

# Polimorfizam nukleotida rs531564 gena za pri-miR-124 u bolesnika s primarnim sklerozirajućim kolangitisom i upalnom bolesti crijeva

---

Jelaković, Mislav

Doctoral thesis / Disertacija

2025

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:595524>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Mislav Jelaković**

Polimorfizam nukleotida rs531564 gena  
za pri-miR-124 u bolesnika s primarnim  
**sklerozirajućim kolangitisom i upalnom**  
bolesti crijeva

DISERTACIJA



Zagreb, 2025.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

Mislav Jelaković

**Polimorfizam nukleotida rs531564 gena za pri-miR-124 u  
bolesnika s primarnim  
sklerozirajućim kolangitisom i upalnom bolesti crijeva**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2025.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju KBC-a Zagreb i Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković

Voditelj rada: prof. dr. sc. Silvija Čuković-Čavka

*Zahvala: Zahvaljujem svojoj mentorici profesorici Silviji Čuković-Čavki koja mi je svojim iskustvom, znanjem i savjetima omogućila uspješan završetak ove disertacije. Također zahvaljujem doktorici Sanji Kapitanović na velikoj pomoći u laboratorijskoj analizi uzoraka i interpretaciji rezultata, profesoru Milanu Miloševiću na pomoći u statističkoj analizi te svim kolegicama i kolegama sa Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju koji su pomogli u ovom istraživanju.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 Upalne bolesti crijeva i PSC	1
1.2 Epidemiologija upalnih bolesti crijeva	2
1.3 Epidemiologija primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa	3
1.4 Patogeneza upalnih bolesti crijeva	4
1.4.1 Genski čimbenici	4
1.4.2 Okolišni čimbenici	7
1.4.3 Crijevna mikrobiota	8
1.4.4 Intestinalni imunوسي sustav	9
1.5 Patogeneza primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa	11
1.5.1 Genski čimbenici	11
1.5.2 Imunosni čimbenici	12
1.5.3 Disbioza i teorija toksične žuči	13
1.6 Dijagnostika i praćenje upalnih bolesti crijeva	16
1.6.1 Postavljanje dijagnoze upalne bolesti crijeva	16
1.6.2 Praćenje upalne bolesti crijeva	19
1.7 Dijagnostika i praćenje primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa	24
1.7.1 Postavljanje dijagnoze PSC-a	24
1.7.2 Praćenje PSC-a	26
1.8 Liječenje upalnih bolesti crijeva	27
1.8.1 Konvencionalna terapija	27
1.8.2 Biološka terapija i male molekule	28
1.9 Liječenje primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa	30
1.10 MikroRNA	31
1.10.1 MikroRNA u kliničkoj medicini i upalnim bolestima crijeva	31
1.10.2 MikroRNA 124, polimorfizam rs531564 i upalne bolesti crijeva	34
1.10.3 MikroRNA u bolesnika s upalnim bolestima crijeva i primarnim sklerozirajućim kolangitisom	38
<b>2. HIPOTEZA</b>	<b>41</b>
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>42</b>
<b>4. ISPITANICI I METODE</b>	<b>43</b>
4.1 Ispitanici	43
4.2 Metode	43
4.2.1 Klinički podaci	43
4.2.2 Izolacija DNA-a iz pune krvi	44
4.2.3 Određivanje koncentracije DNA-a	45
4.2.4 Real-time PCR analiza SNP-a	46
4.2.5 Statističke metode	46
<b>5. REZULTATI</b>	<b>47</b>
5.1 Klinički i sociodemografski pokazatelji ispitanika	47

5.1.1 Zastupljenost dijagnoza na cjelokupnom uzorku .....	47
5.1.2 Opisna statistika kategorijskih sociodemografskih i kliničkih varijabli na cjelokupnom uzorku .....	48
5.1.3 Opisna statistika ispitivanih kontinuiranih kliničkih i sociodemografskih karakteristika na cjelokupnom uzorku.....	48
5.1.4 Usporedba kliničkih pokazatelja i ishoda liječenja među skupinama ispitanika .....	49
<b>5.2 Učestalost genotipa SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 u ispitivanim skupinama .....</b>	<b>50</b>
5.2.1 Zastupljenost polimorfizama gena rs531564 miR-124 na cjelokupnom uzorku .....	50
5.2.2 Zastupljenost polimorfizama gena rs531564 miR-124 prema ispitivanim skupinama .....	51
<b>5.3 Povezanost SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 s kliničkim karakteristikama bolesnika s upalnom bolešću crijeva.....</b>	<b>53</b>
5.3.1 Povezanost SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 s kliničkim karakteristikama bolesnika s Crohnovom bolešću .....	53
5.3.2 Povezanost SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 s kliničkim karakteristikama bolesnika s ulceroznim kolitisom .....	55
<b>5.4 Povezanost SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 s kliničkim karakteristikama bolesnika s primarnim sklerozirajućim kolitisom.....</b>	<b>57</b>
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>59</b>
<b>7. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>64</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>65</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>66</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>67</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>78</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

- AE2 – protein za izmjenu aniona 2 (engl. *anion exchange protein 2*)
- ALP – alkalna fosfataza (engl. *alkaline phosphatase*)
- ANCA – antineutrofilna citoplazmatska antitijela (engl. *antineutrophil cytoplasmic antibodies*)
- APC – stanice koje predočuju antigen (engl. *antigen-presenting cells*)
- CAM – celularne adhezijske molekule (engl. *cellular adhesion molecules*)
- CB – Crohnova bolest (engl. *Crohn's disease*)
- CCL25 – kemokinski ligand 25 (engl. *chemokine ligand 25*)
- CDAI – indeks aktivnosti Crohnove bolesti (engl. *Crohn's Disease Activity Index*)
- CDEIS – endoskopski indeks težine Crohnove bolesti (engl. *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity*)
- CRP – C-reaktivni protein (engl. *C-reactive protein*)
- DHFR – inhibitor dihidrofolat reduktaze (engl. *dihydrofolate reductase inhibitor*)
- EASL – Europska udruga za proučavanje jetre (engl. *European Association for the Study of the Liver*)
- EGDS – ezofagogastroduodenoskopija (engl. *esophagogastroduodenoscopy*)
- EIM – ekstraintestinalne manifestacije (engl. *extraintestinal manifestations*)
- ERCP – endoskopska retrogradna kolangiopankreatografija (engl. *endoscopic retrograde cholangiopancreatography*)
- ESR – sedimentacija eritrocita (engl. *erythrocyte sedimentation rate*)
- GWAS – studije cijelog genoma (engl. *genome-wide association studies*)
- HR – omjer ugroženosti (engl. *hazard ratio*)
- HBI – Harvey-Bradshawov indeks (engl. *Harvey-Bradshaw index*)
- InsP3R3 – receptor inozitol-1,4,5-trifosfata (engl. *inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*)
- JAK – Janusove kinaze (engl. *Janus kinases*)
- KRK – kolorektalni karcinom (engl. *colorectal cancer*)
- LSM – mjerenje krutosti jetre (engl. *liver stiffness measure*)
- MAMP – molekularni uzorci povezani s mikroorganizmima (engl. *microbe-associated molecular patterns*)
- MES – Mayo endoskopski zbroj (engl. *Mayo endoscopic score*)
- MCP-1/CCL2 – protein koji privlači monocite 1 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*)
- miR – mikroRNA (engl. *microRNA*)
- MPO – mijeloperoksidaza (engl. *myeloperoxidase*)
- MR – magnetska rezonancija (engl. *magnetic resonance*)
- MRCP – magnetska rezonancija kolangiopankreatografija (engl. *magnetic resonance cholangiopancreatography*)
- mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger RNA*)
- MSCT – višeslojna kompjutorizirana tomografija (engl. *multislice computed tomography*)
- OR – omjer šansi (engl. *odds ratio*)
- PKM – piruvat kinaza mišića (engl. *pyruvate kinase muscle*)
- pri-miR – primarna mikroRNA (engl. *primary microRNA*)
- PSC – primarni sklerozirajući kolangitis (engl. *primary sclerosing cholangitis*)
- PTB 1 – protein koji veže polipirimidinski slijed 1 (engl. *polypyrimidine tract-binding protein 1*)
- RR – relativni rizik (engl. *relative risk*)

- SE – sedimentacija eritrocita (engl. *sedimentation rate*)
- SES-CD – jednostavni endoskopski zbroj za Crohnovu bolest (engl. *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*)
- SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)
- SPHK1 – sfingozin kinaza 1 (engl. *sphingosine kinase 1*)
- SPL – sfingozin 1-fosfat liaza (engl. *sphingosine-1-phosphate lyase*)
- STAT3 – signalni prijenosnik i aktivator transkripcije 3 (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*)
- STRIDE – odabir terapijskih ciljeva u upalnim bolestima crijeva (engl. *Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease*)
- S1P – receptor sfingozin 1-fosfata (engl. *sphingosine-1-phosphate receptor*)
- UBC – upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*)
- UCEIS – endoskopski indeks težine ulceroznog kolitisa (engl. *Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity*)
- UDCA – ursodeoksikolna kiselina (engl. *ursodeoxycholic acid*)
- UK – ulcerozni kolitis (engl. *ulcerative colitis*)
- ULN – gornja granica normale (engl. *upper limit of normal*)
- 5-ASA – mesalazin (engl. *mesalamine*)
- 6-TG – 6-tiogvanin nukleotid (engl. *6-thioguanine nucleotide*)



# 1. UVOD

## 1.1 Upalne bolesti crijeva i PSC

Upalne bolesti crijeva (UBC, engl. *inflammatory bowel disease*) kronične su, imunosno posredovane bolesti nepoznate etiologije koje zahvaćaju probavni sustav.

Obuhvaćaju dvije osnovne bolesti, ulcerozni kolitis (UK) i Crohnovu bolest (CB)<sup>[1]</sup>, koje imaju specifične kliničke i patohistološke karakteristike kao, i specifičan tijek.

Riječ je o neizlječivim bolestima koje karakteriziraju periodi remisije i relapsa te brojne opisane izvancrijevne manifestacije (EIM, engl. *extraintestinal manifestations*).<sup>[2]</sup> S obzirom na prevalenciju i incidenciju bolesti, kao i na sve veću dostupnost naprednih oblika liječenja, Upalne bolesti crijeva predstavljaju velik javnozdravstveni i socioekonomski problem.<sup>[3]</sup>

Još je jedna od važnih karakteristika UK-a i CB-a konkomitantna pojava drugih bolesti, od kojih posebno mjesto po važnosti zauzima primarni sklerozirajući kolangitis (PSC, engl. *primary sclerosing cholangitis*). Riječ je o kroničnoj kolestatskoj bolesti jetre i žučnih vodova, progresivnog karaktera, koja često vodi do zatajivanja jetre i potrebe za transplantacijom. Bolest karakteriziraju progresivna upala, fibroza te strikture intrahepatičkih i ekstrahepatičkih žučnih vodova.<sup>[4]</sup> U bolesnika oboljelih od PSC-a zabilježena je visoka pojavnost upalnih bolesti crijeva. Posebno je velika učestalost UK-a, koja, ovisno o studiji, varira od 25 do 90 %, dok je učestalost CB-a nešto niža i kreće se oko 20 %.<sup>[5,6]</sup> Bolesnici oboljeli od PSC-a imaju specifičan fenotip UBC-a, koji između ostalog karakterizira blaži klinički tijek i specifična ekstenzija upale u crijevu.<sup>[7]</sup> Nažalost, upravo kod skupine bolesnika koji boluju od PSC-a i UBC-a opisan je znatno povišen rizik razvoja karcinoma, primjerice kolorektalnog karcinoma, čiji desetgodišnji kumulativni rizik prema nekim procjenama iznosi i do 11 %.<sup>[8]</sup> Opisani čimbenici rizika koji bi mogli dovesti do tako povišenog rizika brojni su, poput povišene koncentracije sekundarnih žučnih soli, kronične supkliničke upale, genskih čimbenika itd.<sup>[9,10]</sup> Unatoč opisanim mehanizmima u literaturi, točan uzrok povišenog rizika karcinogeneze u ovih bolesnika ostaje nejasan, kao i optimalan način njihova nadzora i liječenja, te su potrebna daljnja istraživanja koja bi nam dala odgovore na ta važna pitanja.

## 1.2 Epidemiologija upalnih bolesti crijeva

Globalna epidemiološka slika UBC-a prošla je znatne promjene zadnjih sto godina, što se posebno vidi u zemljama tzv. zapadnog stila života. Prema opisanim modelima, prevalencija i incidencija UBC-a prolaze kroz četiri razvojna stadija – pojavnost, ubrzanje u incidenciji, složena prevalencija i ekvilibrij prevalencije.<sup>[11]</sup> Studija incidencije CB-a u Cardiffu u Walesu najduža je kontinuirana epidemiološka analiza CB-a, koja prati pojavnost bolesti od njezina prvog opisa 1932. Inicijalno, incidencija je bila niska, između 0,27 i 0,09 na 100 000 osoba 1933. i 1943, ali zatim dolazi do znatnog porasta na 0,98 na 100 000 osoba 1953., 5,2 na 100 000 osoba 1973., do 9,1 na 100 000 osoba 1983. Nakon toga incidencija je stabilizirana na 6 do 7 na 100 000 osoba u periodu od 1993. do 2003.<sup>[12]</sup> Slični porasti incidencije opisani su i u drugim zemljama zapadnog stila života poput Danske ili Islanda, gdje je u istom periodu incidencija rasla između 4 i 5 % godišnje.<sup>[13,14]</sup> Sustavnim pregledom literature koji su proveli Ng i sur. uključene su opservacijske i epidemiološke studije incidencije i prevalencije UBC-a u periodu od 1990. do 2015. Prema rezultatima ove skupine autora, 72,7 % studija CB-a i 83,3 % studija UK-a provedenih u zemljama Sjeverne Amerike i Europe pokazuje stabilizaciju ili čak smanjenje incidencije UBC-a u navedenom periodu, što govori u prilog tome da se zemlje zapadnog stila života približavaju fazi tzv. „složene prevalencije”. Zabrinjavaju epidemiološki trendovi u novoundustrijaliziranim zemljama poput Brazila, u kojima se bilježe dramatični godišnji porasti prevalencije (+11,1 % (95 % CI: 4,8 – 17,8) za CB i +14,9 % (95 % CI: 10,4 – 19,6) za UK).<sup>[15]</sup> Također, zabrinjavajući su podaci pedijatrijskih studija. Primjerice, nedavno je publiciran sustavni pregled i metaanaliza literature grupe autora Roberts i sur. U analizu su uključeni podaci iz ukupno 51 europske države, uključujući podatke za CB i UK. Rezultati pokazuju da su i incidencija i prevalencija UBC-a u pedijatrijskoj dobi u znatnom porastu u svim europskim zemljama kroz zadnjih 50 godina, što je posebno izraženo za zemlje sjeverne Europe, najviše u Skandinaviji.<sup>[16]</sup>

Ako pogledamo trenutačnu epidemiološku situaciju u zemljama Europe, prosječno 0,2 % populacije boluje od UBC-a, što znači oko 1,3 milijuna ljudi. Najnoviji podaci ukazuju da se incidencija za CB kreće od 0,4 do 2,8 na 100 000 osoba godišnje, uz nešto višu incidenciju za UK, koja se kreće od 2,4 do 44 na 100 000 osoba godišnje. Vrhunac je incidencije za obje bolesti u dobi od 20 do 40 godina, dok podaci ukazuju da je za UK ta dob oko 5 do 10 godina kasnije u odnosu na CB. Podaci o eventualnoj bimodalnoj distribuciji, tj. ponovnom porastu incidencije u starijoj životnoj dobi su nekonzistentni. Kad je riječ o spolnoj raspodjeli, rizik za

UK uglavnom je jednak za muškarce i žene do dobi od 45 godina, kada rizik za muškarce postaje nešto viši. Kad je riječ o CB-u, osobe ženskog spola imaju niži rizik u dječjoj dobi (u dobi od 10 do 14 godina), ali viši rizik nakon adolescencije (u dobi od 25 do 29 i nakon 35. godine života) u odnosu na muški spol.<sup>[17,18]</sup>

### **1.3 Epidemiologija primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa**

PSC je rijetka bolest jetre za koju se procjenjuje da zahvaća od 0,006 do 0,016 % svjetske populacije.<sup>[19]</sup> Epidemiološka istraživanja PSC-a naglašavaju raznolikost u distribuciji bolesti širom svijeta. Iako je PSC dijagnosticiran u svim dijelovima svijeta, zapaženo je da se češće javlja u određenim regijama. Na primjer, podaci ukazuju na višu incidenciju PSC-a među populacijama europskog podrijetla u usporedbi s drugim etničkim skupinama. Također, opažena je viša učestalost u sjevernijima u odnosu na južne regije. Primjerice, u Sjevernoj Americi, procijenjena incidencija za muškarce iznosila je 1,25 na 100 000 osoba godišnje, a za žene 0,68 na 100 000 osoba godišnje, uz ukupnu prevalenciju od 5,58 na 100 000 osoba godišnje.<sup>[20]</sup> S druge strane, zemlje jugoistočne Azije, primjerice Singapur, imaju verificiranih ukupno samo 10 slučajeva u periodu praćenja od 10 godina.<sup>[21]</sup> PSC se može javiti u bilo kojoj životnoj dobi, uključujući dječju dob, ali ipak je najučestaliji između 30. i 60. godine života. Dodatno, nešto se češće javlja u osoba muškog spola u odnosu na ženski.<sup>[19]</sup>

Epidemiološki, postoji znatna povezanost UBC-a i PSC-a. Prema epidemiološkim podacima područja Sjeverne Amerike, utvrđeno je da 73 % bolesnika oboljelih od PSC-a boluje i od UBC-a.<sup>[20]</sup> Slični podaci dolaze iz velike multicentrične retrospektivne studije u koju je uključeno ukupno 37 centara u Europi, Sjevernoj Americi i Australiji kroz period praćenja od 30 godina. Analiza je provedena na 7121 bolesniku, od kojih je 70 % razvilo UBC kroz period praćenja.<sup>[22]</sup> Barberio i sur. proveli su metaanalizu i veliki sustavni pregled literature kojim su uključene 64 studije, obuhvaćajući ukupno 776 700 bolesnika. Podaci te studije pokazuju da prevalencija PSC-a u bolesnika s UBC-om iznosi 2,16 % uz najvišu zabilježenu od 3,83 % u Južnoj Americi te najnižu u jugoistočnoj Aziji od 0,60 %. Zanimljivo, ako se uzme u obzir prevalencija PSC-a malih vodova u bolesnika s UBC-om, onda iznosi 19,7 %. Ako se pogledaju rezultati specifično za fenotip UBC-a, pokazano je da prevalencija UK-a iznosi 2,47 %, dok je prevalencija CB-a niža i iznosi 0,96 %. Čini se da i ekstenzija same upalne

bolesti crijeva igra ulogu u prevalenciji PSC-a, pa tako bolesnici s UK-om s ekstenzivnom bolešću imaju višu prevalenciju u odnosu na ograničenu ljevostranu bolest ili proktitis. Kod bolesnika s CB-om zabilježena je viša prevalencija u koloničkoj i ileokoloničkoj formi bolesti u odnosu na ostale fenotipe. Dodatno, pokazana je muška predominacija u prevalenciji uz OR 1,15 (95 % CI: 0,76 – 1,76).<sup>[23]</sup>

## **1.4 Patogeneza upalnih bolesti crijeva**

Točna etiologija i patogeneza UBC-a nije poznata, a u tijeku su brojna istraživanja u tom području. Vjeruje se da je patogeneza ovih bolesti rezultat kompleksne interakcije genskih, imunskih, mikrobioloških i okolišnih čimbenika.

### *1.4.1 Genski čimbenici*

Jasno je da genska predispozicija ima važnu ulogu u patogenezi UBC-a. Relativni je rizik među članovima obitelji oboljelih od UBC-a u prvom koljenu za 8 do 10 viši u odnosu na opću populaciju. Pozitivna obiteljska anamneza smatra se najizraženijim rizičnim čimbenikom za razvoj UBC-a. Od 12 do 20 % bolesnika ima oboljelog člana obitelji. Istraživanja na populaciji bijele rase pokazala su da je rizik obolijevanja od CB-a osam puta viši među članovima obitelji u prvom koljenu, dok je rizik obolijevanja od UC-a viši četiri puta. Ako se pogleda iz perspektive prevalencije, podaci pokazuju da iznosi 5 % za CB i 3 % za UC među članovima obitelji u prvom koljenu. Rizik je znatno viši ako oba roditelja boluju od UBC-a i tada iznosi od 16 do 30 %.<sup>[24–26]</sup> Zanimljivo, među jednojajčanim blizancima konkordancija za CB iznosila je do 67 %, dok je za UC varirala između 13 i 20 %.<sup>[27]</sup>

Međutim, sama nasljednost i genska predispozicija za CB i UC ne može se objasniti isključivo mendelijanskim modelom. Iz dostupne je literature jasno da u patogenezi UBC-a sudjeluju brojni geni koji utječu na razne aspekte bolesti. Jasan primjer utjecaja više gena dolazi iz velike genomske studije koju su proveli Jostins i sur. Riječ je o metaanalizi genomske studije CB-a i UC-a u kojoj je u konačnu analizu uključeno više od 75 000 slučajeva i kontrola. Autori su identificirali ukupno 163 lokusa povezana s UBC-om. Ako se pogleda detaljnije, 110/163 lokusa povezano je s obje bolesti, dok je 30 specifično za CB, a 23 za UC. Zanimljivo, ukupno 70 % lokusa (113/163) preklapa se s drugim imunski posredovanim bolestima poput ankilozantnog spondilitisa i psorijaze.<sup>[28]</sup> Ono na što genomske studije konzistentno ukazuju jest povezanost same genske sklonosti i interakcije domaćina s mikrobima, tj. mikrobiomom.

Iz tog aspekta povijesnu važnost ima otkriće gena NOD2 (engl. *Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2*) koji je također opisan pod nazivom CARD15 (engl. *Caspase-Recruitment Domain 15*). Homozigoti za mutirani alel ovog gena imaju OR (omjer šansi) 17,1 (95 % CI: 10,7 – 27,2) za razvoj CB-a, dok heterozigoti imaju OR 2,5 (95 % CI: 2,0 – 2,9), a smatra se da od 20 do 30 % bolesnika nosi mutirani gen. Genski polimorfizmi NOD2/CARD15 povezani su s ranijom dobi obolijevanja, ilealnom lokalizacijom bolesti i većim rizikom za razvoj striktura.<sup>[29,30]</sup> Otkriće gena NOD2/CARD15 nema samo povijesnu važnost, već i jasno ukazuje na jedan od potencijalnih patogenetskih mehanizama UBC-a. Njegove mutacije jasno narušavaju urođenu imunost i antibakterijski odgovor na oralno unesene patogene, poput smanjene produkcije  $\beta$ -defenzina i smanjene aktivacije (NF)- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor - $\kappa$ B*).<sup>[31]</sup>

Jasno, osim puta *NOD2*, opisani su i brojni drugi genski putovi koji dovode do razvoja UBC-a. Ako pogledamo specifično za CB, jasno je opisan put IL-23 koji je važan za imunosti odgovor na razne mikrobne signale. Opisane su mutacije gena za receptor IL-23 koje su u rjeđim slučajevima protektivne, a u mnogo češćima SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*) povisuje rizik za CB, ali i UC.<sup>[32]</sup> IL-23R se nalazi na kromosomu 1p31 i kodira podjedinicu proinflatornog citokina IL-23R. Varijante IL-23R povezane su sa zaštitom protiv upalnih bolesti crijeva (UC), vjerojatno zbog gubitka funkcije samog receptora ili barem kroz posredno oštećenje funkcije stanica. Također, IL-23 kao ligand IL-23R ima ključnu ulogu u patogenezi crijevne upale: IL-23 i njegov blisko povezani citokin IL-12 sa zajedničkom podjedinicom p40 postali su atraktivne mete za neutralizirajuća antitijela u liječenju UBC-a. Ipak, glavni protuupalni učinak postiže se blokiranjem IL-23 ili, specifičnije, njegove podjedinice p19 (umjesto p40), što je dovelo do razvoja selektivnijih IL-23 antitijela kao što su guselkumab, risankizumab, mirikizumab i brazikumab.<sup>[33–35]</sup>

Osim osi IL-23/17, genetika UBC-a također naglašava važnost specijaliziranih mreža citokina prilagođenih za imunitet u barijernim tkivima, kao što je obitelj citokina IL-1. IL-1b prvenstveno proizvode fagociti kao odgovor na molekularne uzorke povezane s mikroorganizmima (engl. *microbe-associated molecular patterns* – MAMPs) koji induciraju transkripciju IL-1b mRNA, dok inflammasomi potiču proteolitičku aktivaciju IL-1b i formiranje gasderminskih pora, omogućujući nekonvencionalno izlučivanje aktivnog citokina i induciranje piroptoze. Kod pacijenata s UBC-om koji imaju varijante gubitka funkcije IL-10RA, višak IL-1b koji proizvode makrofagi dovodi do prekomjerne upale, a liječenje antagonistom IL-1R, anakinrom, ublažava simptome kod osoba koje su prethodno bile refraktorne na terapiju.<sup>[36,37]</sup>

U patogenezu CB-a također su direktno implicirane mutacije gena za regulaciju autofagije, procesa iznimno važnog za homeostazu stanice i eliminaciju nepotrebnih proteina. Primjerice, SNP gena ATG16L1 (engl. *autophagy-related 16-like 1*) koji je eksprimiran na intestinalnim epitelnim stanicama i određenim tipovima T-limfocita nosi protektivne čimbenike za razvoj CB-a. Sličan učinak nije primijećen kod bolesnika oboljelih od UK-a.<sup>[32]</sup>

Kod UBC-a, klasični HLA geni imaju najjaču povezanost s razvojem bolesti. Ti se geni dijele u dvije skupine: 1. skupina – regija gena razreda I s HLA obilježjima A, B i C, te 2. skupina – geni razreda II s HLA obilježjima DR, DQ i DP. Najdosljednija povezanost HLA alela razreda II u UBC-a vidi se kod HLA-DRB1 i HLA-DQB1. DRB1 je najviše proučavan gen i nosi najveći rizik među svim HLA genima u UBC-u. HLA-DRB10103 je snažno povezan s obje bolesti, UK-om i CB-om. Ipak, smatra se rijetkim alelom s učestalošću manjom od 2 % u europskoj populaciji. Ova varijanta pokazuje posebno snažnu povezanost kod pacijenata s teškim ekstenzivnim UK-om i kod onih s koloničnim CB-om. Daljnje povezanosti uočene su s HLA-DRB11502 u UK-u, posebno u japanskoj populaciji, s visokom prevalencijom od oko 20 %. U CB-u najkonzistentnije su povezanosti pronađene s HLA-DRB107, posebno kod ilealne bolesti, te s HLA-DRB104, pretežno u japanskoj populaciji. Općenito, utjecaj HLA gena veći je u UK-u nego u CB-u. Studija asocijacije cijelog genoma pokazala je da nošenje alela HLA-DQA1\*05 (približno 40 % europskih pojedinaca) udvostručuje rizik od imunogenosti na anti-TNF terapiju. Sveukupno, povezanost HLA alela i UBC-a je složena, uz znatnu gustoću genskih varijanti i snažnu gensku neravnotežu.<sup>[38–41]</sup>

Genetičke studije UBC-a također su identificirale regulatore različitih epitelnih funkcija. Posebno, geni koji kontroliraju integritet crijevne barijere, poput C1orf106, RNF186 i HNF4A, predstavljaju važne rizične čimbenike za UK. C1orf106 je prvi put povezan s UK-om kroz studije GWAS, a sekvenciranje egzoma naknadno je identificiralo kodirajuću varijantu povezanu s rizikom za UK. U funkcionalnim studijama, C1orf106 djeluje kao adaptor koji regulira ubikvitinaciju i degradaciju proteina citohezina, važan u procesu sinteze proteina ARF6. ARF6 ima ključnu ulogu u endocitoznom recikliranju receptora na površini stanice, uključujući proteine kadherin, koji formiraju adherentne spojeve koji fizički povezuju epitelne stanice u jednom sloju. Varijanta C1orf106 Y33F povezana je s povišenim razinama citohezina, neispravnim preoblikovanjem adherentnih spojeva i posljedičnim oštećenjem funkcije barijere, što se smatra da pridonosi kroničnoj upali crijeva izazvanoj mikrobiotom.<sup>[42,43]</sup>

#### 1.4.2 Okolišni čimbenici

Kao što je i ranije napomenuto, patogeneza UBC-a ne oslanja se isključivo na genske čimbenike. Podaci u literaturi i više nego uvjerljivo ukazuju na to da okolišni čimbenici u najmanju ruku igraju jednako važnu ulogu.

