

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**I**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**ANTONIA ALFIREVIĆ**

**EKSPRESIJA CD44 BILJEGA NA CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> SUBPOPULACIJI MONOCITA U  
BOLESNIKA S ULCEROZNYM KOLITISOM**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2021./2022.**

**Mentor:**

**Doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić**

**Split, rujan 2022. godine**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**I**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**ANTONIA ALFIREVIĆ**

**EKSPRESIJA CD44 BILJEGA NA CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> SUBPOPULACIJI MONOCITA U  
BOLESNIKA S ULCEROZNYM KOLITISOM**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2021./2022.**

**Mentor:**

**Doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić**

**Split, rujan 2022. godine**

**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  
**Nastavni predmet:** Medicinska biokemija  
**Tema rada:** prihvaćena je na 74. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i na 14. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić  
**Pomoć pri izradi:** doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić

**EKSPRESIJA CD44 BILJEGA NA CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> SUBPOPULACIJI MONOCITA U BOLESNIKA S ULCEROZNIH KOLITISOM**

Antonia Alfirević, broj indeksa 219

**Naslov rada:** Ekspresija CD44 biljega na CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> subpopulaciji monocita u bolesnika s ulceroznim kolitisom

**Cilj istraživanja:** Cilj je istraživanja usporedba upalnog odgovora kod različito liječenih pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa

**Materijali i metode:** Uzorci krvi svih sudionika uzeti su za analizu. Uzorak je tretiran Fc-receptor blokirajućim reagensom te je uzorak inkubiran 20 minuta bez izvora svjetlosti pri sobnoj temperaturi uz dodatak anti-humanog CD14s PerCP-Cy5.5-konjugiranog protutijela i protutijela konjugiranog fikoeritriinom, reaktivnog na humani CD16 te dodatak mišjih antitijela reaktivnim na humani CD44, koji je konjugiran s fluorescein izotiocijanatom. Nakon lize stanica, stanice su analizirane pomoću protočne citometrije. Podatci su obrađeni korištenjem FlowLogic Software-a.

**Rezultati:** Pacijenti oboljeli od ulceroznog kolitisa liječeni biološkom terapijom imali su značajno smanjenje medijana intenziteta fluorescencije CD44 biljega na CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> subpopulaciji monocita. Medijan intenziteta fluorescencije CD44 biljega na CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfocitima gotovo je dvostruko veći kod pacijenata liječenih biološkom terapijom u usporedbi s pacijentima liječenih nebiološkom terapijom. Postotci CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfocita nisu se pokazali različitim između navedenih skupina.

**Zaključci:** Opisana je različita ekspresija CD44 biljega na neklasičnim monocitima pacijenata, s obzirom na terapiju koju pacijent prima. Osim neklasičnih monocita, zahvaćeni su i CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfociti – uočena je različita ekspresija CD44 biljega ovisno o terapiji.

**Ključne riječi:** ulcerozni kolitis, CD44, neklasični monociti

**Rad sadrži:** 54 stranice, 5 tablica, 14 slika i 40 referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva:** 1. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, predsjednik  
2. doc. dr.sc. Diana Gujinović, mag. pharm., član  
3. doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić, član-mentor

**Datum obrane:** 28.09.2022.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i 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  
**Course title:** Medicinal biochemistry  
**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 74 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 14  
**Mentor:** doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić  
**Technical assistance:** doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić

**EXPRESSION OF CD44 IN CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> MONOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS**

Antonia Alfirević, index number 219

**Diploma thesis title:** Expression of CD44 in CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocyte subpopulations in patients with ulcerative colitis

**The aim of this study:** The aim of this research was comparison of inflammatory response between differently treated patients with ulcerative colitis

**Methods:** Blood samples of all participants were taken for analysis. The sample was treated with Fc receptor blocking solution, then incubated for 20 minutes without a light source at room temperature with the addition of anti-human CD14s PerCP-Cy5.5-conjugated antibodies and phycoerythrin-conjugated antibodies reactive to human CD16 and with murine antibodies reactive to human CD44, conjugated with fluorescein isothiocyanate. After cell lysis, cells were analyzed by flow cytometry. Data were processed using FlowLogic Software.

**Results:** Ulcerative colitis patients treated with biological therapy had a significant decrease in the median fluorescence intensity of the CD44 marker on the CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> subpopulation of monocytes. The median fluorescence intensity of the CD44 marker on CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> lymphocytes is almost twice as high in patients treated with biological therapy compared to patients treated with non-biological therapy. The percentages of CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> lymphocytes did not differ between the mentioned groups.

**Conclusion:** Different expression of the CD44 marker on non-classical monocytes of patients was described, with regard to the therapy the patient received. In addition to non-classical monocytes, CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> lymphocytes are also affected – a different expression of the CD44 marker was observed depending on the therapy.

**Keywords:** ulcerative colitis, CD44, non-classical monocytes

**Thesis contain:** 54 pages, 5 tables, 14 figures and 40 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:** 1. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, chair person  
2. doc. dr.sc. Diana Gujinović, mag. pharm., member  
3. doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić, member-supervisor

**Defence date:** 28.09.2022.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Nikolini Režić-Mužinić na pomoći prilikom izrade  
diplomskog rada, prijateljskom pristupu i uloženom vremenu.*

*Hvala mojoj obitelji te svim dragim ljudima koji su bili uz mene tijekom cijelog procesa  
studiranja, bez vas ne bih bila ono što jesam.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Upalne bolesti crijeva</b> .....	2
1.1.1. Crohnova bolest.....	6
1.1.2. Ulcerozni kolitis .....	6
<b>1.2. Faktori rizika</b> .....	7
1.2.1. Genetika.....	7
1.2.2. Okolišni čimbenici .....	8
1.2.3. Crijevna mikrobiota.....	8
1.2.4. Imunološki sustav.....	9
<b>1.3. Ekspresija CD44</b> .....	9
<b>1.4. Liječenje upalnih bolesti crijeva</b> .....	10
1.4.1. Crohnova bolest.....	10
1.4.2. Ulcerozni kolitis .....	12
<b>1.5. Smjernice za liječenje upalnih bolesti crijeva u Republici Hrvatskoj</b> .....	13
1.5.1. Smjernice za liječenje Crohnove bolesti .....	14
1.5.2. Smjernice za liječenje ulceroznog kolitisa .....	14
<b>1.6. Biološka terapija</b> .....	15
<b>1.7. Klasifikacija monocita</b> .....	16
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE</b> .....	19
<b>2.1. Cilj istraživanja</b> .....	20
<b>2.2. Hipoteze istraživanja</b> .....	20
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	21
<b>3.1. Ustroj studije</b> .....	22
<b>3.2. Ispitanici</b> .....	22
<b>3.3. Priprema uzorka</b> .....	23
<b>3.4. Protočna citometrija</b> .....	23
<b>3.5. Analiza podataka</b> .....	25
<b>3.6. Statistička analiza</b> .....	25
<b>3.7. Plan istraživanja</b> .....	26
<b>4. REZULTATI</b> .....	27
<b>4.1. Osnovne karakteristike ispitanika</b> .....	28
<b>4.2. Karakteristike podskupina pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa</b> .....	29
<b>4.3. Ekspresija CD44 biljega na CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> subpopulaciji monocita</b> .....	29

<b>4.4. Ekspresija CD44 na CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfocitima kod različito liječenih pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa .....</b>	<b>30</b>
<b>4.5. Omjer CD16<sup>-</sup> monocita i limfocita kod pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa .....</b>	<b>31</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>32</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>35</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>37</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>42</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>44</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>46</b>

## **1. UVOD**

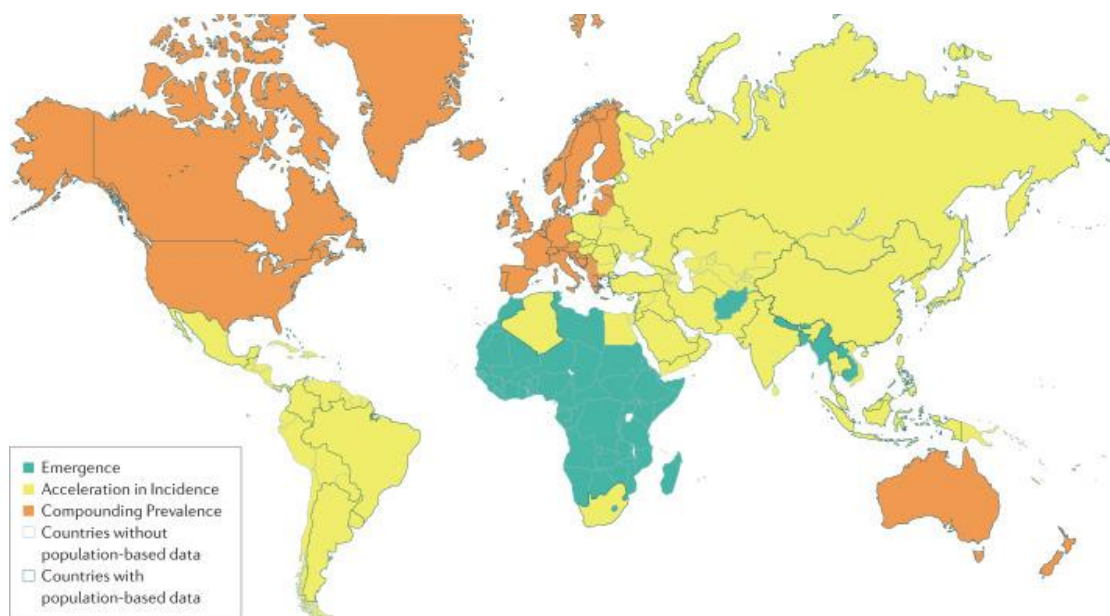


## 1.1. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*), uključujući Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis, karakterizirane su kroničnim upalama gastrointestinalnog trakta. Pretpostavka je da se javljaju zbog imunološkog odgovora na mikrobe u crijevima, katalizirano zbog određenih genetičkih predispozicija pojedinca. Iako je etiologija tih bolesti i dalje nepoznata, ona uključuje kompleksnu interakciju između genetskih, okolišnih ili mikrobnih faktora i imunološkog odgovora (1).

Upalne bolesti crijeva predstavljaju globalni zdravstveni problem s kontinuiranim porastom u incidenciji. Primjerice, u današnje vrijeme više od 2 milijuna ljudi s područja Sjeverne Amerike boluje od upalnih bolesti crijeva te se procjenjuje da će ta brojka doći 4 milijuna do 2030. godine (2).

Krajem 20. i početkom 21. stoljeća najveća je prevalencija zabilježena u Europi i Sjevernoj Americi. Od 1990. godine stopa je incidencije u zapadnim zemljama u mirovanju, a porast je uočen u novoundustrijaliziranim državama Azije, Afrike i Južne Amerike (3).



**Slika 1.** Globalno epidemiološko stanje upalnih bolesti crijeva 2020. godine

Preuzeto sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7542092/>

Datum pristupa: 29.07.2022.

