0,072	0,705
Trajanje bolesti	0,298	0,109
Fekalni kalprotektin	0,416	0,022

Kratice: ITM - indeks tjelesne mase, **hs-CRP** - visoko osjetljivi C-reaktivni protein.

* Pearsonov korelacijski koeficijent

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju analizirano je ukupno 60 pacijenata od kojih je 30 bilo u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva i 30 u kontrolnoj skupini. Broj pušača u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva nije se razlikovao od broja pušača u kontrolnoj skupini. Također, nije pronađena statistički značajna razlika u tjelesnoj masi, tjelesnoj visini i indeksu tjelesne mase između ispitivane i kontrolne skupine. Međutim, dokazana je statistički značajna razlika u pozitivnoj obiteljskoj anamnezi na upalne bolesti crijeva koja je bila 7 puta češća u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu. Medijan trajanja upalne bolesti crijeva u ispitivanoj skupini bio je 10,2 (6,1-15,2) godine. Naše je istraživanje pokazalo da je serumska koncentracija PAI-1 bila veća u bolesnika s upalnim bolestima crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu, ali da nije bilo statistički značajne razlike u serumskoj koncentraciji PAI-1 u bolesnika s Crohnovom bolešću u odnosu na bolesnike s ulceroznim kolitisom. Uz to razine fekalnog kalprotektina umjereno su korelirale s PAI-1 u serumu, dok za ostale mjerene parametre poput dobi, ITM-a, visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina, ukupnog kolesterola i trajanja bolesti takva korelacija nije uočena.

Grčka studija uključila je 132 ispitanika s upalnim bolestima crijeva koji su bili uspoređeni s 50 kontrolnih ispitanika. Trajanje upalne bolesti crijeva u pacijenata s Crohnovom bolesti bilo je 8,6 godina, dok je u bolesnika s ulceroznim kolitisom 7,2 godine. U kontrolnoj skupini medijan serumske koncentracije PAI-1 bio je 3,0 IU/ml, u bolesnika s ulceroznim kolitisom 3,7 IU/ml dok je u bolesnika s Crohnovom bolesti bio 3,6 IU/ml (61). U ovom istraživanju dokazana je statistički značajna razlika u razini serumske koncentracije PAI-1 između skupine bolesnika s upalnim bolestima crijeva i kontrolne skupine, međutim statistički značajna razlika u istom parametru nije dokazana između ispitanika s Crohnovom bolešću i ulceroznim kolitisom (61).

Zanimljiva studija provedena je u Turskoj 2011. godine koja je uključivala skupinu od 36 ispitanika s upalnim bolestima crijeva i 20 ispitanika u kontrolnoj skupini. Unutar ispitivane skupine, 24 pacijenta bolovalo je od ulceroznog kolitisa, dok je 12 bolesnika imalo Crohnovu bolest. Kontrolna skupina sastojala se od 13 muškaraca i 7 žena, a ispitivana skupina od 24 muškarca i 12 žena. Životna dob u kontrolnoj skupini iznosila je $37,9 \pm 16,1$, a u ispitivanoj skupini $36,9 \pm 12,2$ godina. Serumska koncentracija PAI-1 u kontrolnoj skupini iznosila je 30 ± 12 ng/mL, a u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva 65 ± 27 ng/mL te je dokazana statistički značajna razlika u serumskoj koncentraciji PAI-1 između kontrolne i ispitivane skupine (62). U usporedbi s našim istraživanjem, studija u Grčkoj imala je veći ukupni broj ispitanika, ali i veću razliku u broju ispitanika između skupine bolesnika s upalnim bolestima

crijeva i kontrolne skupine (61). Za razliku od navedene, studija u Turskoj imala je sličan broj ukupnih ispitanika kao i naša studija te je i međusobna razlika u broju ispitanika između skupina bila manja (62). Studija u Grčkoj, kao i naša studija, imala je sličan omjer pacijenata s ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolesti kao i omjer muškaraca i žena u ispitivanoj i kontrolnoj skupini, a studija u Turskoj imala je duplo više pacijenata s ulceroznim kolitisom od pacijenata s Crohnovom bolesti te približno duplo veći broj muškaraca u odnosu na žene u obje skupine (61,62). Životna dob ispitanika u studiji u Turskoj bila je slična životnoj dobi naših ispitanika (62). Obje navedene studije dokazale su statistički značajno veću serumsku koncentraciju PAI-1 između skupine bolesnika s upalnim bolestima crijeva i kontrolne skupine, što je potvrdila i naša studija (61,62). Studija u Grčkoj nije dokazala statistički značajnu razliku u serumskoj koncentraciji PAI-1 između skupine bolesnika s ulceroznim kolitisom i skupine bolesnika s Crohnovom bolesti, a navedeni rezultati poklapaju se s onima u našoj studiji (61).