Dobro je poznata Strachanova „higijenska hipoteza”, koja govori da djeca koja odrastaju u relativno sterilnom okruženju, dakle minimalno izložena mikrobima, nemaju dovoljno adaptiran imunostni sustav na vanjske čimbenike. Stoga kasnije u životu imaju veći rizik za razvoj neadekvatnog odgovora nakon izloženosti patogenim mikroorganizmima.<sup>[44]</sup> Strachanova se hipoteza inicijalno odnosila na alergije, ali kasnije je jasno pokazano da ima uporište i u ostalim imunostno posredovanim bolestima, uključujući upalne bolesti crijeva. Brojne studije jasno pokazuju da osobe koje odrastaju u ruralnim sredinama, velikim obiteljima ili imaju kućne ljubimce imaju manji rizik za razvoj UBC-a. S druge strane, osobe koje su u prvoj godini života izložene antibioticima ili osobe koje su rano preboljele gastrointestinalnu infekciju imaju veći rizik za razvoj UBC-a.<sup>[45,46]</sup>

Važan okolišni čimbenik svakako je i pušenje, koji je ujedno jedan od najistraživanijih. Pušenje, kao rizični čimbenik, posebno se negativno reflektira na patogenezu, ali i na klinički tijek CB-a. Brojne studije konzistentno ukazuju da pušači imaju povišen rizik za razvoj CB-a, dok prestanak pušenja ima povoljan učinak na tijek bolesti. Dodatno, osobe s CB-om koje puše vjerojatnije će trebati kirurški zahvat u odnosu na one bolesnike koji ne puše. Nedavno je publicirana velika metaanaliza kliničkih studija koju su proveli Piovani i sur. u cilju ispitivanja pušenja kao rizičnog čimbenika za razvoj UBC-a prema fenotipu bolesti, ali i prema etnicitetu. U analizu je uključeno 57 studija s više od 9000 bolesnika s CB-om i 23 000 bolesnika s UC-om. Pronađen je povišen relativni rizik (RR) za razvoj CB-a među pušačima bijele rase, nežidovskog porijekla (RR 1,95, 95 % CI: 1,69 – 2,24), dok značajno povišen rizik nije pronađen u populaciji židovskog, azijskog i južnoameričkog porijekla. Protektivni učinak pušenja za razvoj UK-a pronađen je među svim uključenim populacijama (RR: 0,55, 95 % CI: 0,48 – 0,64), ali uz slabu razinu dokaza i veliku heterogenost među studijama.<sup>[47–49]</sup>

Osim pušenja, brojna su istraživanja fokusirana na ulogu prehrane u patogenezi UBC-a. Pritom se primarno misli na tzv. zapadnjačku prehranu, koja podrazumijeva prekomjeren unos masnoća, raznih aditiva, crvenog mesa i rafiniranih šećera, kao i nizak unos vlakana. Zanimljiv sustavni pregled literature i metaanalizu na tu temu publicirali su Li i sur. Cilj studije bio je analizirati utjecaj zapadnjačke prehrane prije postavljanja dijagnoze, tako da su uključivane samo studije s bolesnicima kod kojih su postojali podaci o prehrani najmanje godinu dana prije

početka bolesti. Uključeno je ukupno devet studija, tj. 1491 bolesnik s UBC-om i oko 53 000 kontrola. Rezultati pokazuju da je prethodna zapadnjačka prehrana rizični čimbenik za UBC u cjelini (RR 1,92, 95 % CI: 1,37 – 2,68), kao i zasebno za UC (RR 2,15, 95 % CI: 1,38 – 3,34), ali i CB (RR 1,72, 95 % CI: 1,01 – 2,93). U analizi podgrupa, dodatno povišen rizik pronađen je među europskom i pedijatrijskom populacijom.<sup>[50]</sup>

### 1.4.3 Crijevna mikrobiota

U moderno vrijeme diskusija o patogenezi UBC-a nije moguća bez uzimanja u obzir crijevne mikrobiote. Broj publikacija na tu temu u znatnom je porastu u zadnjem desetljeću, uz brojna odgovorena pitanja, ali i dalje brojne nepoznanice.

Iako su istraživanja u zadnje vrijeme intenzivirana, sam koncept crijevnog mikrobioma kao etiopatogenetskog čimbenika već je dugo poznat, doduše, primarno u smislu patogenih sojeva, a ne komenzalne flore. Jedna od prvih, ali i dalje aktualnih hipoteza uključuje *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) kao potencijalni uzročnik CB-a, a temelji se na njezinoj sličnosti s Johneovom bolesti koja je također kronični granulomatozni enterokolitis, ali u preživača, uzrokovan MAP-om. Dosad je provedeno jedno randomizirano, placebom kontrolirano kliničko ispitivanje terapije protiv MAP-a (klaritromicin, rifabutin, klofazimin), koje nije pokazalo učinkovitost u odnosu na placebo. Međutim, područje je i dalje aktivno te su tijekom ispitivanja koja uključuju novu formulaciju antibiotika RHB-104 i cjepiva protiv MAP-a.<sup>[51]</sup>

U dostupnoj literaturi vidljiva su brojna klinička i bazična ispitivanja, kao i ispitivanja na animalnim modelima koja jasno govore o važnosti utjecaja intestinalne mikrobiote na razvoj UBC-a. Disbioza crijevnog mikrobioma dobro je prepoznata i kao uzročnik, ali i kao posljedica aktivne upale. Opisane alteracije uključuju smanjenje općenite raznolikosti bakterija, porast sojeva bakterija poput *Fusobacterium* i *Proteobacteria*, za koje se pretpostavlja da su agresivne, te redukcija sojeva poput *Bifidobacterium* i posebno izdvojene *Faecalibacterium prausnitzii*, za koje se pretpostavlja da su protektivne.<sup>[52]</sup>

Osim crijevne disbioze, važnost mikrobiote očituje se i posredno, kao posljedica određene intervencije, odnosno terapijskog djelovanja u smislu primjene probiotika, postbiotika i sinbiotika. Uloga probiotika u prevenciji i liječenju upale ileoanalnoga zdjelice rezervoara



(engl. *pouchitis*) dobro je poznata i dio je rutinske kliničke prakse.<sup>[53]</sup> S druge strane, njihova primjena u liječenju UK-a i CB-a za sada nije dovoljno potkrijepljena dokazima. Zadnja Cochraneova metaanaliza na temu upotrebe probiotika u liječenju CB-a nije pronašla dovoljno dokaza za njihovu preporuku, a uključene studije nisu pokazale dodatnu korist. Potrebna su dodatna randomizirana klinička ispitivanja u tom području.<sup>[54]</sup>

Do sličnih zaključaka došli su Zhang i sur., autori metaanalize publicirane nešto kasnije od ranije spomenutog članka. Pronađena je blaga korist od liječenja probioticima i sinbioticima u skupini bolesnika s UK-om, dok za CB nije bilo znatne razlike. Heterogenost među studijama je i dalje znatna, kao i među primijenjenim sojevima bakterija i njihovom brojnosti, iako su najvažniji dokazi za sada među sojevima *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*.<sup>[55]</sup>

Kao potencijalna terapijska opcija u ovom području razmatrana je i fekalna transplantacija, ali dosad klinička ispitivanja nisu dala definitivni odgovor o njezinoj koristi. Nedavno publicirana Cochraneova metaanaliza uključila je ukupno 550 bolesnika u 12 dostupnih studija. Studije su karakterizirane raznolikim načinom provedbe same transplantacije, kao i heterogenim populacijama. Dokazi o koristi za indukciju i održavanje remisije CB-a i UK-a vrlo su nesigurni i preporučena su daljnja istraživanja.<sup>[56]</sup>

#### 1.4.4 Intestinalni imunosni sustav

Ako uzmemo u obzir broj bakterija i mikroorganizama koji kontinuirano nastanjuju naš probavni sustav, kao i broj i raznolikost tvari koje u njega svakodnevno unosimo, iznimno je zanimljivo da sluznica crijeva nije kontinuirano inflamirana. Doduše, u zdravoj sluznici crijeva prisutna je kontinuirana, ali blaga fiziološka razina upale koja u biti oslikava stanje pripremljenosti za eventualni odgovor na dodir s patološkim mikroorganizmom.<sup>[57]</sup> U održavanju intestinalnoga imunosnog sustava sudjeluje više čimbenika, uključujući epitelnu barijeru, stanice koje predočuju antigen (APC) i imunoregulatorne stanice, kao i proupalne i protoupalne citokine te adhezijske molekule. U bolesnika s UBC-om narušena je homeostaza tog kompleksnog sustava, što dovodi do poticanja i održavanja patološke upale na razini sluznice.

Gastrointestinalni epitel u biti je najveća površina ljudskog organizma koja je u kontaktu s vanjskim svijetom. Riječ je o selektivnoj barijeri, koja transcelularnim i paracelularnim mehanizmima regulira unos, tj. transport. Sami kolonociti dodatno mogu imati funkciju APC-

a jer eksprimiraju MHC (engl. *Major Histocompatibility Complex*) molekule razreda II, kao i receptore za brojne citokine, što dodatno govori o njihovoj važnosti u regulaciji upalnog odgovora.<sup>[57]</sup>

Kad je riječ o samoj fizičkoj barijeri, podaci u literaturi jasno opisuju tanji sloj sluzi vezane uz sluznicu kolona bolesnika s UC-om u odnosu na zdrave bolesnike. Dodatno, postoje dokazi o štetnom djelovanju emulgatora na debljinu sluzi, što je još jedan mehanizam kojim procesuirana hrana može narušiti epitelnu barijeru i dovesti do povećane permeabilnosti.<sup>[58,59]</sup>

U održavanju integriteta epitelne barijere jasno sudjeluju u brojni geni, pa su prema publiciranim studijama GWAS (engl. *Genome-Wide Association Studies*) detektirani polimorfizmi u genima koji kodiraju junkcijske proteine kao što su E-kadherin, protein  $\alpha 12$  koji veže gvanin-nukleotid i drugi.<sup>[60]</sup>

Kritična je točka u započinjanju i održavanju upale u patogenezi UBC-a interakcija između APC-a i izvršnih T-limfocita. Riječ je o kompleksnoj interakciji koja uključuje izvršne i regulatorne T-limfocite, APC te brojne citokine. Ovisno u uključenim citokinima, imunosni proces bit će usmjeren prema štetnoj, tj. patološkoj upali ili će biti atenuiran. Primjerice, prisutnost IL-23, TGF- $\beta$  i IL-6 pospješuje diferencijaciju naivnih T-limfocita u patogene Th17 stanice. Također, dobro je opisana i uloga TNF- $\alpha$  u formiranju granuloma, ali i u aktivaciji neutrofila te poticanju ekspresije adhezijskih molekula na endotelu intestinalne vaskulature.<sup>[61,62]</sup>

Same adhezijske molekule nalaze se na površini leukocita dok su njihovi ligandi na endotelu venula. Njihova se interakcija odvija kroz nekoliko koraka u kojima sudjeluju kemokini, poput IL-8, ali i leukocitni integrini, kao i celularne adhezijske molekule (CAM) na površini endotela. U patogenezi UBC-a posebnu važnost imaju integrini  $\alpha 4\beta 7$  i  $\alpha E\beta 7$  jer je njihov ligand specifičan za crijevo – mukozni adresin CAM ili MAdCAM-1. Otkriće te crijevne specifičnosti bilo je jedan od temelja koji je doveo do razvoja antitijela za integrine  $\alpha 4\beta 7$  (vedolizumab) i  $\alpha E\beta 7$  (etrolizumab).<sup>[63]</sup>

## 1.5 Patogeneza primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa

Patogeneza PSC-a za sada je nepoznata i teško objašnjiva, kao i njegova etiologija. Razvijene su brojne teorije i modeli koji jasno imaju uporište u znanstvenoj literaturi i ono što je sigurno jest da važnu ulogu igraju genski, okolišni i imunosni čimbenici. Primarni sklerozirajući kolangitis prema svojem kliničkom tijeku i izostanku odgovora na imunosupresivnu terapiju ne može biti karakteriziran kao autoimuna bolest, ali svakako je imunosno posredovana bolest. U nastavku teksta detaljnije su opisani pojedini patogenetski čimbenici, kao i njihova povezanost s PSC-om.

### 1.5.1 Genski čimbenici

Važnost genskih čimbenika u patogenezi PSC-a dobro je oslikana u rezultatima analize švedske kohorte bolesnika. Bergquist i sur. uključili su ukupno 678 bolesnika s PSC-om iz nacionalne baze podataka i 6347 usklađenih kontrola bez dijagnoze PSC-a. Pronađen je statistički značajan, povišen omjer ugroženosti (engl. *hazard ratio* – HR) za djecu (HR 11,5 95 % CI: 1,6 – 84,4), braću/sestre (HR 11,1 95 % CI: 3,3 – 37,8) i roditelje (HR 2,3 95 % CI: 0,9 – 6,1). Dodatno je opisan i značajno povišen HR za razvoj UBC-a, što govori u prilog zajedničke genske osnove ovih dviju bolesti.<sup>[64]</sup>

Ciljane genetičke analize i studije GWAS predominantno ukazuju na HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*) kompleks na 6. kromosomu, uz povišen OR za PSC između 3. i 5. Iako postoje određena preklapanja s UBC-om, određeni haplotipovi ipak su specifični za PSC ili PSC/UC fenotip poput HLA-B8 i HLA-DR3. Također, identificirani su HLA haplotipovi koji nose povišen rizik za razvoj PSC-a, ali i oni koji nose protektivno djelovanje. U svakom slučaju, daljnja su istraživanja u ovom području u tijeku.<sup>[65]</sup>

Osim HLA-a, ukupno su identificirana još najmanje 22 gena koji imaju određenu povezanost s razvojem PSC-a. Polovina tih gena povezana je i s razvojem UBC-a, ali i s drugim klasičnim autoimunim bolestima poput reumatoidnog artritisa.<sup>[65]</sup>

Vrlo su oskudni podaci o povezanosti genskih čimbenika i kliničkog tijeka bolesti. Studija cijelog genoma provedena na velikom broj od 3402 bolesnika nije pronašla značajnu povezanost HLA haplotipa s klinički značajnim događajima. Međutim, pronađena je značajna povezanost varijanti gena rs853974 na 6. kromosomu na način da su homozigoti za AA alele imali desetogodišnje preživljenje bez transplantacije od 50,9 % (95 % CI: 41,5 – 59,5), dok je za homozigote za GG alele iznosilo 72,8 % (95 % CI: 69,6 – 75,7). Nositelji AA alela imali su

za 2,14 povišen relativni rizik za potrebu za transplantacijom jetre ili smrt uzrokovanu PSC-om u odnosu na GG homozigote.<sup>[66]</sup>

Ako je PSC doista bolest posredovana HLA sustavom, nije poznato koji antigeni stimuliraju imunosni odgovor. S obzirom na povezanost s UBC-om postoji hipoteza da je možda riječ o zajedničkom antigenskom „okidaču”, ali i mogućnosti da se T-limfociti primarno aktiviraju u crijevu, a zatim migriraju u jetru, gdje potiču patološki imunosni odgovor.<sup>[67]</sup>

### 1.5.2 Imunosni čimbenici

Za oboljele od PSC-a karakteristična je infiltracija makrofaga u sinusoidalne i perisinusoidalne prostore te se smatra da oni imaju važnu ulogu u daljnjoj patogenezi. U usporedbi sa zdravim osobama, oboljeli od PSC-a imaju znatno više CD68 i mijeloperoksidaza (MPO) pozitivnih stanica u portalnim prostorima.<sup>[68]</sup>

Velik je broj istraživanja posvećen ispitivanju migracije limfocita, njezinu mehanizmu i sličnostima između jetre i crijeva u tom pogledu. Brojni dokazi ukazuju da su adhezijske molekule i citokini uobičajeno isključivo eksprimirani u crijevu, u bolesnika s PSC-om eksprimirani i u jetri, što dovodi do migracije originalno intestinalnih limfocita. Opisana je značajna ekspresija adhezijske molekule MAdCAM i kemokinskog liganda 25 u portalnoj veni i endotelu sinusoida. U skladu s time, Grant i sur. postavili su hipotezu da je PSC posredovan memorijskim T-stanicama koje su se prvotno aktivirale u crijevima i migrirale u jetru radi patološke upalne ekspresije adhezijskih molekula i kemokina koji su obično ograničeni na crijeva. Takvi limfociti aktivirani antigenima koji su ušli u jetru putem portalne vene uzrokuju pretjeran upalni odgovor koji potencijalno prerasta u kroničnu upalu.<sup>[69]</sup>

Od opisanih kemokina, svakako treba istaknuti kemokinski ligand 25 (CCL25). Interakcija CCL25 sa svojim kemokinskim receptorom 9 (CCR9) dovodi do aktivacije  $\alpha 4\beta 7$  integrina i omogućava adheziju limfocita na MAdCAM-1. Analiza ekspresije CCL25 i CCR9 u različitim bolestima jetre ukazuje da je CCL25 imunoreaktivnost, uglavnom detektirana na sinusnom endotelu u područjima *interface* hepatitisa, bila visokospecifična za PSC jer nije bila prisutna u PBC-u i drugim upalnim bolestima jetre. CCR9 je detektiran na 20 % limfocita infiltrata u jetri u bolesnika oboljelih od PSC-a gdje je često bio koeksprimiran s  $\alpha 4\beta 7$ , dok je manje od 2 % limfocitnih infiltrata jetre bilo CCR9 pozitivno u drugim bolestima. Navedena istraživanja ukazuju da je opisana interakcija kemokina i adhezijskih molekula specifična za patogenezu

PSC-a u odnosu na druge bolesti jetre, no za definitivni zaključak potrebna su daljnja istraživanja.<sup>[70]</sup>

Od ostalih kemokina, u kontekstu patogeneze PSC-a opisani su još CCL21 i CCL28, koji također sudjeluju u aktivaciji puta  $\alpha 4\beta 7/\text{MAdCAM-1}$ , ali nisu izraženo specifični za PSC, već su opisani i u drugim autoimunim bolestima jetre. Njihova ekspresija detektirana je na portalnom endotelu, oštećenim žučnim vodovima i nakupinama limfocita specifičnima za PSC i PBC. Smatra se da imaju dodatnu ulogu u regrutaciji naivnih T-limfocita, potiču njihovu adheziju putem adhezijskih molekula i sudjeluju u formiranju limfocitnih nakupina u jetrenom parenhimu.<sup>[71]</sup>

### 1.5.3 Disbioza i teorija toksične žuči

Primjenom tehnologija sekvencioniranja uspješno je opisan sastav crijevne mikrobiote kod oboljelih od PSC-a. U usporedbi sa zdravim pojedincima, mikrobiota je izmijenjena, s ukupnim smanjenjem bakterijske raznolikosti i promijenjenom učestalošću određenih bakterija. Dosadašnja istraživanja sugeriraju da je crijevna mikrobiota bolesnika s PSC-om različita od mikrobiote bolesnika s UBC-om. Štoviše, pacijenti s PSC-om koji imaju UBC često imaju mikrobiotu koja je sličnija pacijentima s PSC-om bez UBC-a nego onima samo s UBC-om. Osim crijevne mikrobiote, mikrobiota žučnih putova također može biti promijenjena kod PSC-a. Za sada nije utvrđena jasna uzročno-posljedična veza ovih promjena mikrobiote sa samim tijekom bolesti te nije jasno kojim bi mehanizmom takve promjene u sastavu mogle biti patogene. Izneseno je nekoliko hipoteza koje opisuju moguću povezanost. Temeljene su uglavnom na narušenoj permeabilnosti crijeva kao posljedici crijevne disbioze, čime je omogućena translokacija mikroba i njihovih produkata. Receptori jetrenih stanica prepoznaju te produkte koji dovode do početka upalnih kaskada te posljedične fibroze i ciroze.<sup>[72]</sup> Primjerice, Nakamoto i sur. pokazali su na mišjem modelu kako *Klebsiella pneumoniae* mijenja epitelnu barijeru kod bolesnika s PSC-om i stoga dovodi do bakterijske translokacije. Jetrene Th-17 stanice koje potiču imunosni odgovor dovodeći do oštećenja jetre povezane su s tom permeabilnošću. Slična interakcija, također na animalnom modelu, opisana je za translokaciju bakterije *Lactobacillus gasseri*, što dovodi do produkcije IL-17, posljedične aktivacije jetrenih T-limfocita i također daljnje fibroze.<sup>[73,74]</sup>

Potencijalni patogenetski mehanizmi nisu ograničeni samo na alteracije u crijevnoj mikrobioti, već i na njezine produkte. Tu se primarno misli na učinke dekonjugiranih žučnih soli koje

izbjegnu reapsorpciju u terminalnom ileumu (tj. enterohepatičku cirkulaciju) te dolaze u kolon. Dekonjugacija žučnih kiselina posredovana je hidrolazom žučnih soli koja je rasprostranjena među sojevima *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Actinobacteria*. Otprilike 5 % neapsorbiranih žučnih kiselina ulazi u distalni ileum i debelo crijevo, gdje ih crijevna mikrobiota kemijski modificira. Prevladavajuće su sekundarne žučne kiseline litokolna kiselina (LCA) i deoksikolna kiselina (DCA), ali u ljudskom fecesu može se detektirati više od 50 različitih vrsta sekundarnih žučnih kiselina koje su mikrobiološkog podrijetla.<sup>[75]</sup>

Žučne kiseline funkcioniraju kao signalne molekule i postižu svoje učinke kroz interakciju s nekoliko receptora, uključujući FXR (engl. *Farnesoid X Receptor*) i TGR5 (engl. *membrane-bound G protein-coupled bile acid receptor-1*). Sekundarne žučne kiseline LCA i DCA vrlo su potentni ligandi TGR5 receptora, a njegov je agonizam povezan s kolangioprotektivnim i protuupalnim učincima. Ovisno o lokaciji, TGR5 receptor iskazuje brojne učinke, pa tako na kolangiocitima stimulira sekreciju klorida putem CFTR-a, na makrofagima njegova aktivnost dovodi do smanjene aktivnosti NF- $\kappa$ B i posljedično smanjene produkcije upalnih citokina.

Uloga receptora FXR i interakcije sa sekundarnim žučnim kiselinama također je važna u monocitima i makrofagima posredovanoj produkciji upalnih citokina.<sup>[76]</sup> Dodatno, Verbeke i sur. pokazali su da aktivacija receptora FXR posredovana sekundarnim žučnim kiselinama sprječava disfunkciju crijevne barijere u animalnom modelu kolestaze.<sup>[77]</sup>

Studije kojima je bio cilj odrediti fekalne profile sekundarnih žučnih soli u bolesnika s PSC-om ili PSC-om/UBC-om heterogenog su dizajna i ograničene te su u pravilu provedene na vrlo malom broju ispitanika. Dostupni rezultati ukazuju na razlike u profilu žučnih soli između bolesnika s PSC-om i bolesnika s fenotipom PSC/UBC, poput znatno manje koncentracije u fecesu osoba koje imaju PSC i pridruženi UBC.<sup>[76]</sup>

U literaturi je također prisutna hipoteza o „toksičnoj žuči” kao mogućem etiopatogenetskom čimbeniku u PSC-u. Promjene u sastavu žuči, smanjenje protoka žuči i povećani žučni tlak u mogu narušiti normalnu homeostazu i dovesti do formiranja toksične žuči. U zdravom je organizmu bilijarni epitel zaštićen od toksičnog djelovanja žuči kroz nekoliko mehanizama, poput njezine dilucije i alkalizacije. Dodatno tom mehanizmu pomaže i formiranje micela s fosfatidilkolinom i kolesterolom.

Podaci koji podržavaju teoriju toksične žuči dolaze uglavnom iz studija na animalnom modelu. U *Mdr2 knockout* miševima (animalni modeli PSC-a), s ligiranim glavnim žučnim vodom, izloženost žučnim kiselinama dovodi do lezija koje histološki nalikuju na PSC (ekstrahepatičke i intrahepatičke bilijarne strikture, periduktalna *onion-skin* fibroza i fokalna obliteracija žučnih

vodova). Osim navedenih histoloških promjena, staza žučnih kiselina dovodi do znatne imunosne aktivnosti i produkcije brojnih citokina koji dovode do fibroze poput TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, MMP-2. Važno je istaknuti da ovi rezultati govore u prilog tome da toksični učinci žuči igraju važnu ulogu tek nakon što je razvijena određena striktura ili stenoza žučnih vodova, a ne na samom početku bolesti.<sup>[78,79]</sup>

## 1.6 Dijagnostika i praćenje upalnih bolesti crijeva

### 1.6.1 Postavljanje dijagnoze upalne bolesti crijeva

Za postavljanje dijagnoze UBC-a ne postoji patognomoničan simptom ili nalaz, već je potrebno korelirati kliničku sliku, endoskopske, laboratorijske, radiološke i patohistološke nalaze. Stoga ne čudi da su smjernice u dijagnostici i praćenju UBC-a rezultat konsenzusa gastroenteroloških i radioloških međunarodnih društava kojima su uspostavljeni određeni hodogrami i definirani ciljevi detaljnije opisani u nastavku teksta.<sup>[80]</sup>

Osim strukturirane anamneze i kliničkog pregleda, pri postavljanju dijagnoze svakom je bolesniku potrebno učiniti određene laboratorijske i mikrobiološke analize. Pritom, pozornost se obraća na upalne parametre poput leukocitoze i CRP-a (C-reaktivni protein). Povišeni CRP korelira s upalnom aktivnošću CB-a, ali manje s UK-om, osim u slučaju teškog kolitisa. U kontekstu same dijagnoze, specifičnost i senzitivnost CRP-a nije dovoljna da bi bio upotrijebljen kao jedini marker. Primjerice, metaanaliza Holtmana i sur. provedena na 19 studija s ukupno 2806 pedijatrijskih bolesnika pokazala je da je senzitivnost CRP-a u postavljanju dijagnoze 0,63 (95 % CI: 0,51 – 0,73), dok je specifičnost iznosila 0,88 (95 % CI: 0,80 – 0,93). U odrasloj populaciji uloga CRP-a prvenstveno može biti pomoć u razlikovanju UBC-a od drugih gastroenteroloških bolesti, primarno sindroma iritabilnog crijeva. U toj ulozi vrijednost CRP-a manja od 0,5 uz fekalni kalprotektin manji od 40 µg/g smanjuje vjerojatnost prisutnosti UBC-a na manje od 1 %.<sup>[80,81]</sup>

Znatno je senzitivniji marker intestinalne upale fekalni kalprotektin, protein koji je prisutan u velikim količinama u neutrofilima. Točna koncentracija fekalnog kalprotektina koja bi bila dijagnostička za UBC nije definirana. Međutim, brojni radovi sugeriraju vrijednost od 150 µg/g. Ograničenje kalprotektina u tome je što nije specifičan za UBC, odnosno samo uz pomoć fekalnog kalprotektina ne možemo reći je li riječ o UBC-u ili o nekom drugom uzroku crijevne upale. Van Rheenen i sur. napravili su veliku metaanalizu dijagnostičkih studija za UBC, uključujući odraslu i pedijatrijsku populaciju. Analizom je obuhvaćeno 13 studija s ukupno više od 1000 ispitanika. Rezultati su pokazali značajnu osjetljivost i specifičnost ovog markera, 0,93 (95 % CI: 0,85 – 0,97) i 0,96 (95 % CI: 0,79 – 0,99), uz zaključak autora da bi probir ovim markerom mogao reducirati broj potrebnih endoskopija za 67 %. Rezultati ove skupine autora nešto su bolji od sličnih studija gdje se prosječne vrijednosti specifičnosti i osjetljivosti kreću između 0,85 i 0,90 s obzirom na samu dijagnostiku bolesti.<sup>[82,83]</sup>