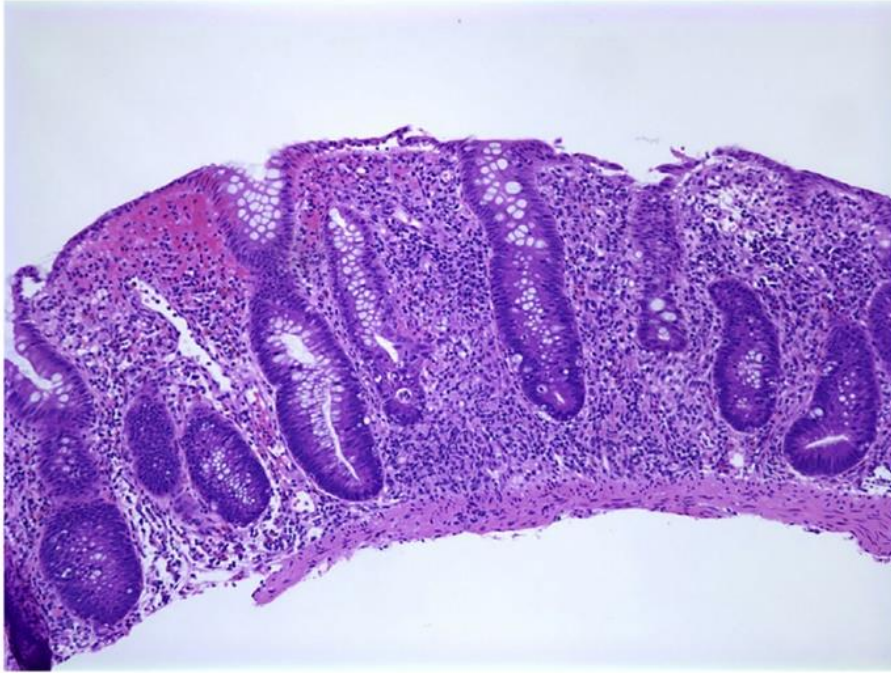
Normalni je kolon karakteriziran pravilnim kriptama koje se protežu od luminalne površine do muskularnih slojeva u paralelnim stupcima. Plazma stanice česte su u gornjoj trećini, ali su odsutne ili vrlo rijetke blizu muskularne mukoze. Moguće akutne upale opisuju se kao prisustvo kriptitisa, apscesa kripti i/ili ulceracija. Za dijagnozu upalnih bolesti crijeva potrebno je promatrati kronične promjene koje uključuju iskrivljenje kripti, grananje, atrofiju i ekspanziju bazalnih plazma stanica. Iako se kronične promjene mogu detektirati kratko nakon pojave simptoma ili čak i prije pojave simptoma, mnogo pacijenata zatraži liječničku pomoć nakon višemjesečnih simptoma (4).



**Slika 2.** Normalna arhitektura kolona s regularnim kriptama

Preuzeto sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6954002/>

Datum pristupa: 28.07.2022.



**Slika 3.** Skraćene kriptе i prisutna upala kod dvogodišnjeg djeteta s upalnom bolesti crijeva

Preuzeto sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6954002/>

Datum pristupa: 28.07.2022.

Neki od simptoma uključuju proljev, abdominalnu bol, rektalno krvarenje i gubitak težine. Abdominalna bol koja se javlja u Crohnoj bolesti često je prisutna i godinama prije dijagnoze, povezana sa crijevnim pokretima. U ovom je slučaju uglavnom lokalizirana u desnom donjem kvadrantu zbog lokalizacije upale u terminalnom ileumu. Proljev je također čest simptom, koji ponekad može biti krvav. Krv je uglavnom povezana s ulceroznim kolitisom, ali nije uvijek prisutna, osobito u blažim slučajevima (5).

Osim gastrointestinalnih simptoma, kod određenog broja pacijenata kvalitetu života narušavaju ekstraintestinalni simptomi. Iz tog je razloga važno imati znanje o prevalenciji, patofiziologiji i kliničkoj prezentaciji navedenih simptoma kako bi se djelovalo na sve aspekte bolesti. Ekstraintestinalni se simptomi pojavljuju kod 24% pacijenata prije klasičnih simptoma, kao što su proljev i abdominalna bol, te je potrebno da se prepoznaju kako bi se napravile prikladne dijagnostičke pretrage. Najčešće je riječ o zglobovima, koži ili očima, ali simptomi mogu obuhvaćati i druge organe, kao što su jetra, pluća i gušterača (6).

**Tablica 1.** Ekstraintestinalni simptomi ulceroznog kolitisa

Preuzeto sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8564770/>

Datum pristupa: 31.07.2022.

organski sustav	simptomi	prevalencija
<b>gastrointestinalni</b>	Primarni sklerozirajući kolangitis	do 5%
	Autoimuni pankreatitis	rijetko
	Autoimuni hepatitis	rijetko (<1%)
<b>mukokutani</b>	Eritema nodozum	2-10%
	Pyoderma gangrenosum	0,4-2,6%
	Sweetov sindrom	rijetko
	Orofacijalne granulomatoze	rijetko
<b>mišićno-koštani</b>	Periferni artritis	4-14%
<b>vidni</b>	Episkleritis i skleritis	rijetko
	Prednji uveitis	3,5-4,1%
<b>plućni</b>	Pneumonitis	rijetko
<b>vaskularni</b>	Tromboza portalne vene	rijetko

Iako Crohnova bolest i ulcerozni kolitis pripadaju upalnim bolestima crijeva te imaju dosta sličnosti i poveznica, postoje i određene karakteristike koje ih razlikuju.

### 1.1.1. Crohnova bolest

Crohnova bolest zahvaća cijela crijeva, s naglaskom na distalni ileum. Pacijenti oboljeli od ove bolesti prolaze kroz periode jačih simptoma i remisije tijekom razvoja bolesti. Patogeneza je utemeljena na upali tkiva uzrokovanoj nekontroliranim imunološkim odgovorom na luminalne bakterijske antigene (7).

Bolest je karakterizirana transmuralnom pleomorfnom upalom koja dovodi do fistula i apscesa, granulomi su često prisutni (5).

**Tablica 2.** Usporedba Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa

Preuzeto sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6954002/>

Datum pristupa: 29.07.2022.

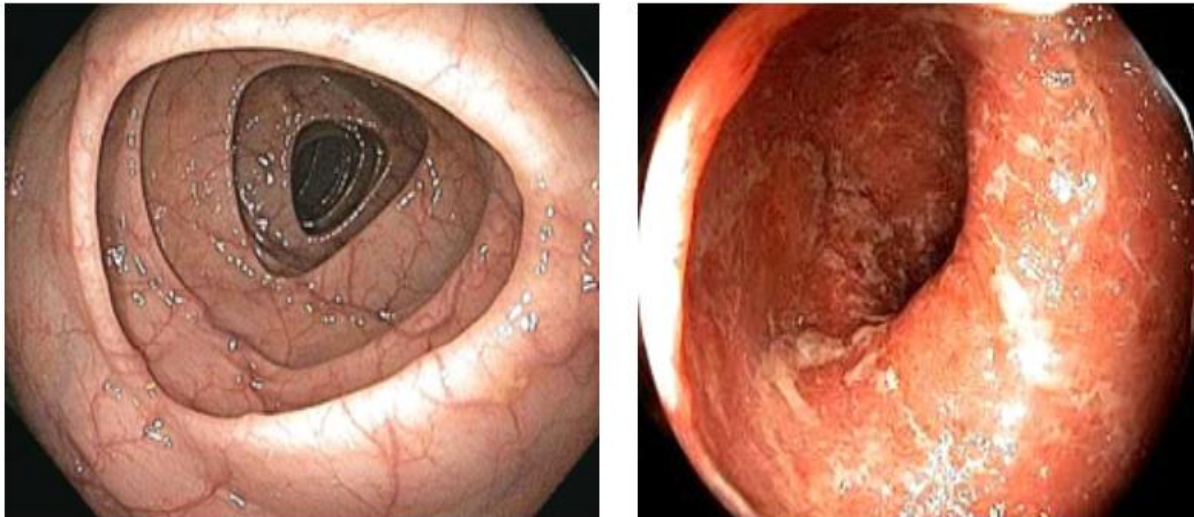
Svojstvo	Crohnova bolest	Ulcerozni kolitis
Uobičajeno mjesto početka	Terminalni ileum	Rektum
Uzorak	Isprekidano	Kontinuirano
Zahvaćeni slojevi	Transmuralni	Submukoza/mukoza
Patologija	Granulomi, fisure	Apscesi kripti, pseudopolipi
Komplikacije	Fistule, apscesi	Hemoragija, toksični megakolon
Rizik za kolorektalni karcinom	+	++

### 1.1.2. Ulcerozni kolitis

Ulcerozni kolitis karakteriziran je izmjeničnim pojavama relapsa i smirivanja upale koja obično počinje u rektumu i širi se proksimalno kontinuirano uzduž kolona. Upalna priroda bolesti, ukoliko ostane neliječena, može rezultirati oštećenjem crijeva s povećanim rizikom za hospitalizacije, operacije i kolorektalni karcinom (8).

Bolest je s prvim pikom u incidenciji u drugom ili trećem desetljeću te drugim pikom između 50 i 80 godina. Etiologija uključuje interakcije između okoliša, imunološkog sustava, mikrobioma u crijevima i genetske predispozicije za bolest. Simptomi uključuju krvavi proljev, abdominalnu bol, umor i fekalnu inkontinenciju (9).

Dijagnoza se uspostavlja na temelju prezentirajućih simptoma bolesti uz endoskopiju koja potvrđuje kontinuiranu i difuznu upalu kolona koja počinje na području rektuma. Većina se slučajeva liječi farmakološkom terapijom kako bi se inducirala remisija i kasnije održala remisija bez kortikosteroida. Unatoč tome, kod otprilike 15% pacijenata kojima ne pomažu lijekovi ili je već dugo bolest neliječena potreban je operativni zahvat (10).



**Slika 4.** Usporedba normalnog kolona (lijevo) i kolona kod ulceroznog kolitisa (desno)

Dostupno na: <https://www.rosebudendoscopy.com.au/ulcerative-colitis-uc.html>

Datum pristupa: 08.09.2022.

## 1.2. Faktori rizika

### 1.2.1. Genetika

Obiteljska anamneza najveći je faktor za razvoj navedenih bolesti, što i opravdava usmjerenost velikog broja studija upravo na genetsku komponentu. Prevalencija ulceroznog kolitisa značajno je veća kod pacijenata koji imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu, varirajući od 2-15% više nego kod ljudi bez pozitivne obiteljske anamneze. Studije napravljene na blizancima pokazale su još veću povezanost. Najveći utjecaj pokazan je kod IL23R, NOD2 i HLA gena, iako je ponekad ekspresija određenog gena faktor rizika za ulcerozni kolitis, a istovremeno ima protektivne učinke kod Crohnove bolesti, i obratno. Na primjer, NOD2 i PTPN22 primjeri su

gena čija ekspresija predstavlja rizični faktor za Crohnovu bolest, ali djeluje protektivno kod ulceroznog kolitisa. Nadalje, ekspresija može imati veći ili manji utjecaj na razvoj bolesti, što otežava utvrđivanje mehanizma same bolesti (11).

Unatoč značajnoj važnosti genetskih otkrića, zdrav pojedinac može biti pozitivan na neku mutaciju, ali biti bez kliničkih i histoloških nalaza koji bi upućivali na upalnu bolest crijeva. Ova činjenica upućuje na važnost ostalih faktora rizika (12).

### 1.2.2. Okolišni čimbenici

Unos hrane važan je okolišni faktor koji utječe na razvoj upalnih bolesti crijeva. Studije su pokazale kako je unos voća i povrća povezan sa smanjenim rizikom, dok unos brze hrane koja sadrži veći udio masti i šećera može pogoršati stanje bolesti.

Pušenje je primjer modifikatora koji pogoršava Crohnovu bolest, ali djeluje protektivno na ulcerozni kolitis. Utječe na stanični i humoralni imunološki odgovor i potiče mukoznu proizvodnju. Nikotin, sastavni dio cigareta, ima inhibicijski učinak na Th2 stanice, ali nema utjecaj na Th1 stanice.