Treća studija provedena je u Nizozemskoj 2003. godine, a u istraživanju je sudjelovalo 38 ispitanika s upalnim bolestima crijeva i 25 ispitanika u kontrolnoj skupini (63). Također, navedena studija je istražila povezanost serumske koncentracije PAI-1 i koncentracije visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina te je dokazala da postoji statistički značajna povezanost u navedenim koncentracijama u bolesnika s ulceroznim kolitisom, ali ne i u bolesnika s Crohnovom bolesti (63). Međutim, naše istraživanje nije uspoređivalo povezanost serumske koncentracije PAI-1 i koncentracije visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina zasebno za ulcerozni kolitis i Crohnovu bolest, već za upalne bolesti crijeva u cjelini te u našem istraživanju nije pronađena statistički značajna povezanost (63). Na temelju dosada provedenih studija čini se da PAI-1 ima ulogu u patofiziologiji upalnih bolesti crijeva, no potrebna su veća multicentrična istraživanja koja bi potvrdila nalaze.

Naša studija ima nekoliko ograničenja vrijednih spomena. Za početak, presječni dizajn nas sprječava od izvlačenja kauzalnih zaključaka. Nadalje, studija je provedena samo na populaciji Hrvata, što ograničava primjenjivost rezultata na druge populacije. Konačno, studija je uključila relativno mali broj ispitanika i zahtjeva validaciju na većoj populaciji. Također, serumsku koncentraciju PAI-1 određena je samo u jednoj točki.

6. ZAKLJUČCI

1. Serumska koncentracija PAI-1 veća je u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu.
2. Nije pronađena statistički značajna razlika u serumskoj koncentraciji PAI-1 između bolesnika s ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolesti.
3. Fekalni kalprotektin pozitivno korelira sa serumskim koncentracijama PAI-1 u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.
4. Nije utvrđena značajna korelacija između serumskih koncentracija PAI-1 i dobi, ITM-a, visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina, ukupnog kolesterola i trajanja bolesti u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

7. LITERATURA

1. Vucelić B. Gastroenterologija i hepatologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002. str. 723–50.
2. Včev A. Bolesti debelog crijeva. 1. Osijek: Grafika; 2002. str. 187–204.
3. Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126:1504–17.
4. Vrdoljak J, Kumric M, Vilovic M, Martinovic D, Tomic IJ, Krnic M i sur. Effects of Olive oil and its components on intestinal inflammation and inflammatory bowel disease. *Nutrients*. 2022;14:757.
5. Vrdoljak J, Vilović M, Živković PM, Tadin Hadjina I, Rušić D, Bukić J i sur. Mediterranean diet adherence and dietary attitudes in patients with inflammatory bowel disease. *Nutrients*. 2020;12:3429.
6. Vrdoljak J, Kumric M, Ticinovic Kurir T, Males I, Martinovic D, Vilovic M i sur. Effects of wine components in inflammatory bowel diseases. *Molecules*. 2021;26:5891.
7. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS i sur. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med*. 2012;156:350–9.
8. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:2687–92.
9. Yeshi K, Ruscher R, Hunter L, Daly NL, Loukas A, Wangchuk P. Revisiting inflammatory bowel disease: Pathology, treatments, challenges and emerging therapeutics including drug leads from natural products. *J Clin Med*. 2020;9:1273.
10. Bitton A, Dobkin PL, Edwardes MD, Sewitch MJ, Meddings JB, Rawal S i sur. Predicting relapse in Crohn's disease: a biopsychosocial model. *Gut*. 2008;57:1386–92.
11. Garg M, Lubel JS, Sparrow MP, Holt SG, Gibson PR. Review article: vitamin D and inflammatory bowel disease-established concepts and future directions. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;36:324–44.
12. Leslie WD, Miller N, Rogala L, Bernstein CN. Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1451–9.

13. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study: A cohort study. *Ann Intern Med.* 2012;156:350–9.
14. . Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:2687–92.
15. Cámara RJ, Schoepfer AM, Pittet V, Bègré S, von Känel R. Mood and nonmood components of perceived stress and exacerbation of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:2358–65.
16. Alicic D, Martinovic D, Rusic D, Zivkovic PM, Tadin Hadjina I, Vilovic M i sur. Urotensin II levels in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2021;27:6142–53.
17. Brnic D, Martinovic D, Zivkovic PM, Tokic D, Vilovic M, Rusic D et al. Inactive matrix Gla protein is elevated in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2020;26:4866–77.
18. Thia KT, Loftus EV, Sandborn WJ, Yang SK. An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:3167–82.
19. Ananthakrishnan AN, McGinley EL, Binion DG, Saeian K. Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: an ecologic analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:1138–45.
20. Liu T-C, Stappenbeck TS. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Pathol.* 2016;11:127–48.
21. Younis N, Zarif R, Mahfouz R. Inflammatory bowel disease: between genetics and microbiota. *Mol Biol Rep.* 2020;47:3053–63.
22. Agrawal M, Allin KH, Petralia F, Colombel J-F, Jess T. Multiomics to elucidate inflammatory bowel disease risk factors and pathways. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022;19:399–409.
23. Cuffari C. The genetics of inflammatory bowel disease: diagnostic and therapeutic implications. *World J Pediatr.* 2010;6:203–9.

24. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. The genetics of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:2820–31.
25. Franić I, Režić-Mužinić N, Markotić A, Živković PM, Vilović M, Rušić D i sur. Expression of CD44 in leukocyte subpopulations in patients with inflammatory bowel diseases. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12:2014.
26. Kumric M, Zivkovic PM, Ticinovic Kurir T, Vrdoljak J, Vilovic M, Martinovic D i sur. Role of B-cell activating factor (BAFF) in inflammatory bowel disease. *Diagnostics (Basel)*. 2021;12:45.
27. Matsuda R, Koide, T Tokoro C. Quantitive cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naïve ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:328–34.
28. Almradi A, Hanzel J, Sedano R, Parker CE, Feagan BG, Ma C i sur. Clinical trials of IL-12/IL-23 inhibitors in inflammatory bowel disease. *BioDrugs*. 2020;34:713–21.
29. Bjarnason I, Sission G, Hayee B. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of a multi-strain probiotic in patients with asymptomatic ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflammopharmacology*. 2019;27:465–73.
30. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S i sur. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*. 2004;113:1490–7.
31. Steel AW, Mela CM, Lindsay JO, Gazzard BG, Goodier MR. Increased proportion of CD16(+) NK cells in the colonic lamina propria of inflammatory bowel disease patients, but not after azathioprine treatment: Azathioprine depletes CD16+ NK cells in IBD. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33:115–26.
32. Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007;133:1670–89.
33. Odze R. Diagnostic problems and advances in inflammatory bowel disease. *Mod Pathol*. 2003;16:347–58.
34. Watts A, Bennett WE, Molleston JP, Gupta SK, Croffie JM, Waseem S i sur. Incidence of low seroimmunity to hepatitis B virus in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;65:551–4.

