

# Usporedba monocitnih podskupina kod različito liječenih bolesnika s Crohnovom bolešću

---

Ćurić, Ana-Maria

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:171:326507>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Ana-Maria Ćurić**

**USPOREDBA MONOCITNIH PODSKUPINA KOD RAZLIČITO LIJEČENIH  
BOLESNIKA S CROHNOVOM BOLEŠĆU**

**Diplomski rad**

**Akadska godina**

**2021./2022.**

**Mentor:**

**doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić**

**Split, rujan 2022.**

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**  
**DIPLOMSKI RAD**

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet**  
**Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA**  
**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno područje:** Farmacija  
**Tema rada:** prihvaćena je na 74. sjednici Vijeća studija Farmacija, 21. sjednici Vijeća Kemijsko- tehnološkog fakulteta i na 14. sjednici Vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić

**USPOREDBA MONOCITNIH PODSKUPINA KOD RAZLIČITO LIJEČENIH BOLESNIKA S CROHNOVOM BOLEŠĆU**

Ana-Maria Ćurić, broj indeksa 218

**Naslov rada:** Usporedba monocitnih podskupina kod različito liječenih bolesnika s Crohnovom bolešću

**Cilj istraživanja:** Cilj istraživanja bio je odrediti postotke monocitnih subpopulacija kod pacijenata s Crohnovom bolešću koji su liječeni biološkom ili nebiološkom terapijom.

**Materijali i metode:** Uzorci krvi, uzeti svim sudionicima istraživanja u jutarnjem razdoblju nakon najmanje 10-satnog posta, korišteni su za biokemijsku analizu i protočnu citometriju. Krv je uzeta iz antekubitalne vene koristeći polietilenski kateter. Sto mikrolitara pune krvi tretirano je reagensom za blokiranje Fc receptora (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka) što je onemogućilo nespecifično vezanje protutijela. Uz to, dodano je 4  $\mu$ L anti-humanog CD14s PerCP-Cy5.5- konjugiranog protutijela (eBioscience, SAD), 4  $\mu$ L protutijela konjugiranog fikoeritriinom reaktivnog na humani CD16 (eBioscience, SAD) i 10  $\mu$ L mišjeg protutijela reaktivnog na humani CD44 konjugiranog s FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA). Zatim su uzorci inkubirani u trajanju od 20 minuta na 25 °C u mraku. Nakon liziranja eritrocita dodatkom otopine za lizu (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka), monociti su analizirani protočnim citometrom (BD Accuri C6, BD Biosciences, Belgija).

**Rezultati:** Rezultati koje smo dobili pokazali su dvostruko veći postotak CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocita u umjereno aktivnoj Crohnoj bolesti u odnosu na blagu i tešku ( $p = 0,002$ ). Isto tako, primjena nebiološke terapije smanjila je za 2,3 puta postotak neklasičnih CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocita, dok su pacijenti koji su primali biološku terapiju imali sličan postotak kao kontrolna skupina.

**Zaključci:** Biološka terapija je povoljnija od nebiološke jer ne snižava postotak neklasičnih protuupalnih CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocita.

**Ključne riječi:** Crohnova bolest, monocitne podskupine, biološka terapija, nebiološka terapija

**Rad sadrži:** 50 stranica, 6 slika, 9 tablica, 39 referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski jezik

**Sastav povjerenstva:** 1. prof. dr.sc. Anita Markotić, predsjednica  
2. doc.dr.sc. Ana Šešelja Perišin, član  
3. doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić, član - mentor

**Datum obrane:** 27.09.2022.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2**

**BASIC DOCUMENTATION CARD**  
**GRADUATE THESIS**

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine**  
**Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy**  
**University of Split, Croatia**

**Scientific area:** Biomedical science  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Thesis subject:** was accepted at the 74th session of the Pharmacy Studies Council, 21st session of the Council of the Faculty of Chemistry and Technology and at the 14th session of the Council Faculty of Medicine  
**Mentor:** doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić

**COMPARISON OF MONOCYTE SUBGROUPS IN DIFFERENTLY TREATED PATIENTS WITH CROHN'S DISEASE**

Ana-Maria Ćurić, index number 218

**Diploma thesis title:** Comparison of monocyte subgroups in differently treated patients with Crohn's disease

**The aim of this study:** The aim of the study was to determine the percentages of monocyte subpopulations in patients with Crohn's disease treated with biological or non-biological therapy.

**Methods:** Blood samples, taken from all research participants in the morning period after at least a 10-hour fast, were used for biochemical analysis and flow cytometry. Blood was taken from the antecubital vein using a polyethylene catheter. 100 microliters of whole blood were treated with Fc receptor blocking reagent (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) to prevent nonspecific binding. In addition, 4  $\mu\text{L}$  of anti-human CD14s PerCP-Cy5.5-conjugated antibodies (eBioscience, USA), 4  $\mu\text{L}$  of phycoerythrin-conjugated antibodies reactive to human CD16 (eBioscience, USA), and 10  $\mu\text{L}$  of mouse antibodies reactive to human CD44 conjugated with FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA). The samples were incubated for 20 minutes at 25 °C in the dark. After lysing erythrocytes with additional lysis solution (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), monocytes were analyzed with a flow cytometer (BD Accuri C6, BD Biosciences, Belgium).

**Results:** The results we obtained showed a twice higher percentage of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in moderately active Crohn's disease compared to mild and severe ( $p = 0.002$ ). Likewise, the use of non-biological therapy decreased by 2.3 times the percentage of non-classical CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocytes, while patients who received biological therapy had a similar percentage as the control group.

**Conclusion:** Biological therapy is more favorable than non-biological therapy because it does not lower the percentage of non-classical anti-inflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocytes.

**Keywords:** Crohn's disease, monocyte subgroups, biological therapy, non-biological therapy

**The thesis contains:** 50 pages, 6 figures, 9 tables, 39 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:** 1. Asst. prof. Ana Šešelja Perišin, PhD, chair person  
2. Prof. Anita Markotić, PhD, member  
3. Asst. prof. Nikolina Režić Mužinić, PhD, member - supervisor

**Defence date:** 27.09.2022.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of School of Medicine,  
Šoltanska 2.

POPIS KRATICA:

IBD – od engl. *Inflammatory bowel disease*; upalna bolest crijeva

CD – od engl. *Crohn's disease*; Crohnova bolest

UC – od engl. *Ulcerative colitis*; ulcerozni kolitis

GIT – gastrointestinalni trakt

NOD2 – od engl. *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*; protein 2 koji sadrži oligomerizacijsku domenu za vezanje nukleotida

ATG16L1 – od engl. *Autophagy Related 16 Like 1*

IRGM – od engl. *Immunity Related GTPase M*; GTPaza M povezana s imunitetom

ECCO – od engl. *European Crohn's and Colitis Organisation*; Europska organizacija za Crohnovu bolest i kolitis

CRP – od engl. *C-reactive protein*; C-reaktivni protein

DNA – od engl. *Deoxyribonucleic acid*; deoksiribonukleinska kiselina

TNF- $\alpha$  – od engl. *Tumor necrosis factor*; Čimbenik tumorske nekroze

IL-12/23 – interleukin-12/23

IL-1 $\beta$  – interleukin-1 $\beta$

CCL3/MIP1 $\alpha$  – od engl. *Macrophage Inflammatory Protein 1 $\alpha$* ; makrofagni upalni protein 1-alfa

FcR – od engl. *Immunoglobulin Fc receptors*; imunoglobulinski Fc receptori

KBC – klinički bolnički centar

SES-SC – od engl. *The simple endoscopic score for Crohn disease*; jednostavna endoskopska procjena za Crohnovu bolest

FSC-detektor – od engl. forward scatter

SSC-detektor – od engl. side scatter

FITC – od engl. *Fluorescein isothiocyanate*; fluorescein izotiocijanat

ESR – od engl. *Erythrocyte sedimentation rate*; stopa sedimentacije eritrocita

Hb – hemoglobin

Hct – od engl. *Hematocrit*; hematokrit

LDH – od engl. *Lactate dehydrogenase*; laktatdehidrogenaza

ALP – od engl. *alkaline phosphatase*; alkalna fosfataza

FC – od engl. *Faecal calprotectin*; fekalni kalprotektin;

hs-CRP – od engl. *High-sensitivity C-reactive protein*; C-reaktivni protein visoke osjetljivosti

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Nikolini Režić Mužinić na ukazanoj pomoći i uloženom trudu prilikom izrade diplomskog rada.*

*Veliko hvala svim prijateljima i dragim ljudima koji su obilježili razdoblje studiranja divnim uspomenama.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima i obitelji što su me vodili i pokazali mi pravi put.*

*Hvala što ste mi pomogli da postanem ono što jesam.*

## Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....                                       | 1  |
| 1.1. Upalne bolesti crijeva .....                   | 2  |
| 1.2. Definicija Crohnove bolesti .....              | 2  |
| 1.3. Epidemiologija.....                            | 3  |
| 1.4. Etiologija .....                               | 4  |
| 1.4.1. Genetski čimbenici.....                      | 5  |
| 1.4.2. Okolišni čimbenici .....                     | 5  |
| 1.5. Proširenost i podtipovi bolesti .....          | 6  |
| 1.6. Klinička manifestacija bolesti .....           | 7  |
| 1.6.1. Crijevni simptomi .....                      | 7  |
| 1.6.2. Izvancrijevne manifestacije .....            | 8  |
| 1.6.3. Malignost .....                              | 8  |
| 1.7. Postavljanje dijagnoze .....                   | 9  |
| 1.8. Liječenje Crohnove bolesti.....                | 9  |
| 1.8.1. Nebiološka terapija .....                    | 10 |
| 1.8.2. Biološka terapija .....                      | 11 |
| 1.8.3. Smjernice za liječenje Crohnove bolesti..... | 12 |
| 1.9. Monocitne podskupine .....                     | 13 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA.....                | 15 |
| 2.1. Ciljevi istraživanja.....                      | 16 |
| 2.2. Hipoteza istraživanja .....                    | 16 |
| 3. ISPITANICI I METODE .....                        | 17 |
| 3.1. Ustroj istraživanja.....                       | 18 |
| 3.2. Ispitanici .....                               | 18 |
| 3.3. Procjena ozbiljnosti bolesti.....              | 18 |
| 3.4. Protočna citometrija.....                      | 19 |
| 3.5. Uzimanje i priprema uzoraka .....              | 21 |
| 3.6. Analiza podataka .....                         | 21 |
| 3.7. Statistička analiza podataka.....              | 22 |
| 3.8. Plan istraživanja.....                         | 23 |
| 4. REZULTATI.....                                   | 24 |



|  |    |
|--|----|
| 4.1. Utjecaj endoskopske aktivnosti bolesti na postotak monocita .....   | 25 |
| 4.2. Razlike u antropometrijskim i laboratorijskim parametrima različito liječenih bolesnika s Crohnovom bolešću ..... | 26 |
| 4.3. Razlike u monocitnim podskupinama različito liječenih bolesnika s Crohnovom bolešću .....                         | 28 |
| 5. RASPRAVA.....   | 29 |
| 6. ZAKLJUČAK .....   | 32 |
| 7. LITERATURA.....   | 34 |
| 8. SUMMARY .....   | 39 |
| 9. ŽIVOTOPIS .....   | 41 |