U svakom slučaju, kod bolesnika s odgovarajućom kliničkom slikom i biokemijskim nalazima ključan dokaz o prisutnosti upalne bolesti crijeva dat će endoskopija. Stručna društva savjetuju kolonoskopiju s intubacijom terminalnog ileuma te biopsijama upaljenih regija (najmanje dvije biopsije po mjestu upale). Ezofagogastroduodenoskopija (EGDS) je preporučena isključivo za bolesnike koji imaju simptome povezane s gornjim dijelom probavnog sustava.<sup>[80]</sup> Karakteristični kolonoskopski nalaz CB-a uključuje segmentalne aftozne ili veće ulceracije s područjima uredne sluznice, dok kod UK-a upala kontinuirano zahvaća debelo crijevo od rektuma prema oralnom. Patohistološki, CB često pokazuje prisutnost aftoznih erozija i granuloma, iako granulomi nisu uvijek prisutni. Prema literaturi, granulomi su verificirani u 6 do 66 % slučajeva CB-a, a kada su prisutni, važno ih je razlikovati od sarkoidoze i tuberkuloze. Transmuralna upala, koja zahvaća cijelu stijenku crijeva, važan je znak CB-a, a limfocitne nakupine u submukozi pouzdan su pokazatelj CB-a, čak i u odsutnosti granuloma.<sup>[80,84]</sup> Patohistološki, rana faza UK-a obilježena je edemom *lamina propria* i kongestijom kapilara i venula, uz ekstravazaciju eritrocita. Uz to, opisuje se akutna infiltracija neutrofila, limfocita, plazma stanica i makrofaga, a moguće i povećanog broja eozinofila i masnih stanica. Neutrofilna infiltracija kripti debelog crijeva dovodi do kriptitisa, a konačno do kriptalnih apscesa s neutrofilnim nakupljanjem u lumenu kripe. Međutim, kriptitis, posljedično uništavanje vrčastih stanica, eksudat i nekroza epitelnih stanica nisu karakteristika isključivo UK-a. Za razliku od CB-a, u patohistološkim preparatima UK-a upala je uglavnom ograničena do razine *muscularis mucosae*.<sup>[84,85]</sup>

Stručna društva daju jasne preporuke i za radiološke pretrage u dijagnostici bolesti, a pritom se misli na novodijagnosticirane bolesnike s CB-om koji moraju biti upućeni na jednu od pretraga tankog crijeva (MR ili MSCT enterografija ili videokapsula). Princip MR i MSCT enterografije sličan je u smislu da obje pretrage zahtijevaju primjenu peroralnoga kontrastnog sredstva te se procjena zahvaćenosti tankog crijeva temelji na mjerenju debljine i imbibicije stijenke kontrastom.<sup>[80]</sup> Prospektivne analize nisu pokazale dijagnostičku razliku između ovih dviju metoda. Autori Fiorina i sur. prospektivno su uključivali bolesnike i ileokoloničnom formom CB-a koji su praćeni objema radiološkim metodama. Nije bilo razlike u specifičnosti i senzitivnosti za ispitivane parametre lokalizacije, zadebljanja stijenke, enteroenteričnih fistula, abdominalnih nodusa i perivisceralne masti. Magnetska enterografija pokazala se superiornijom jedino u detekciji striktura. S obzirom na navedeno, stručna društva savjetuju

obje metode u dijagnostici UBC-a, ali daju prednost MR-u kako bolesnici ne bi bili izloženi zračenju.<sup>[86]</sup>

Metoda koja se sve više primjenjuje svakako je intestinalni ultrazvuk (IUS). Riječ je o metodi koja je široko dostupna, lako izvodiva te u realnom vremenu daje relevantne podatke o zahvaćenosti stijenke crijeva upalom. Prospektivna studija direktne usporedbe MR enterografije i IUS-a provedena je na ukupno 249 bolesnika sa sumnjom na Crohnovu bolest. Svi uključeni bolesnici bili su upućeni na kolonoskopiju, IUS i MR enterografiju. Intestinalni ultrazvuk bio je manje precizan u odnosu na MR u definiranju ekstenzije bolesti, ali uz vrlo dobru konkordanciju s obzirom na lokalizaciju bolesti, prisutnost striktura, fistula i apscesa. Autori su zaključili da su obje procedure korisne za dijagnostiku CB-a tankog crijeva, no ipak daju prednost MR-u po pitanju definiranja ekstenzije bolesti.<sup>[87]</sup> Slični su i rezultati velike studije METRIC. Riječ je o multicentričnoj studiji kojoj je cilj bio usporediti MR enterografiju i IUS u smislu dijagnostike CB-a, ekstenzije bolesti i razvijenih komplikacija. Finalna kohorta uključivala je ukupno 284 bolesnika od koji je pola imalo novootkrivenu bolest, a druga polovina suspektan relaps bolesti. U smislu definiranja ekstenzije bolesti, MR enterografija imala je višu osjetljivost u odnosu na IUS kako za nove slučajeve CB-a tako i pri sumnji na relaps bolesti (80 % (95 % CI: 72 – 86) vs 70 % (95 % CI: 62 – 78),  $p = 0,027$ ) uz ukupnu razliku od 10 % među metodama. Također, osjetljivost MR enterografije bila je značajno veća u odnosu na IUS za prisutnost bolesti u kolonu (20 % razlike (95 % CI: 1 – 39) i aktivnost bolesti tankog crijeva (6 % razlike (95 % CI: 2 – 11)). Općenito, rezultati su vrlo slični i za novodijagnosticirane bolesnike kao i za one ranije dijagnosticirane kod kojih postoji sumnja na relaps bolesti. Obje su metode podjednako utjecale na terapijske odluke koje su donosili nadležni liječnici. Buduća će istraživanja biti usmjerena na uspoređivanje korisnosti ovih dviju metoda za procjenu odgovora na terapiju te istraživanje koristi od UZV pregleda bolesnika s nespecifičnim abdominalnim simptomima radi potvrde ili isključivanja Crohnove bolesti.<sup>[88]</sup>

U postavljanju dijagnoze CB-a koji zahvaća tanko crijevo, od dijagnostičkih je metoda na raspolaganju i videokapsula (VCE). Riječ je o standardnoj preporuci stručnih društava, koja je dio međunarodnih smjernica. Prisutnost najmanje tri ulceracije tankog crijeva vizualizirane videokapsulom, u slučaju da bolesnik ne uzima lijekove iz skupine ne steroidnih protuupalnih lijekova, visokosuspektna je za dijagnozu CB-a tankog crijeva. Kopylov i sur. napravili su veliki pregled i metaanalizu literature u cilju usporedbe VCE-a, MR enterografije i kontrastnog IUS-a. U finalnu je analizu uključeno 13 studija s ukupno 500 bolesnika. Dijagnostički prinos VCE-a u dijagnostici CB-a tankog crijeva bio je sličan MR enterografiji (OR 1,17; 95 % CI:

0,83 – 1,67) i kontrastnom IUS-u (OR 0,88; 95 % CI: 0,51 – 1,53). Videokapsula se čak pokazala superiorna u odnosu na MR u dijagnostici CB-a gornjih dijelova probavnog sustava (OR 2,79; 95 % CI: 1,2 – 6,48). Autori su zaključili da je dijagnostički prinos VCE-a usporediv s drugim metodama, međutim u obzir uvijek treba uzeti rizik retencije kapsule.<sup>[89]</sup>

Po postavljanju dijagnoze UBC-a, bolest je važno klasificirati u smislu primarne ekstenzije i fenotipa bolesti. U tu svrhu, kako u kliničkoj praksi tako i u kliničkim ispitivanjima, najviše se primjenjuje Montrealska klasifikacija bolesti. Ova klasifikacija omogućuje preciznije definiranje oblika bolesti na temelju različitih kliničkih i patoloških karakteristika. Montrealska klasifikacija za CB fokusira se na tri glavna područja: dob bolesnika u vrijeme postavljanja dijagnoze, lokaciju bolesti i težinu bolesti. U kategoriji dobi bolest se klasificira na tipove A1 (dijagnoza prije 16. godine), A2 (od 17. do 40. godine) i A3 (nakon 40. godine). Prema lokalizaciji razlikuju se: L1 (ilealna bolest), L2 (bolest kolona), L3 (ileokolonična bolest) i L4 (izolirana bolest gornjega probavnog sustava). Prema ponašanju, tj. fenotipu bolesti razlikuju se B1 (nestrikturirajuća i nepenetrirajuća bolest), B2 (strikturirajuća bolest) i B3 (penetrirajuća bolest) uz poseban modulator „p” koji se odnosi na prisutnost perianalne bolesti.

Montrealska klasifikacija za UK razlikuje tri podgrupe: E1 (ulcerozni proktitis – do rektosigmoidnog prijelaza), E2 (ljevostrani kolitis – do razine lijenalne fleksure) i E3 (pankolitis – ekstenzija proksimalnije od lijenalne fleksure).<sup>[90]</sup>

### 1.6.2 Praćenje upalne bolesti crijeva

Praćenje (engl. *monitoring*) aktivnosti u UBC-a ključno je za pružanje optimalne skrbi pacijentima. Omogućuje bolje razumijevanje dinamike bolesti te planiranje i prilagodbu terapije kako bi se postiglo najbolje moguće kontroliranje simptoma i poboljšanje kvalitete života pacijenata.

Obuhvaća različite dijagnostičke, laboratorijske i slikovne metode koje omogućuju procjenu trenutnog stanja bolesti, pravodobno prilagođavanje terapije, optimizaciju liječenja i smanjenje rizika od komplikacija. Stalni monitoring bolesnika pomaže u postizanju ciljeva remisije ili kontroliranja bolesti, čime se poboljšava kvaliteta života pacijenata s UBC-om.<sup>[91]</sup>

U praćenju upalne aktivnosti veliku ulogu imaju klinički indeksi aktivnosti koji se razlikuju za UK i CB. Važno je naglasiti da se kompletni klinički indeksi primjenjuju uglavnom u domeni kliničkih ispitivanja i znanstvenih radova, dok se svakodnevnoj kliničkoj praksi u pravilu upotrebljavaju samo određeni segmenti svakog indeksa.

Za UK, među najkorištenijima je Mayo klinički zbroj (ili indeks) i parcijalni Mayo klinički zbroj. U računanju tog zbroja boduje se učestalost stolice, rektalno krvarenje, endoskopski izgled sluznice na endoskopiji i općenita procjena liječnika. Kliničko poboljšanje definira se kao smanjenje početnih bodova za  $\geq 3$  boda, a klinička remisija kao ukupni rezultat  $\leq 2$  (i nijedan pojedinačni podrezultat  $> 1$ ). Kod parcijalnog Mayo zbroja računa se samo broj stolica i rektalno krvarenje. Iako nije validiran, pokazuje dobru korelaciju s kliničkom remisijom odnosno aktivnom bolesti.<sup>[92]</sup>

Drugi je iznimno važan indeks Truelove-Wittsov indeks aktivnosti bolesti koji se primjenjuje već 70-ak godina. Indeks uključuje kliničke i endoskopske parametre kojima se procjenjuje ozbiljnost, odnosno težina bolesti. Ovaj indeks pomaže u određivanju potrebe za hospitalizacijom i vrstom terapije. Boduju se varijable: broj stolica, srčana frekvencija, tjelesna temperatura, vrijednost hemoglobina, sedimentacija eritrocita (SE) ili C-reaktivni protein (CRP). Težina UK-a procjenjuje se zbrojem dobivenih bodova: 0 – 2 boda (blaga bolest), 3 – 5 bodova (umjereni bolest), 6 – 11 bodova (teška bolest). Visoki indeks može ukazivati na potrebu za intenzivnijom terapijom i hospitalizacijom. Pritom je za dijagnozu teškog kolitisa potrebno zadovoljiti kriterij od minimalnog broja šest stolica uz još samo jedan od ispitivanih parametara.<sup>[93]</sup>

U praćenju CB-a također je dostupan velik broj kliničkih indeksa, uglavnom primijenjenih u znanstvene svrhe. Među najčešćima u primjeni svakako su *Crohn's Disease Activity Indeks* (CDAI) i Harvey-Bradshawov indeks (HBI). U upotrebi od 1976., CDAI su razvili autori Best i sur. Temelji se na podacima o simptomima unatrag sedam dana koje bilježi bolesnik, kao i na objektivnim parametrima koji uključuju hematokrit i tjelesnu masu. Prema izračunanim bodovima bolest se klasificira kao remisija (CDAI manji od 150 bodova), umjereni aktivnost bolesti (CDAI između 150 i 450 bodova) i teška aktivnost bolesti: CDAI veći od 450 bodova. Riječ je o indeksu koji ima brojna ograničenja, poput slabe korelacije s endoskopskim nalazima, serumskim markerima upale i fekalnim biomarkerima. Također, preciznost mu je lošija u bolesnika s fistulirajućom ili stenozirajućom bolešću, kao i kod bolesnika s prethodnim resekcijama crijeva.<sup>[94,95]</sup>

Harvey-Bradshawov indeks u procjeni aktivnosti CB-a u upotrebi je duže od 40 godina. Razvijen je radi jednostavne i brze procjene aktivnosti bolesti. HBI se fokusira na ključne

simptome koji karakteriziraju CB, a uključuje komponente: opće stanje, bol u trbuhu, broj tekućih stolica dnevno, prisutnost abdominalne mase i komplikacija. Na temelju tih podataka izračunava se ukupni rezultat, koji pomaže u klasifikaciji aktivnosti bolesti: remisija (HBI manji od 5 bodova), umjerena aktivnost (HBI od 5 i do 6 bodova) i teška aktivnost bolesti (HBI veći od 16 bodova). Loše korelira s endoskopskim nalazima i CRP-om, a karakteristično je da precjenjuje aktivnost bolesti u kontekstu istodobnih funkcionalnih simptoma crijeva, dok istodobno podcjenjuje bolest u podskupini pacijenata koji mogu imati supklinički prisutne stenoze ili fistule.<sup>[96,97]</sup>

U literaturi je opisan velik broj endoskopskih zbrojeva procjene upalne aktivnosti UK-a.<sup>[91]</sup> Ipak, među najkorištenijima su Mayo endoskopski zbroj (MES) i *Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity* (UCEIS), koji je i validiran. U kliničkoj praksi, pa i u kliničkim ispitivanjima češće se primjenjuje MES. Indeks procjenjuje upalu na temelju skale od 4 boda (0 – 3): 0 – normalna sluznica; 1 – eritem; smanjen vaskularni uzorak; 2 – izražen eritem, odsutni vaskularni uzorak, frijabilnost, erozije i 3 – ulceracije i spontano krvarenje. Mukozno cijeljenje definirano je kao vrijednost 0 ili 1.<sup>[92,98]</sup>

*Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity* validiran je endoskopski zbroj koji ocjenjuje tri endoskopska parametra iz upalom najzahvaćenijeg dijela kolona. Parametri koji se ocjenjuju jesu vaskularni crtež sluznice, krvarenje i erozije/ulceracije. Maksimalan zbroj iznosi 8, od čega vaskularnost nosi od 0 do 2 boda, jednako kao i erozije/ulceracije, dok krvarenje može nositi najviše 4 boda. Remisija je definirana kao vrijednost od 1 ili manje bodova.<sup>[99]</sup>

U endoskopskom praćenju CB-a validirana su i najčešće u primjeni dva endoskopska zbroja, CDEIS (engl. *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity*) i SES-CD (engl. *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*).<sup>[100,101]</sup>

*Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity* iznimno je kompleksan zbroj koji zahtijeva dugotrajnu edukaciju kako bi se mogao adekvatno primjenjivati, a i njegova je primjena u svakodnevnoj praksi vremenski zahtjevna. Rezultati zbroja mogu varirati od 0 do najviše 44, a boduju se sljedeći segmenti crijeva: terminalni ileum, desni kolon, transverzum, lijevi i sigmoidni kolon te rektum. S obzirom na navedena ograničenja, primjenjuje se uglavnom u znanstvene svrhe.<sup>[101]</sup>

*Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease* jest zbroj koji je mnogo jednostavniji za primjenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Također boduje pet segmenata crijeva, kao i CDEIS, te dobro korelira s njim. Boduje se veličina ulceracija, zahvaćenost s ulceracijama, zahvaćenost sluznice upalnim promjenama i prisutnost stenoza.<sup>[100]</sup>

U prognozi poslijeoperacijskog relapsa CB-a zlatni je standard Rutgeertsov zbroj. Riječ je o validiranom zbroju koji boduje promjene neoterminalnog ileuma po kategorijama od i0 do i4. Kategorije i3 i i4 jasni su prediktori relapsa bolesti.<sup>[102]</sup>

Važnu ulogu u procjeni aktivnosti i relapsa bolesti imaju i biomarkeri, prvenstveno fekalni kalprotektin. Već je ranije spomenut u smislu dijagnoze bolesti, međutim postoji i veliko iskustvo u smislu praćenja bolesnika s UBC-om. Unatoč toj činjenici, točne vrijednosti koje bi definirale relaps bolesti ili cijeljenje sluznice još nisu točno definirane. Rokkas i sur. publicirali su veliku metaanalizu 25 studija koje ukupno uključuju 2822 bolesnika s UBC-om i kontrola. Biomarker je pokazao ukupnu osjetljivost od 85 % (UK + CB), specifičnost od 75 %, dijagnostički omjer šansi 16,3 i AUC 0,88 u dijagnozi aktivne bolesti. Najbolju je osjetljivost pokazala koncentracija od 50 µg/g (90,6 %), dok je najveća specifičnost bila pri koncentraciji većoj od 100 µg/g. Autori su također pokazali da je specifičnost ovog biomarkera nešto bolja za praćenje UK-a nego CB-a.<sup>[103]</sup>

Normalizacija fekalnog kalprotektina kao službeni cilj liječenja uvrštena je u veliki međunarodni konsenzus STRIDE-II (engl. *Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease*). Iako je točna ciljna koncentracija fekalnog kalprotektina i dalje predmet diskusije, ovim su konsenzusom kao cilj definirane vrijednosti od 100 do 250 µg/g. Pritom se vrijednosti manje od 100 µg/g smatraju pokazateljem dublje remisije koja uključuje endoskopsku i transmuralnu remisiju, dok se vrijednosti manje od 250 µg/g smatraju manje zahtjevnim ciljem poput odsutnosti vidljivih lezija pri endoskopiji.<sup>[104]</sup>

U slikovnom praćenju UBC-a najčešće su metode u primjeni MR enterografija i ultrazvuk. Iako za MR enterografiju postoje validirani indeksi upalne aktivnosti i oštećenja stijenke crijeva, u kliničkoj se praksi rijetko primjenjuju. Opisan je indeks MaRIA (engl. *Magnetic Resonance Index of Activity*) kojim se validira debljina stijenke crijeva, kvantificira naglašenost stijenke nakon aplikacije gadolinija te identificiraju ulceracije i edem.<sup>[105]</sup>

Validiran je i Lémannov indeks, koji objedinjuje kliničke, endoskopske, kirurške i radiološke nalaze u procjeni ukupnog oštećenja crijeva.<sup>[106]</sup>

Također, sve više dokaza u literaturi potvrđuje važnost IUS-a u praćenju bolesnika s UBC-om. U metaanalizu koju su proveli Huynh i sur. uključeno je 16 ispitivanja u cilju usporedbe biokemijskih pokazatelja upale s UZV karakteristikama. Dijagnostička osjetljivost i specifičnost IUS-a u otkrivanju upale kod pacijenata s CB-om i UBC-om premašila je one biokemijskih markera i endoskopije. Preciznost IUS-a bila je još istaknutija u kombinaciji s

biokemijskim markerima, što dodatno ukazuje na važnost kombiniranja ove metode s drugim metoda radi što preciznijeg praćenja bolesnika.<sup>[107]</sup>

U zadnje se vrijeme u literaturi sve više spominje histološka remisija kao važan cilj liječenja te je kao takva i uvrštena u novija klinička ispitivanja lijekova. Iako je izgledno da će u budućnosti postati važan cilj u praćenju bolesnika s UBC-om, za sada još nema takvih službenih preporuka. Dostupni validirani indeksi ili zbrojevi aktivnosti prvenstveno se odnose na UK, dok za CB još nema dostupnih. U kliničkoj je upotrebi najviše Nancy zbroj, prema kojem se upala može kategorizirati od 0 (odsutnost histološke aktivnosti) do 4 (teško aktivna bolest). U obzir se uzima prisutnost ulceracija te karakteristike upalnog infiltrata u bioptičkim uzorcima sluznice.<sup>[91,108]</sup>

## 1.7 Dijagnostika i praćenje primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa

### 1.7.1 Postavljanje dijagnoze PSC-a

Inicijalna klinička slika i prezentacija PSC-a razlikuje se od bolesnika do bolesnika i ovisi između ostalog i o uznapređovalosti bolesti. Pri postavljanju dijagnoze vidimo širok spektar bolesnika, od asimptomatskih bolesnika s blago povišenim vrijednostima alkalne fosfataze (ALP) do bolesnika s razvijenom cirozom jetre i komplikacijama bolesti. Ipak, najčešći su simptomi umor (65 do 75 % bolesnika), abdominalni bolovi (24 do 72 %), svrbež (15 do 69 %) i žutica (30 do 73 %). Karakteristika je bolesti pogotovo u inicijalnim fazama intermitentnost simptoma, tj. periodi u kojima su izraženi i periodi u kojima je bolesnik asimptomatski, vjerojatno kao posljedica prolazne bilijarne opstrukcije.<sup>[109]</sup>

U laboratorijskim nalazima dominira povišenost ALP-a, koja je najvažniji biokemijski marker PSC-a. Tipično, vrijednosti su povišene tri do pet puta iznad gornje granice normale. Vrijednosti aminotransferaza također mogu biti povišene, iako u manjoj mjeri osim u bolesnika kod kojih je riječ o preklapanju PSC-a s drugim bolestima jetre poput autoimunog hepatitisa. Od ostalih nalaza svakako se izdvaja konjugirana hiperbilirubinemija te u kasnijim fazama kao posljedica narušene sintetske funkcije jetre hipoalbuminemija i prolongacija protrombinskog vremena. U obzir treba uzeti i imunosne markere, tj. autoantitijela. U bolesnika s PSC-om najčešće su pozitivna ANCA (engl. *Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies*), tj. perinuklearna ANCA odnosno pANCA, detektirana u između 65 i 88 % bolesnika. Međutim, ANCA nisu specifična isključivo za PSC, već su pozitivna i u drugim bolestima poput autoimunog pankreatitisa i UBC-a.<sup>[110,111]</sup>

Iznimno važnu ulogu u postavljanju dijagnoze imaju slikovne, odnosno radiološke metode. Pritom je prva metoda izbora svakako magnetska kolangiopankreatografija (MRCP), prema svim relevantnim međunarodnim smjernicama. MRCP-om je moguće vidjeti multiple intrahepatičke i ekstrahepatičke strikture i dilatacije žučnih vodova, periduktalnu upalu, kao i ostale parenhimske promjene jetre. Njegova je dijagnostička preciznost usporediva s endoskopskom retrogradnom kolangiopankreatografijom (ERCP) i iznosi oko 85 %. Metaanalizom koju su proveli Dave i sur. obuhvaćeni su podaci 456 bolesnika. Rezultati pokazuju visoku specifičnost i osjetljivost metode za postavljanje dijagnoze, odnosno 0,86 i 0,94, uz visoku vjerojatnost potvrde dijagnoze u rizičnih bolesnika i visoku vjerojatnost isključivanja dijagnoze u bolesnika niskog rizika. Ograničenje je MRCP-a slaba vizualizacija



perifernih intrahepatalnih ogranaka, što otežava postavljanje dijagnoze u vrlo ranoj fazi bolesti.<sup>[112,113]</sup>

Biopsija jetre nije nužna za postavljanje dijagnoze bolesti, međutim u približno 10 % slučajeva zahvaćeni su isključivo periferni vodovi koji se ne mogu prikazati MRCP-om ili ERCP-om. Ti bolesnici pripadaju u kategoriju tzv. PSC-a malih vodova. U takvim je slučajevima opravdana biopsija jetre, a za postavljanje dijagnoze potrebna je prisutnost karakterističnih histoloških znakova bolesti. Te promjene uključuju periduktalnu fibrozu koja može dovesti do karakterističnog *onion-skin* izgleda, odnosno koncentrične fibroze oko srednjih vodova. Takve su karakteristične promjene vidljive u manje od polovine biopsijskih uzoraka. Manji vodovi zahvaćeni su fibroobliterativnim kolangitisom, tj. u potpunosti su obliterirani procesom, što su promjene prisutne u oko 5 do 10 % uzoraka, a smatraju se gotovo patognomoničnima za PSC. Ostali klasični histološki znakovi uključuju duktalnu proliferaciju, periduktalnu upalu, duktopeniju te moguću portalnu inflamaciju. U rutinskoj kliničkoj upotrebi za sada nema histoloških zbrojeva aktivnosti koji bi bili od koristi u dijagnozi ili praćenju.<sup>[109,114]</sup>

Pri postavljanju dijagnoze važno je procijeniti prognozu, odnosno težinu rizika bolesti. Konačna se procjena temelji na fenotipskim karakteristikama bolesnika i neinvazivnim testovima koji uključuju standardne biokemijske testove (bilirubin, albumin, ALP, ALT, trombocite i protrombinsko vrijeme), MR ili MRCP i elastografiju jetre. U fenotipske, dobre prognostičke čimbenike ubrajaju se: mlađa dob pri dijagnozi, ženski spol, bolest malih vodova, konkomitantna CB, normalna ili blago povišena vrijednost ALP-a. Loši su fenotipski prognostički čimbenici ekstenzivna zahvaćenost intrahepatičkih i/ili ekstrahepatičkih žučnih vodova, narušena sintetska funkcija jetre i/ili portalna hipertenzija, fibroza jetrenog parenhima ili ciroza te žutica. Dodatno, razvijeni su PSC-specifični prognostički zbrojevi u cilju pomoći u daljnjem stratificiranju rizika pojedinog bolesnika. Primjerice, zbroj UK-PSC daje procjenu kratkoročnog rizika (predviđena stopa preživljenja unutar dvije godine) i dugoročnog rizika (stopa preživljenja od pet do osam godina). U obzir uzima iduće varijable: dob pri dijagnozi, bilirubin, albumin, trombocite i ALP (sve u trenutku dijagnoze i nakon dvije godine), hemoglobin pri postavljanju dijagnoze, tip bolesti (ekstrahepatička prisutnost ili ne) te varicealno krvarenje unutar dvije godine. Stručno društvo EASL (engl. *European Association for the Study of the Liver*) predlaže svoj pristup u inicijalnoj procjeni rizika. Prema EASL-u, nizak rizik neželjenih događaja imaju sljedeći bolesnici: PSC malih vodova bez znakova ciroze ili klasičan PSC, ali sa svim sljedećim kriterijima; asimptomatski uz uredan bilirubin,

albumine, trombocite i protrombinsko vrijeme, ALP < 1,5 ULN, LSM < 6,5 kPa, ograničena zahvaćenost žučnih vodova na MR-u/MRCP-u. Visok rizik od neželjenih događaja imaju bolesnici koji imaju prisutan bilo koji od sljedećih kriterija: simptome, ALP > 1,5 ULN, abnormalan bilirubin, albumine, trombocite, protrombinsko vrijeme, LSM > 9,9 kPa i ekstenzivne promjene na MR-u/MRCP-u.<sup>[109,115]</sup>

### 1.7.2 Praćenje PSC-a

Trenutačno dostupne preporuke za praćenje bolesnika s PSC-om temeljene su uglavnom na kliničkom i empirijskom iskustvu. Koliko nam je poznato, u literaturi nije dostupan algoritam temeljen na dokazima za rutinsko praćenje bolesnika s PSC-om. Iznimka su bolesnici koji imaju konkomitantnu UBC, kod kojih su potrebne redovite nadzorne kolonoskopije u svrhu probira na kolorektalni karcinom i osobe s razvijenom cirozom jetre. Kod osoba koje nemaju razvijenu cirozu ili UBC predlaže se kombinacija kliničkog i laboratorijskog praćenja jednom godišnje u bolesnika s niskim rizikom (prema ranije definiranim kriterijima) ili jednom u šest mjeseci u osoba s visokim rizikom. Također, savjetuju se godišnji radiološki pregledi MRCP-om i elastografija. Budući da bolesnici s PSC-om imaju povišen rizik razvoja osteoporoze, potrebne su i redovite denzitometrije, za koje se predlaže provođenje svake dvije do četiri godine.