35. Goldman L, Schafer AI. *Goldman-Cecil Medicine*. 25. izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015.
36. Travis SPL, Schnell D, Krzeski P, Abreu MT, Altman DG, Colombel J-F i sur. Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut*. 2012;61:535–42.
37. 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;60:505–12.
38. Tang W, Hu W, Shi P, Ye Z, Wu J, Zhang Y i sur. The SES-CD could be a predictor of short- and long-term mucosal healing after exclusive enteral nutrition in Pediatric Crohn’s disease patients. *Front Pediatr*. 2022;10: 874425.
39. Jeong DY, Kim S, Son MJ, Son CY, Kim JY, Kronbichler A i sur. Induction and maintenance treatment of inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *Autoimmun Rev*. 2019;18:439–54.
40. Schauer C, Avery V, Seleq S, Garg P, Wang MTM, Chieng M i sur. A comparison of intravenous methylprednisolone and hydrocortisone for the treatment of acute inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2021;36:2762–8.
41. Bischoff SC, Escher J, Hébuterne X, Kłęk S, Krznaric Z, Schneider S i sur. ESPEN guideline: Clinical nutrition in inflammatory bowel disease. *Nutr Hosp*. 2022 ;39:678–703.
42. Wehkamp J, Götz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory Bowel Disease. *Dtsch Arztebl Int*. 2016 ;113:72–82.
43. Claytor J, Kumar P, Ananthakrishnan AN, Colombel J-F, Agrawal M, Ungaro RC. Mild Crohn’s disease: Definition and management. *Curr Gastroenterol Rep*. 2023;25:45–51.
44. Hemperly A, Vande Casteele N. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of infliximab in the treatment of inflammatory bowel disease. *Clin Pharmacokinet*. 2018;57:929–42.
45. Andrew AS, Klei LR, Barchowsky A. Nickel requires hypoxia-inducible factor-1 alpha, not redox signaling, to induce plasminogen activator inhibitor-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281:L607–15.

46. Asano Y, Markiewicz M, Kubo M, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M. Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol Cell Biol.* 2009;29:425–34.
47. España F, Estellés A, Fernández PJ, Gilabert J, Sánchez-Cuenca J, Griffin JH. Evidence for the regulation of urokinase and tissue type plasminogen activators by the serpin, protein C inhibitor, in semen and blood plasma. *Thromb Haemost.* 1993;70:989–94.
48. Reilly CF, Fujita T, Mayer EJ, Siegfried ME. Both circulating and clot-bound plasminogen activator inhibitor-1 inhibit endogenous fibrinolysis in the rat. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:1276–86.
49. Gorlatova NV, Cale JM, Elokda H, Li D, Fan K, Warnock M, Crandall DL, Lawrence DA. Mechanism of inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by a small molecule inhibitor. *J Biol Chem.* 2007;282:9288–96.
50. Levin EG, Santell L. Conversion of the active to latent plasminogen activator inhibitor from human endothelial cells. *Blood.* 1987;70:1090–8.
51. Hertig A, Berrou J, Allory Y, Breton L, Commo F, Costa De Beauregard MA, Carmeliet P, Rondeau E. Type 1 plasminogen activator inhibitor deficiency aggravates the course of experimental glomerulonephritis through overactivation of transforming growth factor beta. *FASEB J.* 2003;17:1904–6.
52. Lackie PM. Molecular portfolios: Cells interacting with matrix in repairing airway epithelium. *Clin Expr Allerg.* 2008;38:1840–43.
53. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol.* 2012;227:493–507.
54. Oishi K. Plasminogen activator inhibitor-1 and the circadian clock in metabolic disorders. *Clin Expr Hypertens.* 2009;31:208–19.
55. Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): A key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther.* 2010;28:e72– e91.
56. Lira FS, Rosa JC, Lima-Silva AE, Souza HA, Caperuto EC, Seelaender MC i sur. Sedentary subjects have higher PAI-1 and lipoproteins levels than highly trained athletes. *Diabetol Metab Syndr.* 2010;2:7.

57. Meltzer ME, Doggen CJ, de Groot PG, Rosendaal FR, Lisman T. The impact of the fibrinolytic system on the risk of venous and arterial thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2009;35:468–77.
58. Schleef RR, Higgins DL, Pillemer E, Levitt LJ. Bleeding diathesis due to decreased functional activity of type 1 plasminogen activator inhibitor. *J Clin Invest*. 1989;83:1747–52.
59. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone E *et al*. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:152–6.
60. Eddy AA. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283:F209-20.
61. Koutroubakis IE, Sfiridaki A, Tsiolakidou G, Coucousi C, Theodoropoulou A, Kouroumalis EA. Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 levels in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20:912–6.
62. Alkim H, Ayaz S, Alkim C, Ulker A, Sahin B. Continuous active state of coagulation system in patients with nonthrombotic inflammatory bowel disease. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2011;17:600–4.
63. Vrij AA, Rijken J, van Wersch JWJ, Stockbrügger RW. Coagulation and fibrinolysis in inflammatory bowel disease and in giant cell arteritis. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33:75–83.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Glavni cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti razliku u serumskoj koncentraciji PAI-1 između bolesnika s upalnim bolestima crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu. Sporedni ciljevi bili su ispitati razliku u serumskoj koncentraciji PAI-1 između bolesnika s ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolesti te istražiti povezanost PAI-1 s odabranim antropometrijskim, laboratorijskim i kliničkim pokazateljima u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