## **1. UVOD**

## 1.1. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva karakterizirane su učestalim epizodama upale gastrointestinalnog trakta uzrokovane pretjeranom reakcijom imunološkog sustava na crijevnu mikrofloru. Pod nazivom upalna bolest crijeva obuhvaćene su dvije idiopatske bolesti crijeva, a razlikuju se prema položaju i dubini zahvaćenosti crijevne stijenke. Ulcerozni kolitis predstavlja difuznu upalu sluznice debelog crijeva, najčešće zahvaćajući područje rektuma uz mogućnost proširenja na i izvan sigmoidnog kolona ili cijelog debelog crijeva do cekuma (pankolitis). Crohnova bolest izaziva transmuralnu ulceraciju gastrointestinalnog trakta, najčešće terminalnog ileuma i debelog crijeva. Obje bolesti mogu se razlikovati i klasificirati po opsegu zahvaćenosti kao blage, umjerene i teške, dok se Crohnova bolest također može klasificirati prema fenotipu (1).

**Tablica 1.** Osnovne razlike ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti (2)

| ZAHVAĆENOST         | CROHNOVA BOLEST  | ULCEROZNI KOLITIS  |
|---------------------|--|--|
| gornji dijelovi GIT | rijetko  | Nikada   |
| distalni ileum      | vrlo često   | Nikada   |
| kolon               | rijetko  | Uvijek   |
| rektum              | rijetko  | Nikada   |
| <b>SIMPTOMI</b>     | Bol koja zahvaća donji desni dio abdomena, natečenost i zadebljanje stijenke crijeva | Bol koja zahvaća donji lijevi dio abdomena, dijareja, gubitak tjelesne težine i rektalno krvarenje |

\*GIT – gastrointestinalni trakt

## 1.2. Definicija Crohnove bolesti

Crohnova bolest, koja se još naziva regionalni enteritis ili ileitis, kronična i doživotna je bolest koja izaziva upalu i iritaciju u gastrointestinalnom traktu, posebno u tankom i debelom crijevu (3).

### 1.3. Epidemiologija

Incidencija i prevalencija Crohnove bolesti razlikuju se u pojedinim regijama svijeta. Razne studije pokazuju da je incidencija u porastu te da najveći porast bilježe razvijene zemlje svijeta. Najveći porast broja oboljelih zabilježen je u Sjevernoj Europi, Ujedinjenom Kraljevstvu i Sjevernoj Americi (4). Incidencija Crohnove bolesti u visokorazvijenim zemljama poput Njemačke iznosi 322 na 100000 stanovnika ili 319 na 100000 stanovnika u Kanadi (5). Također, isti trend porasta incidencije bilježi se i u zemljama u razvoju. Prevalencija bolesti najveća je u Sjevernoj Europi i Sjevernoj Americi, gdje se bilježi prevalencija od 100 do 300 na 100000 stanovnika. Smatra se da je trenutno pogođeno više od pola milijuna Amerikanaca te da je bolest češća kod pacijenata židovske vjeroispovijesti (6). U južnim dijelovima svijeta i Aziji zabilježene su manje stope incidencije i prevalencije, iako se i kod njih zadnjih desetljeća bilježi trend porasta (7).

Republika Hrvatska, premda zemljopisno pripada mediteranskim zemljama, priključuje se trendu zapadnoeuropskih zemalja te bilježimo porast slučajeva upalnih bolesti crijeva (8). Nedavna studija provedena tijekom 2006 – 2014. Godine u Splitsko-dalmatinskoj županiji pokazala je prosječnu godišnju pojavnost Crohnove bolesti 4,1 na 100000 stanovnika. Isto tako, pokazala je kako je učestalija u muškaraca za 1,3 puta te se češće javlja na otocima i u gradovima te među visokoobrazovanim stanovništvom (9).

Bitno je naglasiti kako je klinička manifestacija bolesti različita, a mogućnosti dijagnostike su varijabilne te ovisne o medicinskoj i ekonomskoj situaciji u različitim regijama svijeta. Nadalje, prikupljanje podataka, mogućnost i kvaliteta provođenja kliničkih ispitivanja kao i opća informiranost pacijenata mogu utjecati na točne brojke te se pretpostavlja da su stvarne brojke čak i veće od zabilježenih. Osim što je zemljopisno ovisna, studije su također pokazale kako se Crohnova bolest češće javlja u osoba ženskog spola. Takva ovisnost nije uočena u cijelom svijetu. Uz to, zadnje studije pokazuju kako u područjima koja su imala veću incidenciju Crohnove bolesti u žena poput Europe, Sjeverne Amerike i država u razvoju, sada bilježe porast stope oboljelih muškaraca, postavši jednaka ili čak veća nego u žena. Crohnova bolest najčešće se dijagnosticira u dobi od 15 – 30 godina (4). Na slici 1 pokazana je pojavnost Crohnove bolesti u svijetu.



**Slika 1.** Pojavnost Crohnove bolesti u svijetu (9)

## 1.4. Etiologija

Točna etiologija bolesti za sada još nije u potpunosti poznata. Iako opsežno proučavani, uzročni čimbenici u nastanku bolesti još nisu shvaćeni. Smatra se kako nastanku bolesti pogoduju interakcije između genetskih i okolišnih čimbenika, utječući na normalnu crijevnu floru izazivanjem neodgovarajućeg imunološkog odgovora sluznice (10).

### 1.4.1. Genetski čimbenici

Identificirana su ukupno 163 gena/lokusa rizika. Velika većina pronađenih lokusa povezana je s Crohnovom bolešću i ulceroznim kolitisom što ukazuje kako biološki mehanizmi uključeni u jednu bolest mogu imati ulogu i u drugoj bolesti. Otkako je 1909. godine prvi put prepoznata obiteljska priroda upalnih bolesti crijeva, pronađeno je kako 5 – 23 % pacijenta s Crohnovom bolesti ili ulceroznim kolitisom ima oboljelog u obitelji (11). Crohnova bolest povezana je s funkcionalnim polimorfizmima u genskim regijama NOD2, ATG16L1 i IRGM. Polimorfizam u NOD2 regiji povezan je sa smanjenom sposobnošću proteina NOD2 da na ispravan način prepozna bakterijski peptidoglikan i aktivira nuklearni faktor- $\kappa$ B i putove protein kinaze aktivirane mitogenom (12). Potrebne su dodatne studije kako bi se u potpunosti shvatila i razumjela genetska predispozicija ove bolesti.

### 1.4.2. Okolišni čimbenici

Iako genetska predispozicija može utjecati na etiologiju bolesti, nije jedina odgovorna za njezin nastanak. Upalne bolesti crijeva su primarno okarakterizirane kao bolesti industrijaliziranog svijeta s najvećom prevalencijom u razvijenim zemljama. Samim time, uz genetske čimbenike, na nastanak bolesti izrazito utječu i okolišni čimbenici. Razlike u životnim stilovima i načinu življenja ljudi u urbanim i ruralnim područjima mogu objasniti veću učestalost bolesti u urbanim sredinama (10). Potencijalno bitni čimbenici obuhvaćaju i način rađanja i hranjenja novorođenčadi te izloženost antibioticima kroz životni vijek. Dojenje i smanjena izloženost antibioticima pokazuju protektivni učinak u ranoj imunomodulaciji sluznice probavnog sustava (13). Pokazalo se kako pušenje u kod bolesnika s Crohnovom bolesti povećava učestalost recidiva i potrebu za operativnim zahvatima te kako prekid pušenja poboljšava tijek bolesti. Studije još nisu u potpunosti dokazale utjecaj prehrane na Crohnovu bolest, no antigeni hrane se povezuju s razvojem crijevne upale (14).

## 1.5. Proširenost i podtipovi bolesti

Crohnovu bolest prvi put su opisali dr. Burill B. Crohn i kolege 1932. godine. Crohnovu bolest karakteriziraju diskontinuirane upalne lezije duž gastrointestinalnog sustava, a nastala upala je klasično transmuralna uz mogućnost pronalaska granuloma tijekom biopsije. Crohnova bolest klasificira se na temelju anatomske zahvaćenosti i po fenotipu. Naime, bolest ima tendenciju zahvaćati bilo koji dio gastrointestinalnog sustava, a kod najvećeg dijela pacijenata lezije se javljaju u terminalnom ileumu i kolonu. Uz to, 25 % pacijenata pati od perianalnih komplikacija koje uključuju analne fisure i fistule. Kod znatno manjeg broja pacijenata (10 %), bolest se prezentira izoliranim perianalnim simptomima, ekstraintestinalnim manifestacijama ili simptomima u gornjem gastrointestinalnom sustavu (15). Uz to, za olakšavanje istraživanja i liječenja bolesti, donesene su dvije međunarodne klasifikacije Crohnove bolesti. Prva je donesena na Svjetskom gastroenterološkom kongresu u Beču 1998. godine, a druga 2005. godine u Montrealu. U tablici 2 je sažeta Montrealska klasifikacija Crohnove bolesti.