Posebnu pažnju zahtijevaju skupine kod kojih je pri praćenju verificiran porast vrijednosti bilirubina i ALP-a, porast tvrdoće jetrenog parenhima za više od 1,5 kPa godišnje ili progresija zahvaćenosti vodova. U tim slučajevima potrebno je isključivanje kolangiocelularnog karcinoma, određivanje vrijednosti CA 19-9 i MRCP-a te po potrebi ERCP radi prikupljanja uzoraka za citološku analizu. Dodatna obrada također je indicirana u slučaju kliničke sumnje na razvoj autoimunog hepatitisa ili toksičnosti lijeka (biopsija jetre) ili razvoja klinički značajne portalne hipertenzije, kada se savjetuje ezofagogastroduodenoskopija (EGDS).<sup>[109,115]</sup>

## 1.8 Liječenje upalnih bolesti crijeva

U liječenju UBC-a u obzir se uzima više čimbenika, poput lokalizacije odnosno ekstenzije bolesti, težine kliničke i endoskopske slike, razvijenih komplikacija i prisutnosti EIM-a, kao i odgovora na dosadašnju terapiju. Načelno, farmakoterapijske opcije mogu se podijeliti u konvencionalnu ili temeljnu terapiju te biološke lijekove, odnosno male molekule. Ciljevi liječenja definirani su međunarodnim konsenzusom i dugoročno se odnose na postizanje dobre kvalitete života i duboke remisije bolesti.<sup>[104,116,117]</sup>

### 1.8.1 Konvencionalna terapija

Temeljna su terapija UK-a blage do umjerene aktivnosti aminosalicilati, odnosno mesalazin (5-ASA). Mesalazin iskazuje brojne protuupalne učinke putem više mehanizama djelovanja poput inhibiranja ciklooksigenaze, lipoksigenaze te blokiranja privlačenja neutrofila i mastocita. Optimalan učinak liječenja postiže se kombiniranom primjenom peroralnog i lokalnog pripravka lijeka. Skupina 5-ASA lijekovi su dokazane učinkovitosti za liječenje UK-a, dok ih zbog nedostatka dokaza o djelovanju stručna društva ne preporučuju za liječenje CB-a.<sup>[116–118]</sup>

Glukokortikoidi su snažni protuupalni lijekovi primijenjeni u brojnim indikacijama, pa tako i u liječenju UBC-a. Svoj učinak ostvaruju vezanjem za intracitoplazmatske glukokortikoidne receptore te posljedičnim brojnim protuupalnim učincima, uključujući inhibiciju nakupljanja i proliferacije limfocita, monocita, makrofaga, migraciju neutrofila na mjesta upale te supresiju produkcije brojnih citokina poput TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ . Glukokortikoidi se primjenjuju za indukciju remisije u srednje teškom do teškom UK-u kao i u CB-u. Profil nuspojava sistemskih glukokortikoida ograničava njihovu dugotrajnu pojavu te se primjenjuju za postizanje remisije, dok se za održavanje remisije primjenjuju drugi modaliteti liječenja.

U liječenju UBC-a dostupni su nam i lokalno aktivni glukokortikoidi – budezonid. Riječ je o lijeku znatno povoljnijega sigurnosnog profila sa značajnim metabolizmom prvog prolaska, zbog čega su sustavni učinci znatno manji. Aplikacija je indicirana peroralno u slučaju blago do umjereno aktivnog CB-a ograničenog na ileum i ascendentni kolon ili u slučaju blago do umjereno aktivnog UK-a kada liječenje 5-ASA nije dostatno. U topičkom obliku može se primjenjivati za distalni oblik UK-a.<sup>[116–118]</sup>

Analozi purina, odnosno 6-merkaptopurin i njegov prolijek azatioprin, također su snažni protuupalni lijekovi primijenjeni u liječenju UBC-a. Svoje djelovanje ostvaruju konverzijom u aktivni metabolit 6-tiogvanin nukleotid (6-TG), koji interferira sa sintezom nukleinskih kiselina te ima antiproliferativne učinke na aktivirane limfocite i inducira apoptozu. Kod UK-a su tiopurini indicirani u održavanju remisije kod bolesnika s ranim relapsima koji zahtijevaju liječenje glukokortikoidima, dok se u liječenju CB-a primjenjuju u širem spektru indikacija, uključujući indukciju i održavanje remisije u srednje teškoj do teškoj luminalnoj CB, cijeljenje kompleksnih perianalnih fistula i u poslijeoperacijskoj prevenciji relapsa. Ova se skupina lijekova također primjenjuje u kombinaciji s anti-TNF lijekovima u svrhu smanjenja njihove imunogeničnosti.<sup>[116,117,119]</sup>

Metotreksat je analog folata i reverzibilni kompetitivni inhibitor dihidrofolat reduktaze (DHFR), koji je nužan za biosintezu purina i pirimidina odnosno sintezu DNA-a. Dovodi do smanjenja sinteze nukleinskih kiselina i inhibicije proliferacije stanica te smanjenja sinteze proupalnih citokina. Može se primjenjivati za indukciju remisije srednje teške do teške CB kao terapijska opcija kod steroid-ovisnih bolesnika s CB-om kod kojih nisu moguće druge terapijske opcije. Nije indiciran za liječenje UK-a.

Također, može se primjenjivati u prevenciji imunogeničnosti anti-TNF lijekova.<sup>[116,117]</sup>

### *1.8.2 Biološka terapija i male molekule*

Dostupni su nam anti-TNF lijekovi, među kojima su za liječenje UBC-a indicirani infliksimab, adalimumab i golimumab. Infliksimab je prvi registriran u ovoj indikaciji, a riječ je o kimeričkom anti-TNF monoklonalnom protutijelu indiciranom za liječenje UK-a i CB-a. Adalimumab je rekombinantno humano IgG1 monoklonalno protutijelo, također registriran za UK i CB, dok je golimumab (također humano IgG1 monoklonalno protutijelo) registriran isključivo za UK. Infliksimab je indiciran za liječenje teškog UK-a refraktornog na primjenu parenteralnih glukokortikoida, dok su anti-TNF kao skupina indicirani u steroid-ovisnom aktivnom kolitisu, steroid-refraktornoj bolesti i u imunomodulator-refraktornoj bolesti.

Kod CB-a, anti-TNF lijekovi indicirani su za liječenje steroid- refraktorne ili imunomodulator-refraktorne i ovisne bolesti, teške aktivne bolesti s negativnim prognostičkim faktorima te u fistulirajuće bolesti.<sup>[116–118]</sup>

Vedolizumab je indiciran za liječenje UK-a i CB-a, a njegovo se djelovanje temelji na selektivnom blokiranju  $\alpha 4\beta 7$  integrina na površini određenih bijelih krvnih stanica koje migriraju u crijevnu sluznicu, čime se smanjuje upalni odgovor. Karakteristika je vedolizumaba da djeluje selektivno na sluznicu, bez sustavnih učinaka imunosupresije. Primjenjuje se u indukciji i liječenju UK-a i CB-a koji nisu imali adekvatan odgovor na temeljnu terapiju ili kao poslijeoperacijska profilaksa recidiva CB-a. Također, indiciran je i za liječenje refraktornog *pouchitisa*.<sup>[116-118]</sup>

Ustekinumab je monoklonalno protutijelo čije se djelovanje temelji na blokiranju dijelova citokina IL-12 i IL-23, odnosno na njihovu podjedinicu p40, te tako inhibiraju daljnju diferencijaciju pomagačkih Th17 limfocita i posljedičnu upalnu kaskadu. Ustekinumab se primjenjuje u indukciji i održavanju remisije bolesnika s UK-om i CB-om.

Iz ove podskupine bioloških lijekova recentno su registrirani lijekovi mirikizumab i risankizumab. Riječ je o monoklonalnim antitijelima na p19 podjedinicu IL-23. Mirikizumab je odobren za liječenje umjereno do teškog aktivnog UK-a bez odgovora na konvencionalnu terapiju. Risankizumab je odobren za liječenje umjereno do teškog aktivnog CB-a bez odgovora na konvencionalnu terapiju.<sup>[116,117,119,120]</sup>

Iz skupine inhibitora Janusovih kinaza (JAK) dostupno je nekoliko lijekova. Prvi je registrirani lijek u ovoj skupini tofacitinib kao pan JAK inhibitor s djelovanjem na JAK1, JAK2, JAK3 i TYK2, koji se pokazao učinkovit u liječenju srednje teškog do teškog UK-a, refraktornog na konvencionalnu terapiju. Recentno, iz ove skupine lijekova registriran je upadacitinib kao JAK1 selektivni inhibitor, odobren za liječenje UK-a i CB-a, te filgotinib (također JAK1 selektivan), odobren za liječenje UK-a.<sup>[116,117,121]</sup>

Novi su mehanizam liječenja koji nam je dostupan u liječenju UBC-a modulatori receptora sfingozin 1-fosfata (S1P). Riječ je o lijekovima koji modulacijom S1P receptora inhibiraju migraciju limfocita iz limfnog čvora i tako smanjuju upalni proces. Iz ove skupine lijekova odobrenje imaju ozanimod (S1P 1 i 5 inhibitor) za liječenje umjereno do teškoga aktivnog UK-a bez odgovora na konvencionalnu terapiju te etrasimod (S1P 1, 4 i 5 inhibitor) u istoj indikaciji.<sup>[122]</sup>

## 1.9 Liječenje primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa

Prema dostupnoj literaturi, nema učinkovitog lijeka za liječenje PSC-a. Provedena su brojna ispitivanja učinkovitosti ursodeoksikolne kiseline (UDCA) u indikaciji PSC-a. Rezultati randomiziranih kliničkih ispitivanja i njihovih metaanaliza u pravilu pokazuju da liječenje UDCA-om znatno ne pridonosi preživljenju PSC-a bolesnika niti smanjuje pojavnost komplikacija. Studija Lindora i sur. pokazala je da UDCA u dozi od 13 do 15 mg/kg poboljšava laboratorijske nalaze jetrenih enzima, ali nema učinka na histološku aktivnost ni preživljenje bolesnika. Određeni broj manjih studija pokazao je da liječenje UDCA-om u većim dozama poput 20 do 30 mg/kg ima određene pozitivne učinke na vrijednosti laboratorijskih nalaza, ali i na vrijednosti histoloških i zbrojeva procjene rizika. Trenutačne su preporuke međunarodnih društava da se u liječenju može primijeniti UDCA u dozi od 15 do 20 mg/kg, ali uz nisku razinu dokaza.<sup>[109,123,124]</sup>

Učinak sistemskih glukokortikoida, imunosupresiva i određenih bioloških molekula poput vedolizumaba nije pokazan kroz brojne studije te trenutačno nema preporuka o njihovoj primjeni u ovoj indikaciji. Iznimka su, jasno, bolesnici s komorbiditetima poput AIH-a ili UBC-a.<sup>[109]</sup>

U ovoj indikaciji ispitivana je i uloga antibiotika poput metronidazola i vankomicina, od koji su rezultati za vankomicin pokazivali određeni benefit u smislu poboljšanja laboratorijskih nalaza, ali i redukcije vrijednosti zbrojeva rizičnih čimbenika (*Mayo score*). Riječ je o studijama na malim brojevima ispitanika i antibiotici se trenutačno ne preporučuju u liječenju PSC-a osim u slučaju razvoja bakterijskog kolangitisa.<sup>[109,125]</sup>

U okviru simptomatskog liječenja bolesnika s PSC-om u prvom se redu razmatra liječenje svrbeža. Najveće je randomizirano ispitivanje na tu temu studija FITCH, koja je pokazala jasan benefit bezafibrata u liječenju teškog svrbeža kod bolesnika s PSC-om u odnosu na placebo. Bezafibrat je trenutačno preporučen u dozi od 400 mg kao prva linija liječenja. Dodatne preporuke međunarodnih stručnih društava upućuju na rifampicin kao drugu liniju i naltrekson u trećoj liniji liječenja teškog svrbeža.<sup>[109,126]</sup>

## 1.10 MikroRNA

### 1.10.1 MikroRNA u kliničkoj medicini i upalnim bolestima crijeva

MikroRNA (miRNA) su male, evolucijski očuvane molekule RNA-a (duge oko 19 do 24 nukleotida) koje reguliraju ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini. Djeluju tako da se vežu na komplementarne sekvencije u mRNA, sprječavajući proizvodnju proteina. Osim što inhibiraju translaciju, miRNA također potiču razgradnju mRNA, smanjujući njezinu ekspresiju. Transkripcijom gena za miRNA prvo se sintetiziraju primarne miRNA (pri-miRNA) dužine od 500 do 3000 nukleotida. Zatim, u daljnjem procesu, dolazi do formiranja prekursorske miRNA (pre-miRNA) dužine 60 do 70 nukleotida, koja prelaskom iz jezgre u citoplazmu formira zrelu miRNA.<sup>[127,128]</sup>

MikroRNA prvi su put otkrivene 1993. u nematodi *Caenorhabditis elegans*, gdje je snižavanje razine proteina LIN-14, ovisno o genu lin-4, omogućilo prijelaz iz prve larvalne faze u drugu. Kasnije su slične male RNA, poput let-7, otkrivene u mnogim drugim organizmima, uključujući ljude. Potvrda postojanja tih malih RNA sada nazvanih mikroRNA (miRNA) doveli su do intenzivnih istraživanja u cilju identifikacije novih članova ove obitelji.

Od tada su brojna istraživanja identificirala mnoge miRNA u različitim vrstama u cilju razumijevanja njihove biološke uloge. Registar miRBase, osnovan 2002., postao je glavni repozitorij za miRNA sekvencije, predikcije ciljeva i druge relevantne informacije. Iako je identificirano mnogo miRNA, njihov biološki značaj još uvijek nije u potpunosti shvaćen i zahtijeva daljnja istraživanja.

Zrele miRNA mogu imati onkogenu ili tumor-supresorsku ulogu kroz djelovanje na ciljnu glasničku RNA (mRNA) i posljedičnu sintezu proteina. Svaka miRNA može imati kao cilj nekoliko stotina mRNA, stoga prema podacima u literaturi miRNA regulira više od 30 % gena odgovornih za sintezu proteina. Brojni biološki procesi stanice povezani su s regulacijom miRNA, uključujući diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu stanica. Stoga ne iznenađuje da je njihova uloga ispitivana u patofiziologiji brojnih bolesti.<sup>[127–132]</sup>

Prvi dokazi o ulozi miRNA u patogenezi neke bolesti publicirani su 2002. Calin i sur. proveli su istraživanje na skupini bolesnika oboljelih od kronične limfocitne leukemije. Analizom periferne krvi uključenih bolesnika i analizom linija ljudskih stanica pokazali su da su miR-15

i miR-16 smješteni na kromosomu 13q14, regiji koja je delecijom zahvaćena u više od polovice kroničnih limfocitnih leukemija B-stanica. Odnosno, analizom delecije i ekspresije pokazali su da su oba gena deletirana ili smanjena u otprilike 68 % slučajeva kroničnih limfocitnih leukemija.<sup>[133]</sup> Njihov rad potaknuo je brojna istraživanja u području onkologije gdje miRNA pokazuje jedinstvene obrasce ekspresije i funkcije koje ovise o kontekstu u različitim vrstama raka. Generalno govoreći, u kliničkoj onkologiji smjer primjene miRNA može se podijeliti u dvije kategorije; primjena miRNA kao biomarkera za postavljanje dijagnoze ili učinkovitosti terapije te primjena miRNA kao potencijalne terapijske ciljeve.<sup>[134]</sup>

Na primjer, Yao i sur. analizirali su profile cirkulirajuće miRNA u plazmi oboljelih od karcinoma želuca i zdravih kontrola. Identificirali su tri miRNA; hsa-miR-320a, hsa-miR-1260b i hsa-miR-6515-5p, koji mogu razlikovati slučajeve raka želuca od zdravih kontrola. Tri miRNA pokazale su područje ispod krivulje (AUC) iznad 0,95 s visokom specifičnošću (> 93,0 %) i osjetljivošću (> 85,0 %). Autori su zaključili da su navedene tri miRNA potencijalni biomarkeri ranog karcinoma želuca te da bi mogli pružiti bolesnicima mogućnost rane dijagnoze i kurativne resekcije.<sup>[135]</sup> Slična potencijalna primjena miRNA ustanovljena je i za KRK. Egzosomalni miR-1470 bio je značajno pojačano izražen kod pacijenata s KRK-om u usporedbi sa zdravim kontrolama. Analiza krivulje ROC pokazala je vrijednost AUC-a od 0,74 (95 % CI: 0,6876 – 0,7920) za egzosomalni miR-1470, što sugerira njegov potencijal kao neinvazivnoga dijagnostičkog biomarkera koji se također može primijeniti u ranoj detekciji bolesti.<sup>[136]</sup> Slična uloga miRNA kao biomarkera u dijagnostici malignih bolesti utvrđena je za karcinom ovarija, prostate, mokraćnog mjehura, ali i brojne druge.<sup>[137–139]</sup>

Brojne miRNA također su ispitivane kao potencijalni lijekovi, odnosno terapijski ciljevi u onkologiji. Primjerice, miR-34a potencijalni je terapijski cilj u liječenju raka. Riječ je o miRNA čija ekspresija je povezana s tumor-supresorskim p53 genom te očekivano snižena u slučaju gubitka funkcije tog gena. Lijek MRX34 sintetički je dvostruko usmjeren miR-34a mimik, inkapsuliran u liposomalnoj nanopartikuli te je prvi miRNA lijek ikada ispitan na ljudima za nekoliko vrsta raka poput limfoma, melanoma, multiplog melanoma, ali i brojnih drugih. Kliničko je ispitivanje prekinuto zbog imunosno posredovanih neželjenih događaja od kojih su neki imali i smrtni ishod, što je uglavnom povezano sa samom sintetskom miRNA i osmišljenim mehanizmom dostave samog lijeka, dok sama miR-34a i dalje ostaje potencijalni terapijski cilj za buduća ispitivanja.<sup>[140–142]</sup>

Osim u onkologiji, miRNA se opsežno istražuje i u drugim granama kliničke medicine. Na primjer, postoje brojni podaci o njihovoj upotrebi i ulozi u kardiovaskularnoj medicini,



uključujući progresiju ateroskleroze, dijagnostiku i prognozu akutnoga koronarnog sindroma te dijagnostiku, prognozu i težinu srčanog zatajenja.<sup>[143–145]</sup> Dodatno, razmatrane su brojne terapijske primjene miRNA, s obzirom na to da se smrt srčanih stanica u starenju srca ne može nadomjestiti zbog zaustavljene diobe stanica, što je veliki terapijski izazov u prevenciji srčanog oštećenja. U nekim istraživanjima pokušalo se primijeniti miRNA za kontrolu staničnog ciklusa kako bi se obnovio regenerativni potencijal zrelog miokarda.<sup>[146]</sup>

Opsežna ispitivanja provedena su i u području pulmologije, gdje su također utvrđene promjene u ekspresiji u plućnom tkivu, upalnim stanicama i krvi te se smatra da djeluju kao pokretači i modifikatori bolesti. Kao i u drugim područjima, u tijeku su ispitivanja terapija temeljenih na mi-RNA, ali i biomarkera.<sup>[147]</sup>

Detaljan prikaz rezultata tih istraživanja, ali i brojnih drugih koja su dostupna praktički za svaku granu kliničke medicine, izlazi izvan okvira ove disertacije. Jasno je da će miRNA u budućnosti biti važan čimbenik u liječenju i praćenju brojnih bolesti.

Wu i sur. publicirali su prvu studiju u kojoj su zabilježene razlike u ekspresiji miRNA između bolesnika s UK-om i kontrola. Autori su pronašli ukupno 11 različito eksprimiranih miRNA od kojih je ekspresija pojedinih bila povišena (miR-16, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-29a, miR-126, miR-195), a pojedinih snižena (miR-192, miR-375, miR-422b).<sup>[148]</sup>

Usljedila su brojna ispitivanja koja su ispitivala ulogu miR u UBC-u kao markerima kliničke, biokemijske i endoskopske aktivnosti, kao prediktore odgovora na terapiju ili čak prediktore kolorektalnog karcinoma.

Primjerice, u studiji koju su proveli Wang i sur. ispitivana je serumska ekspresija miR-223 kao biomarkera kliničke aktivnosti UBC-a. Uključeno je po 50 bolesnika svake skupine (UK, CB i zdrave kontrole). Serumske koncentracije miR-223 imale su značajniju korelaciju s kliničkim indeksima aktivnosti u odnosu na sedimentaciju eritrocita (ESR) i CRP.<sup>[149]</sup>

Slične rezultate za miR-320a publicirali su Cordes i sur. Koncentracije miR-320a bile su značajno povišene u bolesnika s UK-om i CB-om, ovisno o kliničkoj, ali i endoskopskoj težini bolesti. Zanimljivo, u analizu je uključen i manji broj bolesnika s infektivnim kolitisom koji su također imali statistički značajno niže koncentracije miR-320a, ukazujući na dodatnu potencijalnu ulogu ovog biomarkera.<sup>[150]</sup>

MikroRNA imaju i svoju ulogu u predikciji odgovora na terapiju. Retrospektivna studija koju su proveli Morilla i sur. uključila je 46 bolesnika s akutnim, teškim UK-om. Bolesnici su liječeni intravenskim glukokortikoidima, ciklosporinom ili infliksimabom. Tkiva biopsije sluznice kolona uzeta do tri dana prije početka terapije analizirana su na miR ekspresiju i

kvantificirana PCR analizom. Uporabom umjetne neuronske mreže autori su uspjeli identificirati 15 miR povezanih s odgovorom na glukokortikoide, šest miR povezanih s odgovorom na infliksimab i četiri s odgovorom na ciklosporin. Dodatno, razvijen je i prediktivni algoritam temeljen na razini ekspresije miRNA koji predviđa odgovor na infliksimab s 84-postotnom vjerojatnošću (AUC = 0,82), ali i algoritam koji predviđa odgovor na ciklosporin s 80-postotnom vjerojatnošću (AUC = 0,79).<sup>[151]</sup>

Razlike u koncentraciji miR u fecesu bolesnika s UBC-om u odnosu na kontrolne ispitanike dobro su opisane u literaturi. Verdier i sur. proveli su opsežan probir više od 800 miRNA u stolici, serumu, intestinalnom tkivu bolesnika s aktivnim i inaktivnim CB-om/UK-om, zdravih kontrola i bolesnika s infekcijom *C. difficile*. U stolici bolesnika s aktivnim CB-om i UK-om verificirane su značajno povišene koncentracije miR-223 i miR-1246 u odnosu na zdrave kontrole.<sup>[152]</sup> Slični rezultati u stolici bolesnika s UBC-om pronađeni su za miR-16-5p i za miR-21-5p.<sup>[153]</sup>

Iz tih rezultata proizlazi i potencijalno važna uloga miRNA kao prediktivnog čimbenika u detektiranju KRK-a. Primjerice, zanimljivu multicentričnu studiju proveli su Pardini i sur. Cilj studije bio je identificirati profil miRNA u stolici kao neinvazivnog biomarkera detekcije KRK-a. U analizu su uključeni uzorci bolesnika s KRK-om, adenomima, gastrointestinalnim bolestima (uključujući UBC) i zdrave kontrole. Profil od pet miRNA (miR-149-3p, miR-607-5p, miR-1246, miR-4488 i miR-6777-5p) uspješno je razlikovao bolesnike s KRK-om u odnosu na kontrole (AUC 0,86; 95 % CI: 0,79 – 0,94). Pritom miR-6777-5p nije bio drugačije eksprimiran ni u jednoj drugoj gastrointestinalnoj bolesti, a miR-149-3p jedino još u skupini bolesnika s adenomima. Autori su zaključili da ovako definiran profil miRNA znatno pridonosi neinvazivnoj dijagnostici KRK-a.<sup>[154]</sup>

### *1.10.2 MikroRNA 124, polimorfizam rs531564 i upalne bolesti crijeva*

Polimorfizam jednog nukleotida ili mutacija u genskoj sekvenciji za miRNA mogu promijeniti ekspresiju miRNA i njezino sazrijevanje od pri-miRNA do zrelog oblika. U načelu, SNP utječe na dva važna aspekta miRNA. Kao prvo, SNP-ovi koji utječu na biogenezu jesu oni koji su smješteni u područjima pri-miRNA ili pre-miRNA te mogu utjecati na proces sazrijevanja miRNA. Ove genske varijacije mogu promijeniti način na koji se primarni miRNA transkript obrađuje u zreli miRNA. Promjene u razinama ekspresije zrelih miRNA mogu imati nizvodne učinke na regulaciju gena, potencijalno utječući na brojne stanične procese i pridonoseći

osjetljivosti na bolesti. Kao drugo, SNP-ovi mogu utjecati na interakciju između miRNA i mRNA. Oni se nalaze u ciljnim sekvencijama mRNA te mogu utjecati na sposobnost miRNA da se vežu za svoje ciljeve. Interakcija između miRNA i njezine ciljne mRNA obično se oslanja na komplementarno sparivanje baza, često uključujući regiju „sjeme” od šest do osam nukleotida. Budući da je ljudski 3'UTR relativno dug (~ 950 nt) i jer miRNA mogu vezati na više mjesta na jednoj mRNA, SNP-ovi u tim regijama mogu na složen način utjecati na ciljne interakcije miRNA, mijenjajući ekspresiju gena i pridonoseći fenotipskoj varijabilnosti. Ovaj dvostruki utjecaj SNP-ova, na biogenezu miRNA i interakcije miRNA-mRNA, ističe složenu regulatornu mrežu u kojoj djeluju miRNA i kako genske varijacije mogu utjecati na ekspresiju gena te potencijalno pridonijeti mehanizmima bolesti.<sup>[155–157]</sup>

Jedan od češćih polimorfizama za pri-miR-124 (rs531564 C > G), povezan je s ekspresijom zrele miR-124. Ovisno o prisutnom alelu, formira se drugačija sekundarna struktura pri-miR, tj. prisutnost alela G rezultat će promijenjenom konačnom strukturom u usporedbi s alelom C. Te strukturne razlike mogu znatno mijenjati stabilnost pri-miR te u konačnici utjecati na ekspresiju zrele miR. Prema rezultatima Qi i sur., postoji značajna razlika u ekspresiji zrele miR-124 vezana za genotip. Tako genotip GC pokazuje 8,974 puta veću ekspresiju u usporedbi s genotipom CC i 1,248 puta veću ekspresiju u odnosu na genotip GG.<sup>[158]</sup> Navedeno nije jedinstveno za miR-124, već su slične poveznice s genotipom i konačnom ekspresijom opisane za brojne druge, poput miR-155. Wang i sur., konstruirali su SNP miRNA bazu podataka u koju je uključeno 886 pre-miR i 2640 SNP-ova. Autori su ustanovili da tek manji broj SNP-ova ne igra ulogu u sazrijevanju miR, kao i da je genotip određenog SNP-a važan za daljnji ishod tog procesa. Osim genotipa, u procesu važnu ulogu ima i lokacija SNP-a kao i njime posredovana slobodna energija.<sup>[159,160]</sup>

Sama miR-124 u zadnje je vrijeme u znatnom obujmu ispitivana u kontekstu uloge u patofiziologiji UBC-a, pa i u terapijskom smislu. Sun i sur. ispitivali su sinergistički učinak miR-1-3p i miR-124-3p na disfunkciju intestinalne barijere i kolitis u starijoj populaciji. Kombinacijom animalnog modela i analize humanog tkiva autori su došli do zaključka kako su ove dvije miR važne za održavanje crijevne homeostaze. Blago povišena ekspresija miR-1-3p i miR-124-3p u tkivu kolona, povezana sa starenjem i u suradnji s vrčastim stanicama i intestinalnim epitelnim stanicama, dovodila je do značajnije narušenosti crijevne barijere i veće sklonosti razvoju kolitisa.<sup>[161]</sup>

Osim po pitanju utjecaja na integritet crijevne barijere, uloga miR-124 ispitana je i po pitanju utjecaja na regulaciju upalnih procesa. Koukos i sur. proveli su analizu bioptiranog tkiva kolona pedijatrijskih i adultnih bolesnika s UBC-om, kao i zdravih kontrolnih ispitanika. Mjerene su

razine miR-124 metodom *real-time* PCR, kao i fosforilacija važnoga upalnog puta STAT3 (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) i gena koji su regulirani tim putem. Od svih analiziranih miR, miR-124 je imala najizraženiji učinak, bila je smanjeno izražena u tkivu kolona pedijatrijskih pacijenata te je izravno ciljala STAT3 mRNA. Kad je učinjena usporedba tkiva aktivnih bolesnika i onih u remisiji, izmjerene su niže razine ekspresije miR-124 i izraženija fosforilacija STAT3 u aktivnih bolesnika. Dodatnom analizom u animalnom modelu eksperimentalnog kolitisa potvrđena je negativna korelacija razine ekspresije miR-124 i fosforilacije STAT3. Autori su zaključili da miR-124 ima ulogu u regulaciji puta STAT3 i ulogu u patogenezi UBC-a u pedijatrijskoj populaciji.<sup>[162]</sup> Ponešto oprečne rezultate, iako na manjem uzorku ispitanika dobili su Ni i sur. Oni su pronašli blago povišenu ekspresiju miR-124, odnosno bez značajne promjene u odnosu na kontrole. Razliku su objasnili individualnom varijacijom u razinama miR čak i među pacijentima s istom bolešću, što odražava razlike u stadiju razvoja ili genskom podrijetlu, ali može biti i odraz maloga ispitivanog uzorka.<sup>[163]</sup> Iduća potencijalna, ali važna uloga miR-124 u istraživanjima povezanima s UBC-om jest povezanost s kolorektalnim karcinomom nastalim na podlozi kolitisa. Veliki pregledni članak koji su objavili Bocchetti i sur. bavi se upravo tom temom. Autori su podijelili ispitivane miR na dvije skupine, odnosno one s povišenom ekspresijom u KRK-u vezanom uz kolitis i sniženom ekspresijom, a miR-124 pripada među one čija je ekspresija snižena u tih bolesnika. Njegova svojstva uključuju inhibiciju stanične proliferacije i metastaza, indukciju apoptoze i oksidativnog stresa, kao i korelaciju s boljim preživljenjem bolesnika s KRK-om. Navedeno je posljedica brojnih ciljnih mjesta miR-124 poput PKM-a (engl. *Pyruvate Kinase Muscle*) izoformi i PTB1 (engl. *Polypyrimidine Tract-Binding protein 1*). MikroRNA-124 također cilja i signalni put STAT3, koji je važan za upalnu regulaciju u kolitisu, ali i za progresiju KRK-a povezanog s kolitisom.<sup>[164]</sup>