Postoje i ostali okolišni čimbenici koji utječu na razvoj upalnih bolesti crijeva, uključujući psihološki stres, apendektomiju, prehranu te lijekove. Na primjer, apendektomija je neovisan rizični faktor za razvoj Crohnove bolesti, dok djeluje protektivno na ulcerozni kolitis.

Iako dosta epidemioloških studija povezuje navedene okolišne faktore s evolucijom bolesti, i dalje je mehanizam njihovog utjecaja dosta nepoznat (13).

### 1.2.3. Crijevna mikrobiota

Procijenjeno je da ljudska crijevna mikrobiota sadrži 500-1000 različitih bakterijskih vrsta, kao i gljiva i virusa. Simbiotski proizvodi vitamine, sprječava širenje patogenih organizama i olakšava probavu hrane, dok je cijelo to vrijeme u kontaktu s imunološkim sustavom domaćina, kojeg i regulira.

Sastav mikrobiote određen je prvim mikroorganizmima koje novorođenče prima. Uočene su određene razlike između prirodnog porođaja i carskog reza te hrani li se dijete majčinim mlijekom ili formulom. Nakon prestanka dojenja, smanjenje u prijelazu imunoglobulina A s majke na dijete potiče promjene u mikrobiomu djeteta. Tijekom prve do treće godine,

imunološki sustav i crijevni mikroorganizmi razvijaju određen odnos te dolazi do uspostavljanja homeostaze.

Upalne bolesti crijeva povezane su s disbalansom crijevne flore. Promjene u mikrobiomu imaju značajnu ulogu u patologiji bolesti, u kombinaciji s genetskim predispozicijama i ostalim okolišnim čimbenicima.

Kod osoba oboljelih od upalnih bolesti crijeva dolazi do smanjenja u bioraznolikosti i do redukcije određenih vrsta, kao na primjer *Lactobacillus* i *Eubacterium*. Javlja se i smanjenje u proizvodnji butirata i kratkolančanih masnih kiselina koje pozitivno moduliraju intestinalnu homeostazu i smanjuju upalu. Može doći do porasta u broju fakultativnih anaeroba, kao što je *Escherichia coli* (14).

#### 1.2.4. Imunološki sustav

Upalne bolesti crijeva potaknute su imunološkom disfunkcijom u gastrointestinalnom sustavu. Mukozne imunološke stanice, kao što su T stanice, makrofagi, dendritičke stanice, reguliraju intestinalnu homeostazu sekrecijom raznih vrsta citokina. Navedeni su citokini izravno povezani s patogenezom upalnih bolesti crijeva – kontroliraju intestinalnu upalu.

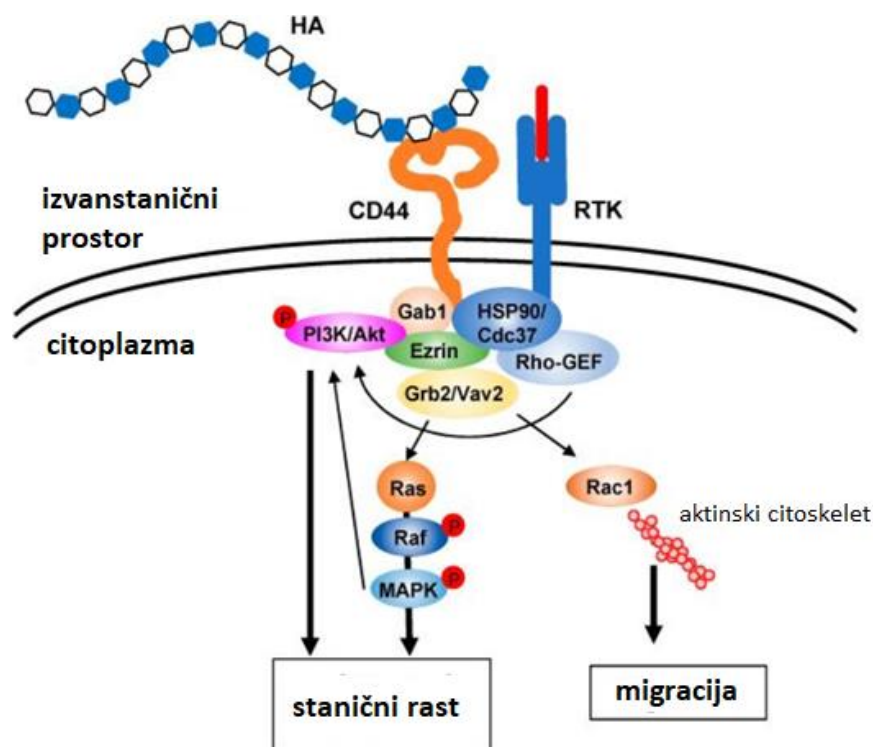
Mikrobiota osigurava najbitnije signale za razvoj i funkciju imunološkog sustava, što su potvrdile razne studije tijekom posljednja dva desetljeća (15).

### 1.3. Ekspresija CD44

Gastrointestinalna upala prepisuje se povećanoj ekspresiji CD44 na monocitima i limfocitima (19).

CD44 je obitelj nekinaznih, jednolančanih transmembranskih glikoproteina izraženih na embrionalnim matičnim stanicama te u različitim količinama na različitim vrstama stanica, uključujući vezivna tkiva i koštanu srž (20). Navedena obitelj glikoproteina uključena je u razne stanične funkcije, uključujući interakcije na razini stanica-matriks, staničnu migraciju, programiranu staničnu smrt i staničnu aktivaciju (21). Glavni je receptor za hijaluronan (HA) te zajedno sa svojim ligandom pridonosi patogenezu raznih upalnih bolesti. Hijaluronat sudjeluje u organizaciji ekstracelularnog matriksa te su studije pokazale kako je povećan tijekom upale (22, 23).





Slika 5. Signalizacijska kaskada hijaluronana

Preuzeto sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7695009/>

Datum pristupa: 06.08.2022.

## 1.4. Liječenje upalnih bolesti crijeva

### 1.4.1. Crohnova bolest

Činjenica da su glavni uzroci Crohnove bolesti i dalje nepoznati otežala je razvijanje strategija za liječenje. Kompleksnost bolesti i nesigurnost u ozbiljnost iste komplicira dijagnostiku i terapiju.

Ciljevi farmakološkog liječenja opisani su kao sljedeći:

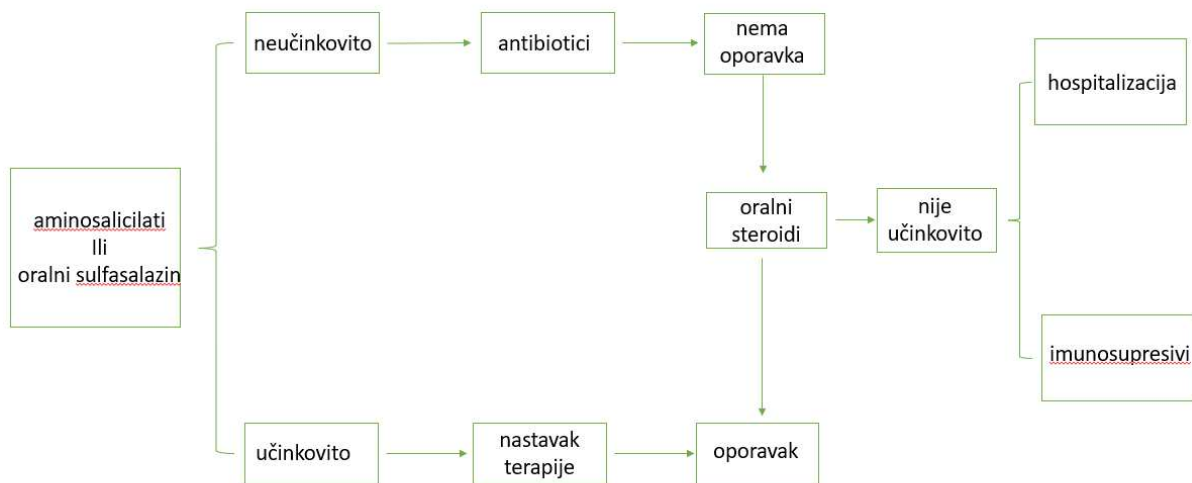
1. Pобољшanje kliničke slike bolesnika
2. Smanjenje nuspojava lijekova
3. Pобољшanje kvalitete života
4. Smanjenje trovanja lijekovima
5. Nutritivna podrška pacijentu
6. Reguliranje bolesti prije potrebe za operacijom

Prvi korak u terapiji upalnih bolesti crijeva je farmakološko liječenje. Na početku se obično propisuju manje štetni lijekovi – ako navedeni lijekovi ne dovedu do određenog olakšanja, dolazi do promjene u terapiji. U terapiji se koriste kortikosteroidi, aminosalicilati, antibiotici i imunosupresivi.

Za blagu do umjerenu bolest, aminosalicilati su lijek izbora i mogu se koristiti u različitim oblicima. Učinkovitost aminosalicilata ovisna je o dozi. Kortikosteroidi su preporučeni u umjerenim do teškim stanjima kako bi se poboljšali simptomi bolesti. Neki antibiotici, kao što su amoksisilin, ciprofloksacin, metronidazol i azitromicin, mogu poboljšati simptome Crohnove bolesti.

Kirurški zahvati mogu se koristiti u slučajevima u kojima lijekovi ne dovode do poboljšanja simptoma.

Također, liječenje Crohnove bolesti ovisno je o mjestu upale, ozbiljnosti stanja, nuspojavama i pacijentovom odgovoru na terapiju (24).



**Slika 6.** Liječenje Crohnove bolesti

Preuzeto sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6685307/>

Datum pristupa: 07.08.2022.

#### 1.4.2. Ulcerozni kolitis

Cilj je liječenja ulceroznog kolitisa izazivanje kliničke remisije i zatim održavanje remisije bez potrebe za kortikosteroidima. Remisija se definira kao normalizacija crijevnih pokreta i prestanak krvarenja.

Izbor terapije određen je ozbiljnošću bolesti i mjestima upale. Iako se u prošlosti koristio *step-up* pristup, novije smjernice usredotočene su na biranje terapije temeljem ozbiljnosti bolesti. Koristeći se navedenim algoritmom, pacijenti s teškim oblikom i simptomima trebali bi odmah krenuti s biološkom terapijom, zaobilazeći lijekove kao što je mesalamin, koji je učinkovit samo u blažim stanjima.

Blaga do umjerena bolest liječi se 5-aminosalicilatima. Većina terapijskih pristupa uključuje peroralnu primjenu mesalamina koji je učinkovit i u indukciji i održavanju remisije. Odgovor na terapiju javlja se unutar 14 dana, ali je ponekad potrebno do 8 tjedana za započinjanje remisije. Nakon što dođe do remisije, pacijenti obično nastave s terapijom održavanja.

Umjerena do teška bolest uglavnom se započinje liječiti sistemskim kortikosteroidima, kao što je oralni prednizon ili, u ozbiljnijim slučajevima, uključuje intravenske kortikosteroide. Ovi se lijekovi nikad ne bi trebali koristiti dugoročno, već samo dok se ne izazove remisija. Za terapiju održavanja koriste se drugi lijekovi, uključujući tiopurine (azatioprin, 6-merkaptopurin), metotreksat, anti-TNF (infliksimab, adalimumab, certolizumab), anti-integrine (natalizumab). Osim tiopurina, navedeni su lijekovi učinkoviti i u izazivanju i održavanju remisije.