**Tablica 2.** Montrealska klasifikacija bolesti (16)

| <b>A (engl. AGE OF DIAGNOSIS) – dob u vremenu postavljene dijagnoze</b>                           |  |  |  |
|---|--|--|--|
| <b>A1</b> < 17 godina   | <b>A2</b> 17 – 40 godina   | <b>A3</b> > 40 godina  |  |
| <b>B (engl. BEHAVIOR) – manifestacija bolesti</b>   |  |  |  |
| <b>B1</b> – nije došlo do komplikacija tijekom bolesti  | <b>B2</b> – strukture se definiraju kao pojava diskontinuiranog suženja lumena dokazana endoskopski, patološki ili kirurško patološki s postojanjem prestenoične dilatacije ili znakova opstrukcije bez penetracije u bilo koje trenutku tijekom bolesti | <b>B3</b> – penetrirajuća bolest koja se definira kao pojava perianalnih ili intraabdominalnih fistula, upalnih masa i/ili apscesa u bilo kojem trenutku tijekom trajanja bolesti. |  |
| <b>L (engl. LOCALIZATION) – lokalizacija bolesti</b>  |  |  |  |
| <b>L1</b> – upala je zahvatila donju trećinu tankog crijeva, a cekum može i ne mora biti zahvaćen | <b>L2</b> – bolest zahvaća područje cijelog kolona između cekuma i rektuma (bilo koji dio), a ne zahvaća tanko crijevo i gornji dio probavnog sustava  | <b>L3</b> – bolest zahvaća terminalni ileum i bilo koji dio između uzlaznog kolona i rektuma   | <b>L4</b> – bolest jedino zahvaća tanko crijevo proksimalno od terminalnoga ileuma (bilo koji dio) |

\* Oznaka «p» se dodaje B1-B3 ukoliko je postojana i perianalna bolest

## 1.6. Klinička manifestacija bolesti

### 1.6.1. Crijevni simptomi

Prezentirajući simptomi dosta su varijabilni, ali donekle mogu korelirati s fenotipom i lokalizacijom bolesti. Često se događa da pacijenti imaju simptome godinama prije postavljanja ispravne dijagnoze. Najčešći simptomi koji se prezentiraju su abdominalna bol, pogotovo u donjem desnom abdomenu, i dijareja uz mogućnost razvijanja sistemskih simptoma kao što su gubitak tjelesne težine, malaksalosti i blago povišenje tjelesne temperature. Fizikalnim pregledom prvo bi se trebali identificirati nestabilni pacijenti kojima je potrebno pružiti hitnu pomoć. Treba izmjeriti puls, krvni tlak, temperaturu, brzinu disanja i tjelesnu težinu. Nalazi abdominalnog pregleda mogu uključivati osjetljivost, nadutost i/ili prisutnost mase. Potreban je anorektalni pregled, a treba razmotriti i pregled zdjelice jer su apscesi, fisure ili fistule česti u Crohnovoj bolesti. Perianalni nalazi (npr. fistule, apscesi) povećavaju vjerojatnost Crohnove bolesti. Pacijenti koji pate od stenozirajućeg tipa bolesti često razviju abdominalne opstrukcije koje dovode do poteškoća u pražnjenju crijeva, povraćanja i muke. S druge strane, pacijenti s penetrirajućom Crohnovom bolesti mogu razviti fistule ili apscese. Kod težih kliničkih slika, uz navedeno, javlja se i krvava stolica, iako se češće manifestira kod ulceroznog kolitisa. Svakako, simptomi sami po sebi nisu dovoljni za postavljanje dijagnoze. Potrebne su različite dijagnostičke obrade poput praćenja biokemijskih markera, endoskopije i sl. (15, 17).

Pacijenti se često suočavaju s malnutricijom ili nutritivnim nedostacima uzrokovanih lošijom apsorpcijom unesene hrane. Određene studije su pokazale kako pacijenti s Crohnovom bolesti pate od različitih komorbiditeta poput kolorektalnog karcinoma, kardiovaskularnih i respiratornih bolesti (2).



## 1.6.2. Izvancrijevne manifestacije

Izvancrijevne manifestacije upalne bolesti crijeva česta su pojava kod Crohnove bolesti, kao i kod ulceroznog kolitisa (tablica 3). To su promjene koje se događaju pod utjecajem bolesti, a ne zahvaćaju gastrointestinalni sustav. Postoji mogućnost zahvaćanja bilo kojeg organskog sustava uključujući mišićno-koštani sustav, dermatološki, hepato-pankreato-bilijarni, očni, bubrežni i plućni sustav (18).

**Tablica 3.** Izvancrijevne manifestacije Crohnove bolesti (18)

| <b>ORGANSKI SUSTAV</b>     | <b>IZVANCRIJEVNE MANIFESTACIJE</b>  |
|----------------------------|---|
| mišićno-koštani            | arthritis, osteoporoza, hipertrofična osteoartropatija                      |
| dermatološki               | fisure, fistule, vitiligo, psorijaza  |
| očni                       | ulkusi rožnice, uveitis, vaskularna bolest retine                           |
| hepato-pankreato-bilijarni | autoimuni kronični aktivni hepatitis, portalna fibroza, ciroza, masna jetra |

## 1.6.3. Malignost

Istraživanja su pokazala kako postoji povećani rizik za pacijente s Crohnovom bolesti za razvijanje karcinoma tankog crijeva, karcinoma jetre i karcinoma bilijarnog trakta. Također, uočen je povećani rizik za nastanak limfoma kod muškaraca oboljelih od Crohnove bolesti (19).

## 1.7. Postavljanje dijagnoze

Najčešći simptomi koji ukazuju na Crohnovu bolest su dijareja, abdominalna bol, gubitak tjelesne težine i opća slabost. Osim simptoma koji mogu ukazivati na postojanje bolesti, potrebne su dodatne dijagnostičke metode kako bi se dijagnoza mogla potvrditi. Zbog nepostojanja specifičnog testa koji bi mogao utvrditi razliku između Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa, sa simptomima koji su često slični i zbunjujući, potrebno je provesti određene laboratorijske pretrage, fizičke preglede, endoskopske preglede i biopsije kako bi se dijagnoza ispravno postavila (20). Laboratorijska pretraga identificirat će upalu, a mjerenje fekalnog kalprotektina koristi se za isključivanje bolesti. Endoskopija i kolonoskopija omogućuju uvid u proširenost bolesti te služe za konačno postavljanje dijagnoze (17).

## 1.8. Liječenje Crohnove bolesti

Liječenje Crohnove bolesti ovisi o stupnju proširenosti, aktivnosti bolesti i simptomima. Idealna terapijska strategija za bolesnike s Crohnovom bolesti potaknut će i održati remisiju bez pretjeranog korištenja kortikosteroida i uz minimalne operativne zahvate (21). Prema ECCO konsenzusu stupanj aktivnosti Crohnove bolesti definira se na sljedeći način:

- Blagi stupanj aktivnosti – pacijent može normalno hodati i tolerira oralnu prehranu, nema znakova dehidracije i sistemske zahvaćenosti, nije prisutna abdominalna bol ili abdominalna masa, gubitak težine nije viši od 10 %, CRP obično je povišen.
- Umjereni stupanj aktivnosti – pacijent pati od povremenog povraćanja, gubitak tjelesne težine je veći od 10 %, izostaje reakcija na terapiju za blagu aktivnost Crohnove bolesti, CRP je povišen.
- Teški stupanj aktivnosti – pacijent je kahektičan, indeks tjelesne mase je ispod 18, ima apscese i trajne simptome unatoč liječenju, CRP je povišen (22).

### 1.8.1. Nebiološka terapija

Postoje različiti lijekovi koji se mogu koristiti u postupcima liječenja Crohnove bolesti, ali izbor lijeka individualan je za svakog pacijenta (tablica 4).

**Tablica 4.** Lijekovi korišteni u liječenju Crohnove bolesti (23)

| Lijekovi                   | Doziranje  | Blaga do umjerena Crohnova bolest |                  | Teška Crohnova bolest |                  |
|----------------------------|--|-----------------------------------|------------------|-----------------------|------------------|
|                            |  | Indukcija                         | Održavanje       | Indukcija             | Održavanje       |
| Sulfasalazin (oralno)      | Indukcija 3–6 g/dan                                | Da                                | Ne               |                       |                  |
| Mesalazin (oralno)         |  | Ne <sup>*1</sup>                  | Ne <sup>*1</sup> |                       |                  |
| Prednizolon (oralni)       | Indukcija 0,25 mg/kg do 0,75 mg/kg                 | Da                                | Ne               | Da                    | Ne               |
| Metil-prednizolon (oralno) | Indukcija 48 mg/d                                  | Da                                | Ne               | Da                    | Ne               |
| Prednizolon (IV)           | Indukcija 60 mg/d                                  |                                   |                  | Da                    |                  |
| Budezonid (oralno)         | Indukcija 9 mg/d Održavanje 6 mg/d <sup>*2</sup>   | Da                                | Ne <sup>*2</sup> |                       | Da <sup>*2</sup> |
| Metronidazol (oralno)      | Indukcija 10-20 mg/kg/dan                          | Ne <sup>*1</sup>                  |                  |                       |                  |
| Azatioprin (oralno)        | 2-3 mg/kg/dan                                      | Ne <sup>*5</sup>                  | Ne <sup>*6</sup> | Ne <sup>*5</sup>      | Da               |
| 6-merkaptopurin (oralno)   | Održavanje 1,5 mg/kg/dan                           | Ne <sup>*5</sup>                  | Ne <sup>*6</sup> | Ne <sup>*5</sup>      | Da               |
| Metotreksat (IM)           | Indukcija 25 mg/tjedan; održavanje 15–25 mg/tjedan |                                   |                  | Da <sup>*5</sup>      | Da               |

\*1 - preporučeno u trenutnim smjernicama; stanje dokaza je nedosljedno i ne dokumentira nedvosmisleno učinkovitost.

\*2 - budezonid u dozi od 6 mg/dan produljuje interval do sljedećeg relapsa, ali ne ispunjava standardne kriterije za održavanje remisije. Također se može koristiti kao lijek za "štednju steroida" za pacijente ovisne o prednizolonu.