Navedena su istraživanja dovela do razvoja potencijalno nove terapijske opcije za liječenje UBC-a. Riječ je o „prvom-u-kласi” lijeku imena obefazimod, koji je trenutačno u fazi kliničkih ispitivanja. Obefazimod je mala molekula dostupna u oralnom obliku s protuupalnim svojstvima koja se temelje na povišenoj ekspresiji miR-124 u upalnim stanicama. Njegov je učinak pokazan u animalnim studijama gdje je liječenje obefazimodom znatno ublažavalo težinu inducirano kolitisa, što se očitivalo u oporavku tjelesne mase liječenih životinja, kao i u ublažavanju lezija sluznice kolona. Zabilježena je znatna redukcija pro-inflamatornih citokina poput TNF  $\alpha$ , IL-6 i MCP-1/CCL2 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*), ali, zanimljivo, samo u sluznici kolona, a ne i u koštanoj srži. Utjecaj obefazimoda na ekspresiju

miR-124 dokazan je ne samo *in vitro* nego i u pacijenata. U ispitivanju ekspresije miR-124 u rektalnim biopsijama pacijenata inficiranih HIV-om, liječenjem obefazimodom tijekom 28 dana postignuta je ekspresija miR-124 kao u zdravih ispitanika. Nakon prestanka uzimanja obefazimoda ekspresija miR-124 smanjila se na razine prije liječenja, što ukazuje da su promjene u ekspresiji specifično uzrokovane ovim lijekom.<sup>[165–168]</sup> Navedeni rezultati doveli su i do većih kliničkih ispitivanja među oboljelima od UBC-a, prvenstveno UK-a. Placebom kontrolirana studija faze 2a uključivala je bolesnike s umjerenim do teško aktivnim UK-om. Uključena su ukupno 32 bolesnika iz 15 europskih centara, a bolesnici su randomizirani u omjeru 2 : 1 (liječenje s 50 mg obefazimoda dnevno ili placebo). Nakon osam tjedana induksijskog liječenja u aktivnoj skupini 35 % bolesnika postiglo je kliničku remisiju, a 70 % klinički odgovor, za razliku od 11 % i 33 % u placebo skupini ( $p = 0,03$ ). Zabilježeno je i značajno endoskopsko poboljšanje u 50 % ispitanika za razliku od 11 % u placebo skupini.<sup>[169]</sup> S obzirom na te rezultate provedena je studija faze 2b. Uključeno je 254 bolesnika koji su randomizirani na jednu od tri različite doze (25 mg, 50 mg ili 100 mg jednom dnevno) ili na placebo. U osmom tjednu od indukcije lijeka sve tri su doze pokazale statistički značajnu učinkovitost u odnosu na placebo po kliničkim i endoskopskim parametrima postizanja remisije. Nakon osam tjedana endoskopsko poboljšanje bilo je veće u skupinama koje su primile terapiju u usporedbi s placebo (34,5 %, 39,6 % i 44,4 % u skupinama s dozama od 25 mg, 50 mg i 100 mg, u usporedbi s 13,6 % u placebo skupini). Zabilježeno je čak i znatno histološko poboljšanje u sve tri skupine. U otvorenom je nastavku praćenja većina bolesnika zadržala klinički i endoskopski odgovor postignut u indukciji.<sup>[170]</sup> U dodatnoj analizi mjerena je i ekspresija miR-124 u serumu i bioptiranoj sluznici rektuma ispitanika. Na početku istraživanja nije bilo razlika u broju kopija miR-124 u rektalnim biopsijama i uzorcima seruma između placeba i skupina koje su primile lijek. Nakon osam tjedana broj kopija miR-124 bio je znatno veći u skupinama koje su primile lijek u usporedbi s placebo, kako u rektumu tako i u serumu (prosječan broj kopija/stanica: placebo, 746; obefazimod (25 mg, 50 mg i 100 mg), 8345, 8347 i 9171, redom, u rektalnim biopsijama; prosječan broj kopija/stanica: placebo, 28,93; obefazimod (25 mg, 50 mg i 100 mg), 4598, 8517 i 13 753, redom, u uzorcima seruma). Zabilježena je i redukcija broja stanica Th17 i IL-17 u serumu bolesnika koji su primili obefazimod, što sugerira da lijek potencijalno i tim putem ostvaruje svoj učinak.<sup>[171]</sup> U tijeku su ukupno tri studije faze 3 (NCT05507203, NCT05507216, NCT05535946), u kojima se planira uključiti 1200 bolesnika za koje se očekuje da će potvrditi ranije opisane rezultate.

### 1.10.3 MikroRNA u bolesnika s upalnim bolestima crijeva i primarnim sklerozirajućim kolangitisom

Brojne su studije pokazale da bolesnici koji boluju od PSC-a imaju specifičan fenotip UBC-a. U bolesnika kod kojih je dijagnosticiran UK inicijalna je ekstenzija bolesti pankolitis u približno 90 % bolesnika, uz karakterističnu poštedu rektuma i takozvani *backwash* ileitis, odnosno retrogradno zahvaćanje terminalnog ileuma upalom. Dijagnoza upalne bolesti crijeva postavlja se u ranijoj životnoj dobi, između 20. i 25. godine, a za ovaj je fenotip karakteristična i činjenica da se češće javlja u muškaraca uz uglavnom blagi klinički tijek.<sup>[7]</sup> Također, u bolesnika kod kojih je nužno učiniti proktokolektomiju učestalije se javlja upala ileoanalnoga zdjeličnog rezervoara, kao i displazija sluznice, iako bez jasnog učinka na samu kvalitetu života bolesnika.<sup>[172]</sup> U bolesnika oboljelih od CB-a najčešće je zahvaćen kolon (od 37 do 82 % bolesnika), a aktivnosti bolesti je jednaka ili blaža u usporedbi s oboljelima samo od CB-a, uz nižu incidenciju striktura i fistula.<sup>[173]</sup>

Međutim, u skupini bolesnika oboljelih od PSC-a i UBC-a opisan je i znatno povišen rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma. Desetogodišnji kumulativni rizik za razvoj displazije ili kolorektalnog karcinoma varira od studije do studije, a maksimalno iznosi oko 11 %, dok je rizik u bolesnika oboljelih samo od upalne bolesti crijeva oko 2 %.<sup>[8]</sup> Podaci u literaturi jasno ukazuju na povišeni rizik oboljelih od UK-a dok su za CB kontroverzni. Stoga su Zheng i sur. proveli veliku metaanalizu studija na temu rizika neoplazije u bolesnika s UBC-om i PSC-om u odnosu na oboljele samo od UBC-a. Uključeno je ukupno 16 studija, odnosno 13 379 bolesnika s UBC-om od kojih je 1022 također imalo PSC. Pacijenti s UBC-om i PSC-om imali su povećani rizik od displazije i raka debelog crijeva u usporedbi s pacijentima samo s UBC-om (OR 3,24; 95 % CI: 2,14 – 4,90). Taj povećani rizik bio je prisutan čak i kada je analiziran samo rizik od raka debelog crijeva (OR 3,41; 95 % CI: 2,13-5,48). Rezultati analize podataka skupine pacijenata s UK-om pokazali su da je konkomitantni PSC bio povezan s povećanim rizikom razvoja neoplazije i raka debelog crijeva (OR 2,98; 95 % CI: 1,54 – 5,76) (OR 3,01; 95 % CI: 1,44 – 6,29), ali postojala je visoka heterogenost među studijama. Stratifikacija prema tipu UBC-a pokazuje da je prisutnost PSC-a povezana s povećanim rizikom razvoja neoplazije debelog crijeva kod pacijenata s UK-om, ali povezanost kod bolesnika s CB-om nije bila značajna.<sup>[174]</sup> Kao mogući uzrok maligne alteracije kolona predložena je povećana koncentracija, moguće kancerogenih, sekundarnih žučnih kiselina, čemu u prilog govori i viša incidencija karcinoma u desnom kolonu, gdje je koncentracija sekundarnih žučnih kiselina i najviša.<sup>[10]</sup> Kronična upala dobro je poznati rizični čimbenik za razvoj karcinoma u bolesnika s upalnom bolešću crijeva.<sup>[175]</sup> Kao što je ranije opisano, upalna bolest crijeva u tih bolesnika

ima znatno blaži, čak i supklinički tijek te može ostati dugo neprepoznata. Zbog toga supklinička upala u tih bolesnika traje znatno dulje prije nego što bude prepoznata i liječena te samim time znatno povisuje rizik za razvoj karcinoma.<sup>[9]</sup>

Nadalje, britanska je pilot-studija primjenom multiomičke transkriptomске i analize mikrobiote na biopsijama sluznice bolesnika s PSC-om/UBC-om, bolesnika s UK-om i zdravih kontrola pokazala da se mikrobiota sluznice kod pacijenata s PSC-om/UBC-om značajno razlikuje od one kod pacijenata s UK-om, a transkriptomска analiza ukazala je na disregulaciju homeostaze žučnih kiselina u kolonu.<sup>[176]</sup>

Usprkos opisanim mehanizmima, patogeneza povišenog rizika maligne bolesti u tih bolesnika i dalje ostaje nejasna, ali izvjesno je da je i gensko nasljeđe bitan čimbenik. Jednako kao što je nepotpuno jasan povišen rizik maligne alteracije, tako nisu jasne ni razlike u kliničkom tijeku UBC-a u oboljelih od PSC-a.

U literaturi postoji ograničen broj studija koje ispituju ulogu miRNA u fenotipu UBC-a/PSC-a. Kempinska-Podhorodecka i sur. ispitivali su ulogu miR-506 u fenotipskoj prezentaciji bolesnika s UK-om i PSC-om. Autori su analizirali ekspresiju miR-506 i njezinih ciljnih gena u bioptatu uzlaznog i sigmoidnog kolona u bolesnika s UK-om i usporedili ih s onima koji boluju od UK-a i PSC-a, kao i sa zdravim kontrolama. Ekspresija miR-506 bila je značajno povećana u uzlaznom kolona bolesnika s PSC-om i PSC-om/UK-om, za razliku od bolesnika s UK-om, kod kojih je miR-506 značajno suprimiran (smanjenje od 90 %) i u uzlaznim i u sigmoidnim dijelovima kolona. Autori su ustanovili da je naznačena ekspresija u tom dijelu crijeva rezultirala smanjenom ekspresijom AE2 (engl. *Anion Exchange protein 2*) i InsP3R3 (engl. *inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor*), što je destabiliziralo zaštitu od toksičnih žučnih kiselina. Nedostatak indukcije sfingozin kinaze 1 (SPHK1) uslijed povećane upale u ovom dijelu crijeva, kao i gubitak aktivnosti sfingozin 1-fosfat liaze (SPL), potaknuo je neoplastičnu transformaciju putem puta ovisnog o p53. S druge strane, supresiju miR-506 u oba dijela kolona pacijenata s UK-om te u sigmoidnom kolonu pacijenata s PSC-om i UK-om pratilo je značajno povećanje izražaja SPHK1 te posljedično usmjerilo patogenezu u upalni, a ne u neoplastični put.<sup>[177]</sup> Od iste skupine autora dolaze i rezultati povezani s miR-125b. Prekomjerna ekspresija miR-125b bila je praćena povećanom regulacijom S1P, sintetaza ceramida, kinaza ceramida i smanjenom regulacijom interakcijske domene bogate AT-om 2 u uzlaznom kolonu kod PSC-a/UK-a, što je pridonijelo napredovanju kolorektalnog karcinoma s visokom mikrosatelitskom nestabilnošću.<sup>[178]</sup>

Također, dostupni su rezultati za miR-346. Autori su ispitivali ekspresiju miR-346 te njezina dva ciljna gena – receptor vitamina D i TNF- $\alpha$  koji su poznati modulatori karcinogeneze.

Analizirana su tkiva uzeta biopsijama sluznice ascendensa i sigmoidnog kolona u ukupno četiri skupine bolesnika (PSC, PSC/UK, UK i zdrave kontrole). Pronađena je značajno povišena ekspresija miR-346 u ascendensu bolesnika skupine s PSC-om/UK-om, statistički značajno različita u odnosu na druge skupine. U bolesnika s UK-om niska ekspresija miR-346 bila je povezana s povećanom ekspresijom receptora za vitamin D i gena TNF- $\alpha$ . Autori su zaključili da bi povišena ekspresija miR-346 u kolonu bolesnika s PSC-om mogla biti povezana s promjenama receptora za vitamin D i signalnog puta TNF- $\alpha$ , koje bi mogle dovesti do neadekvatne supresije neoplazije.<sup>[179]</sup>



## **2. HIPOTEZA**

Učestalost genotipa GC polimorfizma jednog nukleotida rs531564, gena za pri-miR-124, veća je u oboljelih od upalne bolesti crijeva u odnosu na oboljele od upalne bolesti crijeva i primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Primarni cilj:

Analizirati učestalost genotipa polimorfizma jednog nukleotida (SNP) (rs531564) gena za pri-miR-124 u bolesnika s upalnom bolešću crijeva i u oboljelih od primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa i upalne bolesti crijeva

Specifični ciljevi:

- 1) Analiza i usporedba osnovnih kliničkih i sociodemografskih karakteristika uključenih ispitanika
- 2) Učestalost genotipa SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 u bolesnika sa specifičnim fenotipom PSC-a/UBC-a, u bolesnika s upalnom bolešću crijeva te u bolesnika samo s PSC-om
- 3) Povezanost SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 s kliničkim karakteristikama bolesnika s upalnom bolešću crijeva (dob pri dijagnozi, ekstenzija bolesti/endoskopski sustav bodovanja – Montrealska klasifikacija, klinički tijek bolesti)
- 4) Povezanost SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 s kliničkim karakteristikama bolesnika s PSC-om (dob početka bolesti, klinički tijek)

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1 Ispitanici

U ovo opservacijsko presječno istraživanje uključene su slučajno odabrane skupine muških i ženskih ispitanika kojima je postavljena dijagnoza upalne bolesti crijeva i/ili primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa. U obzir su uzeti punoljetni bolesnici kod kojih je dijagnoza upalne bolesti crijeva postavljena na temelju klasičnih endoskopskih, histoloških i kliničkih kriterija<sup>[80]</sup> i oni kod kojih je dijagnoza primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa postavljena na temelju standardnih smjernica<sup>[109]</sup>. Osim navedenog, svi su ispitanici uključeni tek nakon potpisanoga informiranog pristanka i nakon što su im objašnjene sve pojedinosti istraživanja. Kriteriji isključivanja bili su nepotpisani informirani pristanak, trudnoća, osobe s teškim invaliditetom te osobe koje boluju od demencije ili psihičke bolesti.

U inicijalnom probiru uključeno je ukupno 120 bolesnika, od kojih 23 nije moglo ili pristalo sudjelovati dominantno kao posljedica pandemije bolesti COVID-19. U konačnu analizu uključeno je ukupno 97 bolesnika, od kojih je 31 bilo u skupini s PSC-om/UBC-om, pet u skupini s PSC-om i 61 u skupini s UBC-om.

Istraživanje je provedeno u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju KBC-a Zagreb, dok je analiza SNP-a ispitivanog gena učinjena u Institutu Ruđer Bošković, na Zavodu za molekularnu medicinu. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkoga bolničkog centra Zagreb i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te je provedeno u skladu s etičkim načelima i Deklaracijom iz Helsinkija iz 2000.

### 4.2 Metode

#### 4.2.1 Klinički podaci

Klinički podaci ispitanika, odnosno podaci o dosadašnjem tijeku bolesti, metodama liječenja i komplikacija, prikupljeni su uvidom u elektroničku bazu medicinske dokumentacije, razgovorom s ispitanicima i uvidom u medicinsku dokumentaciju liječnika obiteljske medicine (ako je bila dostupna). Tjelesna visina ispitanicima je izmjerena u stojećem položaju bez obuće, a tjelesna masa bez teških odjevnih predmeta. Indeks tjelesne mase izračunan je kao masa ispitanika u kilogramima podijeljena s kvadratom visine u metrima.

Za prikaz kliničkih odnosno endoskopskih karakteristika UBC-a i fenotipa same bolesti primijenjena je Montrealska klasifikacija.<sup>[90]</sup> Bolesnici s CB-om klasificirani su stoga prema tri kategorije – dob pri dijagnozi, lokalizacija bolesti i ponašanje bolesti. Lokalizacija bolesti klasificirana je na sljedeći način: L1 – bolest zahvaća terminalni ileum, L2 – bolest zahvaća kolon, L3 – bolest zahvaća i terminalni ileum i kolon te L4 – izolirana zahvaćenost gornjega probavnog trakta.

Bolesnici s UK-om klasificirani su prema lokalizaciji bolesti na sljedeći način: L1 – ograničena na rektum, L2 – bolest ograničena na lijevi kolon (upalne promjene ne nalaze se proksimalno od lijenalne fleksure kolona), L3 – bolest koja se šiti proksimalno od lijenalne fleksure.

Kao indirektan biljeg težine UBC-a upotrijebljeni su podaci o primjeni biološke terapije te eventualnoj primjeni više linija biološke terapije prije uključivanja u ispitivanje, a kao zasebne kategorije dob pri početku biološke terapije, odnosno trajanje same bolesti prije početka. Prikupljeni su i podaci o prisutnosti EIM-a.

Također, upotrijebljeni su podaci o broju hospitalizacija uzrokovanih UBC-om i kao zasebna kategorija pojavnost maligne bolesti među ispitanicima.

Prikupljeni su podaci o važnim ishodima liječenja UBC-a, uključujući steroid-ovisnu bolest i duboku remisiju bolesti koji su definirani u skladu s vrijedećim međunarodnim smjernicama.<sup>[80,91]</sup> U praćenju PSC-a kao ishod liječenja zabilježeni su podaci o transplantaciji jetre.

Ako su podaci za određenu varijablu bili nedostupni, nisu uzimani u konačnu analizu.

#### *4.2.2 Izolacija DNA-a iz pune krvi*

Iz uzoraka pune krvi genomska DNA izolirana je metodom fenol/kloroform. U prvoj fazi manji volumen pune krvi (2 do 5 ml) dodan je u polipropilensku epruvetu (Falcon) od 50 ml te je epruveta do 45 ml nadopunjena otopinom 1x RETIC (5x RETIC: 40,9 g NaCl, 1,85 g KCl, 7,1 g MgCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O, 1 l dH<sub>2</sub>O). Smjesa pufera i krvi promiješana je te su uzorci centrifugirani 10 min na 5000 rpm pri 4 °C (Eppendorf, Centrifuge 5403). Supernatant je uklonjen, a talogu leukocita ponovno je dodana otopina 1x RETIC te je smjesa centrifugirana. Nakon uklanjanja supernatanta talogu je dodano 30 ml otopine za lizu (131 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, dH<sub>2</sub>O), te je smjesa centrifugirana 10 min na 5000 rpm pri 4 °C. Postupak je ponovljen. Staničnom talogu dodano je 500 µl pufera STE (0,1 M NaCl, 0,05 M Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4). Suspenzija stanica premještena je u tubicu od 2 ml i dodano je 15 µl proteinaze K (20 mg/ml, Sigma, SAD). S pomoću drmalice suspenzija je dobro promiješana i zatim

inkubirana na 37 °C preko noći. U drugoj je fazi suspenziji, nakon što je ohlađena na sobnu temperaturu, dodano 500 µl fenola (Kemika, RH), nakon čega su nastale dvije faze. Laganim miješanjem tijekom 10 min nastala je emulzija. Emulzija je centrifugirana 10 min na 5000 rpm pri 4 °C, što je dovelo do razdvajanja faza. Gornji sloj, koji je činila vodena faza, izdvojen je u čistu, sterilnu epruvetu. Pročišćavanje je provedeno još dva puta. Vodena je faza nakon toga pročišćena s 500 µl smjese kloroforma i izoamilnog alkohola u omjeru 24 : 17 te je smjesa promućkana i centrifugirana 10 min na 5000 rpm pri 4 °C. Gornja je faza premještena u novu epruvetu i iz pročišćene vodene faze DNA je precipitirana s 500 µl hladnoga (–20 °C) apsolutnog etanola (Kemika, RH). Nakon centrifugiranja 1 min etanol je uklonjen, a talog DNA-a kratko se sušio na sobnoj temperaturi. Talog je zatim otopljen u 300 µl pufera TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) i ostavljen preko noći na 37 °C na termobloku. Nakon toga je određena koncentracija DNA-a. Uzorci su prikupljeni u periodu od siječnja 2020. do ožujka 2022.

#### 4.2.3 Određivanje koncentracije DNA-a

Koncentracija izolirane DNA u uzorcima izmjerena je s pomoću spektrofotometra (Ceceil, CE 2040, SAD). Za izračunavanje koncentracije DNA-a, izmjerena je optička gustoća ispitivanih uzoraka pri valnoj duljini od 260 nm. Korištene su kvarcne kivete u koje je otpipetirano 99 µl QH<sub>2</sub>O te 1 µl uzorka. S pomoću izmjerene optičke gustoće (OD) izračunana je masena koncentracija ( $\gamma$ ) DNA-a u uzorku prema formuli:

$$\gamma = OD \times R \times \varepsilon$$

gdje je:  $\gamma$  = masena koncentracija µg/ml

OD = optička gustoća očitana pri valnoj duljini od 260 nm

R = razrjeđenje u kivetu

$\varepsilon$  = ekstincijski koeficijent za DNA (50 µg/ml)

Čistoća DNA-a provjerena je mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm te izračunavanjem omjera A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> koji je trebao biti između 1,65 i 1,85. Kvaliteta izolirane DNA provjerena je horizontalnom elektroforezom u 1-postotnom gelu agaroze (Sigma).

#### 4.2.4 Real-time PCR analiza SNP-a

Za analizu polimorfizma miR-124 (rs531564) primijenjena je metoda *real-time* PCR i komercijalno dostupan specifični genotipizacijski esej TaqMan® SNP (Applied Biosystems). U optičkim tubicama od 0,2 ml pripremljena je reakcijska smjesa koja se sastojala od 100 ng DNA-a, 1,25 µl eseja, 12,5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena od 25 µl. Reakcija se odvijala u uređaju 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) pod sljedećim uvjetima: 50 °C kroz 2 min, 95 °C kroz 10 min te 40 ciklusa od 92 °C 15 s te 60 °C 1 min.

Produkti reakcije PCR-a analizirani su na istom uređaju s pomoću programa 7300 System SDS Software za alelnu diskriminaciju (Applied Biosystems).

#### 4.2.5 Statističke metode

Podaci su prikazani tablično i grafički. Napravljena je analiza normalnosti raspodjele numeričkih podataka (Smirnov-Kolmogorovljev test) te su se shodno dobivenim rezultatima primijenili odgovarajući neparametrijski statistički testovi. Kvantitativni podaci prikazani su kroz medijane i interkvartilne raspone. Kategorijski podaci prikazani su kroz apsolutne frekvencije i pripadajuće udjele. Razlike u kvantitativnim vrijednostima analizirane su Mann-Whitneyjevim U-testom kod razlika koje su se odnosile na usporedbu kontinuiranih vrijednosti između dviju skupina. Razlike u kategorijskim varijablama su analizirane Fisher-Freeman-Haltonovim egzaktnim testom.

Metodom izračuna veličine uzorka, uz razinu značajnosti  $\alpha = 0,05$ ; snagu testa od 80 %, očekivanu pojavnost mutacije u općoj populaciji od 5 % te apsolutnu grešku u preciznosti mjerenja od 10 %, potrebno je uključiti 19 ispitanika po skupini.<sup>[180,181]</sup>

Sve p-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su značajnima. U analizi je primijenjena licencirana programska podrška IBM SPSS Statistics for Windows, verzija 29.0.1.

## 5. REZULTATI

### 5.1 Klinički i sociodemografski pokazatelji ispitanika

#### 5.1.1 Zastupljenost dijagnoza na cjelokupnom uzorku

Opisna statistika zastupljenosti pojedinih dijagnoza izolirano i u kombinacijama na cjelokupnom uzorku prikazana je u tablici 1. Pacijenata samo s CD-om bilo je 32 (33,0 %), samo s UK-om 29 (29,9 %), kombinacija upalne bolesti crijeva s PSC-om 31 (32,0 %), a samo s PSC-om 5 (5,2 %).

**Tablica 1.** Opisna statistika zastupljenosti pojedinih dijagnoza izolirano i u kombinacijama na cjelokupnom uzorku

		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>95 % CI</b>	
CB	Ne	56	57,7 %	47,8 %	67,2 %
	Da	41	42,3 %	32,8 %	52,2 %
UK	Ne	46	47,4 %	37,7 %	57,3 %
	Da	51	52,6 %	42,7 %	62,3 %
PSC	Ne	61	62,9 %	53,0 %	72,0 %
	Da	36	37,1 %	28,0 %	47,0 %
Dijagnoza	CB	32	33,0 %	24,2 %	42,7 %
	UK	29	29,9 %	21,5 %	39,5 %
	PSC + CB	9	9,3 %	4,7 %	16,2 %
	PSC + UK	22	22,7 %	15,2 %	31,7 %
	PSC	5	5,2 %	2,0 %	10,9 %

### *5.1.2 Opisna statistika kategorijskih sociodemografskih i kliničkih varijabli na cjelokupnom uzorku*

U cjelokupnom uzorku, 48,5 % ispitanika bilo je ženskog spola (95 % CI: 38,7 – 58,3), dok je 51,5 % bilo muškog spola (95 % CI: 41,7 – 61,3). Biološku terapiju upotrebljavalo je 55,4 % ispitanika (95 % CI: 45,2 – 65,3), dok je 44,6 % nije upotrebljavalo (95 % CI: 34,7 – 54,8). Kirurgija zbog UBC-a nije provedena kod 68,5 % ispitanika (95 % CI: 58,5 – 77,3), dok je 31,5 % ispitanika prošlo ovu kiruršku intervenciju (95 % CI: 22,7 – 41,5). Maligna bolest nije bila prisutna kod 90,7 % ispitanika (95 % CI: 83,8 – 95,3), dok je 9,3 % ispitanika imalo malignu bolest (95 % CI: 4,7 – 16,2). Steroid-ovisnu bolest nije imalo 94,6 % ispitanika (95 % CI: 88,5 – 97,9), dok je 5,4 % ispitanika imalo ovu ovisnost (95 % CI: 2,1 – 11,5). Duboku remisiju bolesti postiglo je 67,4 % ispitanika (95 % CI: 57,4 – 76,3), dok 32,6 % nije postiglo remisiju (95 % CI: 23,7 – 42,6). Većina ispitanika, njih 79,6 %, nije pušila (95 % CI: 70,5 – 86,8), dok je 20,4 % ispitanika pušilo (95 % CI: 13,2 – 29,5). Transplantacija jetre nije bila potrebna kod 89,5 % ispitanika (95 % CI: 76,9 – 96,3), dok je 10,5 % ispitanika prošlo transplantaciju (95 % CI: 3,7 – 23,1). Ekstraintestinalne manifestacije nisu bile prisutne kod 93,5 % ispitanika (95 % CI: 87,1 – 97,2), a kod 6,5 % jesu (95 % CI: 2,8 – 12,9). Među oboljelima od CB-a 31,7 % ispitanika imalo je zahvaćen terminalni ileum (L1), 24,4 % kolon (L2), 41,4 % ileokolon, 17,1 % gornji probavni trakt (L4), a 21 % perianalnu bolest. Prema ekstenziji među oboljelima od UK-a, proktitis (E1) je imalo 2 % ispitanika, ljevostrani kolitis (E2) 22 %, a ekstenzivni kolitis (E3) 76 %.