Izbor koji će se točno lijek koristiti i je li potrebna kombinirana terapija uglavnom se određuje individualno na temelju ozbiljnosti stanja te liječničkog i pacijentovog izbora (25).

**Tablica 3.** Liječenje ulceroznog kolitisa

Preuzeto sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6685307/>

Datum pristupa: 07.08.2022.

<b>BLAGI DO UMJERENI</b>	
<b>Distalni kolitis</b>	Oralni ili rektalni aminosalicilati, rektalni kortikosteroidi
<b>Ekstenzivni kolitis</b>	Oralni aminosalicilati
<b>UMJERENI DO JAKI</b>	
<b>Distalni kolitis</b>	Oralni kortikosteroidi, rektalni kortikosteroidi
<b>Ekstenzivni kolitis</b>	Oralni kortikosteroidi
<b>KRONIČNI ILI KRITIČNI</b>	
<b>Ekstenzivni kolitis</b>	Jaki kortikosteroidi, intravenski ciklosporin
<b>OPORAVAK</b>	
<b>Distalni kolitis</b>	Oralni ili rektalni aminosalicilati, oralni azatioprin ili merkaptopurin
<b>Ekstenzivni kolitis</b>	Oralni aminosalicilati, oralni azatioprin ili merkaptopurin

Probiotici su široko korišteni kod pacijenata s upalnim bolestima crijeva, uglavnom kao potporna terapija. Unatoč njihovoj popularnosti i sigurnosti, dokazi o učinkovitosti nisu čvrsti u ovom slučaju. Iako je uloga mikrobioma u upalnim bolestima crijeva nedvojbeno, više faktora utječe na ove bolesti (26). Korist probiotskih kultura mora se promatrati na različitim modelima. Suplementacija živim kulturama probiotika ima svoje prednosti i nedostatke – stimuliraju stanice domaćina i aktivno mijenjaju okoliš, ali u određenim slučajevima mogu izazvati bakterijemiju ili intestinalna oštećenja. Unatoč tome, živi probiotici su najkorisniji kad su kombinirani i uzeti u isto vrijeme (27).

### **1.5. Smjernice za liječenje upalnih bolesti crijeva u Republici Hrvatskoj**

Smjernice za liječenje dostupne su na stranicama Hrvatskog udruženja za Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis te odgovaraju europskim smjernicama.

### 1.5.1. Smjernice za liječenje Crohnove bolesti

Umjereno aktivna Crohnova bolest, lokalizirana na završnom dijelu tankog crijeva i početnom dijelu kolona, treba se liječiti budesonidom ili sistemskim kortikosteroidima, kao što su prednizolon ili metilprednizolon. Anti-TNF terapija treba se primjenjivati kod pacijenata koji ne reagiraju na kortikosteroide ili ih iz nekog razloga ne podnose. Pacijentima s rijetkim relapsima bolesti, potrebno je uz kortikosteroide u terapiju uključiti i imunosupresive. Kod osoba koje ne reagiraju na steroide i/ili anti-TNF, uvodi se vedolizumab. Izlaganje kortikosteroidima potrebno je svesti na minimum, što olakšava rana primjena anti-TNF terapije. U ranim je fazama bolesti ustanovljeno da je za postizanje i održavanje remisije kombinacija infliksimaba i azatioprina učinkovitija od infliksimaba primijenjenog samostalno.

Teška aktivna Crohnova bolest, lokalizirana na završnom dijelu tankog crijeva i početnom dijelu kolona, liječi se prvo sistemskim kortikosteroidima. Anti-TNF terapija pogodna je za osobe kod kojih se javio relaps. Ukoliko ne dođe do poboljšanja s navedenim lijekovima, prikladna je opcija vedolizumab, blokator integrina. Kod pacijenata s rijetkim pojavama relapsa mogu se u terapiju, uz steroide, uključiti imunosupresivi. Ukoliko osoba ne reagira na medikamentozno liječenje, treba razmotriti opciju operativnog zahvata. Iako su kortikosteroidi inicijalna terapija, posljednjih je godina porasla upotreba anti-TNF terapije u slučajevima teškog fenotipa bolesti i loše prognoze. Studije su pokazale da kontinuirana anti-TNF terapija smanjuje rizik od operacije. Također, lakše je indicirati operaciju ukoliko je upala lokalizirana u završnom dijelu tankog crijeva i početnom dijelu kolona, nego na ostalim dijelovima.

Ukoliko je remisija postignuta sistemskim kortikosteroidima, treba razmisliti o liječenju tiopurinima ili metotreksatom. Neke osobe mogu ostati u remisiji bez ikakvog liječenja (28).

### 1.5.2. Smjernice za liječenje ulceroznog kolitisa

Ulcerozni proktitis jedan je od oblika ulceroznog kolitisa te se smatra početnim pokazateljem bolesti. Definira se kao regionalna upala na analnoj strani kolona. Prevenција pogoršanja ulceroznog proktitisa bitna je radi poboljšanja prognoze ulceroznog kolitisa (29).

U slučaju proktitisa, prvi je izbor 5-aminosalicilat, 1 g dnevno primijenjen rektalno. Monoterapija oralnim 5-ASA (engl. *5-aminosalicylic acid*) nije tako učinkovita za liječenje bolesti kao kad se koristi u kombinaciji. Topički steroidi trebaju ostati rezervirani za osobe koje ne podnose topičke 5-ASA lijekove, a ukoliko se ne postigne poboljšanje potrebno je dodati

oralni prednizolon. Ukoliko pacijent ne odgovara na navedenu terapiju, mogu se dodati lijekovi kao što su imunosupresivi i/ili anti-TNF lijekovi.

Prošireni kolitis blagog do umjerenog oblika treba se liječiti s više od 2,4 g oralnog 5-ASA dnevno, terapiju treba kombinirati s topičkim 5-ASA ako ga bolesnik podnosi radi većih šansi za remisiju. U slučaju da pacijent ne odgovara na navedene lijekove, idući je korak uvođenje sistemskih kortikosteroida.

Ako osoba ima teški prošireni ulcerozni kolitis, treba biti hospitalizirana jer se radi o stanju koje je potencijalno opasno po život (30).

## **1.6. Biološka terapija**

Biološki lijek jest lijek čija je djelatna tvar biološka tvar; biološka tvar jest tvar koja se proizvodi ili izlučuje iz biološkog izvora, a čija se ukupna svojstva i kakvoća utvrđuju fizičko-kemijsko-biološkim ispitivanjem zajedno s odgovarajućim podacima o postupku proizvodnje i kontrole postupka proizvodnje. Biološkim lijekovima smatraju se imunološki lijekovi, lijekovi iz ljudske krvi ili ljudske plazme, lijekovi dobiveni biotehnološkim postupcima i lijekovi za naprednu terapiju.

Zadnje studije ukazuju kako uvođenje biološke terapije, osobito anti-TNF lijekova, ranije u terapiju poboljšava ishode pacijenta i može prevenirati progresiju u ireverzibilno oštećenje crijeva. Dosta je istraživanja napravljeno na Crohnovoj bolesti, dokazi su slabiji kad se radi o ulceroznom kolitisu.

U pokusima je pokazano poboljšanje od 15% u stopi remisije kod pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti kod kojih je unutar dvije godine od dijagnoze uključen adalimumab u terapiju u odnosu na pacijente kod kojih je to napravljeno nakon pet godina. Razvoj anti-TNF lijekova predstavlja revolucionarni napredak u terapiji Crohnove bolesti, dovodeći do poboljšanih kliničkih ishoda, uključujući mukozno zacjeljenje (31).

Pet bioloških lijekova odobreno je u liječenju ulceroznog kolitisa: infliksimab, adalimumab, golimumab, vedolizumab i ustekinumab. Navedeni lijekovi imaju zadovoljavajuću učinkovitost i preporučeni su kao prva linija liječenja u umjerenim do teškim stanjima bolesti (32).

Infliksimab, adalimumab i golimumab predstavnici su terapije temeljene na supresiji čimbenika nekroze tumora (TNF) koji predstavlja jednog od ključnih proupalnih citokina u upalnoj bolesti

crijeva. Vedolizumab je biološki imunosupresiv selektivan za crijeva. To je humanizirano monoklonsko protutijelo koje se specifično veže na integrin  $\alpha_4\beta_7$  koji je pretežno prisutan na pomagačkim T limfocitima u crijevima. Ustekinumab je potpuno ljudsko IgG1k monoklonsko protutijelo koje se specifično veže na zajedničku p40 proteinsku podjedinicu ljudskog citokina interleukina (IL)-12 i IL-23 te inhibira njihovu aktivnost.

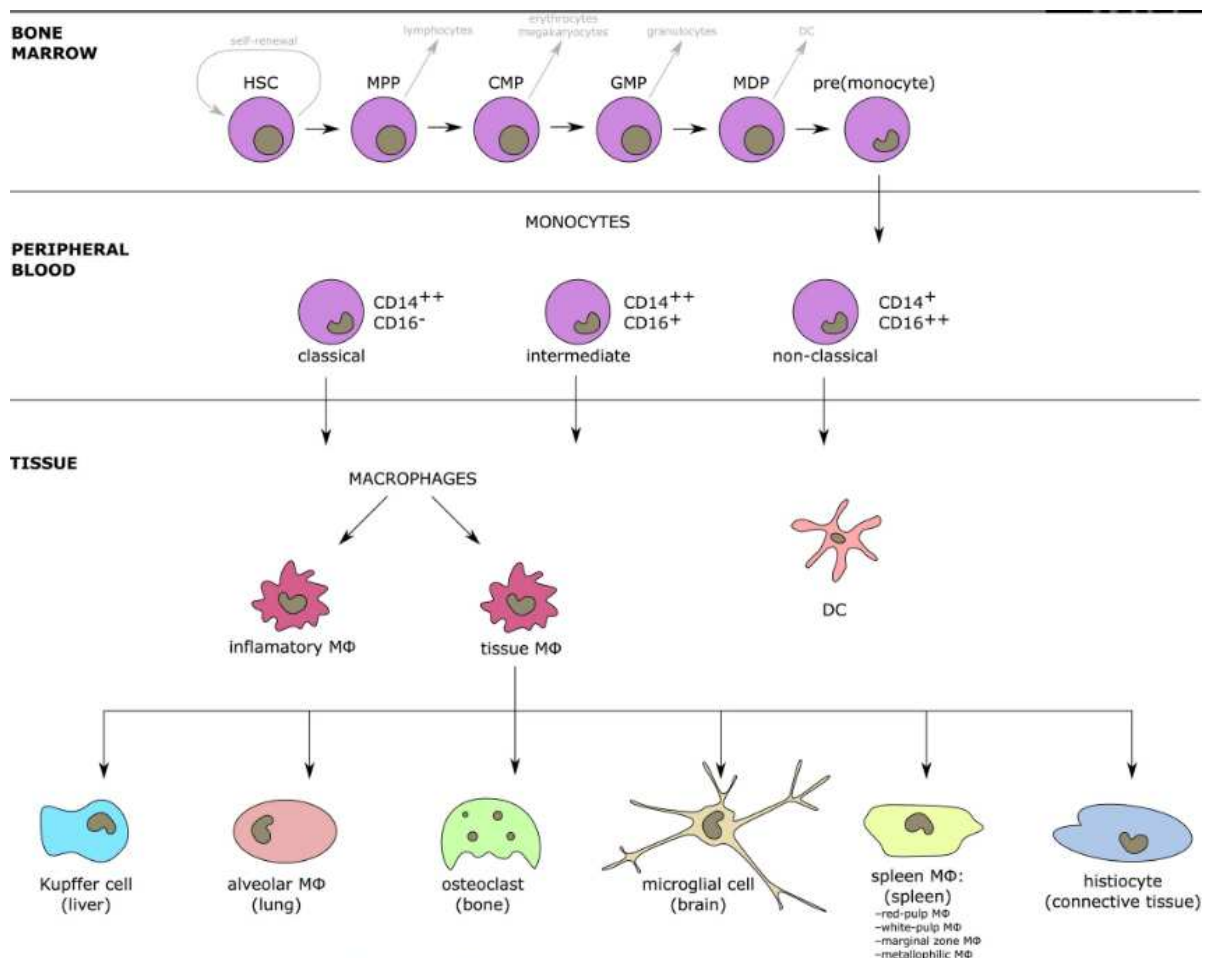
Ne reagiraju svi pacijenti na biološku terapiju, a određeni broj pacijenata gubi odgovor na terapiju tijekom vremena. Terapijsko praćenje lijekova dobar je alat za praćenje terapije i prilagodbu doze te može poboljšati dugoročnu učinkovitost navedenih lijekova (32, 33).