\*5 - Spor početak učinka ograničava korisnost za izazivanje remisije.

\*6 - Profil toksičnosti ovog lijeka čini ga neprikladnim za ovu indikaciju.

Sulfasalazin koristi se za liječenje bolesti koja je ograničena na debelo crijevo i potpuni učinak ostvaruje nakon nekoliko tjedana, iako do olakšanja simptoma dolazi protekom nekoliko dana. 5-aminosalicilati počinju djelovati prolaskom kroz tanko crijevo, korisni su u liječenju aktivne faze bolesti te u postizanju i održavanju remisije. Antibiotici, koji se najčešće koriste za smanjivanje upale uzrokovane bakterijama, su ciprofloksacin i metronidazol. Kortikosteroidi su lijekovi koji se koriste u aktivnoj fazi bolesti za postizanje remisije, ali se ne preporučuju koristiti kroz duže vremensko razdoblje i u remisiji zbog nuspojava. Imunomodulatori poput azatioprina, metotreksata i merkaptopurina koriste se za liječenje bolesti te najčešće nisu korišteni kao prva linija liječenja (24). Uobičajeno, kada 5-aminosalicilati nisu pokazali učinak, u liječenju bolesnika koriste se kortikosteroidi.

Azatioprin koristi se za poboljšavanje kvaliteta života smanjivanjem učestalosti proljeva i abdominalne boli. Uz to, uključuje se u liječenje kako bi se smanjila uporaba kortikosteroida u liječenju (25).

### 1.8.2. Biološka terapija

Zadnjih nekoliko desetljeća razvijaju se novi lijekovi za liječenje Crohnove bolesti, dok najnoviju terapiju predstavljaju biološki lijekovi. Biološka terapija uključuje raznoliku skupinu lijekova koji djeluju izravno na imunološki sustav. Spomenuta sredstva mogu biti genetski modificirane verzije prirodnih spojeva ili sasvim novi spojevi (26). Navedeni lijekovi se proizvode metodom rekombinantne DNA, gdje se geni potrebni za sintetiziranje nekog proteina trebaju ugraditi u genom matične stanice uz pomoć vektora. Sintetizirani protein izolira se iz stanice te se koristi kao aktivna supstancija (27).

Sredstva za biološku terapiju osmišljena su s ciljem specifičnog ciljanja gena, proteina, skupinu gena ili proteina za koje se smatra da su uključeni u bolest (tablica 5). Čimbenik tumorske nekroze (TNF- $\alpha$ ) je protuupalni citokin koji inducira proliferaciju i diferencijaciju stanica. TNF- $\alpha$  potiče upalni odgovor u Crohnovoj bolesti, a trenutno se za liječenje IBD-a koriste tri anti-TNF molekule: infliksimab, adalimumab i certolizumab (28). Osim anti-TNF molekula, u liječenju koriste se i antiintegrini. Umjesto blokiranja proizvodnje upalnih citokina, spomenuta klasa sredstava djeluje tako što ometa migraciju leukocita do mjesta upale. Oni to čine blokiranjem integrina, koji su transmembranski receptori prisutni na različitim stanicama koji posreduju staničnu adheziju, signalizaciju i migraciju. Inhibicijom ove interakcije između  $\alpha 4$  integrina i molekula stanične adhezije, anti-integrini blokiraju migraciju upalnih stanica do mjesta bolesti, uključujući gastrointestinalni trakt, i sprječavaju daljnje trajanje upalne kaskade. Najnovija klasa bioloških lijekova dostupna za upotrebu u IBD-u su anti-IL-12/23 koji inhibiraju zajedničku p40 podjedinicu (29).

Biološka terapija koristi se više od 20 godina, a predstavlja revoluciju u liječenju imunoloških bolesti. U dolje navedenoj tablici prikazani su biološki lijekovi koji se mogu koristiti u liječenju IBD. Terapija se treba primjenjivati u kliničkim centrima s iskustvom korištenja biološke terapije, a pacijenti bi trebali biti pod nadzorom liječnika. Nedostatak ovakve vrste terapije je njena visoka cijena zbog čega predstavlja veliki teret zdravstvenome sustavu.

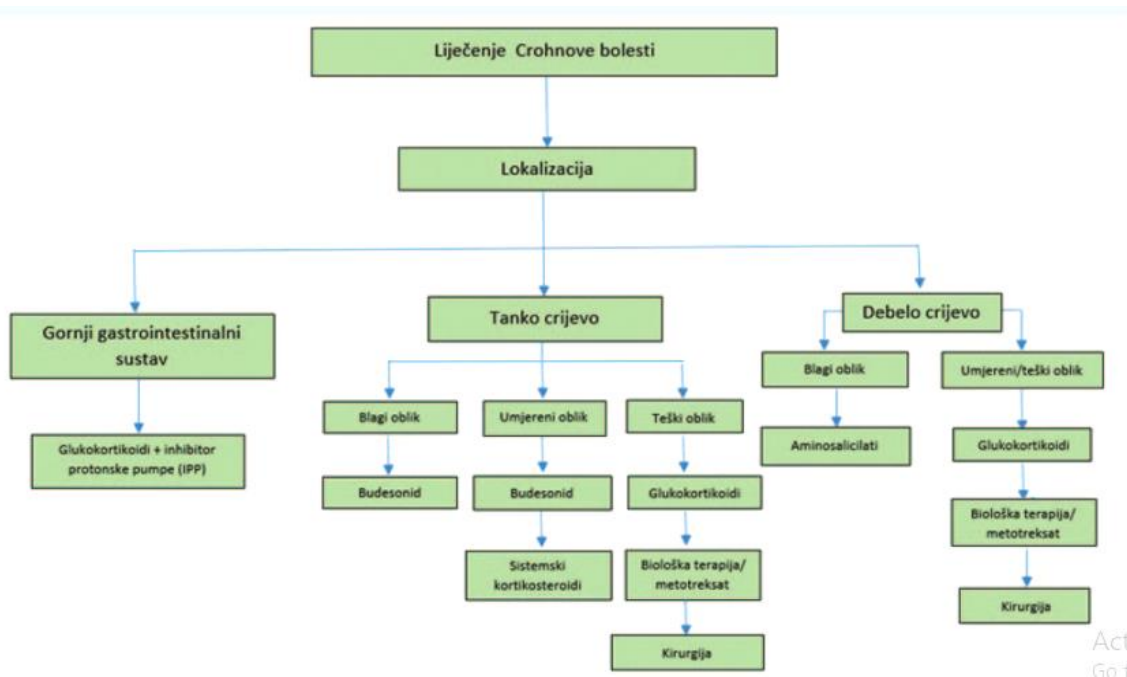
**Tablica 5.** Biološka terapija za liječenje IBD (28)

| <b>CILJ</b>                   | <b>SPOJ</b>   | <b>BOLEST</b>                 |
|-------------------------------|---|-------------------------------|
| TNF- $\alpha$                 | Infliksimab,<br>adalimumab,<br>certolizumab,<br>golimumab | CD,UC<br>CD,UC<br>CD<br>CD,UC |
| $\alpha$ 4-integrin           | natalizumab   | CD, UC                        |
| $\alpha$ 4 $\beta$ 7-integrin | vedolizumab   | CD, UC                        |
| IL-12/23                      | ustekinumab   | CD                            |

\*CD-Crohnova bolest, UC-ulcerozni kolitis

### 1.8.3. Smjernice za liječenje Crohnove bolesti

Smjernice za liječenje Crohnove bolesti u Republici Hrvatskoj odgovaraju smjernicama Europske organizacije za Crohnovu bolest i kolitis. Umjereno aktivna Crohnova bolest koja je proširena na završni dio tankog crijeva i početni dio kolona liječi se sistemskim kortikosteroidima poput prednizolona ili metil-prednizolona. Kod bolesnika koji nisu podnosili ili nisu reagirali na steroide koristi se anti-TNF terapija. Bolesnici koji ne reagiraju na kortikosteroide i anti-TNF terapiju liječe se vedolizumabom. Bolesnici u ranijim fazama bolesti bolje odgovaraju na kombiniranu terapiju infliksimabom i azatioprina. Bolesnici s teško aktivnom Crohnovom bolesti isprva se liječe sistemskim kortikosteroidima, a anti-TNF terapija pogodna je za bolesnike s relapsom. Kod bolesnika kod kojih je izostao odgovor na liječenje može se razmotriti operativni zahvat. Imunosupresivi koriste se kao najpogodnija terapija za bolesnike čiji simptomi pokazuju lošiji tijek bolesti. Biološka terapije najčešće se koristi kod bolesnika koji nisu imali odgovor na lijekove prve linije liječenja (30). Na slici 2 prikazan je postupak i pristup liječenju Crohnove bolesti.



Slika 2. Postupak liječenja Crohnove bolesti (27)

## 1.9. Monocitne podskupine

Monociti i makrofagi stanice su unutar mijeloidne stanične loze koje igraju ključnu ulogu u urođenom imunološkom odgovoru protiv patogena (31). Monociti i makrofagi sudjeluju u imunološkom odgovoru oslobađanjem protuupalnih citokina. Kao posljedica toga, neodgovarajuća aktivacija receptora može izazvati dugotrajnu upalu koja rezultira autoimunim i upalnim bolestima. Krvni monociti igraju ključnu ulogu u urođenoj imunološkoj obrani putem fagocitoze patogena, probave, obrade i predavljanja antigena te otpuštanjem efektorskih molekula kao što su kemokini i citokini. Štoviše, smatra se da su monociti jedini izvor crijevnih makrofaga, a nekoliko je studija pokazalo promjene u sastavu monocita periferne krvi kod Crohnove bolesti (CD, od engl. Crohn's disease) (32).