### *5.1.3 Opisna statistika ispitivanih kontinuiranih kliničkih i sociodemografskih karakteristika na cjelokupnom uzorku*

Medijan dobi pri dijagnozi (interkvartilni raspon) iznosio je 27,10 godina (19,79 – 33,66). Medijan dobi početka biološke terapije je iznosio 32,59 godina (21,68 – 39,23), a trajanje bolesti pri početku biološke terapije 4,37 godina (1,59 – 10,00). Indeks tjelesne mase (BMI) iznosio je 22,50 (20,40 – 27,10) a medijan hospitalizacija zbog UBC-a 1,00 (0,00 – 3,00).



#### 5.1.4 Usporedba kliničkih pokazatelja i ishoda liječenja među skupinama ispitanika

Razlike kategorijskih kliničkih karakteristika i ishoda liječenja između skupina s UBC-om i UBC-om uz PSC prikazane su u tablici 2. U skupini ispitanika s UBC-om/PSC-om manje je bolesnika liječeno biološkom terapijom ( $p = 0,001$ ). U usporedbi ostalih varijabli utvrđene su samo numeričke razlike.

U usporedbi kontinuiranih kliničkih pokazatelja i ishoda liječenja dobiveni su sljedeći rezultati. Dob pri dijagnozi bolesnika s UBC-om imala je medijan od 28,1 godine (20,7 – 36,5), dok je kod UBC-a/PSC-a iznosio 25,8 godina (17,4 – 28,9;  $p = 0,0698$ ). Dob početka biološke terapije kod bolesnika s UBC-om imala je medijan od 33,3 godine (22,9 – 40,2), dok je kod bolesnika s UBC-om/PSC-om iznosio 29 godina (20,8 – 33,7;  $p = 0,2355$ ). Trajanje bolesti pri početku imalo je medijan od 22,6 godina (1,5 – 10,4) u skupini bolesnika s UBC-om, dok je kod bolesnika s UBC-om/PSC-om iznosio 22,4 godine (4,4 – 6,2;  $p = 0,7159$ ). Indeks tjelesne mase u skupini bolesnika s UBC-om imao je medijan od 21,70 kg/m<sup>2</sup> (20,6 – 27,1), a kod bolesnika s UBC-om/PSC-om bio je 23,50 kg/m<sup>2</sup> (20,1 – 24,8;  $p = 0,6272$ ). Broj hospitalizacija zbog UBC-a imao je medijan od 2 u skupini bolesnika s UBC-om (1 – 3) a u skupini s UBC-om/PSC-om medijan broja hospitalizacija bio je 1 (0 – 3;  $p = 0,0625$ ). Sve razlike među skupinama bile su numeričke.

**Tablica 2.** Razlike kategorijskih kliničkih karakteristika i ishoda liječenja bolesnika među skupinama s UBC i UBC uz PSC: Fisherov egzakti test

		UBC		UBC+PSC		
		N	%	N	%	
Spol	Ženski	33	54,0 %	12	38,7 %	0,1900
	Muški	28	46,0 %	19	61,3 %	
Biološka terapija	Ne	20	32,8 %	21	67,8 %	0,0018
	Da	41	67,2 %	10	32,2 %	
Više linija biološke terapije	Ne	42	68,9 %	24	77,5 %	0,4675
	Da	19	31,1 %	7	22,5 %	
UBC kirurgija	Ne	38	62,3 %	25	80,7 %	0,0974
	Da	23	37,7 %	6	19,3 %	
Maligna bolest	Ne	57	93,5 %	26	83,9 %	0,1586
	Da	4	6,5 %	5	16,1 %	
Steroid-ovisna bolest	Ne	59	96,8 %	28	90,4 %	0,1586
	Da	2	3,2 %	3	9,6 %	
Duboka remisija bolesti	Ne	21	34,5 %	9	29,1 %	0,6456
	Da	40	65,5 %	22	70,9 %	
EIM	Ne	57	93,5 %	29	93,6 %	1,000
	Da	4	6,5 %	2	6,4 %	

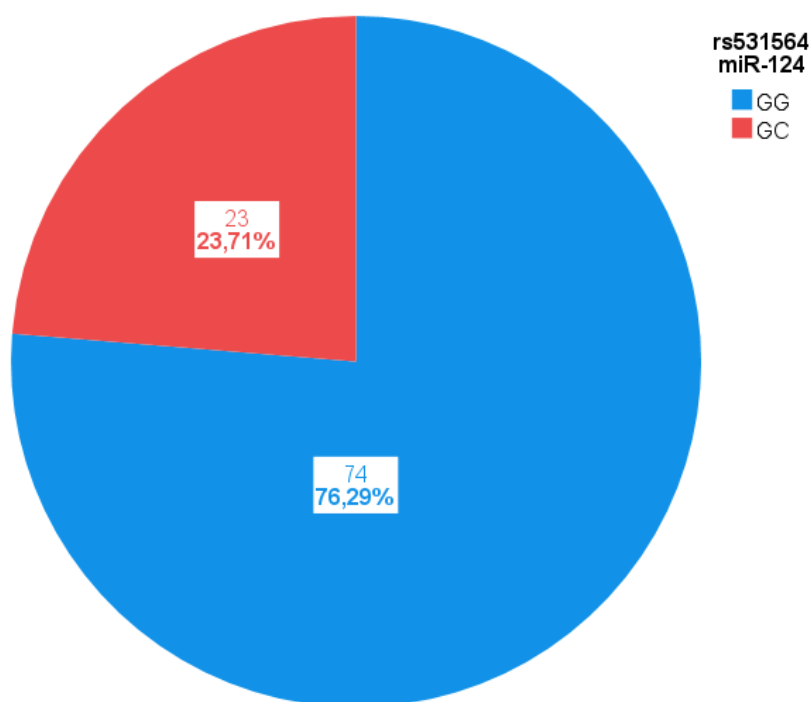
## 5.2 Učestalost genotipa SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 u ispitivanim skupinama

### 5.2.1 Zastupljenost polimorfizama gena rs531564 miR-124 na cjelokupnom uzorku

Zastupljenost polimorfizama gena rs531564 miR-124 na cjelokupnom uzorku prikazana je u tablici 3 i na slici 1. Varijanta GG je bila zastupljena u više od tri četvrtine ispitanika (76,3 %).

**Tablica 3.** Zastupljenost polimorfizama gena rs531564 miR-124 na cjelokupnom uzorku

		N	%	95 % CI	
rs531564 miR-124	GG	74	76,3 %	67,1 %	83,9 %
	GC	23	23,7 %	16,1 %	32,9 %



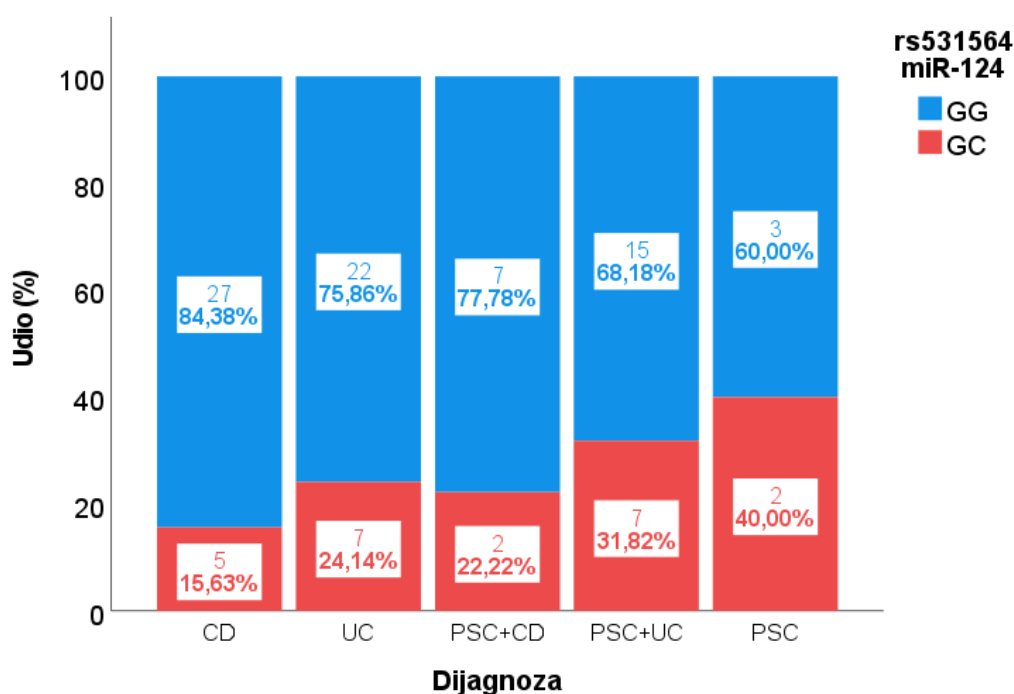
**Slika 1.** Zastupljenost polimorfizama gena rs531564 miR-124 na cjelokupnom uzorku

### 5.2.2 Zastupljenost polimorfizama gena rs531564 miR-124 prema ispitivanim skupinama

Učestalost genotipa SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 u bolesnika sa specifičnim fenotipom PSC-a/UCB-a, u bolesnika s upalnom bolešću crijeva te u bolesnika s PSC-om prikazana je u tablici 4 i na slici 2. Među skupinama je utvrđena numerička razlika zastupljenosti pojedinih genotipova ( $p = 0,543$ ).

**Tablica 4.** Učestalost genotipa SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 u bolesnika sa specifičnim fenotipom PSC-a/UCB-a, u bolesnika s upalnom bolešću crijeva te u bolesnika s PSC-om

		rs531564 miR-124				P
		GG		GC		
		N	%	N	%	
	CB	27	84,4 %	5	15,6 %	
	UK	22	75,9 %	7	24,1 %	
Dijagnoza	PSC + CB	7	77,8 %	2	22,2 %	0,543
	PSC + UK	15	68,2 %	7	31,8 %	
	PSC	3	60,0 %	2	40,0 %	

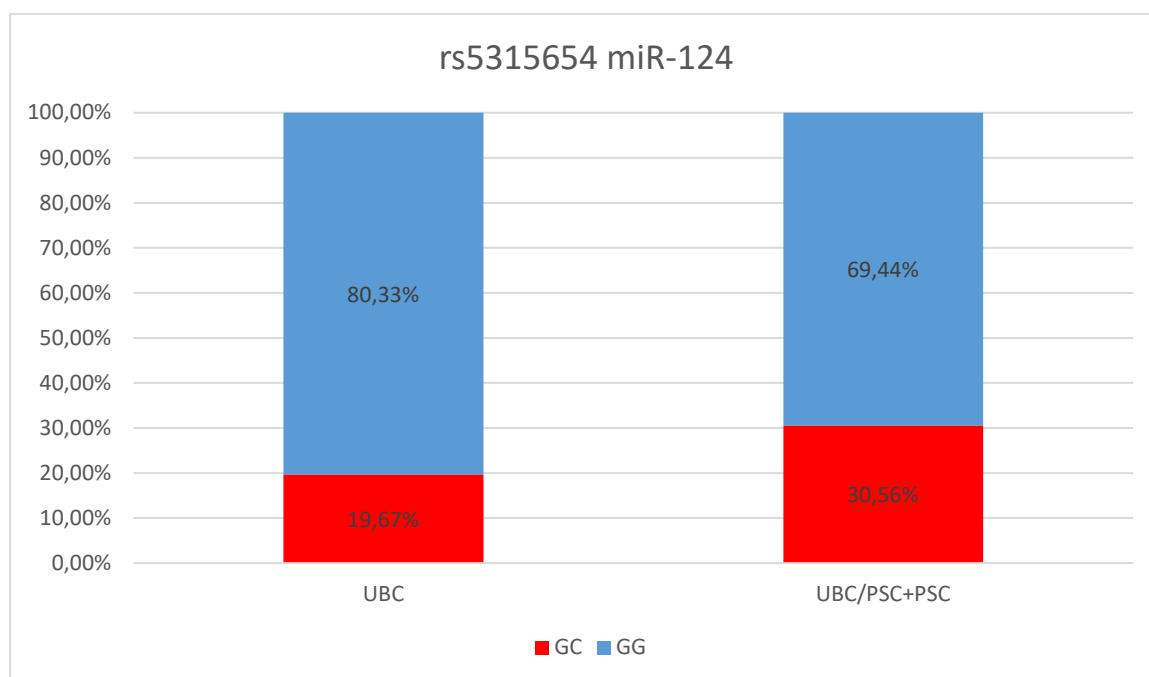


**Slika 2.** Učestalost genotipa SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 u bolesnika sa specifičnim fenotipom PSC-a/UCB-a, u bolesnika s upalnom bolešću crijeva te u bolesnika s PSC-om

Učestalost genotipa polimorfizma jednog nukleotida (SNP) (rs531564) gena za pri-miR-124 u bolesnika s upalnom bolešću crijeva i u oboljelih od primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa i upalne bolesti crijeva prikazana je u tablici 5 i na slici 3. Iako je genotip GC bio zastupljeniji u skupini s PSC-om i/ili upalnim bolestima u odnosu na samo upalne bolesti crijeva, te su razlike numeričke ( $p = 0,223$ ).

**Tablica 5.** Učestalost genotipa polimorfizma jednog nukleotida (SNP) (rs531564) gena za pri-miR-124 u bolesnika s upalnom bolešću crijeva i u oboljelih od primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa i upalne bolesti crijeva

		rs531564 miR-124				P
		GG		GC		
		N	%	N	%	
Dijagnoza	UBC	49	80,3 %	12	19,7 %	0,223
	UBC/PSC + PSC	25	69,4 %	11	30,6 %	



**Slika 3.** Učestalost genotipa polimorfizma jednog nukleotida (SNP) (rs531564) gena za pri-miR-124 u bolesnika s upalnom bolešću crijeva i u oboljelih od primarnoga sklerozirajućeg kolangitisa i upalne bolesti crijeva

### **5.3 Povezanost SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 s kliničkim karakteristikama bolesnika s upalnom bolešću crijeva**

#### *5.3.1 Povezanost SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 s kliničkim karakteristikama bolesnika s Crohnovom bolešću*

U usporedbi učestalosti genotipa SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 s kategorijskim kliničkim karakteristikama bolesnika s CB-om utvrđene su samo numeričke razlike primjenom Fisherova egzaktnog testa. U analizu su uključeni bolesnici s CB-om i PSC-om/CB-om.

Analizom podataka pronađena je numerička razlika u distribuciji genotipova GG i GC prema spolu. Genotip GG bio je jednako zastupljen među bolesnicama i bolesnicima (50,0 %, N = 17 za oba spola,  $p = 1,000$ ), dok je genotip GC bio nešto češći među bolesnicama (57,1 %, N = 4) nego među bolesnicima (42,9 %, N = 3;  $p = 1,000$ ).

Kad je riječ o ekstenziji bolesti, u zahvaćenosti različitih dijelova gastrointestinalnog trakta također su utvrđene samo numeričke razlike između genotipova. Terminalni ileum bio je zahvaćen kod 35,3 % bolesnika s genotipom GG (N = 12) u usporedbi s 14,3 % bolesnika s genotipom GC (N = 1;  $p = 0,399$ ). Slično, zahvaćenost kolona zabilježena je kod 26,5 % bolesnika s genotipom GG (N = 9) i 14,3 % bolesnika s genotipom GC (N = 1;  $p = 0,660$ ). Iako su oba genotipa pokazala sličnu zastupljenost u ileokolitisu, 38,2 % bolesnika s genotipom GG (N = 13) i 57,1 % bolesnika s genotipom GC (N = 4;  $p = 0,421$ ) te zahvaćenosti gornjega gastrointestinalnog trakta (14,7 %, N = 5 kod GG naspram 28,6 %, N = 2 kod GC;  $p = 0,581$ ), nijedna od tih razlika nije bila statistički značajna. Perianalna bolest također nije pokazala bitne razlike između genotipova, zabilježena je kod 23,5 % bolesnika s genotipom GG (N = 8) i kod 14,3 % bolesnika s genotipom GC (N = 1;  $p = 1,000$ ).

Ishodi liječenja, uključujući primjenu biološke terapije i broj linija biološke terapije, također su pokazali samo numeričke razlike između genotipova. Biološka terapija primijenjena je kod 70,6 % bolesnika s genotipom GG (N = 24) i 57,1 % bolesnika s genotipom GC (N = 4;  $p = 0,659$ ). Više linija biološke terapije upotrebljavalo je 38,2 % bolesnika s genotipom GG (N = 13) i 28,6 % bolesnika s genotipom GC (N = 2;  $p = 0,697$ ). Sličan obrazac primijećen je i kod UBC kirurgije, gdje su genotipovi GG i GC pokazali jednaku zastupljenost u polovici slučajeva (50,0 %, N = 17 za GG i 57,1 %, N = 4 za GC;  $p = 1,000$ ). Kad je riječ o steroid-

ovisnoj bolesti, genotip GG nije bio povezan s ovim ishodom u 97,1 % slučajeva (N = 33), dok genotip GC nije bio povezan u svih 100 % slučajeva (N = 7; p = 1,000).

Analiza malignih bolesti, duboke remisije bolesti, pušenja, transplantacije jetre i prisutnosti ekstraintestinalnih manifestacija (EIM) također nije pokazala značajne razlike između genotipova. Maligne bolesti zabilježene su kod 11,8 % bolesnika s genotipom GG (N = 4), dok nijedan bolesnik s genotipom GC nije imao malignu bolest (0,0 %, N = 0; p = 1,000). Duboka remisija postignuta je kod 61,8 % bolesnika s genotipom GG (N = 21) i kod 71,4 % bolesnika s genotipom GC (N = 5; p = 1,000). Pušenje je bilo prisutno kod 20,6 % bolesnika s genotipom GG (N = 7) i kod 28,6 % bolesnika s genotipom GC (N = 2; p = 0,637). Ekstraintestinalne manifestacije (EIM) nisu bile prisutne kod 91,2 % bolesnika s genotipom GG (N = 31) i kod 100 % bolesnika s genotipom GC (N = 7; p = 1,000).

Usporedba učestalosti genotipa SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 u odnosu na kontinuirane varijable provedena je primjenom Mann-Whitneyjeva U-testa. U analizu su uključeni bolesnici s CB-om i CB-om/PSC-om.

Kod bolesnika s različitim genotipovima rs531564 miR-124 uočene su numeričke varijacije u dobi pri dijagnozi, dobi početka biološke terapije, trajanju bolesti prije početka terapije, indeksu tjelesne mase (BMI) te broju hospitalizacija zbog UBC-a.

Kad je riječ o dobi pri dijagnozi, bolesnici s genotipom GG imali su medijan od 26,24 godine (18,18 – 37,89; p = 0,782), dok su bolesnici s genotipom GC imali nešto viši medijan od 28,77 godina (15,49 – 31,77). Dob početka biološke terapije kod bolesnika s genotipom GG imala je medijan od 32,66 godina (21,32 – 40,82; p = 0,149), dok je kod bolesnika s genotipom GC medijan bio niži, iznoseći 21,29 godina (17,48 – 33,96).

Trajanje bolesti prije početka biološke terapije također je variralo. Bolesnici s genotipom GG imali su medijan trajanja bolesti od 5,17 godina (1,79 – 12,29; p = 0,251), dok su bolesnici s genotipom GC imali kraće trajanje bolesti, s medijanom od 3,59 godina (1,18 – 5,16). Kad je riječ o indeksu tjelesne mase (BMI), bolesnici s genotipom GG imali su medijan od 21,35 kg/m<sup>2</sup> (19,08 – 24,13; p = 0,583), dok je kod bolesnika s genotipom GC medijan BMI-ja bio viši, iznoseći 22,90 kg/m<sup>2</sup> (18,20 – 31,80).

Konačno, broj hospitalizacija zbog UBC-a kod bolesnika s genotipom GG imao je medijan od 2,00 hospitalizacije (1,00 – 4,00; p = 0,561), dok su bolesnici s genotipom GC imali isti medijan od 2,00 hospitalizacije (1,00 – 8,00), ali s većom varijabilnošću.

### *5.3.2 Povezanost SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 s kliničkim karakteristikama bolesnika s ulceroznim kolitisom*

Razlike SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 s kategorijskim kliničkim karakteristikama bolesnika s upalnom bolešću crijeva kod pacijenata s UK-om analizirane su primjenom Fisherova egzaktnog testa. U analizu su uključeni bolesnici s UK-om i UK-om/PSC-om. U usporedbi prema spolu, genotip GG bio je prisutan kod 43,2 % žena (N = 16) i 56,8 % muškaraca (N = 21; p = 0,531), dok je genotip GC bio prisutan kod 57,1 % žena (N = 8) i 42,9 % muškaraca (N = 6; p = 0,531).

Kad je riječ o ekstenziji bolesti, proktitis nije bio prisutan kod 97,3 % pacijenata s genotipom GG (N = 36) i kod 100 % pacijenata s genotipom GC (N = 14; p = 1,000). Ljevostrani kolitis zabilježen je kod 27 % pacijenata s genotipom GG (N = 10) i kod 7,1 % pacijenata s genotipom GC (N = 1; p = 0,251), dok je ekstenzivni kolitis bio prisutan kod 70,3 % pacijenata s genotipom GG (N = 26) i kod 85,7 % pacijenata s genotipom GC (N = 12; p = 0,472).

Kad je riječ o ishodima liječenja, biološka terapija nije primijenjena kod 54,1 % pacijenata s genotipom GG (N = 20) i kod 57,1 % pacijenata s genotipom GC (N = 8; p = 1,000). Više linija biološke terapije bilo je primijenjeno kod 24,3 % pacijenata s genotipom GG (N = 9) i kod 14,3 % pacijenata s genotipom GC (N = 2; p = 0,705). Kirurški zahvat za UBC proveden je kod 16,2 % pacijenata s genotipom GG (N = 6) i kod 21,4 % pacijenata s genotipom GC (N = 3; p = 0,692). Steroid-ovisna bolest zabilježena je kod 5,4 % pacijenata s genotipom GG (N = 2) i kod 14,3 % pacijenata s genotipom GC (N = 2; p = 0,300). Duboka remisija bolesti postignuta je kod 70,3 % pacijenata s genotipom GG (N = 26) i kod 71,4 % pacijenata s genotipom GC (N = 10; p = 1,000).

Pušenje je bilo prisutno kod 18,9 % pacijenata s genotipom GG (N = 7) i kod 21,4 % pacijenata s genotipom GC (N = 3; p = 1,000).

Ekstraintestinalne manifestacije nisu bile prisutne kod 94,6 % pacijenata s genotipom GG (N = 35) i kod 92,9 % pacijenata s genotipom GC (N = 13; p = 1,000).

Razlike SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 u odnosu na kontinuirane kliničke karakteristike bolesnika s upalnom bolešću crijeva kod pacijenata s UK-om analizirane su primjenom Mann-Whitneyjeva U-testa. U analizu su uključeni bolesnici s UK-om i UK-om/PSC-om.

U istraživanju su analizirane varijable povezane s dobi pri dijagnozi, dobi početka biološke terapije, trajanjem bolesti prije početka terapije, BMI-jem i brojem hospitalizacija zbog UBC-a kod bolesnika s različitim genotipovima rs531564 miR-124.

Kod dobi pri dijagnozi, bolesnici s genotipom GG imali su medijan od 30,52 godine (20,69 – 36,02;  $p = 0,019$ ), dok je kod bolesnika s genotipom GC bio 21,95 godina (17,73 – 27,06).

Kad je riječ o dobi početka biološke terapije, medijan za bolesnike s genotipom GG bio je 35,60 godina (26,33 – 41,38;  $p = 0,049$ ), dok je za bolesnike s genotipom GC medijan iznosio 27,33 godine (20,38 – 32,76).

Trajanje bolesti prije početka biološke terapije kod bolesnika s genotipom GG imalo je medijan od 4,00 godine (1,59 – 9,01;  $p = 0,834$ ), dok je kod bolesnika s genotipom GC medijan bio 4,67 godina (1,10 – 7,50).

Indeks tjelesne mase kod bolesnika s genotipom GG pokazao je medijan od 25,30 (20,90 – 29,30;  $p = 0,388$ ), dok je kod bolesnika s genotipom GC medijan bio 22,50 (21,93 – 26,75).

Broj hospitalizacija zbog UBC-a kod bolesnika s genotipom GG imao je medijan od 1,00 (0,00 – 2,00;  $p = 0,534$ ), dok je kod bolesnika s genotipom GC medijan bio 1,00 (0,00 – 3,00).



#### **5.4 Povezanost SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 s kliničkim karakteristikama bolesnika s primarnim sklerozirajućim kolitisom**

Razlike SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 i njihova povezanost s kategorijskim kliničkim karakteristikama bolesnika s PSC-om analizirane su primjenom Fisherova egzaktnog testa. U analizu su uključeni svi bolesnici s PSC-om, ali i UBC-om/PSC-om.

Ishodi liječenja: Kad su u pitanju ishodi liječenja, manji postotak pacijenata s genotipom GG (36,4 %, N = 8; p = 0,677) i GC (22,2 %, N = 2) bio je podvrgnut biološkoj terapiji. Više linija biološke terapije primijenjeno je kod 27,3 % pacijenata s genotipom GG (N = 6; p = 0,639) i 11,1 % pacijenata s genotipom GC (N = 1), što može ukazivati na razlike u odgovoru na liječenje ili progresiji bolesti. Kirurški zahvati za UBC provedeni su kod malog broja pacijenata, s 18,2 % u skupini s genotipom GG (N = 4; p = 1,000) i 22,2 % u skupini s genotipom GC (N = 2). Zabilježena je i slična učestalost duboke remisije bolesti između genotipova GG (68,2 %, N = 15; p = 0,689) i GC (77,8 %, N = 7), dok je steroid-ovisna bolest bila prisutna kod malog broja pacijenata, neovisno o genotipu (GG 9,1 %, GC 11,1 %; p = 1,000).

Također, transplantacija jetre provedena je kod 12,0 % pacijenata s genotipom GG (N = 3; p = 1,000) i 9,1 % pacijenata s genotipom GC (N = 1).

Dodatne karakteristike: Pušenje je bilo prisutno kod 21,7 % pacijenata s genotipom GG (N = 5; p = 0,648) i 11,1 % pacijenata s genotipom GC (N = 1). Maligna bolest bila je nešto češća kod pacijenata s genotipom GG (16,0 %, N = 4; p = 1,000) nego kod pacijenata s genotipom GC (9,1 %, N = 1).

Razlike SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 i njihova povezanost s kontinuiranim kliničkim karakteristikama bolesnika s PSC-om analizirane su primjenom Mann-Whitneyjeva U-testa. U analizu su uključeni svi bolesnici s PSC-om, ali i UBC-om/PSC-om.

U istraživanju su analizirane varijable povezane s dobi pri dijagnozi, dobi početka biološke terapije, trajanjem bolesti prije početka terapije, indeksom tjelesne mase (BMI) i brojem hospitalizacija zbog UBC-a kod bolesnika s različitim genotipovima rs531564 miR-124.

Kod dobi pri dijagnozi, bolesnici s genotipom GG imali su medijan od 25,52 godine (16,95 – 33,59;  $p = 0,604$ ), dok je kod bolesnika s genotipom GC medijan bio 26,59 godina (16,74 – 27,97).

Kad je riječ o dobi početka biološke terapije, bolesnici s genotipom GG započeli su terapiju s medijanom od 29,27 godina (20,86 – 35,19;  $p = 0,296$ ), dok je kod bolesnika s genotipom GC medijan iznosio 24,86 godina (12,85 – 28,78).

Trajanje bolesti prije početka biološke terapije kod bolesnika s genotipom GG imalo je medijan od 5,50 godina (3,28 – 7,28;  $p = 0,794$ ), dok je kod bolesnika s genotipom GC to trajanje bilo 5,08 godina (3,13 – 8,84).

Indeks tjelesne mase (BMI) kod bolesnika s genotipom GG bio je 21,70 (18,80 – 24,73;  $p = 0,223$ ), dok je kod bolesnika s genotipom GC medijan bio 23,50 (21,80 – 27,80).

Broj hospitalizacija zbog UBC-a imao je medijan od 0,50 (0,00 – 3,25;  $p = 0,798$ ) kod bolesnika s genotipom GG, dok je kod bolesnika s genotipom GC medijan bio 1,00 (0,00 – 3,50).

Ovi rezultati ukazuju na određene varijacije između genotipova u pogledu kliničkih karakteristika, ali bez statistički značajnih razlika, što sugerira potrebu za daljnjim istraživanjima kako bi se bolje razumjele moguće povezanosti genotipa s ishodom bolesti.