Unatoč vrlo dobrim rezultatima biološke terapije u terapiji upalnih bolesti crijeva tijekom zadnja dva desetljeća, navedena je terapija skupa i često pokazuje značajne nuspojave. Potrebno je odvagati koristi i rizike te zatim odlučiti o terapiji pacijenta. Unatoč dobrim kliničkim ishodima, pacijenti često prekinu terapiju zbog troškova i jakih nuspojava, osobito rizika od malignih bolesti (34).

Uzimajući u obzir kompleksnost biološke terapije, primjena zahtijeva iskustvo liječnika i provodi se prvenstveno u specijaliziranim bolnicama. Sukladno tome, nalaz upalnih i protuupalnih monocita mogao bi biti od pomoći u daljnoj terapiji i prognozi bolesti.

## **1.7. Klasifikacija monocita**

Monociti čine jednu komponentu „mononuklearnog fagocitnog sustava“, kojeg dijele s makrofazima i dendritičkim stanicama. Definirani su kao cirkulirajuće krvne stanice koje čine 10% perifernih leukocita kod ljudi i 4% kod miševa. Razvijaju se iz koštane srži iz zajedničkog mijeloidnog prekursora kojeg dijele s eritrocitima, trombocitima, dendritičkim stanicama i granulocitima (16).



**Slika 7.** Razvoj monocita

Preuzeto sa: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/sji.12883>

Datum pristupa: 04.08.2022.

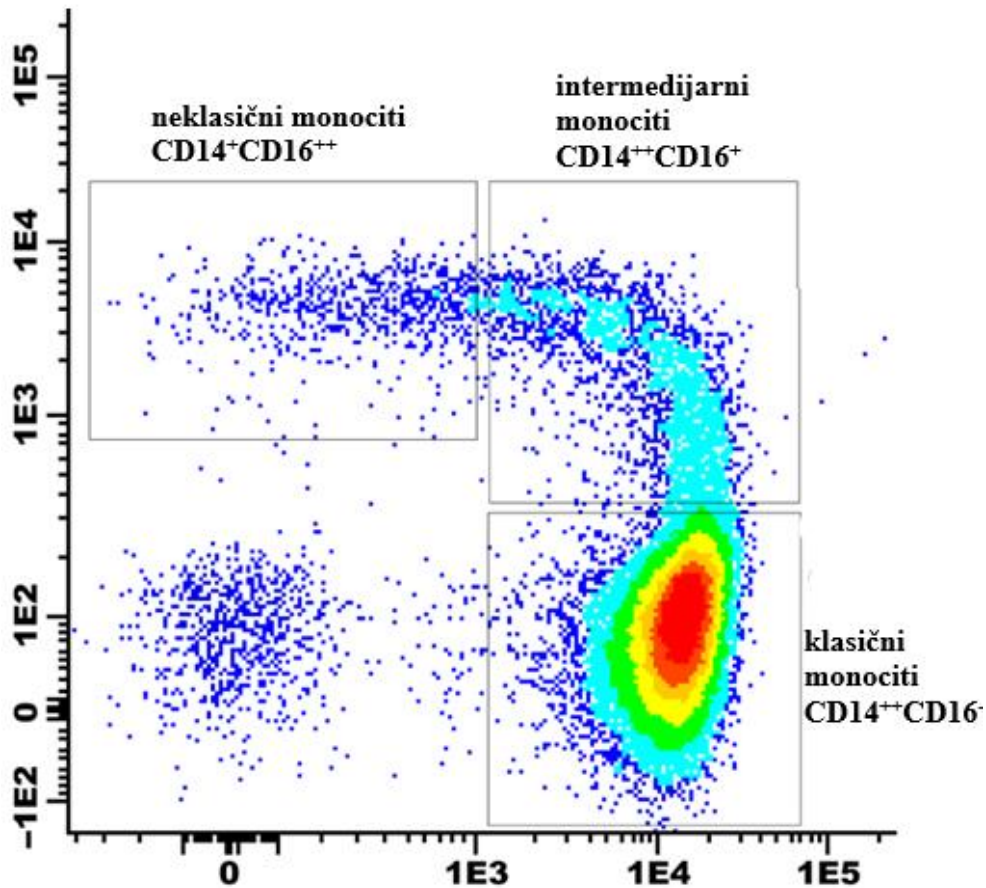
Podjela monocita temelji se na njihovoj ekspresiji CD14 (stanični koreceptor za liposaharide [LPS]) i CD16 (IgG receptor niskog afiniteta).

Postoje tri subpopulacije:

- Klasični monociti (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) – čine oko 90% monocita; CD14 je jako eksprimiran, CD16 nije eksprimiran
- Intermedijarni monociti (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) – CD14 je jako eksprimiran, dok je CD16 slabo eksprimiran
- Neklasični monociti (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) – CD14 je slabo eksprimiran, CD16 je jako eksprimiran



Podrijetlo i podvrste monocita bili su slabo poznati do pojave protočne citometrije. Ova tehnologija omogućila je identifikaciju progenitora i diferencijacije različitih vrsta stanica (17).



Slika 8. Monocitne subpopulacije

Preuzeto sa: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/sji.12883>

Datum pristupa: 04.08.2022.

Neklasični monociti odgovorni su za proliferaciju i stimulaciju CD4<sup>+</sup> T-stanica.

Pokusima je uočeno kako neklasični monociti imaju tendenciju mobilizacije na endotelu nakon prenošenja u miševe. *In vitro* eksperimenti pokazali su veću mobilnost monocita s visokom ekspresijom CD16, u odnosu na one sa slabijom ekspresijom ili bez nje. Ova pojava upućuje na konstantno pomicanje neklasičnih monocita po endotelu u potrazi za znakovima upale ili oštećenja, spremnih za brzu transmigraciju (18).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE**

## **2.1. Cilj istraživanja**

Cilj je istraživanja usporedba upalnog odgovora u različito liječenih pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa. Diplomski je rad izrađen u sklopu provedenog istraživanja za koji postoji publikacija.

## **2.2. Hipoteze istraživanja**

1. Biološka terapija smanjuje ekspresiju CD44 biljega na neklasičnim monocitima pacijenata s ulceroznim kolitisom.
2. Ekspresija CD44 biljega na limfocitnim populacijama kod ulceroznog kolitisa ovisi o vrsti terapije koju pacijent prima.
3. Prisutan je povećan omjer CD16<sup>+</sup> monocita i limfocita u osoba oboljelih od ulceroznog kolitisa.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Ustroj studije

Istraživanje je presječno, provedeno na Zavodu za gastroenterologiju u KBC-u Split te na Medicinskom fakultetu u Splitu.

### 3.2. Ispitanici

Istraživanje je obuhvatilo 94 osobe podijeljene u dvije skupine – pacijente s upalnim bolestima crijeva (46) i kontrolnu skupinu (48). Unutar oboljele skupine ljudi, 28 ih je imalo Crohnovu bolest i 18 ulcerozni kolitis.

Pacijenti s upalnim bolestima crijeva podijeljeni su u dvije podskupine: jedna je skupina liječenja biološkom terapijom, dok je druga liječena nebiološkom terapijom. Svi su sudionici bili punoljetni te su prošli potpuni protokol ispitivanja, osim procjene fekalnog kalprotektina mjerene samo u skupini pacijenata.

**Tablica 4.** lijekovi korišteni u ispitivanju kod pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa

biološka terapija (n = 10)	nebiološka terapija (n = 8)
infliksimab	mesalazin
adalimumab	6-merkaptopurin
vedolizumab	metotreksat

Na početku je 100 osoba bilo uključeno u ispitivanje – dvije su isključene zbog pogoršanja bolesti, dvije zbog nemogućnosti zakazivanja pregleda, a dvije zbog odbijanja daljnjih koraka.

Kriteriji uključanja bili su dijagnoza upalne bolesti crijeva sa stabilnošću bolesti u protekla tri mjeseca i prisutnost bolesti u posljednjih godinu dana.

Kriteriji isključenja bili su: kronična bubrežna bolest, bolest jetre, plućna bolest, srčano zatajenje u anamnezi, kardiovaskularna ili cerebrovaskularna stanja u anamnezi, dijabetes mellitus, maligna bolest te korištenje lokalnih sistemskih kortikosteroida u protekla tri mjeseca.

Zdravi sudionici nisu imali nikakve gastrointestinalne simptome, bili su testirani po Rim IV kriteriju kako bi se isključila upalna bolest crijeva.

### 3.3. Priprema uzorka

Uzorci krvi svih sudionika potrebni za protočnu citometriju i biokemijsku analizu uzeti su tijekom jutarnjih sati, najmanje 10 sati nakon zadnjeg obroka. U tom trenutku nije bilo poznato o kojem se tipu upalne bolesti crijeva radi.

Krv je vađena pomoću polietilenskog katetera umetnutog u antekubitalnu venu. Točno 100  $\mu$ L cijele krvi obrađeno je Fc-receptor blokirajućim reagensom radi sprječavanja nespecifičnog vezanja. Uzorak je dalje inkubiran 20 minuta u mraku pri 25°C s 4  $\mu$ L anti-humanog CD14s PerCP-Cy5.5-konjugiranog antitijela, s 4  $\mu$ L antitijela konjugiranog fikoeritriinom, reaktivnog na humani CD16 i s 10  $\mu$ L mišjih antitijela reaktivnim na humani CD44 koji je konjugiran sa FITC (fluorescein izotiocijanat).

Nakon lize crvenih krvnih stanica s otopinom za lizu, stanice su analizirane pomoću protočne citometrije. Uzorci neobojenih stanica mjereni su i obrađeni kao negativne kontrole. Prikupljanje stanica zaustavljeno je na broju od  $10^6$  stanica.

### 3.4. Protočna citometrija

Iako postoje mnogi testovi koji koriste protočnu citometriju za analizu staničnih obilježja i/ili funkcija, protočna citometrija (engl. *flow cytometry*) najviše se koristi u cilju imunofenotipizacije, tj. obilježavanja specifičnih staničnih biljega.