**Tablica 6.** Ključne funkcije monocitnih podskupina (32)

| <b>PODSKUPINE MONOCITA</b>   |   |  |
|--|---|--|
| <b>CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, klasični ili upalni</b>  | <b>CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, intermedijarni</b>  | <b>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, neklasični ili protuupalni</b>   |
| Imaju visoku sposobnost fagocitoze, efikasno proizvode upalne medijatore kao odgovor na bakterijski patogen, sudjeluju u popravku tkiva, migriraju na mjesto upale | Efikasno proizvode upalne medijatore kao odgovor na bakterijski patogen, prezentiraju antigene, šire se tijekom infekcije | Proizvode TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ i CCL3 kao odgovor na stimulaciju virusom ili imunokompleksom, obavljaju FcR-posredovanu fagocitozu |

CD14 molekula koristi se kao biljeg prepoznavanja ljudskih monocita s obzirom na njen visok izražaj na površini ljudskih monocita i makrofaga. Nekoliko ranijih kliničkih studija koristilo je CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> kao biljege upalnih monocita i utvrdilo povezanost povećanih razina CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocita u ljudskim upalnim bolestima, uključujući Crohnovu bolest (33). Presudnu ulogu u gastrointestinalnoj upali prepisuje se biljegu CD44 izraženom na monocitima i makrofagima. Raznolikost monocitnih podskupina može ukazivati na patogenezu bolesti, a povećani broj određene populacije služi kao biomarker bolesti (34).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA**



## **2.1. Ciljevi istraživanja**

Cilj istraživanja bio je odrediti postotke triju monocitnih subpopulacija kod pacijenata s Crohnovom bolešću koji su liječeni biološkom ili nebiološkom terapijom.

## **2.2. Hipoteza istraživanja**

Postoci klasičnih CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, intermedijarnih CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> i neklasičnih CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocita u pacijenata s Crohnovom bolešću različito će se mijenjati u odnosu na kontrolu skupinu ovisno o primijenjenoj terapiji.

### **3. ISPITANICI I METODE**

### **3.1. Ustroj istraživanja**

Provedena studija bila je presječno istraživanje provedeno na Odjelu za gastroenterologiju u Kliničkom bolničkom centru Split, Katedri za patofiziologiju, medicinsku kemiju i biokemiju na Medicinskom fakultetu u Splitu i na Sveučilišnom odjelu Zdravstvenih studija u Splitu.

### **3.2. Ispitanici**

Istraživanje je uključivalo 28 pacijenata koji su bolovali od Crohnove bolesti. Uspoređivani su s kontrolnom skupinom sačinjenom od 48 zdravih pojedinaca. Pacijenti su bili podijeljeni u dvije grupe, jedna je primala biološku terapiju, a druga nebiološku terapiju. Svi ispitanici imali su 18 ili više godina te su svi prošli protokol istraživanja, osim procjene fekalnog kalprotektina koji je mjereno samo u skupini pacijenata. Bolesnici s Crohnovom bolesti odabrani su iz ambulante Zavoda za gastroenterologiju u KBC Split. Dijagnoza je postavljena po smjernicama Europske organizacije za Crohnovu bolest i kolitis. Kriterij uključivanja odnosio se na dijagnozu Crohnove bolesti sa stabilnom aktivnosti u posljednja tri mjeseca i trajanje bolesti u prošloj godini. Kriterij isključenja studije bile su druge kronične bolesti poput kronične bubrežne bolesti, bolesti jetre, bolesti pluća, povijest zatajivanja srca, povijest kardiovaskularnih ili cerebrovaskularnih bolesti, šećerne bolesti, maligne bolesti ili korištenje lokalnih ili sistemskih kortikosteroida u posljednja tri mjeseca. Zdravi ispitanici bili su pregledani za IBS i potencijalne crijevne simptome.

### **3.3. Procjena ozbiljnosti bolesti**

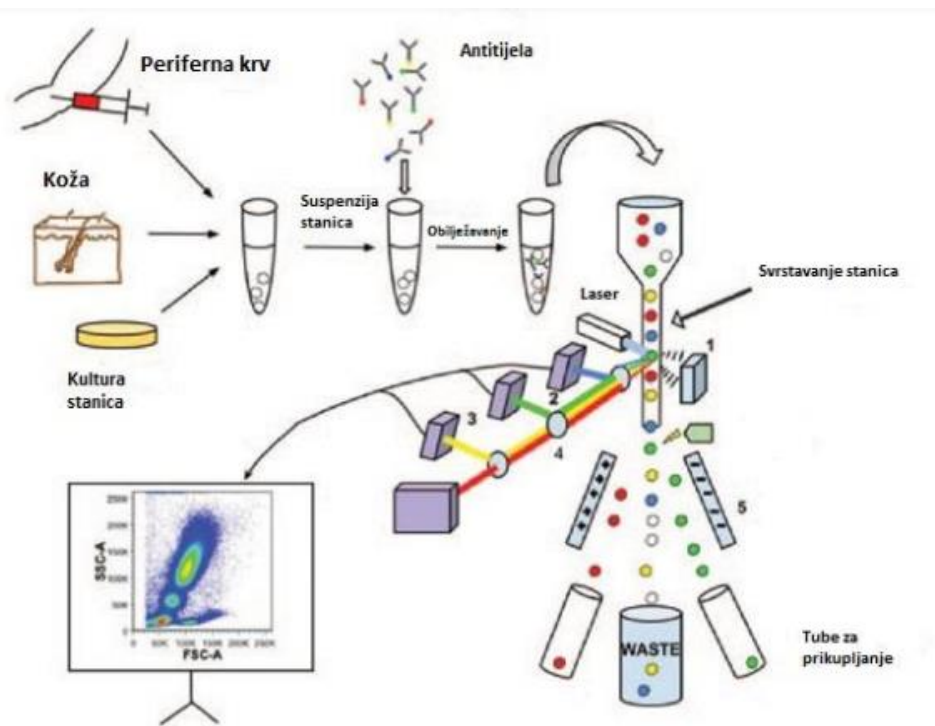
Pacijenti s Crohnovom bolesti procijenjeni su s pomoću SES-CD kao oni s blagim, umjerenim i teškim oblikom bolesti.

### 3.4. Protočna citometrija

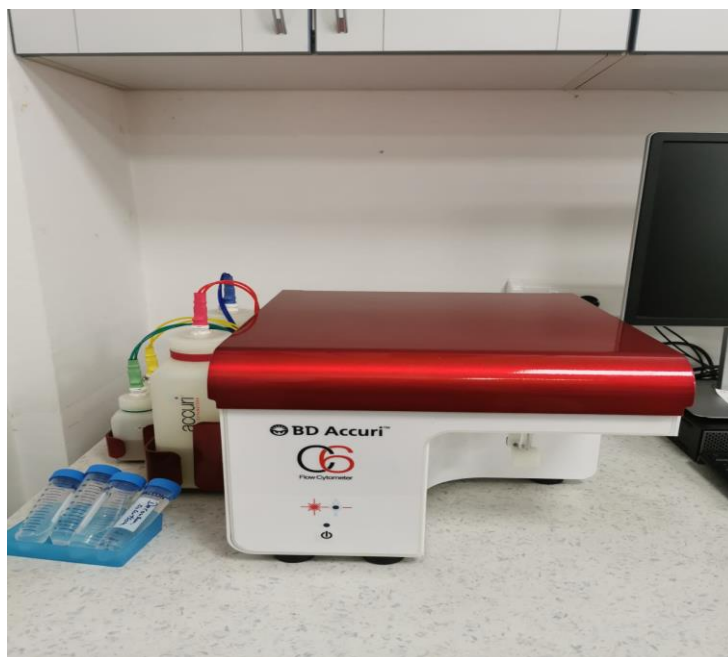
Protočna citometrija je sofisticirani instrument koji mjeri višestruke fizičke karakteristike jedne stanice istovremeno dok stanica teče u suspenziji kroz mjerni uređaj. Njegov rad ovisi o značajkama raspršenja svjetlosti stanica koje se istražuju, a koje mogu biti izvedene iz boja vezanih za monoklonska protutijela koja ciljaju izvanstanične molekule smještene na površini ili unutarstanične molekule unutar stanice.

Protočni citometar sastoji se od tri povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog. Pokretačka tekućina, koja je zapravo nosač suspenzije stanica, zračni potisak i suspenzija stanica čine protočni dio sustava. Njena uloga je laminarnim strujanjem suspenzije pojedinačne stanice dovesti do snopa laserskog svjetla kroz sustav uske kapilare. Optički sustav je sačinjen od leće, filtera, osjetnika i laserskog svjetla (slika 3). Stanice, dolaskom do lasera, obasjane su svjetlom, a stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine bit će pokazatelj fizičkih osobina stanice, najčešće veličine i granuliranosti. Uz to, stanica se može dodatno obilježiti fluorescentnim bojama, slobodno ili vezano za monoklonsko protutijelo, s ciljem obilježavanja specifične stanične strukture. Fluorokromi emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti kada su obasjani laserskom svjetlošću. Navedenu razliku u valnoj duljini hvataju osjetnici protočnog citometra FL-detektori. Navedenih detektora ima najmanje 4. FSC-detektor (engl. *forward scatter*) otkriva raspršenje svjetla koje je razmjerno veličini stanice, dok SSC-detektor (engl. *side scatter*) mjeri stupanj granuliranosti. Naposljetku, elektronski sustav takva raspršenja i različitu jakost fluoriscencije pretvara u grafove (35).

U protočnoj citometriji koriste se različiti fluorescentni reagensi. Navedeno uključuje fluorescentno konjugirana antitijela, boje za vezanje nukleinske kiseline, boje za održivost, boje za ionske indikatore i fluorescentne ekspresijske proteine. Protočna citometrija moćan je alat koji ima primjenu u imunologiji, molekularnoj biologiji, bakteriologiji, virologiji, biologiji raka i praćenju zaraznih bolesti (36).