## 6. RASPRAVA

Upalne bolesti crijeva kronične su upalne bolesti čija etiopatogeneza nije u potpunosti razjašnjena. Međutim, jasno je da je riječ o neadekvatnom imunom odgovoru u osoba koje imaju određenu gensku predispoziciju uz prisutne vanjske čimbenike koji pridonose patogenezi. Iako su dosadašnjim istraživanjima jasno definirana dva glavna entiteta, Crohnova bolest i ulcerozni kolitis, među njima, a i unutar svakog od njih postoje znatne varijacije. Pritom je očita velika raznolikost u kliničkom tijeku bolesti, njezinoj ekstenziji, dobi početka bolesti, odgovoru na terapiju, razvoju komplikacija itd. Te pojedinačne razlike, prisutne gotovo na razini svakog bolesnika, predmet su brojnih istraživanja i vode prema onome što zovemo personalizirana medicina.

Među brojnim varijacijama u skupini upalnih bolesti crijeva, posebno se izdvaja fenotip koji se javlja u oboljelih od UBC-a i PSC-a. Epidemiološki gledano, riječ je o razmjerno rijetkoj pojavi, odnosno malobrojnoj skupini bolesnika. Međutim, ako pogledamo iz perspektive oboljelih od PSC-a, oko 80 % ima konkomitantnu upalnu bolest crijeva, a ovisno o izvoru podataka, te brojke variraju od 40 do 90 %. Rezultati naše kohorte u skladu su s dosadašnjim podacima u literaturi te je 86 % oboljelih od PSC-a imalo i UBC. S druge strane, među oboljelima od UBC-a oko 5 % imat će i pridruženi PSC. Epidemiološki podaci za Hrvatsku nisu dostupni te se ne mogu uspoređivati s globalnima, ali nema dokaza koji bi upućivali da su među njima prisutne znatne razlike. Osim epidemiološke povezanosti s PSC-om, ovaj fenotip UBC-a ima i druge karakteristike koje ga izdvajaju od ostalih. U bolesnika s UK-om, inicijalna ekstenzija bolesti je pankolitis u približno 90 % bolesnika, uz karakterističnu poštedu rektuma i takozvani *backwash* ileitis, odnosno retrogradno zahvaćanje terminalnog ileuma upalom. Dijagnoza upalne bolesti crijeva postavlja se u ranijoj životnoj dobi, između 20. i 25. godine, češće se javlja u muškaraca uz uglavnom blagi klinički tijek crijevne upale.<sup>[7]</sup> Naši su rezultati uglavnom u skladu s tim podacima. Svi uključeni bolesnici s UK-om uz PSC imali su ekstenzivni kolitis, medijan dobi pri postavljanju dijagnoze bio je između 25 i 26 godina te je zabilježena veća učestalost među ispitanicima muškog spola (ukupno 69,4 %). Sam se tijekom bolesti klinički indirektno očitovao kao blaži, što je vidljivo iz toga što je značajno manje bolesnika iz skupine s UBC-om/PSC-om liječeno biološkom terapijom. Također, za numerički manje bolesnika bila je potrebna hospitalizacija zbog UBC-a, kirurški zahvat ili više linija biološke terapije, a većinom su postigli duboku remisiju bolesti bez ovisnosti o steroidima. Za navedene varijable ipak nije postignuta statistička značajnost u našem uzorku.

U literaturi su opisane i zasebne fenotipske karakteristike onih oboljelih od CB-a uz pridruženi PSC. Prema ekstenziji bolesti, u literaturi se navodi da je najčešće zahvaćen kolon (od 37 do 82 % bolesnika), aktivnosti bolesti jednaka je ili blaža u usporedbi s oboljelima samo od CB-a, uz nižu incidenciju striktura i fistula.<sup>[173]</sup> Ti su podaci također u skladu s našim rezultatima, gdje je 66 % bolesnika imalo zahvaćen kolon, bilo kao izoliranu bolest kolona bilo ileokolitis. Ostali rezultati također ne odstupaju od onih koji proizlaze iz literature, poput mlađe dobi pri dijagnozi, blažega kliničkog tijeka i veće učestalosti među muškim spolom.

Fenotip UBC-a uz PSC ima još jednu karakteristiku, presudnu za nadzor i liječenje ovih bolesnika, a to je povišen rizik razvoja maligne bolesti. Navedeno je opisano kroz brojne radove u literaturi, a prvenstveno se odnosi na rizik razvoja KRK-a. Prema podacima koje iznose Leidenius i sur., desetogodišnji kumulativni rizik za razvoj displazije ili KRK-a maksimalno iznosi oko 11 %, dok je rizik u bolesnika oboljelih samo od upalne bolesti crijeva oko 2 %.<sup>[8]</sup> Podaci o povećanom riziku displazije ili karcinoma, potkrijepljeni su i velikom metaanalizom koju su proveli Zheng i sur., s više od 13 000 uključenih ispitanika. Autori su pronašli da su bolesnici s fenotipom UBC-a uz PSC imali povećani rizik od displazije i KRK-a u odnosu na bolesnike samo s UBC-om. Stratifikacija prema tipu UBC-a pokazuje da je prisutnost PSC-a povezana s povećanim rizikom razvoja neoplazije debelog crijeva kod pacijenata s UK-a, ali povezanost kod bolesnika s CB-om nije bila značajna.<sup>[174]</sup>

Također, prisutan je i značajno povišen rizik tzv. „ekstrakoloničkih” karcinoma, a pritom se primarno misli na kolangiocelularni karcinom. Stoga bolesnici s UBC-om i PSC-om zahtijevaju posebno praćenje, odnosno intenzivan nadzor, koji uključuje redovite (godišnje) kolonoskopije i MRCP.<sup>[80,109]</sup> U našoj ispitivanoj skupini također je zabilježena numerički povišena prevalencija malignih bolesti u odnosu na skupinu s isključivo UBC-om, ali nije postignuta statistički značajna razlika. Riječ je bila o dva slučaja adenokarcinoma kolona i po jednom slučaju kolangiocelularnog i hepatocelularnog karcinoma. Dodatna analiza povezanih čimbenika rizika (poput primjerice konzumacije alkohola, obiteljske anamneze i sl.) nije učinjena jer izlazi izvan okvira ovog rada.

Opisana odstupanja od standardnoga kliničkog tijeka UK-a i CB-a potaknula su brojna istraživanja koja bi mogla objasniti te razlike. Kao mogući uzrok maligne alteracije kolona predložena je povećana koncentracija, moguće kancerogenih, sekundarnih žučnih kiselina, čemu u prilog govori i viša incidencija karcinoma u desnom kolonu, gdje je koncentracija sekundarnih žučnih kiselina i najviša. Također, jasno je i verificirana disregulacija homeostaze žučnih kiselina u kolonu. Kao što je ranije opisano, upalna bolest crijeva u tih bolesnika ima znatno blaži, čak i supklinički tijek te dugo može ostati neprepoznata. Zbog toga supklinička

upala u tih bolesnika traje znatno dulje prije nego što bude prepoznata i liječena i samim tim znatno povisuje rizik za razvoj karcinoma, a opisane su i razlike u mikrobioti između bolesnika s UBC-om i UBC-om/PSC-om.<sup>[9,10,176]</sup>

Međutim, unatoč sve većem broju istraživanja, konačan odgovor o uzroku ovih razlika još nije pronađen. Jasno je da je riječ o međudjelovanju više čimbenika, a dokazi u novijoj literaturi upućuju i na važnu ulogu miR. Te male, nekodirajuće RNA imaju važnu ulogu u cijelom nizu bioloških procesa, uključujući diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu stanica. Također, mogu imati i onkogenu ili tumor-supresorsku ulogu kroz djelovanje na ciljanu mRNA, a njihova je uloga ispitivana ne samo u gastroenterologiji nego i u drugim granama medicine poput kardiologije, onkologije i imunologije.<sup>[128,129,139,145,146]</sup> U području UBC-a, miR su ispitivane kao markeri kliničke, biokemijske i endoskopske aktivnosti, kao prediktori odgovora na terapiju ili čak prediktori kolorektalnog karcinoma. Pronađene su značajne korelacije serumske ekspresije miR-223 i miR-320a sa sedimentacijom eritrocita i CRP-om, odnosno kliničkim i endoskopskim pokazateljima težine bolesti.<sup>[149,150]</sup> Morilla i sur. pronašli su miR koji ima određenu prediktivnu vrijednost na odgovor za nekoliko vrsta terapije, uključujući biološku i temeljnu terapiju. Dodatno, opisana je i uloga u detekciji KRK-a, analizom profila miR u stolici bolesnika.<sup>[151,154]</sup> Sve navedeno jasno ukazuje na važnost miR u patogenezi i kliničkom tijeku UBC-a. Među njima se izdvaja miR-124, koja je u zadnje vrijeme u značajnom obujmu ispitivana u kontekstu uloge u patofiziologiji UBC-a, pa i u terapijskom smislu. Opisana je njezina važna uloga u održavanju integriteta crijevne barijere, regulacije signalnog puta STAT3 i karcinogeneze KRK-a. Navedena istraživanja dovela su do razvoja potencijalno nove terapijske opcije, „prvog-u-klasi” lijeka imena obefazimod, koji je trenutačno u fazi kliničkih ispitivanja, a djeluje na povišenje ekspresije miR-124 i posljedično reducira proinflamatorne citokine.<sup>[161,162,164]</sup>

Navedena je miR i glavna tema ovog istraživanja, odnosno njezin SNP (rs531564). Riječ je o jednom od češćih polimorfizama za pri-miR-124 koji je povezan s ekspresijom zrele miR-124. Ovisno o prisutnom alelu, formira se drugačija sekundarna struktura pri-miR, tj. prisutnost alela G rezultirat će promijenjenom konačnom strukturom u usporedbi s alelom C. Te strukturne razlike mogu znatno mijenjati stabilnost pri-miR te u konačnici utjecati na ekspresiju zrele miR. Prema rezultatima koje su dobili Qi i sur., postoji značajna razlika u ekspresiji zrele miR-124 povezana s genotipom. Tako genotip GC pokazuje 8,974 puta veću ekspresiju u usporedbi s genotipom CC i 1,248 puta veću ekspresiju u odnosu na genotip GG.<sup>[158]</sup> U ovom istraživanju nismo mjerili direktno ekspresiju miR-124, već određivali SNP u kontrolnoj i ispitivanoj skupini. Temeljeno na navedenim istraživanjima, razlike u SNP-u među skupinama

potencijalno dovode do različite ekspresije ciljnih miR i posljedično do opisanih fenotipskih razlika. Ako pogledamo naš cjelokupni uzorak, većina ispitanika je imala genotip GG, odnosno 76,3 %, dok je genotip GC utvrđen u 23,7 % ispitanika, a nisu izolirane varijante CC. Ti rezultati nisu u skladu s rezultatima koje su dobili Gao i sur., gdje je genotip GG utvrđen u značajno manjem udjelu ispitanika. Moguće je da navedene razlike proizlaze iz različitih populacija, gdje su Gao i sur. uključili oboljele od KRK-a i zdrave dobrovoljce, stoga direktna usporedba nije moguća.<sup>[180]</sup> Koliko nam je poznato, nijedna studija dosad nije analizirala ovaj SNP u populaciji oboljelih od UBC-a ili PSC-a. Prema našim rezultatima, genotip GG bio je učestaliji u skupini s UBC-om ako ih promatramo kao cjelinu (dakle UK i CB zajedno), ali i analizirano za svaku bolest zasebno. Također, bio je učestaliji i među onima s pridruženim PSC-om. Nijedna od razlika nije dosegla razinu statističke značajnosti. Takva distribucija podržava teoriju o većoj ekspresiji miR-124 u bolesnika s PSC-om i potencijalno blažu kliničku sliku UBC-a, ali je u suprotnosti s očekivanjima u smislu povišene pojavnosti malignih bolesti. U svakom slučaju, riječ je o rezultatima koji zahtijevaju daljnja istraživanja, duže praćenje bolesnika i veći uzorak kako bi mogli biti validirani i adekvatno interpretirani.

Ako pogledamo fenotipske karakteristike u smislu ekstenzije bolesti i prisutnih EIM-a, nismo pronašli značajne razlike prema genotipovima. U skupini ispitanika s UK-om, oni koji su imali varijantu polimorfizma GC bili su značajno mlađi te su u ranijoj životnoj dobi započinjali biološku terapiju u odnosu na ispitanike s varijantom polimorfizma GG. Moguće je da je navedeno posljedica same ranije dobi početka bolesti, a ne slika težine kliničkog tijeka.

Kod ispitanika s CB-om nije pronađena značajna razlika u distribuciji genotipova ni za jednu ispitivanu varijablu. Utvrđene su određene numeričke razlike među skupinama koje bi mogle ukazivati na blaži klinički tijek genotipa GC, poput numerički višeg postotka postizanja duboke remisije, manjeg udjela steroid-ovisne bolesti i potrebe za kirurškim zahvatom ili biološkom terapijom. Međutim, navedene razlike nisu bile statistički značajne.

Dodatno smo analizirali podatke za ispitanike s UBC-om i PSC-om. U bolesnika s genotipom GG utvrđen je veći broj oboljelih od maligne bolesti, veći udio bolesnika na biološkoj terapiji i onih liječenih s više linija terapije. Međutim, navedeno su samo numeričke razlike, nijedan rezultat nije dostigao statističku značajnost.

Koliko nam je poznato, naše je istraživanje prvo koje je ispitalo polimorfizam rs531564 u ovakvoj skupini ispitanika, stoga usporedbe s rezultatima drugih autora nisu moguće. Dostupni su ograničeni rezultati za SNP drugih miR, poput miR-146 rs2910164, za koji je utvrđen snižen rizik pojavnosti UK-a, međutim autori su analizirali UK kao cjelinu bez daljnje raščlambe na eventualne fenotipske karakteristike ili klinički tijek.<sup>[182]</sup>

Ovim istraživanjem nismo uspjeli potvrditi hipotezu o učestalosti genotipova SNP-a rs531564 gena za pri-miR-124 u populaciji oboljelih od UBC-a i UBC-a uz pridruženi PSC. Iako su utvrđene određene numeričke razlike među ispitivanim skupinama, statistička značajnost nije dostignuta. Ograničenje je ovog ispitivanja broj uključenih ispitanika koji zadovoljava potrebe statističke analize, ali uzorak je malen, što je djelomično i posljedica provođenja ispitivanja za vrijeme pandemije bolesti COVID-19, ali i same incidencije, odnosno prevalencije PSC-a. Ipak, može se očekivati da bi rezultati provedeni na većem broju ispitanika, prvenstveno u skupini oboljelih od PSC-a, doveli do značajnih razlika, pogotovo za varijable gdje je razlika bila blizu granice značajnosti. Važno je ograničenje ovog istraživanja da je provedeno u jednom centru, stoga je ekstrapolacija ovih rezultata na generalnu populaciju UBC-a i PSC-a bolesnika teška. Budući da je provedena u referentnom centru za liječenje UBC-a, moguća je selekcijska pristranost u smislu izbora težih bolesnika, liječenih s više linija naprednije terapije nego što je to u općoj populaciji bolesnika. Također, jednako ograničenje vrijedi i za ostale ispitivane varijable poput broja hospitalizacija, kirurških zahvata, ali i dijagnostike malignih bolesti.

Budući da je riječ o presječnom istraživanju, nije bilo moguće utvrditi eventualnu uzročnu-posljedičnu povezanost između ispitivanih genotipova i ishoda liječenja, odnosno karakteristika bolesti.

Svakako su potrebna dodatna ispitivanja, multicentričnog i prospektivnog dizajna, na većem broju ispitanika kako bismo dobili dodatne podatke na ovu temu.

## 7. ZAKLJUČAK

- 1) Osnovni klinički i sociodemografski pokazatelji naših ispitanika ne odstupaju od opisanih populacija u literaturi. Bolesnici s UBC-om uz PSC imali su upalu dominantne ekstenzije u kolonu i dijagnozu postavljenu u mlađoj životnoj dobi, a učestalije su oboljevali muškarci. Upalna bolest crijeva također je imala blaži klinički tijek prema indirektnim pokazateljima težine bolesti poput broja hospitalizacija, primjene i broja linija biološke terapije u liječenju i eventualnih kirurških zahvata.
- 2) Analizom genotipa SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 za cijelu ispitivanu populaciju utvrđen je genotip GG kod numerički većeg broja ispitanika, međutim bez statističke značajnosti.
- 3) Analizom genotipa SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 po ispitivanim skupinama nije utvrđena značajna razlika među oboljelima od PSC-a i UBC-a ili samo UBC-a, čime nismo uspjeli potvrditi hipotezu.
- 4) U skupini ispitanika s UK-om, oni koji su imali varijantu polimorfizma GC bili su značajno mlađi te su mlađi započinjali biološku terapiju u odnosu na ispitanike s varijantom polimorfizma GG.
- 5) Analizom genotipa SNP-a (rs531564) gena za pri-miR-124 nije pronađena značajna povezanost s kliničkim karakteristikama UBC-a (osim navedenog), kao ni PSC-a. Nije pronađena ni značajna povezanost s ekstenzijom UBC-a ili ishodima liječenja poput postizanja duboke remisije, primjene i broja linija biološke terapije te ovisnosti o steroidima.



## 8. SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva (UBC) kronične su imunoso posredovane bolesti genski predisponiranih osoba, čija etiopatogeneza nije potpuno razjašnjena. Posebno se ističe fenotip UBC-a kod pacijenata s primarnim sklerozirajućim kolangitisom (PSC). UK i CB u tih bolesnika dominantno zahvaćaju kolon, karakteristično su blažeg tijeka, ali uz povišen rizik razvoja kolorektalnog karcinoma, a i drugih malignih bolesti. Rezultati naše kohorte bolesnika su u skladu s dosad publiciranim podacima u literaturi.

Smatra se da miR imaju važnu ulogu u navedenoj patogenezi. Uloga miR-124 posebno je istražena, pokazujući važnost u održavanju integriteta crijevne barijere i regulaciji proinflamatornih citokina, a SNP (rs531564) gena povezan je s njezinom ekspresijom.

Cilj ovog ispitivanja bio je prvi put u ovoj populaciji analizirati učestalost genotipa navedenog SNP-a.

Nismo uspjeli pokazati značajne razlike u genotipu između ispitivane (UBC/PSC) i kontrolne skupine (UBC). Genotip GG numerički je učestaliji u bolesnika s UBC-om u odnosu na PSC, ali razlike nisu bile statistički značajne. Nije pronađena značajna razlika po genotipu za kliničke ili demografske varijable osim za bolesnike s UK-om, gdje su ispitanici s genotipom GC bili značajno mlađi te su mlađi započinjali biološku terapiju u odnosu na ispitanike s genotipom GG. Potrebna su daljnja, multicentrična istraživanja na većem uzorku kako bi se potvrdili ovi nalazi.

## 9. SUMMARY

Nucleotide polymorphism rs531564 of pri-miR-124 gene in patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease

Mislav Jelaković (2025)

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic, immunologically mediated diseases of genetically predisposed individuals, whose etiopathogenesis is not fully understood. The phenotype of IBD in patients with primary sclerosing cholangitis (PSC) is particularly notable. Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) in these patients predominantly affect the colon and are characteristically milder in course but with an increased risk of developing colorectal cancer as well as other malignancies. The results from our cohort of patients are consistent with previously published data in the literature.

It is believed that microRNAs (miRNAs) play an important role in the aforementioned pathogenesis. The role of miR-124 has been particularly studied, showing its importance in maintaining intestinal barrier integrity and regulating pro-inflammatory cytokines, with the SNP (rs531564) gene being associated with its expression.

The aim of this study was to analyze, for the first time in this population, the frequency of genotypes of the mentioned SNP.

We did not show significant differences in genotype between the study group (IBD/PSC) and the control group (IBD). The GG genotype was numerically more prevalent in patients with IBD compared to PSC, but the differences were not statistically significant. No significant difference was found by genotype for clinical or demographic variables except for UC patients, where participants with the GC genotype were significantly younger and started biological therapy earlier compared to the GG genotype. Further multicentric studies on larger samples are needed to confirm these findings.

## 10. LITERATURA

1. Kobayashi T, Hibi T. Improving IBD outcomes in the era of many treatment options. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2023;20(2):79–80.
2. Harbord M, Annese V, Vavricka SR, Allez M, Barreiro-de Acosta M, Boberg KM i sur. The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* 2016;10(3).
3. Burisch J, Zhao M, Odes S, De Cruz P, Vermeire S, Bernstein CN i sur. The cost of inflammatory bowel disease in high-income settings: a Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2023;8(5):458–92.
4. Maggs JR, Chapman RW. An update on primary sclerosing cholangitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24(3):377–83.
5. Bambha K, Kim WR, Talwalkar J, Torgerson H, Benson JT, Therneau TM i sur. Incidence, clinical spectrum, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in a united states community. *Gastroenterology* 2003;125(5):1364–9.
6. Fausa O, Schrumpf E, Elgjo K. Relationship of Inflammatory Bowel Disease and Primary Sclerosing Cholangitis. *Semin Liver Dis* 1991;11(01):31–9.
7. Boonstra K, van Erpecum KJ, van Nieuwkerk KMJ, Drenth JPH, Poen AC, Witteman BJM i sur. Primary sclerosing cholangitis is associated with a distinct phenotype of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18(12):2270–6.
8. Leidenius MHK, Färkkilä MA, Kärkkäinen P, Taskinen EI, Kellokumpu IH, Höckerstedt KA V. Colorectal Dysplasia and Carcinoma in Patients with Ulcerative Colitis and Primary Sclerosing Cholangitis. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(7):706–11.
9. Loftus E V. PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2005;54(1):91–6.
10. Claessen MMH, Lutgens MWMD, van Buuren HR, Oldenburg B, Stokkers PCF, van der Woude CJ i sur. More right-sided IBD-associated colorectal cancer in patients with primary sclerosing cholangitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(9):1331–6.
11. Kaplan GG, Windsor JW. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021;18(1):56–66.
12. GUNESH S, THOMAS GAO, WILLIAMS GT, ROBERTS A, HAWTHORNE AB. The incidence of Crohn's disease in Cardiff over the last 75 years: an update for 1996-2005. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;27(3):211–9.
13. Björnsson S. Inflammatory Bowel Disease in Iceland during a 30-Year Period, 1950-1979. *Scand J Gastroenterol* 1989;24(sup170):47–9.
14. Jacobsen BA, Fallingborg J, Rasmussen HH, Nielsen KR, Drewes AM, Puhos E i sur. Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978–2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18(6):601–6.
15. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI i sur. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet* 2017;390(10114):2769–78.
16. Roberts SE, Thorne K, Thapar N, Broekaert I, Benninga MA, Dolinsek J i sur. A Systematic Review and Meta-analysis of Paediatric Inflammatory Bowel Disease Incidence and Prevalence Across Europe. *J Crohns Colitis* 2020;14(8):1119–48.
17. Shah SC, Khalili H, Gower-Rousseau C, Olen O, Benchimol EI, Lynge E i sur. Sex-Based Differences in Incidence of Inflammatory Bowel Diseases—Pooled Analysis of Population-Based Studies From Western Countries. *Gastroenterology* 2018;155(4):1079-1089.e3.

18. Zhao M, Gönczi L, Lakatos PL, Burisch J. The Burden of Inflammatory Bowel Disease in Europe in 2020. *J Crohns Colitis* 2021;15(9):1573–87.
19. Da Cunha T, Vaziri H, Wu GY. Primary Sclerosing Cholangitis and Inflammatory Bowel Disease: A Review. *J Clin Transl Hepatol* 2022;10(3):531–42.
20. Bambha K, Kim WR, Talwalkar J, Torgerson H, Benson JT, Therneau TM i sur. Incidence, clinical spectrum, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in a united states community. *Gastroenterology* 2003;125(5):1364–9.
21. Ang TL, Fock KM, Ng TM, Teo EK, Chua TS, Tan JY. Clinical profile of primary sclerosing cholangitis in Singapore. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(8):908–13.
22. Weismüller TJ, Trivedi PJ, Bergquist A, Imam M, Lenzen H, Ponsioen CY i sur. Patient Age, Sex, and Inflammatory Bowel Disease Phenotype Associate With Course of Primary Sclerosing Cholangitis. *Gastroenterology* 2017;152(8):1975–1984.e8.
23. Barberio B, Massimi D, Cazzagon N, Zingone F, Ford AC, Savarino E V. Prevalence of Primary Sclerosing Cholangitis in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* 2021;161(6):1865–77.
24. Moller FT, Andersen V, Wohlfahrt J, Jess T. Familial Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study 1977–2011. *American Journal of Gastroenterology* 2015;110(4):564–71.
25. Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer A, Vlietinck R i sur. Familial aggregation in Crohn’s disease: Increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* 1996;111(3):597–603.
26. Costa-Santos MP. Conjugal inflammatory bowel disease: a systematic review and European survey. *Ann Gastroenterol* 2021;
27. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011;140(6):1704–12.
28. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY i sur. Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;491(7422):119–24.
29. Brant SR, Wang MH, Rawsthorne P, Sargent M, Datta LW, Nouvet F i sur. A Population-Based Case-Control Study of CARD15 and Other Risk Factors in Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis. *Am J Gastroenterol* 2007;102(2):313–23.
30. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos E V., Ioannidis JPA. Differential Effects of NOD2 Variants on Crohn’s Disease Risk and Phenotype in Diverse Populations: A Metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004;99(12):2393–404.
31. Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF. Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn’s disease. *J Leukoc Biol* 2004;77(4):460–5.
32. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ i sur. A Genome-Wide Association Study Identifies *IL23R* as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science* (1979) 2006;314(5804):1461–3.
33. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ i sur. A Genome-Wide Association Study Identifies *IL23R* as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science* (1979) 2006;314(5804):1461–3.
34. Abreu MT, Rowbotham DS, Danese S, Sandborn WJ, Miao Y, Zhang H i sur. Efficacy and Safety of Maintenance Ustekinumab for Ulcerative Colitis Through 3 Years: UNIFI Long-term Extension. *J Crohns Colitis* 2022;16(8):1222–34.
35. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B i sur. Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity* 2000;13(5):715–25.

36. Shouval DS, Biswas A, Kang YH, Griffith AE, Konnikova L, Mascanfroni ID i sur. Interleukin 1 $\beta$  Mediates Intestinal Inflammation in Mice and Patients With Interleukin 10 Receptor Deficiency. *Gastroenterology* 2016;151(6):1100–4.
37. Malik A, Kanneganti TD. Inflammasome activation and assembly at a glance. *J Cell Sci* 2017;130(23):3955–63.
38. Yap LM, Ahmad T, Jewell DP. The contribution of HLA genes to IBD susceptibility and phenotype. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18(3):577–96.
39. Ahmad T. Genetics of inflammatory bowel disease: The role of the HLA complex. *World J Gastroenterol* 2006;12(23):3628.
40. Fernando MMA, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM i sur. Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. *PLoS Genet* 2008;4(4):e1000024.
41. Sazonovs A, Kennedy NA, Moutsianas L, Heap GA, Rice DL, Reppell M i sur. HLA-DQA1\*05 Carriage Associated With Development of Anti-Drug Antibodies to Infliximab and Adalimumab in Patients With Crohn’s Disease. *Gastroenterology* 2020;158(1):189–99.
42. de Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, Lamb CA, Luo Y, Kennedy NA i sur. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2017;49(2):256–61.
43. Mohanan V, Nakata T, Desch AN, Lévesque C, Boroughs A, Guzman G i sur. *C1orf106* is a colitis risk gene that regulates stability of epithelial adherens junctions. *Science (1979)* 2018;359(6380):1161–6.
44. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299(6710):1259–60.
45. Frolkis A, Dieleman LA, Barkema HW, Panaccione R, Ghosh S, Fedorak RN i sur. Environment and the Inflammatory Bowel Diseases. *Canadian Journal of Gastroenterology* 2013;27(3):e18–24.
46. Rodríguez LAG, Ruigómez A, Panés J. Acute Gastroenteritis Is Followed by an Increased Risk of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2006;130(6):1588–94.
47. Frolkis AD, de Bruyn J, Jette N, Lowerison M, Engbers J, Ghali W i sur. The Association of Smoking and Surgery in Inflammatory Bowel Disease is Modified by Age at Diagnosis. *Clin Transl Gastroenterol* 2016;7(4):e165.
48. Nunes T, Etchevers MJ, García-Sánchez V, Ginard D, Martí E, Barreiro-de Acosta M i sur. Impact of Smoking Cessation on the Clinical Course of Crohn’s Disease Under Current Therapeutic Algorithms: A Multicenter Prospective Study. *Am J Gastroenterol* 2016;111(3):411–9.
49. Piovani D, Pansieri C, Kotha SRR, Piazza AC, Comberg CL, Peyrin-Biroulet L i sur. Ethnic Differences in the Smoking-related Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Crohns Colitis* 2021;15(10):1658–78.
50. Li T, Qiu Y, Yang HS, Li MY, Zhuang XJ, Zhang SH i sur. Systematic review and meta-analysis: Association of a pre-illness Western dietary pattern with the risk of developing inflammatory bowel disease. *J Dig Dis* 2020;21(7):362–71.
51. Honap S, Johnston E, Agrawal G, Al-Hakim B, Hermon-Taylor J, Sanderson J. Anti-*Mycobacterium paratuberculosis* (MAP) therapy for Crohn’s disease: an overview and update. *Frontline Gastroenterol* 2021;12(5):397–403.
52. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ i sur. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(43):16731–6.