Ispitanici i metode: Istraživanje uključuje ukupno 60 ispitanika, i to 30 s upalnom bolesti crijeva (14 s dijagnozom Crohnove bolesti i 16 ulceroznog kolitisa) te 30 kontrolnih ispitanika. Svim ispitanicima je uzeta detaljna medicinska anamneza, obavljen klinički pregled te uzet uzorak venske krvi nakon 10-satnog posta. Serumski koncentracija PAI-1 određena je korištenjem ProcartaPlex multiplex imunotesta (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, SAD).

Rezultati: Pronađena je statički značajno veća koncentracija hemoglobina u kontrolnoj skupini u odnosu na IBD skupinu ($p = 0,005$) i značajno veća serumski koncentracija hsCRP u IBD skupini u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,001$). U bolesnika s upalnim bolestima crijeva pronađena je veća serumski koncentracija PAI-1 u odnosu na kontrolnu skupinu ($8741,5 \pm 2153$ pg/mL vs. $3687,2 \pm 896$ pg/mL, $p < 0,001$). Nije pronađena razlika u serumskim koncentracijama PAI-1 između bolesnika s Crohnovom bolesti i bolesnika s ulceroznim kolitisom ($8519,0 \pm 2396$ pg/mL vs. $8997,0 \pm 2250$ pg/mL, $p = 0,729$). Nadalje, pronađena je pozitivna linearna korelacija ($r = 0,416$, $p = 0,022$) između razine fekalnog kalprotektina i serumski koncentracije PAI-1 u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

Zaključci: Serumski koncentracija PAI-1 statistički je značajno veća u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu, ali nije dokazana statistički značajna razlika u serumskoj koncentraciji PAI-1 između bolesnika s ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolesti. Fekalni kalprotektin ima statistički značajnu povezanost sa serumskom koncentracijom PAI-1 u upalnim bolestima crijeva.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Plasminogen activator-1 inhibitor (PAI-1) in patients with inflammatory bowel diseases

Objectives: The main objective of this thesis was to investigate the difference in PAI-1 serum concentration between patients with inflammatory bowel diseases compared to the control group. Secondary objectives were to examine the difference in serum PAI-1 concentration between patients with ulcerative colitis and Crohn's disease and to investigate the association of PAI-1 with selected anthropometric, laboratory and clinical indicators in patients with inflammatory bowel diseases.

Subjects and methods: The research included a total of 60 subjects, 30 with inflammatory bowel disease (14 diagnosed with Crohn's disease and 16 with ulcerative colitis) and 30 control subjects. A detailed medical history was taken from all subjects, a clinical examination was performed, and a venous blood sample was taken after a 10-hour fast. Serum PAI-1 concentration was determined using the ProcartaPlex multiplex immunoassay (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Results: A statically significantly higher concentration of hemoglobin was found in the control group compared to the IBD group ($p = 0.005$) and a significantly higher serum concentration of hsCRP in the IBD group compared to the control group ($p < 0.001$). In patients with inflammatory bowel diseases, a higher serum concentration of PAI-1 was found compared to the control group (8741.5 ± 2153 pg/mL vs. 3687.2 ± 896 pg/mL, $p < 0.001$). There was no difference in serum PAI-1 concentrations between patients with Crohn's disease and patients with ulcerative colitis (8519.0 ± 2396 pg/mL vs. 8997.0 ± 2250 pg/mL, $p = 0.729$). Furthermore, a positive linear correlation ($r = 0.416$, $p = 0.022$) was found between fecal calprotectin level and serum PAI-1 concentration in patients with inflammatory bowel diseases.

Conclusions: The serum concentration of PAI-1 was statistically significantly higher in the group of patients with inflammatory bowel diseases compared to the control group, but there was no significant difference in the serum concentration of PAI-1 between patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. Fecal calprotectin had a statistically significant association with serum PAI-1 concentration in inflammatory bowel diseases.