**Slika 3.** Princip rada protočnog citometra (37)



**Slika 4.** BD Accuri C6 protočni citometar (korišten u ovom istraživanju)

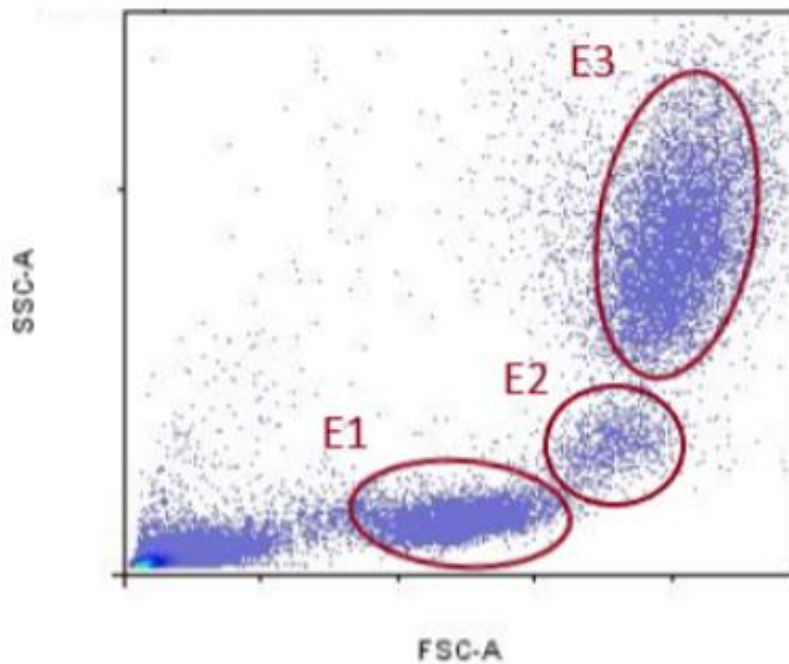
### **3.5. Uzimanje i priprema uzoraka**

Uzorci krvi uzeti su svim sudionicima istraživanja u jutarnjem razdoblju nakon najmanje 10-satnog posta, a korišteni su za biokemijsku analizu i protočnu citometriju. Svi uzorci analizirani su pojedinačno od strane iskusnog biokemičara koristeći isti standardni postupak. Biokemičar je bio oslijepljen za raspodjelu pacijenata. Krv je uzeta iz antekubitalne vene koristeći polietilenski kateter. Sto mikrolitara pune krvi tretirano je reagensom za blokiranje Fc receptora (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka) što je onemogućilo nespecifično vezanje protutijela. Uz to, dodano je 4  $\mu$ L anti-humanog CD14s PerCP-Cy5.5-konjugiranog protutijela (eBioscience, SAD), 4  $\mu$ L protutijela konjugiranog fikoeritriinom reaktivnog na humani CD16 (eBioscience, SAD) i 10  $\mu$ L mišjeg protutijela reaktivnog na humani CD44 konjugiranog s FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA).

Zatim su uzorci inkubirani u trajanju od 20 minuta na 25 °C u mraku. Nakon liziranja eritrocita dodatkom otopine za lizu (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka), monociti su analizirani protočnim citometrom (BD Accuri C6, BD Biosciences, Belgija). Kao negativna kontrola za postavljanje određenih regija korišteni su uzorci neobojenih stanica, a brojanje stanica je završeno na  $10^6$  stanica.

### **3.6. Analiza podataka**

Podaci koji su prikupljeni protočnim citometrom analizirani su računalnim softverom FlowLogic (Inivai Technologies, Mentone Victoria, Australija). Fluorescencija leukocita prikazana je na točkastom dijagramu prednjeg i bočnog raspršenja (FSC/SSC), odnosno veličine i zrnatosti. FSC pokazuje veličinu stanice, SSC granuliranost stanice. Primjer takvog dijagrama prikazan je na slici 5, gdje E1 predstavlja limfocite, E2 monocite, a E3 granulocite.

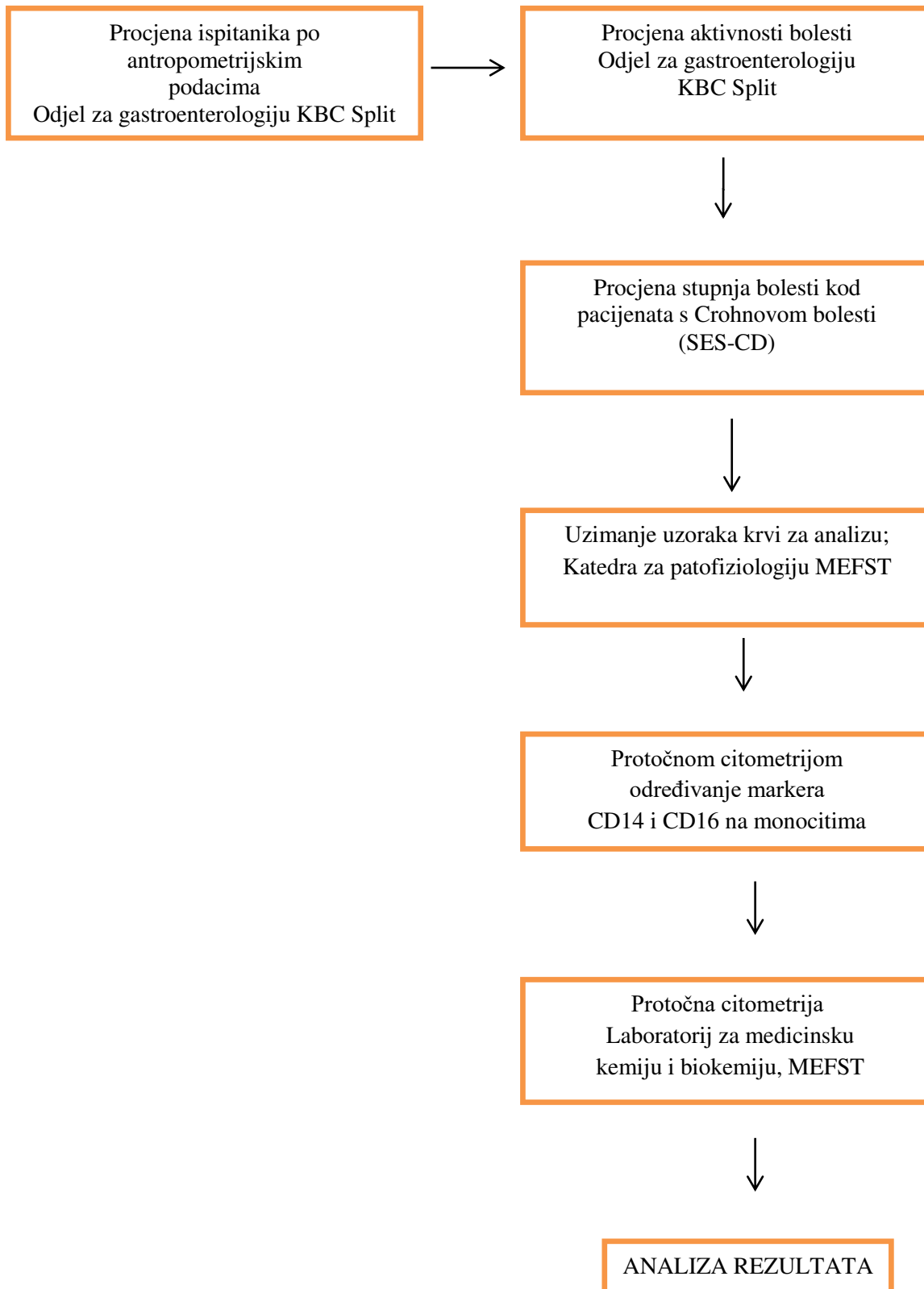


**Slika 5.** Dijagram prednjeg/bočnog raspršenja (FSC/SSC) (34)

### 3.7. Statistička analiza podataka

Normalnost distribucije podataka procijenjena je pomoću Kolmogorov-Smirnovljevog testa. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija za kontinuirane parametarske varijable. Student t-test i Mann Whitney U test upotrjebljeni su za usporedbu kontinuiranih parametarskih podataka. Osim Hi-kvadrat testa koji je služio za usporedbu kategoričkih podataka, za testove višestrukih usporedbi primijenjen je ANOVA Dunn's post-hoc neparametrijski test (38). Sve statističke analize provedene su pomoću softvera Past 3. X (verzija 3.14, Sveučilište u Oslo, Norveška) sa značajnošću postavljenom na  $P < 0,05$ .

### 3.8. Plan istraživanja





## **4. REZULTATI**

## 4.1. Utjecaj endoskopske aktivnosti bolesti na postotak monocita

Istraživanje je utvrdilo kako je postotak CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocita dva puta veći u umjereno aktivnoj Crohnovoj bolesti u odnosu na blagu i tešku ( $p = 0,002$ ) što je prikazano u tablici 7.

**Tablica 7.** Usporedba odabranih parametara između različitih kategorija aktivnosti bolesti u bolesnika s Crohnovom bolešću

| Parametri                              | Endoskopska aktivnost bolesti (SES-CD) |                     |                    | ANOVA |       |
|--|--|---------------------|--------------------|-------|-------|
|  | Blaga<br>(N = 9)                       | Umjerena<br>(N = 9) | Teška<br>(N = 9)   | F     | p*    |
| <b>Monociti</b>                        |  |                     |                    |       |       |
| CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> % | 5.99 (1.9-7.25)                        | 7.98 (6.48-11.63)   | 5.95 (2.76-11.3)   | 1.56  | 0.23  |
| CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> % | 7.69 (6.45-9.28)                       | 16.04 (9.65-19.67)  | 6.43 (4.67-9.7)    | 8.03  | 0.002 |
| CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> % | 33.79 (23.95-46.93)                    | 27.92 (25.71-36.99) | 35.4 (24.75-39.36) | 0.36  | 0.7   |

\*Datum je predstavljen kao medijan (interkvartilni raspon).

SES-CD – jednostavni endoskopski rezultat za Crohnovu bolest; CD - klaster diferencijacije.

\*ANOVA. Dunnov post-hoc test.

a  $P < 0,05$  blago naspram umjereno

b  $P < 0,005$  umjerena vs teška

## 4.2. Razlike u antropometrijskim i laboratorijskim parametrima različito liječenih bolesnika s Crohnovom bolešću

U dolje navedenim tablicama 8 i 9 prikazano je kako nema značajnih razlika u antropometrijskim karakteristikama i laboratorijskim parametrima između bolesnika s Crohnovom bolešću liječenih različitom terapijom. Jedine statistički značajne razlike bile su brzina sedimentacije eritrocita i fekalni kalprotektin koji su bili 2,4 ( $p = 0,038$ ) i 6,1 ( $p = 0,005$ ) puta niži kod skupine liječene biološkom terapijom.