53. Lichtenstein L, Avni-Biron I, Ben-Bassat O. Probiotics and prebiotics in Crohn's disease therapies. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2016;30(1):81–8.
54. Limketkai BN, Akobeng AK, Gordon M, Adepoju AA. Probiotics for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2020;2020(7).
55. Zhang XF, Guan XX, Tang YJ, Sun JF, Wang XK, Wang WD i sur. Clinical effects and gut microbiota changes of using probiotics, prebiotics or synbiotics in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr* 2021;60(5):2855–75.
56. Imdad A, Pandit NG, Zaman M, Minkoff NZ, Tanner-Smith EE, Gomez-Duarte OG i sur. Fecal transplantation for treatment of inflammatory bowel disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2023;2023(4).
57. Ahmad R, Sorrell MF, Batra SK, Dhawan P, Singh AB. Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. *Mucosal Immunol* 2017;10(2):307–17.
58. Pullan RD, Thomas GA, Rhodes M, Newcombe RG, Williams GT, Allen A i sur. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 1994;35(3):353–9.
59. Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE i sur. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 2015;519(7541):92–6.
60. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* 2009;41(12):1330–4.
61. Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 2008;263(6):591–6.
62. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M i sur. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441(7090):235–8.
63. Van Assche G, Rutgeerts P. Physiological basis for novel drug therapies used to treat the inflammatory bowel diseases. I. Immunology and therapeutic potential of antiadhesion molecule therapy in inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288(2):G169-74.
64. BERGQUIST A, MONTGOMERY S, BAHMANYAR S, OLSSON R, DANIELSSON A, LINDGREN S i sur. Increased Risk of Primary Sclerosing Cholangitis and Ulcerative Colitis in First-Degree Relatives of Patients With Primary Sclerosing Cholangitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2008;6(8):939–43.
65. Liu JZ, Hov JR, Folseraas T, Ellinghaus E, Rushbrook SM, Doncheva NT i sur. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies nine new risk loci for primary sclerosing cholangitis. *Nat Genet* 2013;45(6):670–5.
66. Alberts R, de Vries EMG, Goode EC, Jiang X, Sampaziotis F, Rombouts K i sur. Genetic association analysis identifies variants associated with disease progression in primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2018;67(8):1517–24.
67. Grant AJ, Lalor PF, Salmi M, Jalkanen S, Adams DH. Homing of mucosal lymphocytes to the liver in the pathogenesis of hepatic complications of inflammatory bowel disease. *The Lancet* 2002;359(9301):150–7.
68. Wu CT, Eiserich JP, Ansari AA, Coppel RL, Balasubramanian S, Bowlus CL i sur. Myeloperoxidase-positive inflammatory cells participate in bile duct damage in primary biliary cirrhosis through nitric oxide-mediated reactions. *Hepatology* 2003;38(4):1018–25.

69. Grant AJ, Lalor PF, Salmi M, Jalkanen S, Adams DH. Homing of mucosal lymphocytes to the liver in the pathogenesis of hepatic complications of inflammatory bowel disease. *The Lancet* 2002;359(9301):150–7.
70. Eksteen B, Grant AJ, Miles A, Curbishley SM, Lalor PF, Hübscher SG i sur. Hepatic Endothelial CCL25 Mediates the Recruitment of CCR9+ Gut-homing Lymphocytes to the Liver in Primary Sclerosing Cholangitis. *J Exp Med* 2004;200(11):1511–7.
71. Borchers AT, Shimoda S, Bowlus C, Keen CL, Gershwin ME. Lymphocyte recruitment and homing to the liver in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Semin Immunopathol* 2009;31(3):309–22.
72. Little R, Wine E, Kamath BM, Griffiths AM, Ricciuto A. Gut microbiome in primary sclerosing cholangitis: A review. *World J Gastroenterol* 2020;26(21):2768–80.
73. Nakamoto N, Sasaki N, Aoki R, Miyamoto K, Suda W, Teratani T i sur. Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. *Nat Microbiol* 2019;4(3):492–503.
74. Tedesco D, Thapa M, Chin CY, Ge Y, Gong M, Li J i sur. Alterations in Intestinal Microbiota Lead to Production of Interleukin 17 by Intrahepatic  $\gamma\delta$  T-Cell Receptor–Positive Cells and Pathogenesis of Cholestatic Liver Disease. *Gastroenterology* 2018;154(8):2178–93.
75. Winston JA, Theriot CM. Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota. *Gut Microbes* 2020;11(2):158–71.
76. Little R, Wine E, Kamath BM, Griffiths AM, Ricciuto A. Gut microbiome in primary sclerosing cholangitis: A review. *World J Gastroenterol* 2020;26(21):2768–80.
77. Verbeke L, Farre R, Verbinnen B, Covens K, Vanuytsel T, Verhaegen J i sur. The FXR Agonist Obeticholic Acid Prevents Gut Barrier Dysfunction and Bacterial Translocation in Cholestatic Rats. *Am J Pathol* 2015;185(2):409–19.
78. Fickert P, Zollner G, Fuchs bichler A, Stumtner C, Weiglein AH, Lammert F i sur. Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct–ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology* 2002;123(4):1238–51.
79. Popov Y, Patsenker E, Fickert P, Trauner M, Schuppan D. Mdr2 (Abcb4)-/- mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *J Hepatol* 2005;43(6):1045–54.
80. Maaser C, Sturm A, Vavricka SR, Kucharzik T, Fiorino G, Annese V i sur. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J Crohns Colitis* 2019;13(2):144-164K.
81. Holtman GA, Lisman-van Leeuwen Y, Reitsma JB, Berger MY. Noninvasive Tests for Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis. *Pediatrics* 2016;137(1).
82. van Rheenen PF, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 2010;341(jul15 1):c3369–c3369.
83. Lin JF, Chen JM, Zuo JH, Yu A, Xiao ZJ, Deng FH i sur. Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20(8):1407–15.
84. Turner K, Genta RM, Lujan G, Robiou C, Sonnenberg A. Significance of the epithelioid granuloma in biopsies of Crohn’s colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20(12):2271–5.
85. Warren BF. Classic pathology of ulcerative and Crohn’s colitis. *J Clin Gastroenterol* 2004;38(5 Suppl 1):S33-5.
86. Fiorino G, Bonifacio C, Peyrin-Biroulet L, Minuti F, Repici A, Spinelli A i sur. Prospective comparison of computed tomography enterography and magnetic

- resonance enterography for assessment of disease activity and complications in ileocolonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17(5):1073–80.
87. Castiglione F, Mainenti PP, De Palma GD, Testa A, Bucci L, Pesce G i sur. Noninvasive Diagnosis of Small Bowel Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19(5):991–8.
  88. Taylor SA, Mallett S, Bhatnagar G, Morris S, Quinn L, Tomini F i sur. Magnetic resonance enterography compared with ultrasonography in newly diagnosed and relapsing Crohn's disease patients: the METRIC diagnostic accuracy study. *Health Technol Assess (Rockv)* 2019;23(42):1–162.
  89. Kopylov U, Yung DE, Engel T, Vijayan S, Har-Noy O, Katz L i sur. Diagnostic yield of capsule endoscopy versus magnetic resonance enterography and small bowel contrast ultrasound in the evaluation of small bowel Crohn's disease: Systematic review and meta-analysis. *Digestive and Liver Disease* 2017;49(8):854–63.
  90. Satsangi J. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55(6):749–53.
  91. Sturm A, Maaser C, Calabrese E, Annese V, Fiorino G, Kucharzik T i sur. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 2: IBD scores and general principles and technical aspects. *J Crohns Colitis* 2019;13(3):273–84.
  92. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated Oral 5-Aminosalicylic Acid Therapy for Mildly to Moderately Active Ulcerative Colitis. *New England Journal of Medicine* 1987;317(26):1625–9.
  93. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in Ulcerative Colitis. *BMJ* 1955;2(4947):1041–8.
  94. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70(3):439–44.
  95. Sostegni R, Daperno M, Scaglione N, Lavagna A, Rocca R, Pera A. Crohn's disease: monitoring disease activity. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17(s2):11–7.
  96. Solem CA, Loftus E V, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-Reactive Protein With Clinical, Endoscopic, Histologic, and Radiographic Activity in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(8):707–12.
  97. Harvey RF, Bradshaw JM. A SIMPLE INDEX OF CROHN'S-DISEASE ACTIVITY. *The Lancet* 1980;315(8167):514.
  98. Colombel JF, Rutgeerts P, Reinisch W, Esser D, Wang Y, Lang Y i sur. Early Mucosal Healing With Infliximab Is Associated With Improved Long-term Clinical Outcomes in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2011;141(4):1194–201.
  99. Travis SPL, Schnell D, Krzeski P, Abreu MT, Altman DG, Colombel J i sur. Reliability and Initial Validation of the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity. *Gastroenterology* 2013;145(5):987–95.
  100. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V i sur. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004;60(4):505–12.
  101. Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. *Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID)*. *Gut* 1989;30(7):983–9.
  102. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990;99(4):956–63.



103. Rokkas T, Portincasa P, Koutroubakis IE. Fecal Calprotectin in Assessing Inflammatory Bowel Disease Endoscopic Activity: a Diagnostic Accuracy Meta-analysis. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 2018;27(3):299–306.
104. Turner D, Ricciuto A, Lewis A, D’Amico F, Dhaliwal J, Griffiths AM i sur. STRIDE-II: An Update on the Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE) Initiative of the International Organization for the Study of IBD (IOIBD): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target strategies in IBD. *Gastroenterology* 2021;160(5):1570–83.
105. Coimbra AJF, Rimola J, O’Byrne S, Lu TT, Bengtsson T, de Crespigny A i sur. Magnetic resonance enterography is feasible and reliable in multicenter clinical trials in patients with Crohn’s disease, and may help select subjects with active inflammation. *Aliment Pharmacol Ther* 2016;43(1):61–72.
106. Pariente B, Torres J, Burisch J, Arebi N, Barberio B, Duricova D i sur. Validation and Update of the Lémann Index to Measure Cumulative Structural Bowel Damage in Crohn’s Disease. *Gastroenterology* 2021;161(3):853-864.e13.
107. Huynh D, Rubtsov D, Basu D, Khaing MM. The Diagnostic Utility of Biochemical Markers and Intestinal Ultrasound Compared with Endoscopy in Patients with Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis: A Systemic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med* 2024;13(11):3030.
108. Marchal-Bressenot A, Salleron J, Boulagnon-Rombi C, Bastien C, Cahn V, Cadiot G i sur. Development and validation of the Nancy histological index for UC. *Gut* 2017;66(1):43–9.
109. Chazouilleres O, Beuers U, Bergquist A, Karlsen TH, Levy C, Samyn M i sur. EASL Clinical Practice Guidelines on sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2022;77(3):761–806.
110. Stinton LM, Bentow C, Mahler M, Norman GL, Eksteen B, Mason AL i sur. PR3-ANCA: A Promising Biomarker in Primary Sclerosing Cholangitis (PSC). *PLoS One* 2014;9(11):e112877.
111. Deneau MR, El-Matary W, Valentino PL, Abdou R, Alqoer K, Amin M i sur. The natural history of primary sclerosing cholangitis in 781 children: A multicenter, international collaboration. *Hepatology* 2017;66(2):518–27.
112. Dave M, Elmunzer BJ, Dwamena BA, Higgins PDR. Primary Sclerosing Cholangitis: Meta-Analysis of Diagnostic Performance of MR Cholangiopancreatography. *Radiology* 2010;256(2):387–96.
113. Schramm C, Eaton J, Ringe KI, Venkatesh S, Yamamura J. Recommendations on the use of magnetic resonance imaging in PSC-A position statement from the International PSC Study Group. *Hepatology* 2017;66(5):1675–88.
114. Boonstra K, Weersma RK, van Erpecum KJ, Rauws EA, Spanier BWM, Poen AC i sur. Population-based epidemiology, malignancy risk, and outcome of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2013;58(6):2045–55.
115. Goode EC, Clark AB, Mells GF, Srivastava B, Spiess K, Gelson WTH i sur. Factors Associated With Outcomes of Patients With Primary Sclerosing Cholangitis and Development and Validation of a Risk Scoring System. *Hepatology* 2019;69(5):2120–35.
116. Raine T, Bonovas S, Burisch J, Kucharzik T, Adamina M, Annese V i sur. ECCO Guidelines on Therapeutics in Ulcerative Colitis: Medical Treatment. *J Crohns Colitis* 2022;16(1):2–17.
117. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T i sur. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn’s Disease: Medical Treatment. *J Crohns Colitis* [Internet] 2020;14(1):4–22. Available from: <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz180>

118. Imbrizi M, Magro F, Coy CSR. Pharmacological Therapy in Inflammatory Bowel Diseases: A Narrative Review of the Past 90 Years. *Pharmaceuticals* 2023;16(9):1272.
119. Ribeiro AC, Gerheim PSAS, Chebli JMF, Nascimento JW, de Faria Pinto P. The Role of Pharmacogenetics in the Therapeutic Response to Thiopurines in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *J Clin Med* 2023;12(21):6742.
120. Sands BE, D'Haens G, Clemow DB, Irving PM, Johns JT, Hunter Gibble T i sur. Two-Year Efficacy and Safety of Mirikizumab Following 104 Weeks of Continuous Treatment for Ulcerative Colitis: Results From the LUCENT-3 Open-Label Extension Study. *Inflamm Bowel Dis* 2024;
121. Honap S, Agorogianni A, Colwill MJ, Mehta SK, Donovan F, Pollok R i sur. JAK inhibitors for inflammatory bowel disease: recent advances. *Frontline Gastroenterol* 2024;15(1):59–69.
122. Suilik HA, Jaber F, Abuelazm M, Ramadan A, Elzeftawy MA, Elrosasy A i sur. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulators as an induction and maintenance therapy for ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflammation Research* 2024;73(2):183–98.
123. Harnois DM, Angulo P, Jorgensen RA, LaRusso NF, Lindor KD. High-Dose Ursodeoxycholic Acid as a Therapy for Patients With Primary Sclerosing Cholangitis. *American Journal of Gastroenterology* 2001;96(5):1558–62.
124. Lindor KD. Ursodiol for Primary Sclerosing Cholangitis. *New England Journal of Medicine* 1997;336(10):691–5.
125. Tabibian JH, Weeding E, Jorgensen RA, Petz JL, Keach JC, Talwalkar JA i sur. Randomised clinical trial: vancomycin or metronidazole in patients with primary sclerosing cholangitis - a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;37(6):604–12.
126. de Vries E, Bolier R, Goet J, Parés A, Verbeek J, de Vree M i sur. Fibrates for Itch (FITCH) in Fibrosing Cholangiopathies: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Gastroenterology* 2021;160(3):734-743.e6.
127. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs. *Vet Pathol* 2014;51(4):759–74.
128. Oliveira ECS de, Quaglio AEV, Magro DO, Di Stasi LC, Sasaki LY. Intestinal Microbiota and miRNA in IBD: A Narrative Review about Discoveries and Perspectives for the Future. *Int J Mol Sci* 2023;24(8):7176.
129. Nag S, Mitra O, Tripathi G, Samanta S, Bhattacharya B, Chandane P i sur. Exploring the theranostic potentials of miRNA and epigenetic networks in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Immun Inflamm Dis* 2023;11(12).
130. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75(5):843–54.
131. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 2004;32(90001):109D – 111.
132. Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. The *lin-41* RBCC Gene Acts in the *C. elegans* Heterochronic Pathway between the *let-7* Regulatory RNA and the *LIN-29* Transcription Factor. *Mol Cell* 2000;5(4):659–69.
133. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E i sur. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002;99(24):15524–9.
134. Kim T, Croce CM. MicroRNA: trends in clinical trials of cancer diagnosis and therapy strategies. *Exp Mol Med* 2023;55(7):1314–21.
135. Yao Y, Ding Y, Bai Y, Zhou Q, Lee H, Li X i sur. Identification of Serum Circulating MicroRNAs as Novel Diagnostic Biomarkers of Gastric Cancer. *Front Genet* 2021;11.

136. Wu Y, Zhang J, Lin F, Zhao Y, Zheng B, Zhou N i sur. Exosomal <scp>miR</scp> -1470 is a diagnostic biomarker and promotes cell proliferation and metastasis in colorectal cancer. *Cancer Med* 2024;13(7).
137. Armstrong DA, Green BB, Seigne JD, Schned AR, Marsit CJ. MicroRNA molecular profiling from matched tumor and bio-fluids in bladder cancer. *Mol Cancer* 2015;14(1):194.
138. Lin Y, Miao Z, Zhang X, Wei X, Hou J, Huang Y i sur. Identification of Key MicroRNAs and Mechanisms in Prostate Cancer Evolution Based on Biomarker Prioritization Model and Carcinogenic Survey. *Front Genet* 2021;11.
139. Hamidi F, Gilani N, Arabi Belaghi R, Yaghoobi H, Babaei E, Sarbakhsh P i sur. Identifying potential circulating miRNA biomarkers for the diagnosis and prediction of ovarian cancer using machine-learning approach: application of Boruta. *Front Digit Health* 2023;5.
140. Rokavec M, Li H, Jiang L, Hermeking H. The p53/miR-34 axis in development and disease. *J Mol Cell Biol* 2014;6(3):214–30.
141. Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(11):847–65.
142. Hong DS, Kang YK, Borad M, Sachdev J, Ejadi S, Lim HY i sur. Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2020;122(11):1630–7.
143. Bayés-Genis A, Lanfear DE, de Ronde MWJ, Lupón J, Leenders JJ, Liu Z i sur. Prognostic value of circulating microRNAs on heart failure-related morbidity and mortality in two large diverse cohorts of general heart failure patients. *Eur J Heart Fail* 2018;20(1):67–75.
144. Pinchi E, Frati P, Aromatario M, Cipolloni L, Fabbri M, La Russa R i sur. miR-1, miR-499 and miR-208 are sensitive markers to diagnose sudden death due to early acute myocardial infarction. *J Cell Mol Med* 2019;23(9):6005–16.
145. Elbaz M, Faccini J, Laperche C, Grousset E, Roncalli J, Ruidavets JB i sur. Identification of a miRNA Based-Signature Associated with Acute Coronary Syndrome: Evidence from the FLORINF Study. *J Clin Med* 2020;9(6):1674.
146. Pang JKS, Phua QH, Soh BS. Applications of miRNAs in cardiac development, disease progression and regeneration. *Stem Cell Res Ther* 2019;10(1):336.
147. Stolzenburg LR, Harris A. The role of microRNAs in chronic respiratory disease: recent insights. *Biol Chem* 2018;399(3):219–34.
148. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM i sur. MicroRNAs Are Differentially Expressed in Ulcerative Colitis and Alter Expression of Macrophage Inflammatory Peptide-2 $\alpha$ . *Gastroenterology* 2008;135(5):1624-1635.e24.
149. Wang H, Zhang S, Yu Q, Yang G, Guo J, Li M i sur. Circulating MicroRNA223 is a New Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Medicine* 2016;95(5):e2703.
150. Cordes F, Demmig C, Bokemeyer A, Brückner M, Lenze F, Lenz P i sur. MicroRNA-320a Monitors Intestinal Disease Activity in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Clin Transl Gastroenterol* 2020;11(3):e00134.
151. Morilla I, Uzzan M, Laharie D, Cazals-Hatem D, Denost Q, Daniel F i sur. Colonic MicroRNA Profiles, Identified by a Deep Learning Algorithm, That Predict Responses to Therapy of Patients With Acute Severe Ulcerative Colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2019;17(5):905–13.
152. Verdier J, Breunig IR, Ohse MC, Roubrocks S, Kleinfeld S, Roy S i sur. Faecal MicroRNAs in Inflammatory Bowel Diseases. *J Crohns Colitis* 2020;14(1):110–7.

153. Zhou R, Qiu P, Wang H, Yang H, Yang X, Ye M i sur. Identification of microRNA-16-5p and microRNA-21-5p in feces as potential noninvasive biomarkers for inflammatory bowel disease. *Aging* 2021;13(3):4634–46.
154. Pardini B, Ferrero G, Tarallo S, Gallo G, Francavilla A, Licheri N i sur. A Fecal MicroRNA Signature by Small RNA Sequencing Accurately Distinguishes Colorectal Cancers: Results From a Multicenter Study. *Gastroenterology* 2023;165(3):582-599.e8.
155. Sood P, Krek A, Zavolan M, Macino G, Rajewsky N. Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006;103(8):2746–51.
156. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008;9(2):102–14.
157. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 2009;136(2):215–33.
158. Qi L, Hu Y, Zhan Y, Wang J, Wang BB, Xia HF i sur. A SNP site in pri-miR-124 changes mature miR-124 expression but no contribution to Alzheimer’s disease in a Mongolian population. *Neurosci Lett* 2012;515(1):1–6.
159. Wang Y, Ru J, Meng X, Song J, Jiang Q, Li S i sur. Role of SNPs in the Biogenesis of Mature miRNAs. *Biomed Res Int* 2021;2021:1–13.
160. Li C, Zhao W, Zhou H, Wu J, Huo Y, Jiang D i sur. Functional Mutations in the microRNA-155 Promoter Modulate its Transcription Efficiency and Expression. *Mol Biotechnol* 2023;
161. Sun T yi, Li Y qi, Zhao F qian, Sun H mei, Gao Y, Wu B i sur. MiR-1-3p and MiR-124-3p Synergistically Damage the Intestinal Barrier in the Ageing Colon. *J Crohns Colitis* 2022;16(4):656–67.
162. Koukos G, Polytarchou C, Kaplan JL, Morley–Fletcher A, Gras–Miralles B, Kokkotou E i sur. MicroRNA-124 Regulates STAT3 Expression and Is Down-regulated in Colon Tissues of Pediatric Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2013;145(4):842-852.e2.
163. Ni Y, Song C, Jin S, Chen Z, Ni M, Han L i sur. Gene set enrichment analysis: A genome-wide expression profile-based strategy for discovering functional microRNA–disease relationships. *Journal of International Medical Research* 2018;46(2):596–611.
164. Bocchetti M, Ferraro MG, Ricciardiello F, Ottaiano A, Luce A, Cossu AM i sur. The Role of microRNAs in Development of Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22(8):3967.
165. Vermeire S, Solitano V, Peyrin-Biroulet L, Tilg H, Danese S, Ehrlich H i sur. Obefazimod: A First-in-class Drug for the Treatment of Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis* 2023;17(10):1689–97.
166. Chebli K, Papon L, Paul C, Garcel A, Campos N, Scherrer D i sur. The Anti-Hiv Candidate Abx464 Dampens Intestinal Inflammation by Triggering Il-22 Production in Activated Macrophages. *Sci Rep* 2017;7(1):4860.
167. Tazi J, Begon-Pescia C, Campos N, Apolit C, Garcel A, Scherrer D. Specific and selective induction of miR-124 in immune cells by the quinoline ABX464: a transformative therapy for inflammatory diseases. *Drug Discov Today* 2021;26(4):1030–9.
168. Vautrin A, Manchon L, Garcel A, Campos N, Lapasset L, Laaref AM i sur. Both anti-inflammatory and antiviral properties of novel drug candidate ABX464 are mediated by modulation of RNA splicing. *Sci Rep* 2019;9(1):792.

169. Vermeire S, Hébuterne X, Tilg H, De Hertogh G, Gineste P, Steens JM. Induction and Long-term Follow-up With ABX464 for Moderate-to-severe Ulcerative Colitis: Results of Phase IIa Trial. *Gastroenterology* 2021;160(7):2595-2598.e3.
170. Vermeire S, Sands BE, Tilg H, Tulassay Z, Kempinski R, Danese S i sur. ABX464 (obefazimod) for moderate-to-severe, active ulcerative colitis: a phase 2b, double-blind, randomised, placebo-controlled induction trial and 48 week, open-label extension. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2022;7(11):1024–35.
171. Apolit C, Campos N, Vautrin A, Begon-Pescia C, Lapasset L, Scherrer D i sur. ABX464 (Obefazimod) Upregulates miR-124 to Reduce Proinflammatory Markers in Inflammatory Bowel Diseases. *Clin Transl Gastroenterol* 2023;14(4):e00560.
172. Rahman M, Desmond P, Mortensen N, Chapman RW. The clinical impact of primary sclerosing cholangitis in patients with an ileal pouch–anal anastomosis for ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2011;26(5):553–9.
173. Kaplan GG, Laupland KB, Butzner D, Urbanski SJ, Lee SS. The Burden of Large and Small Duct Primary Sclerosing Cholangitis in Adults and Children: A Population-Based Analysis. *Am J Gastroenterol* 2007;102(5):1042–9.
174. Zheng HH, Jiang XL. Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2016;28(4):383–90.
175. Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M i sur. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2004;126(2):451–9.
176. Quraishi MN, Acharjee A, Beggs AD, Horniblow R, Tselepis C, Gkoutos G i sur. A Pilot Integrative Analysis of Colonic Gene Expression, Gut Microbiota, and Immune Infiltration in Primary Sclerosing Cholangitis-Inflammatory Bowel Disease: Association of Disease With Bile Acid Pathways. *J Crohns Colitis* 2020;14(7):935–47.
177. Kempinska-Podhorodecka A, Adamowicz M, Ostrycharz E, Chmielarz M, Wójcicki M, Milkiewicz P i sur. Role of miR-506 in ulcerative colitis associated with primary sclerosing cholangitis. *Sci Rep* 2021;11(1):10134.
178. Abramczyk J, Milkiewicz M, Hula B, Milkiewicz P, Kempinska-Podhorodecka A. The Role of hsa-miR-125b-5p Interaction with S1P/Ceramide Axis in the Potential Development of Inflammation-Associated Colon Cancer in Primary Sclerosing Cholangitis. *Int J Mol Sci* 2023;24(11):9175.
179. Kempinska-Podhorodecka A, Blatkiewicz M, Wunsch E, Krupa L, Gutkowski K, Milkiewicz P i sur. Oncomir MicroRNA-346 Is Upregulated in Colons of Patients With Primary Sclerosing Cholangitis. *Clin Transl Gastroenterol* 2020;11(1):e00112.
180. Gao X ren, Wang H ping, Zhang S long, Wang M xi, Zhu Z sheng. Pri-miR-124 rs531564 polymorphism and colorectal cancer risk. *Sci Rep* 2015;5(1):14818.
181. Kotrlík J, Higgins C. Organizational research: Determining appropriate sample size in survey research appropriate sample size in survey research. *Information Technology, Learning, and Performance Journal* 2001;19(1):43–50.
182. Li Z, Wang Y, Zhu Y. Association of miRNA-146a rs2910164 and miRNA-196 rs11614913 polymorphisms in patients with ulcerative colitis. *Medicine* 2018;97(39):e12294.

## 11. ŽIVOTOPIS

Mislav Jelaković rođen je 1989. u Zagrebu, gdje je završio osnovnu i srednju školu. Nakon mature u zagrebačkoj II. gimnaziji 2007. upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao je 2013., a tijekom studija nagrađen je Dekanovom i Rektorovom nagradom za studentski rad. Obvezni pripravnički staž odradio je u Domu zdravlja Centar i KBC-u Zagreb, nakon čega je položio državni ispit 2014. Od lipnja 2014. do srpnja 2015. bio je zaposlen u Nastavnom zavodu za hitnu medicinu Grada Zagreba. U srpnju 2015. započeo je specijalizaciju iz gastroenterologije u Klinici za unutarnje bolesti KBC-a Zagreb. Iste godine upisao je poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Silvije Čuković-Čavke. Specijalizaciju iz gastroenterologije završio je u veljači 2021. te od tad radi kao specijalist gastroenterologije u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju KBC-a Zagreb. U dosadašnjem radu sudjelovao je u više stručnih usavršavanja i znanstvenih skupova u inozemstvu i Hrvatskoj. Autor je nekoliko znanstvenih radova i većeg broja kongresnih sažetaka prezentiranih na domaćim i međunarodnim kongresima. Sudjeluje u brojnim multicentričnim kliničkim studijama dominantno u području novih terapijskih opcija za liječenje upalnih bolesti crijeva. Član je nekoliko domaćih i inozemnih stručnih društava.