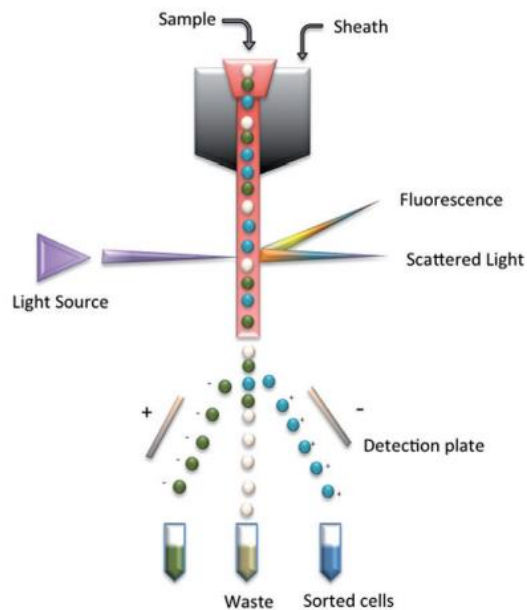
Protočni citometar sastoji se od tri međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog elektronskog.

Protočni sustav čine pokretačka tekućina, koja je nosač suspenzije stanica, suspenzija stanica i zračni potisak. Navedeni sustav omogućuje da stanice iz suspenzije pojedinačno laminarnim protokom kroz sustav uske kapilare dolaze do snopa laserskog svjetla.

Lasersko svjetlo, leće, filtri i osjetnici čine optički sustav. Nakon što se stanice obasjaju svjetlom, stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih osobina stanica – veličine i zrnitosti. Dodatno obilježavanje stanica slobodnim ili za monoklonska protutijela vezanim fluorescentnim bojama (fluorokromima) rabi se za dodatno obilježavanje specifičnih staničnih struktura. Fluorokromi obasjani laserskom svjetlošću emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti, a hvataju je specifični osjetnici protočnog citometra FL-detektori,

kojih ima najmanje 4 u protočnom citometru. Detektori hvataju 4 različite boje koje su vezane na 4 različita protutijela. FSC-detektor (eng. *forward scatter*) otkriva raspršenje svjetla difrakcijom (koja je razmjerna veličini stanice), a SSC-detektor (engl. *side scatter*) mjeri stupanj kompleksnost unutarnjih struktura stanice (staničnih organela) i neobojenih stanica.

Elektronski sustav pretvara različita raspršenja i različitu jakost fluorescencije koji se kasnije interpretiraju pomoću grafova u računalnom programu (35).



**Slika 9.** Princip rada protočnog citometra

Preuzeto sa: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2015.1128876>

Datum pristupa: 04.09.2022.



**Slika 10.** BD Accuri™ C6 citometar

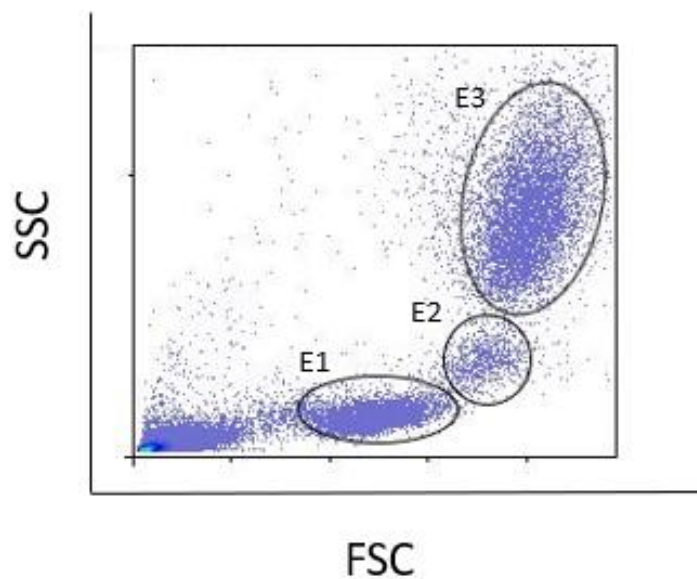
### 3.5. Analiza podataka

Podatci prikupljeni citometrom analizirani su korištenjem FlowLogic Software-a.

Veličina se stanice može odrediti pomoću FSC-detektora, dok se unutarnja struktura, tj. granuliranost stanice može odrediti pomoću SSC-detektora.

Uz postotak  $CD14^+CD16^{++}$ ,  $CD14^{++}CD16^+$ ,  $CD14^{++}CD16^-$  stanica određivan je i prosječni izražaj MFI (eng. *median fluorescence intensity*) po jednoj stanici ( $CD44^+$  na  $CD14^+CD16^{++}$  i  $CD44^+$  na  $CD14^{++}CD16^-$ ).

Za definiciju staničnih populacija najčešće se koristi točkasti dijagram veličine i zrnatosti stanica (FSC×SSC) na kojem se postavlja regija (R) analize oko ciljnih stanica iz kojih će se analizirati specifični fluorescentni signali.



**Slika 11.** FSC x SSC dijagram  
Limfociti (E1), monociti (E2), granulociti (E3)

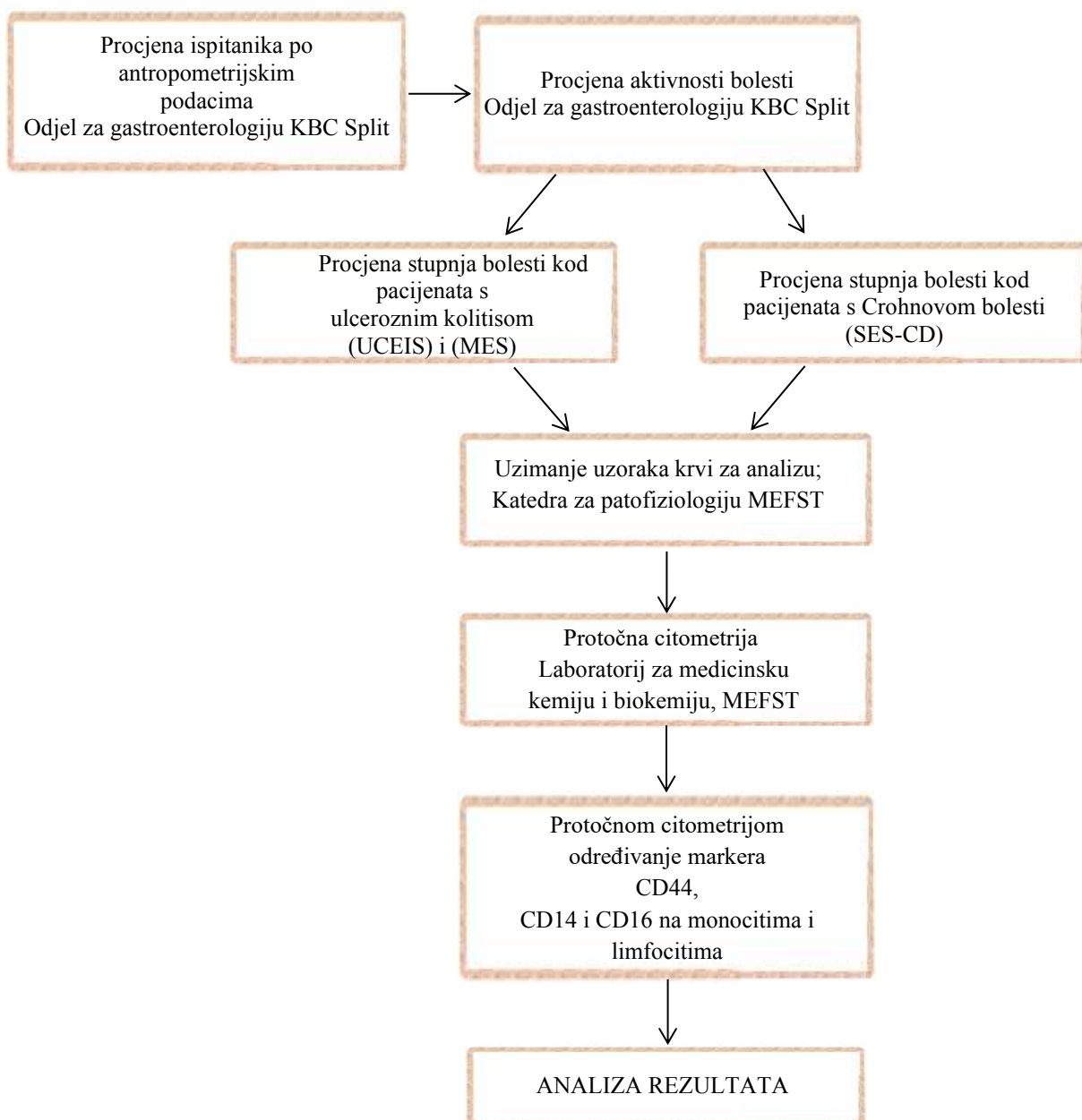
### 3.6. Statistička analiza

Svi podatci uneseni su u prethodno formiranu bazu podataka koja je tijekom istraživanja korigirana. Sve statističke metode obrađene su pomoću Past 3. X software-a (verzija 3.14, Sveučilište Oslo, Norveška) s postavljenom značajnošću na  $p < 0.05$  (36).



Pomoću Kolmogorov-Smirnov testa određena je normalnost razdiobe brojevnih varijabli. Podatci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija za kontinuirane parametarske varijable, medijan (interkvartilni raspon) za kontinuirane neparametarske varijable te kao cijeli broj i postotak za kategorijalne varijable. Student t-test korišten je za usporedbu parametarskih kontinuiranih podataka, a Mann Whitney U test za usporedbu parametrijskih kontinuiranih podataka.

### 3.7. Plan istraživanja



## **4. REZULTATI**

## 4.1. Osnovne karakteristike ispitanika

Nije postojala značajna razlika u spolu, dobi, tjelesnoj masi, BMI i pušenju između skupine pacijenata i kontrolne skupine, osim u visini ispitanika koja je bila niža u skupini pacijenata. Pacijenti oboljeli od ulceroznog kolitisa imali su blago do umjereno ozbiljan oblik bolesti (UCEIS, MES), bez razlika u označenim varijablama.

**Tablica 5.** Usporedba označenih parametara između različitih aktivnosti bolesti kod pacijenata s ulceroznim kolitisom

Parametri	Endoskopska ozbiljnost bolesti (UCEIS; MES)		p*
	Blago (N=5)	Umjereno (N=11)	
Limfociti			
MFI od CD44 na CD44 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	25028 (13845-104526)	69528 (66467-94765)	0.364
Monociti			
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> %	8.9 (6.82-10.14)	8.77 (6.37-14.24)	0.82
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> %	7.71 (4.53-16.34)	7.66 (5.38-12.9)	0.89
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> %	25.53 (22.52-43.44)	25.26 (15.26-32.93)	0.42
MFI od CD44 <sup>+</sup> na CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>	97363 (75098-98412)	76118 (62665-86808)	0.058
MFI od CD44 <sup>+</sup> na CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>	91715 (72015-113863)	68445 (26607-86346)	0.302

Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

UCEIS – endoskopski indeks ozbiljnosti ulceroznog kolitisa; MES – Mayo endoskopski bodovi;

MFI – medijan intenziteta fluorescencije; CD – marker diferencijacije.