**Tablica 8.** Usporedba vrijednosti odabranih karakteristika između različito liječenih bolesnika s Crohnovom bolešću

| Karakteristika       | Biološka terapija<br>(n = 18) | Nebiološka terapija<br>(n = 10) | p       |
|----------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------|
| Dob                  | 41.44 ± 13.87                 | 38.3 ± 11.83                    | 0.0551* |
| Muški spol           | 11 (61.1 %)                   | 5 (50 %)                        | 0.43**  |
| Tjelesna težina (kg) | 74.6 ± 14.06                  | 67.3 ± 18.81                    | 0.251*  |
| Tjelesna visina (cm) | 175 ± 10.35                   | 175 ± 11.92                     | 0.814*  |
| BMI                  | 24 ± 3.64                     | 21.44 ± 4.36                    | 0.085*  |
| Aktivno pušenje      | 8 (44.4 %)                    | 2 (20 %)                        | 0.076** |
| SES - CD             | 11.12 ± 9.69                  | 18.24 ± 12.69                   | 0.108*  |

\*Osnovni parametarski podaci prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, kategorički podaci prikazani su kao broj (postotak). BMI: indeks tjelesne mase; SES-CD: jednostavan endoskopski rezultat za Crohnovu bolest; \* Studentov t-test za neovisne uzorke. \*\* Hi-kvadrat test. \*\*\* Mann–Whitneyev U test.

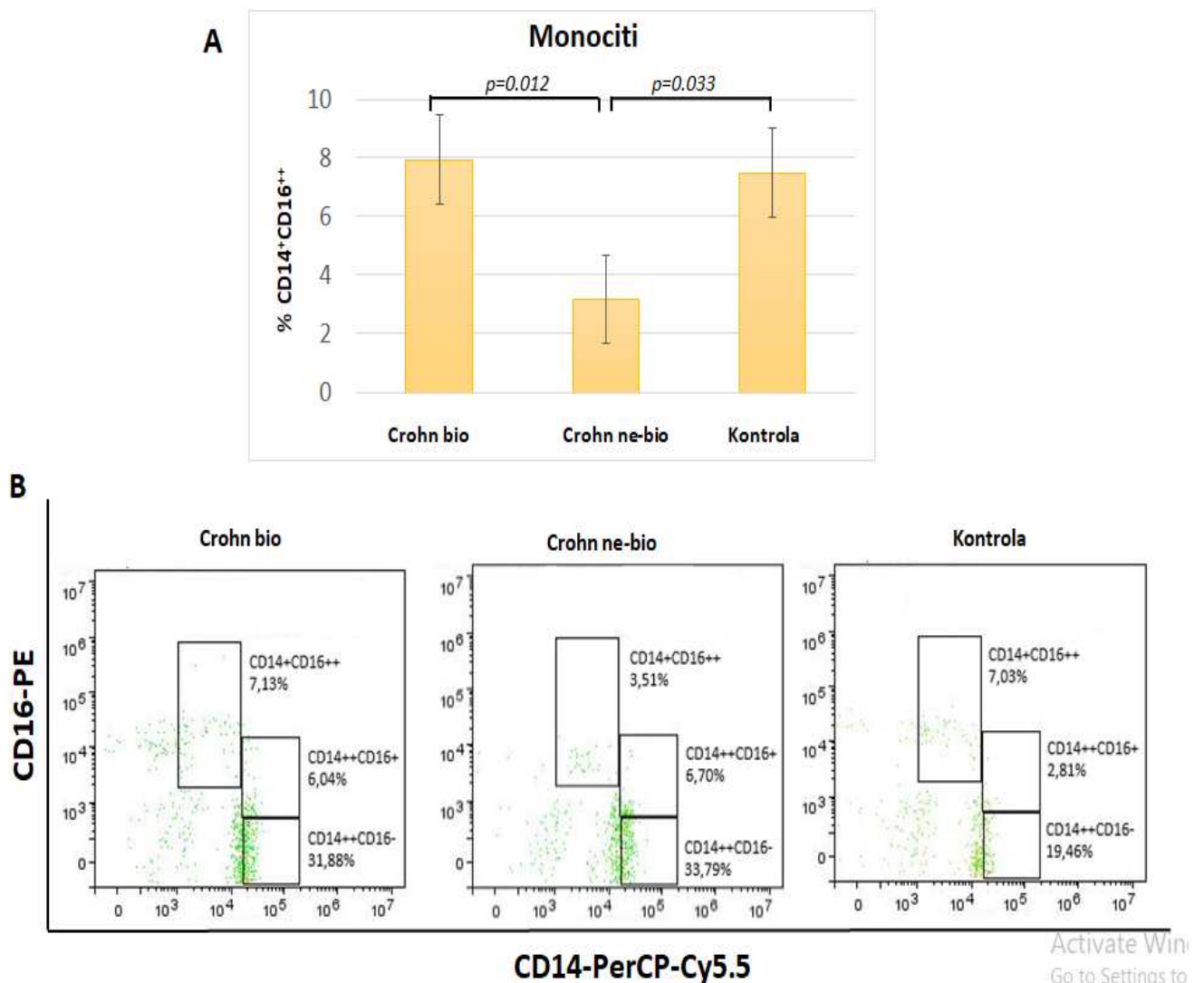
**Tablica 9.** Usporedba odabranih laboratorijskih parametara između različito liječenih bolesnika s Crohnovom bolešću

| Parametar                         | Biološka terapija<br>(n = 18) | Nebiološka terapija<br>(n = 10) | p      |
|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------|
| Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)   | 8.2 ± 3.3                     | 6.51 ± 1.73                     | 0.144* |
| Eritrociti (x10 <sup>12</sup> /L) | 4.76 ± 0.63                   | 4.41 ± 0.91                     | 0.653* |
| Trombociti (x10 <sup>9</sup> /L)  | 261 ± 59.4                    | 323 ± 117.4                     | 0.072* |
| Albumini                          | 38.66 ± 4.1                   | 34.3 ± 8.33                     | 0.08*  |
| ESR (mm/h)                        | 11.22 ± 9.43                  | 26.9 ± 28.2                     | 0.038* |
| Hb (g/L)                          | 139 ± 12.78                   | 126 ± 24.45                     | 0.072* |
| Hct (L/L)                         | 0.432 ± 0.045                 | 0.396 ± 0.084                   | 0.127* |
| LDH (mmol/L)                      | 164.5 ± 26.17                 | 174.7 ± 46.1                    | 0.459* |
| ALP (U/L)                         | 63.55 ± 16                    | 92.1 ± 77                       | 0.136* |
| FC (mg/kg)                        | 265.11 ± 299                  | 1632 ± 1917                     | 0.005* |
| hs-CRP (mg/l)                     | 8.88 ± 24.09                  | 25.37 ± 39.81                   | 0.181* |

\*Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. WBC – bijele krvne stanice; RBC – crvene krvne stanice; ESR – brzina sedimentacije eritrocita; Hb – hemoglobin; Hct – hematokrit; LDH – laktat dehidrogenaza; ALP – alkalna fosfataza; FC – fekalni kalprotektin; hs-CRP – C-reaktivni protein visoke osjetljivosti. \*Studentov t-test za neovisne uzorke.

### 4.3. Razlike u monocitnim podskupinama različito liječenih bolesnika s Crohnovom bolešću

Istraživanje je pokazalo kako pacijenti liječeni nebiološkom terapijom imaju 2,3 puta manji postotak nekласičnih CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocita u usporedbi s pacijentima liječenim biološkom terapijom. Uz to, nema značajne razlike u postotku nekласičnih CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocita kod bolesnika liječenih biološkom terapijom i kontrolne skupine (slika 6).



**Slika 6.** Postotak subpopulacija monocita (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> i CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) u bolesnika s Crohnovom bolesti. Statistički histogrami (A) i reprezentativni točkasti dijagrami (B) pacijenata liječenih biološkom i nebiološkom terapijom kao i kontrolnih subjekata.

*P*<0,05.

## **5. RASPRAVA**

Crohnova bolest je autoimuni poremećaj nepoznate etiologije koja ima genetsku pozadinu. Trenutno ne postoji specifičan lijek za oboljele od Crohnove bolesti nego pacijenti često primaju više različitih lijekova kako bi se regulirali simptomi bolesti i poboljšala kvaliteta života. Incidencija i prevalencija Crohnove bolesti u porastu su u svijetu, a većina slučajeva je koncentrirana u ekonomski razvijenijim zemljama. Poznato je kako nekontrolirana upala dovodi do dugotrajnih komplikacija, uključujući intestinalne neoplazije. Stoga je rana i učinkovita kontrola upale od iznimne važnosti.

U Republici Hrvatskoj dugo vremena osnovni princip terapije temeljio se na kontroliranju simptoma i korištenje lijekova za uvođenje bolesti u remisiju. Primjenjivali su se lijekovi s najmanjom toksičnošću u ranoj fazi bolesti, a iduća terapija uvedena je zbog nedostatnog odgovora ili nuspojava prethodne terapije. Navedeni model odbačen je kad se pokazalo kako je rezultat takvog pristupa progresija bolesti uz komplikacije koje su često zahtijevale operativne zahvate i hospitalizaciju. Loši rezultati liječenja uvjetovali su određivanje djelotvornosti terapije u određenim vremenskim granicama. Za 5-aminosalicilate vremenski interval je 4 – 8 tjedana nakon početka terapije, za sistemske kortikosteroide 2 – 4 tjedna, dok je za imunomodulatore poput azatioprina i metotreksata određen vremenski interval 16 – 24 tjedna. Dolaskom biološke terapije kao najnovijih lijekova za liječenje IBD-a, postignuta je dugotrajna remisija bez korištenja kortikosteroida i prevencija destrukcije tkiva. Smanjila se potreba za operativnim intervencijama, a kvaliteta života i radne sposobnosti iznimno su se poboljšale. Dovoljan broj studija govori u prilog korištenju biološke terapije u što ranijoj fazi bolesti, prije pojave komplikacija. U Republici Hrvatskoj biološka terapija uvodi se po ubrzanom “step-up” pristupu, gdje se najdjelotvornije lijekove ne uvodi odmah, ali se ne oklijeva predugo s uvođenjem navedenih lijekova kako bi se spriječila nekontrolirana upala i gomilanje nedjelotvorne terapije. Pristup gdje se biološki lijekovi koriste u najranijim fazama bolesti, koji je trenutno korišten u velikom broju europskih zemalja, nije prihvaćen. Biološka terapija u RH uključuje infiksimab, adalimumab, ustekinumab i vedolizumab (40).