\*Mann Whitney U test

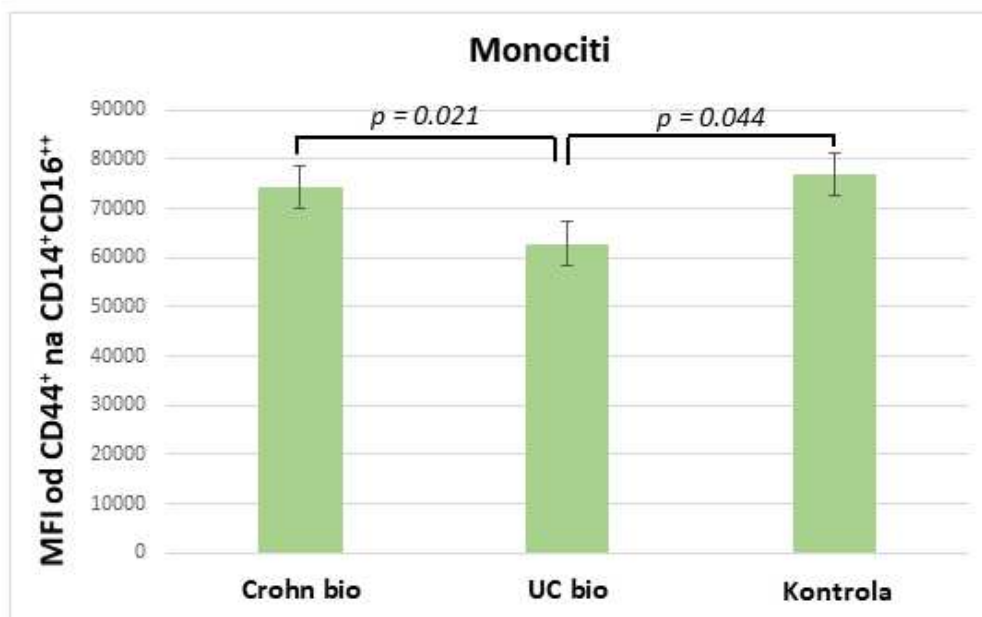
## 4.2. Karakteristike podskupina pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa

Nije postojala značajna razlika u antropometrijskim karakteristikama, karakteristikama povezanim s bolešću i laboratorijskih parametara između podskupine pacijenata liječenih biološkom i podskupine pacijenata liječenih nebiološkom terapijom.

Iznimka su bijele krvne stanice, koje su bile niže u podskupini osoba liječenih nebiološkom terapijom.

## 4.3. Ekspresija CD44 biljega na CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> subpopulaciji monocita

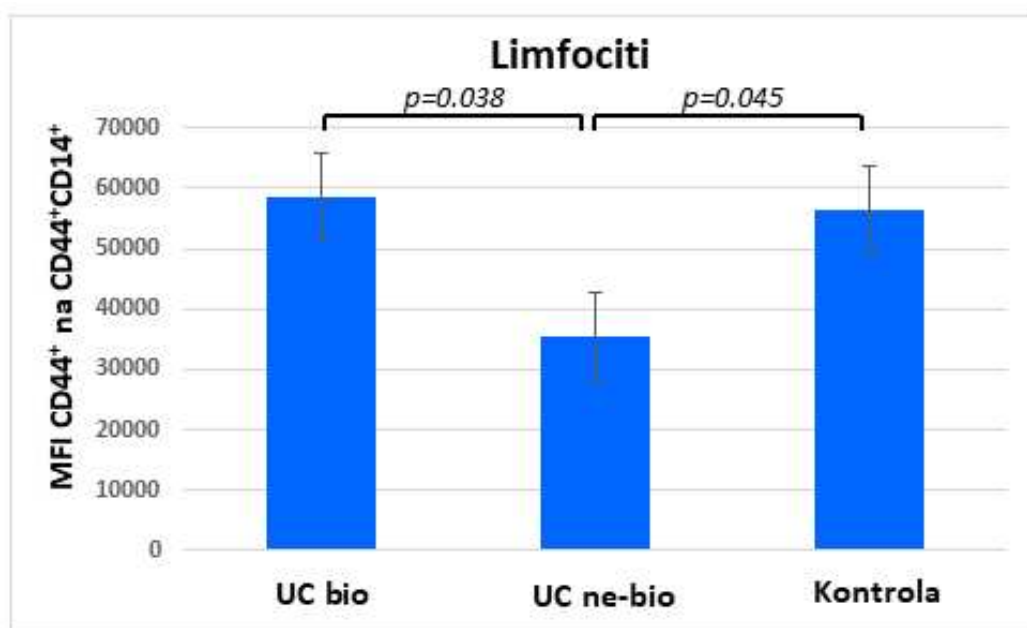
Pacijenti oboljeli od ulceroznog kolitisa liječeni biološkom terapijom imali su značajno smanjenje medijana intenziteta fluorescencije CD44 biljega na CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> subpopulaciji monocita.



**Slika 12.** Medijan intenziteta fluorescencije CD44 biljega na CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> subpopulaciji monocita prilikom liječenja biološkom terapijom – usporedba kontrolne skupine i skupine pacijenata

#### 4.4. Ekspresija CD44 na CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfocitima kod različito liječenih pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa

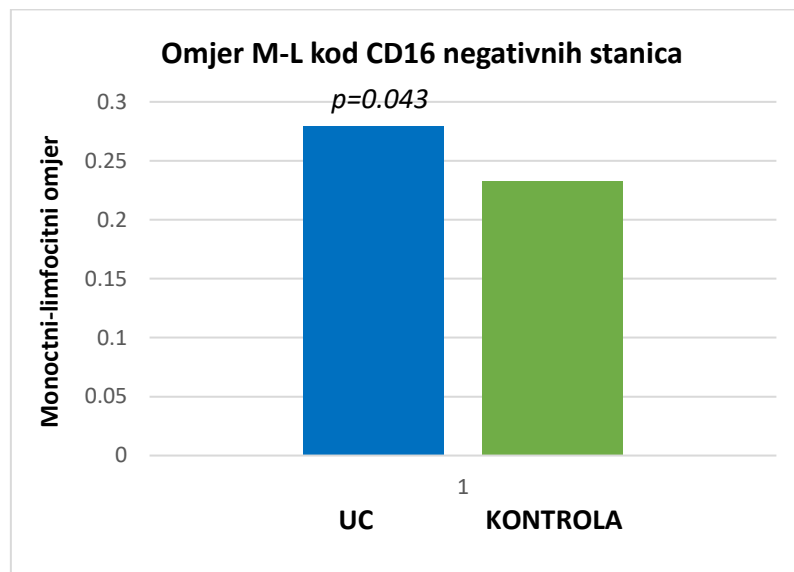
Medijan intenziteta fluorescencije CD44 biljega na CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfocitima gotovo je dvostruko veći kod pacijenata liječenih biološkom terapijom u usporedbi s pacijentima liječenih nebiološkom terapijom. Postotci CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfocita nisu se pokazali različitima između navedenih skupina.



**Slika 13.** Medijani intenziteta fluorescencije CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfocita kod pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa

#### 4.5. Omjer CD16<sup>+</sup> monocita i limfocita kod pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa

Omjer CD16<sup>+</sup> monocita i limfocita kod pacijenata s ulceroznim kolitisom je pokazao povećanje samo između svih pacijenata liječenih biološkom i nebiološkom terapijom zajedno u odnosu na kontrolu.



**Slika 14.** Omjer monocita i limfocita kod pacijenata s ulceroznim kolitisom

## **5. RASPRAVA**

Ulcerozni je kolitis autoimuna kronična upalna bolest crijeva nepredvidljivog tijeka karakterizirana kroničnom upalom sluznice rektuma i kolona s izmjeničnim razdobljima remisije i relapsa, što može utjecati na život i smanjiti kvalitetu istoga. Zahvaća milijune ljudi diljem svijeta i smatra se globalnom bolešću (37).

Cilj je liječenja ulceroznog kolitisa izazivanje kliničke remisije i zatim održavanje remisije bez potrebe za kortikosteroidima, dok je izbor terapije određen ozbiljnošću same bolesti. U prošlosti se koristio step-up pristup, ali prema novijim smjernicama teži se oblici bolesti odmah liječe biološkom terapijom.

Blaga do umjerena bolest liječi se 5-aminosalicilatima. Odgovor na terapiju javlja se unutar 14 dana, ali je ponekad potrebno do 8 tjedana za započinjanje remisije. Nakon što dođe do remisije, pacijenti obično nastave s terapijom održavanja.

Umjerena do teška bolest uglavnom se započinje liječiti sistemskim kortikosteroidima, kao što je oralni prednizon ili, u ozbiljnijim slučajevima, uključuje intravenske kortikosteroide. Važno je da se kortikosteroidi ne koriste dugoročno, već samo do pojave remisije. Za terapiju održavanja koriste se drugi lijekovi – tiopurini, anti-TNF, anti-integrini i Janus kinazni inhibitori.

Pojavom biološke terapije pojavili su se lijekovi koji mogu promijeniti prirodni tijek bolesti, što može rezultirati dugotrajnom remisijom bez primjene kortikosteroida te posljedično smanjenom potrebom za operacijama i hospitalizacijama (38).

Ranije su studije pokazale značajno povećanu ekspresiju CD44 biljega u kolonu kod ulceroznog kolitisa (39).

Navedeno je istraživanje usmjereno na analizu ekspresije CD44 biljega na neklasičnim monocitima i podskupini limfocita kod pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa, koji su liječeni različitim vrstama terapije. Kod podskupine liječene biološkom terapijom uočena je smanjena ekspresija CD44 biljega na neklasičnim monocitima. CD44 jedan je od glavnih receptora za hijaluronan čija ekspresija doprinosi patogenezi upale. Samim time, smanjenje CD44 upućuje na djelotvornost terapije.

Kod podskupine liječene nebiološkom terapijom pokazana je manja ekspresija CD44 biljega na CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfocitima, dok kod pacijenata liječenih biološkom terapijom nije bilo razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod nebiološki liječenog ulceroznog kolitisa postotak neklasičnih monocita ostao je isti kao kod kontrolne skupine.



Iako se C-reaktivni protein (CRP) i stopa sedimentacije eritrocita (ESR) rutinski prate u pacijenata s upalnim bolestima crijeva kao indikatori za aktivnost bolesti, oni su samo djelomični pokazatelji. Kontinuirano se radi na pronalaženju lako dostupnih i jeftinih biomarkera koji bi se mogli koristiti u kliničkoj praksi kao mjerilo ozbiljnosti bolesti i za predviđanje progresije. U prethodnim studijama uočeno je da u pacijenata s aktivnim ulceroznim kolitisom dolazi do većeg broja CD16<sup>+</sup> monocita u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p < 0.001$ ). Posljedično dolazi do povećanja omjera CD16<sup>+</sup> monocita i limfocita kod pacijenata s aktivnom bolesti u usporedbi s osobama u remisiji ( $p < 0.01$ ) i kontrolnom skupinom ( $p < 0.0001$ ). Navedeni rezultati ukazuju na mogućnost korištenja omjera CD16<sup>+</sup> monocita i limfocita kao biomarkera u praćenju ulceroznog kolitisa (40).

Provedeno istraživanje sadrži nekoliko ograničenja. Istraživanje je presječno prema ustroju, što dovodi u pitanje uzročno-posljedične veze. Nadalje, istraživanje uključuje relativno mali broj ispitanika. Heterogenost skupine bolesnika smanjuje veličinu uzorka i otežava generalizaciju. Ulcerozni je kolitis bolest koju karakteriziraju izmjene remisije i relapsa pa bi trebalo napraviti više mjerenja jer obrazac biljega ne mora biti konstantan.

Biolška terapija predstavlja značajan iskorak u liječenju ulceroznog kolitisa, ali potrebno je sagledati sve prednosti i nedostatke terapije prije odluke o liječenju pojedinca, osobito uzeti u obzir potencijalne nuspojave koje mogu biti ozbiljne (infekcije, plućna embolija, malignost i slično).