Ranije studije pokazale su povećane razine CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocita u Crohnovoj bolesti kao i u nekim drugim upalnim bolestima. Raznovrsnost monocita može ukazivati na patogenezu bolesti, dok se povećani broj određene monocitne populacije koristi kao biomarker bolesti.

Različitu ekspresiju monocita iskoristi smo kako bi utvrdili razliku između različito liječenih bolesnika s Crohnovom bolesti. Ustanovilo se kako je postotak CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocita dva puta veći u umjereno aktivnoj Crohnovoj bolesti ( $p = 0,002$ ), što znači da je terapija najbolji učinak ostvarila kod pacijenata koji boluju od umjereno aktivne bolesti. Isto tako, primjena nebiološke terapije smanjila je za 2,3 puta postotak neklasičnih protuupalnih CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocita, dok su pacijenti na biološkoj terapiji imali sličan postotak kao kontrolna skupina.

Studija je imala nekoliko ograničenja. Prvo, imala je relativno mali broj sudionika, a koncipirana je kao presječno istraživanje što onemogućuje uspostavljanje uzročne veze. Heterogena skupina bolesnika smanjuje veličinu uzorka i otežava generaliziranje rezultata na veću populaciju. Trebalo bi provesti više mjerenja jer je Crohnova bolest ponavljajuća te obrazac izlučenih markera ne mora biti konstantan.

Biološka terapija dovela je do značajnog napretka u liječenju Crohnove bolesti inhibiranjem upalne kaskade i mijenjanjem upalnog odgovora. Međutim, postojanje brojnih nuspojava, koje uključuju i nastanak neoplazmi, mogućnost utjecaja na različite organske sustave i visoka cijena predstavljaju negativne strane ovakve terapije koje se moraju uzeti u obzir.



## **6. ZAKLJUČAK**

Postotak neklasičnih protuupalnih CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocita bio je smanjen kod pacijenata liječenih nebiološkom terapijom u odnosu na kontrolu, dok kod pacijenata liječenih biološkom terapijom i kontrolne skupine nije uočena značajna razlika. Biološka terapija je dakle povoljnija od nebiološke jer ne snižava postotak neklasičnih protuupalnih CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocita.

## **7. LITERATURA**

1. McDowell C, Farooq U, Haseeb M. Inflammatory Bowel Disease. *StatPearls*. 2022; PMID: 29262182.
2. Fakhoury M, Negrulj R, Mooranian A, Al-Salami H. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J Inflamm Res*. 2014;7:113-120.
3. Cleveland Clinic [internet], Crohn's disease [citirano 07. Rujna 2022.] dostupno na: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/9357-crohns-disease>
4. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140:1785-1794.
5. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2017;390:2769-2778.
6. Mediline Plus [internet], Crohn disease [citirano 07. Rujna 2022.] dostupno na: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/crohn-disease/#frequency>
7. Prideaux L, Kamm MA, De Cruz PP, Chan FK, Ng SC. Inflammatory bowel disease in Asia: a systematic review. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27:1266-1280.
8. Despalatović, Bruna Rošić et al. "Epidemiological trends of inflammatory bowel disease (IBD) in Split-Dalmatia County, Croatia from 2006 to 2014." *European journal of internal medicine* vol. 46 (2017): e17-e19.
9. Pavić B. Kliničke osobitosti Crohnove bolesti u bolesnika s izvancrijevnim manifestacijama bolesti [Diplomski rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; 2018 [pristupljeno 04.09.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:519332>
10. Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2010;6:339-346.
11. Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J. The history of genetics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*. 2014;27:294-303.
12. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:458-466.

13. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12:205-217.
14. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev*. 2004;3:394-400.
15. Feuerstein JD, Cheifetz AS. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clin Proc*. 2017;92:1088-1103.
16. Klarin I. Osobitosti upalnih bolesti crijeva u Zadarskoj županiji [Disertacija]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2014 [pristupljeno 03.09.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:155240>
17. Veauthier B, Hornecker JR. Crohn's Disease: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*. 2018;98:661-669.
18. Levine JS, Burakoff R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2011;7:235-241.
19. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliever E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*. 2001;91:854-862.
20. Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J Med Life*. 2019;12:113-122.
21. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369:1641-1657.
22. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*. 2006;. doi:10.1136/gut.2005.081950a
23. Baumgart DC. The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106:123-133
24. Hrvatsko udruženje za Crohnovu bolest i Ulcerozni kolitis [internet], Crohnova bolest [citirano 07. Rujna 2022.] dostupno na: <https://hucuk.hr/851-2/>

25. Gade AK, Douthit NT, Townsley E. Medical Management of Crohn's Disease. *Cureus*. 2020;12:e8351.
26. Eisenberg S. Biologic therapy. *J Infus Nurs*. 2012;35:301-313.
27. Milaković D, Crnčević Urek M. Biološka terapija u liječenju kroničnih upalnih bolesti crijeva. *Medicina Fluminensis*. 2020;56:137-146.
28. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases *Gastroenterology*. 2009;136:1182-1197.
29. Paramsothy S, Rosenstein AK, Mehandru S, Colombel JF. The current state of the art for biological therapy and new small molecule in inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol*. 2018;11:1558-1570.
30. Hrvatsko udruženje za Crohnovu bolest i Ulcerozni kolitis [internet], smjernice za oboljele od Crohnove bolesti [citirano 07. Rujna 2022.] dostupno na: [https://hucuk.hr/brosura/ECCOEFCCA\\_smjernice\\_za\\_oboljele\\_od\\_Crohnove\\_bolesti.pdf](https://hucuk.hr/brosura/ECCOEFCCA_smjernice_za_oboljele_od_Crohnove_bolesti.pdf)
31. De Kleer I, Willems F, Lambrecht B, Goriely S. Ontogeny of myeloid cells. *Front Immunol*. 2014;5:423.
32. Gren ST, Grip O. Role of Monocytes and Intestinal Macrophages in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22:1992-1998.
33. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*. 2014;2:1.
34. Franić I, Režić-Mužinić N, Markotić A, Živković PM, Vilović M, Rušić D, Božić J. Expression of CD44 in leukocyte subpopulations in patients with inflammatory bowel diseases. *Diagnostics*. 2022; 12:2014.
35. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37:163-176.
36. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5.1.1-5.1.11.

37. Bandov I. IZRAŽAJ BILJEGA CD34 I CD77 NA PLAZMA MEMBRANI SRČANIH STANICA HIPERKALCIJEMIČNIH ŠTAKORA [Završni rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija; 2014 [pristupljeno 07.09.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:334252>
38. Hammer Ø, D.A.T. H, P.D. R. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica*. 2001;4:9pp
39. Vucelić B, Cuković-Cavka S, Banić M, et al. Hrvatski konsenzus o liječenju upalnih bolesti crijeva bioloskom terapijom [Croatian consensus on the treatment of inflammatory bowel diseases with biologic therapy]. *Acta Med Croatica*. 2013;67:75-87.7

## **8. SUMMARY**



**The aim of this study:**

The aim of the study was to determine the percentages of monocyte subpopulations in patients with Crohn's disease treated with biological or non-biological therapy.

**Methods:**

Blood samples, taken from all research participants in the morning period after at least a 10-hour fast, were used for biochemical analysis and flow cytometry. Blood was taken from the antecubital vein using a polyethylene catheter. 100 microliters of whole blood were treated with Fc receptor blocking reagent (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) to prevent nonspecific binding. In addition, 4  $\mu$ L of anti-human CD14s PerCP-Cy5.5-conjugated antibodies (eBioscience, USA), 4  $\mu$ L of phycoerythrin-conjugated antibodies reactive to human CD16 (eBioscience, USA), and 10  $\mu$ L of mouse antibodies reactive to human CD44 conjugated with FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA). The samples were incubated for 20 minutes at 25 °C in the dark. After lysing erythrocytes with additional lysis solution (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), monocytes were analyzed with a flow cytometer (BD Accuri C6, BD Biosciences, Belgium).

**Results:**

The results we obtained showed a twice higher percentage of CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in moderately active Crohn's disease compared to mild and severe ( $p = 0.002$ ). Likewise, the use of non-biological therapy decreased by 2.3 times the percentage of non-classical CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocytes, while patients who received biological therapy had a similar percentage as the control group.

**Conclusion:**

Biological therapy is more favorable than non-biological therapy because it does not lower the percentage of non-classical anti-inflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocytes.

## **9. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime:** Ana-Maria Ćurić

**Datum rođenja:** 23.02.1999.

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa:** Srijemska 2, 21000 Split

**e-mail:** anamaria.curic35@gmail.com

## **OBRAZOVANJE:**

- **2005. – 2007.** Ernst-von-Harnack-Schule, Savezna Republika Njemačka
- **2007. - 2013.** Osnovna škola Mejaši, Split
- **2013. - 2017.** Prirodoslovna škola Split, smjer prirodoslovna gimnazija
- **2017. – 2022.** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko- tehnološki fakultet, smjer farmacija

## **RADNO ISKUSTVO:**

- **Ljetna sezona 2016.** - rad u hotelu kategorij 5 zvjezdica Le Méridien Lav, Podstrana kao ispomoć u ugostiteljskom objektu u sklopu hotela
- **Ljetna sezona 2017.** - rad u hotelu kategorije 5 zvjezdica Le Méridien Lav, Podstrana kao ispomoć u ugostiteljskom objektu u sklopu hotela
- **2019.** - prodavač u optici Anda
- **2021. – 2022.** – ispomoć u proizvodnji u Galenskom laboratoriju, Dugopolje
- **II. 2022 – VIII. 2022.** – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko – dalmatinske županije, Solin

## **POSEBNE VJEŠTINE:**

**Rad na računalu:** MS Office, Eskulap 2000

**Strani jezici:** engleski jezik, njemački jezik

**Vozačka dozvola:** B kategorija