## **6. ZAKLJUČAK**

1. Opisana je različita ekspresija CD44 biljega na neklasičnim monocitima pacijenata, s obzirom na terapiju koju pacijent prima.
2. Osim neklasičnih monocita, zahvaćeni su i CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfociti – uočena je različita ekspresija CD44 biljega ovisno o terapiji.
3. U osoba oboljelih od ulceroznog kolitisa prisutan je povećan omjer CD16<sup>-</sup> monocita i limfocita u odnosu na kontrolnu skupinu.

## **7. LITERATURA**

1. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(1):91-99. doi:10.3748/wjg.v20.i1.91
2. Windsor JW, Kaplan GG. Evolving Epidemiology of IBD. *Curr Gastroenterol Rep*. 2019;21(8):40. Published 2019 Jul 23. doi:10.1007/s11894-019-0705-6
3. Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res*. 2019;2019:7247238. Published 2019 Dec 1. doi:10.1155/2019/7247238
4. Kelsen JR, Russo P, Sullivan KE. Early-Onset Inflammatory Bowel Disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2019;39(1):63-79. doi:10.1016/j.iac.2018.08.008
5. Flynn S, Eisenstein S. Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. *Surg Clin North Am*. 2019;99(6):1051-1062. doi:10.1016/j.suc.2019.08.001
6. Rogler G, Singh A, Kavanaugh A, Rubin DT. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease: Current Concepts, Treatment, and Implications for Disease Management. *Gastroenterology*. 2021;161(4):1118-1132. doi:10.1053/j.gastro.2021.07.042
7. Petagna L, Antonelli A, Ganini C, et al. Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence. *Biol Direct*. 2020;15(1):23. Published 2020 Nov 7. doi:10.1186/s13062-020-00280-5
8. Du L, Ha C. Epidemiology and Pathogenesis of Ulcerative Colitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2020;49(4):643-654. doi:10.1016/j.gtc.2020.07.005
9. Segal JP, LeBlanc JF, Hart AL. Ulcerative colitis: an update. *Clin Med (Lond)*. 2021;21(2):135-139. doi:10.7861/clinmed.2021-0080
10. Feuerstein JD, Moss AC, Farraye FA. Ulcerative Colitis [published correction appears in *Mayo Clin Proc*. 2019 Oct;94(10):2149]. *Mayo Clin Proc*. 2019;94(7):1357-1373. doi:10.1016/j.mayocp.2019.01.018
11. Annese V. Genetics and epigenetics of IBD. *Pharmacol Res*. 2020;159:104892. doi:10.1016/j.phrs.2020.104892

12. Younis N, Zarif R, Mahfouz R. Inflammatory bowel disease: between genetics and microbiota. *Mol Biol Rep.* 2020;47(4):3053-3063. doi:10.1007/s11033-020-05318-5
13. Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res.* 2019;2019:7247238. Published 2019 Dec 1. doi:10.1155/2019/7247238
14. Mentella MC, Scaldaferrri F, Pizzoferrato M, Gasbarrini A, Miggiano GAD. Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review. *Nutrients.* 2020;12(4):944. Published 2020 Mar 29. doi:10.3390/nu12040944
15. Hou Q, Huang J, Ayansola H, Masatoshi H, Zhang B. Intestinal Stem Cells and Immune Cell Relationships: Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol.* 2021;11:623691. Published 2021 Jan 20. doi:10.3389/fimmu.2020.623691
16. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity.* 2018;49(4):595-613. doi:10.1016/j.immuni.2018.10.005
17. Ożańska A, Szymczak D, Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand J Immunol.* 2020;92(1):e12883. doi:10.1111/sji.12883
18. Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res.* 2012;53(1-3):41-57. doi:10.1007/s12026-012-8297-3
19. Palamides P, Jodeleit H, Föhlinger M, et al. A mouse model for ulcerative colitis based on NOD-scid IL2R  $\gamma$ null mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from affected individuals. *Dis Model Mech.* 2016;9(9):985-997. doi:10.1242/dmm.025452
20. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):64. Published 2018 May 10. doi:10.1186/s13045-018-0605-5
21. Hoffmann U, Heilmann K, Hayford C, et al. CD44v7 ligation downregulates the inflammatory immune response in Crohn's disease patients by apoptosis induction in mononuclear cells from the lamina propria. *Cell Death & Differentiation.* 2007;14(8):1542-1551. doi:10.1038/sj.cdd.4402153

22. Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front Immunol.* 2015;6:201. Published 2015 May 6. doi:10.3389/fimmu.2015.00201
23. Farkas S, Hornung M, Sattler C, et al. Short-term treatment with anti-CD44v7 antibody, but not CD44v4, restores the gut mucosa in established chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol.* 2005;142(2):260-267. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02911.x
24. Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J Med Life.* 2019;12(2):113-122. doi:10.25122/jml-2018-0075
25. Feuerstein JD, Moss AC, Farraye FA. Ulcerative Colitis [published correction appears in *Mayo Clin Proc.* 2019 Oct;94(10):2149]. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(7):1357-1373. doi:10.1016/j.mayocp.2019.01.018
26. Abraham BP, Quigley EMM. Probiotics in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2017;46(4):769-782. doi:10.1016/j.gtc.2017.08.003
27. Jakubczyk D, Leszczyńska K, Górska S. The Effectiveness of Probiotics in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease (IBD)-A Critical Review. *Nutrients.* 2020;12(7):1973. Published 2020 Jul 2. doi:10.3390/nu12071973
28. Ecco-EFCCA Smjernice za oboljele od Crohnove Bolesti (CD). Hrvatsko udruženje za Crohnovu bolest i Ulcerozni kolitis.  
[https://hucuk.hr/brosura/ECCOEFCCA\\_smjernice\\_za\\_oboljele\\_od\\_Crohnove\\_bolesti.pdf](https://hucuk.hr/brosura/ECCOEFCCA_smjernice_za_oboljele_od_Crohnove_bolesti.pdf).
29. Kato S, Ishibashi A, Kani K, Yakabi K. Optimized Management of Ulcerative Proctitis: When and How to Use Mesalazine Suppository. *Digestion.* 2018;97(1):59-63. doi:10.1159/000484224
30. Ecco-EFCCA Smjernice za oboljele od ulceroznog kolitisa (UC). Hrvatsko udruženje za Crohnovu bolest i Ulcerozni kolitis.  
[https://hucuk.hr/brosura/ECCO-EFCCA\\_smjernice\\_za\\_oboljele\\_od\\_ulceroznog\\_kolitisa.pdf](https://hucuk.hr/brosura/ECCO-EFCCA_smjernice_za_oboljele_od_ulceroznog_kolitisa.pdf)
31. Berg DR, Colombel JF, Ungaro R. The Role of Early Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2019;25(12):1896-1905. doi:10.1093/ibd/izz059

32. Bhattacharya A, Osterman MT. Biologic Therapy for Ulcerative Colitis. *Gastroenterol Clin North Am.* 2020;49(4):717-729. doi:10.1016/j.gtc.2020.08.002
33. Argollo M, Kotze PG, Kakkadasam P, D'Haens G. Optimizing biologic therapy in IBD: how essential is therapeutic drug monitoring?. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(11):702-710. doi:10.1038/s41575-020-0352-2
34. Fredericks E, Watermeyer G. De-escalation of biological therapy in inflammatory bowel disease: Benefits and risks. *S Afr Med J.* 2019;109(10):745-749. Published 2019 Sep 30. doi:10.7196/SAMJ.2019.v109i10.14074
35. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017;37(2):163-176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876
36. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 2001;4:9. [[Google Scholar](#)]
37. Pravda J. Can ulcerative colitis be cured?. *Discov Med.* 2019;27(149):197-200.
38. 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(2):75-87.
39. Cui DJ, Chen C, Yuan WQ, Yang YH, Han L. Integrative analysis of ferroptosis-related genes in ulcerative colitis. *J Int Med Res.* 2021;49(9):3000605211042975. doi:10.1177/03000605211042975
40. Zhang S, Wu Z, Li J, et al. Peripheral differentials by Cytodiff flow cytometric system predict disease activity in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta.* 2017;471:17-22. doi:10.1016/j.cca.2017.05.018



## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:**

Cilj je istraživanja usporedba upalnog odgovora kod različito liječenih pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa.

**Materijali i metode:**

Uzorci krvi svih sudionika uzeti su za analizu. Uzorak je tretiran Fc-receptor blokirajućim reagensom te je uzorak inkubiran 20 minuta bez izvora svjetlosti pri sobnoj temperaturi uz dodatak anti-humanog CD14s PerCP-Cy5.5-konjugiranog protutijela i protutijela konjugiranog fikoeritriinom, reaktivnog na humani CD16 te dodatak mišjih antitijela reaktivnim na humani CD44, koji je konjugiran s fluorescein izotiocijanatom. Nakon lize stanica, stanice su analizirane pomoću protočne citometrije. Podatci su obrađeni korištenjem FlowLogic Software-a.

**Rezultati:**

Pacijenti oboljeli od ulceroznog kolitisa liječeni biološkom terapijom imali su značajno smanjenje medijana intenziteta fluorescencije CD44 biljega na CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> subpopulaciji monocita. Medijan intenziteta fluorescencije CD44 biljega na CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfocitima gotovo je dvostruko veći kod pacijenata liječenih biološkom terapijom u usporedbi s pacijentima liječenih nebiološkom terapijom. Postotci CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfocita nisu se pokazali različitima između navedenih skupina.

**Zaključak:**

Opisana je različita ekspresija CD44 biljega na neklasičnim monocitima pacijenata, s obzirom na terapiju koju pacijent prima. Osim neklasičnih monocita, zahvaćeni su i CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> limfociti – uočena je različita ekspresija CD44 biljega ovisno o terapiji.

## **9. SUMMARY**

**The aim of research:**

The aim of this research was comparison of inflammatory response between differently treated patients with ulcerative colitis.

**Materials and methods:**

Blood samples of all participants were taken for analysis. The sample was treated with Fc receptor blocking solution, then incubated for 20 minutes without a light source at room temperature with the addition of anti-human CD14s PerCP-Cy5.5-conjugated antibodies and phycoerythrin-conjugated antibodies reactive to human CD16 and with murine antibodies reactive to human CD44, conjugated with fluorescein isothiocyanate. After cell lysis, cells were analyzed by flow cytometry. Data were processed using FlowLogic Software.

**The results:**

Ulcerative colitis patients treated with biological therapy had a significant decrease in the median fluorescence intensity of the CD44 marker on the CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> subpopulation of monocytes. The median fluorescence intensity of the CD44 marker on CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> lymphocytes is almost twice as high in patients treated with biological therapy compared to patients treated with non-biological therapy. The percentages of CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> lymphocytes did not differ between the mentioned groups.

**Conclusions:**

Different expression of the CD44 marker on non-classical monocytes of patients was described, with regard to the therapy the patient received. In addition to non-classical monocytes, CD44<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> lymphocytes are also affected – different expression of the CD44 marker was observed depending on the therapy.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime:** Antonia Alfirević

**Datum rođenja:** 23.08.1998.

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa:** Prilaz blatu 9, 21212 Kaštel Sućurac

**e-mail:** [antonia.alfirevic98@gmail.com](mailto:antonia.alfirevic98@gmail.com)

**OBRAZOVANJE:**

- **2005. – 2013.** Osnovna škola kneza Mislava Kaštel Sućurac, Republika Hrvatska
- **2013. – 2017.** IV. gimnazija Marko Marulić Split, Republika Hrvatska
- **2017. - 2022.** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija

**RADNO ISKUSTVO:**

**II. 2022. – VIII. 2022.** – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Kaštel Sućurac

**POSEBNE VJEŠTINE:**

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

**Strani jezici:** engleski jezik

**Vozačka dozvola:** B kategorija