

# Biomarkeri razgradnje i stvaranja kolagena III, IV i V u serumu kao pokazatelji upalne aktivnosti u bolesnika s upalnim bolestima crijeva

---

**Domislović, Viktor**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2021**

*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:105:673015>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-05**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Viktor Domislović**

**Biomarkeri razgradnje i stvaranja  
kolagena III, IV i V u serumu kao  
pokazatelji upalne aktivnosti u  
bolesnika s upalnim bolestima crijeva**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2021.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Viktor Domislović**

**Biomarkeri razgradnje i stvaranja  
kolagena III, IV i V u serumu kao  
pokazatelji upalne aktivnosti u  
bolesnika s upalnim bolestima crijeva**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i u laboratoriju Nordic Bioscience, Biomarkers & Research, Herlev, Danska.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Željko Krznarić

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Željku Krznariću na ustrajnoj podršci, strpljenju, vrijednim savjetima i pomoći oko osmišljavanja i provođenja disertacije.

Hvala kolegama iz Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju KBC Zagreb na iznimno velikom doprinosu, potpori i razumijevanju.

Naposljetku, najviše zahvaljujem svojoj obitelji, ocu Ivanu, majci Vesni, braći Filipu i Jakobu i zaručnici Mariji čija mi je podrška i motivacija tijekom svih ovih godina neizmjereno značila.

## SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. Upalne bolesti crijeva.....	1
1.1.1. Definicija i podjela upalnih bolesti crijeva.....	1
1.1.2. Etiologija, patogeneza, epidemiologija.....	1
1.1.3. Klinička slika i dijagnoza.....	2
1.1.4. Terapija.....	3
1.2. Upalna aktivnost i biomarkeri upalne aktivnosti .....	4
1.2.1. Klinički pokazatelji upalne aktivnosti.....	4
1.2.2. Biokemijski pokazatelji upalne aktivnosti.....	6
1.2.3. Endoskopski pokazatelji upalne aktivnosti.....	8
1.3. Izvanstanični matriks i remodeliranje izvanstaničnog matriksa.....	10
1.3.1. Definicija izvanstaničnog matriksa.....	10
1.3.2. Struktura izvanstaničnog matriksa.....	11
1.3.3. Remodeliranje izvanstaničnog matriksa.....	13
1.4. Biomarkeri razgradnje i stvaranja kolagena III, IV i V.....	14
1.4.1. Produkti razgradnje i stvaranja proteina kao biomarkeri.....	14
1.4.2. Biomarkeri razgradnje i stvaranja kolagena III (C3M i Pro-C3).....	16
1.4.3. Biomarkeri razgradnje i stvaranja kolagena tip IV (C4M i Pro-C4)....	17
1.4.4. Biomarker stvaranja kolagena V (PRO-C5).....	17
2. HIPOTEZA.....	18
3. CILJEVI RADA.....	19
4. MATERIJALI I METODE.....	20
4.1. Materijali .....	20
4.1.1. Ispitanici.....	20
4.2. Metode .....	20
4.2.1. Antropometrijski i klinički podaci .....	20
4.2.2. Laboratorijski podaci .....	21
4.2.3. Procjena endoskopske, kliničke i laboratorijske aktivnosti upale.....	21
4.2.4. Analiza biomarkera C3M, Pro-C3, C4M, Pro-C4 i Pro-C5.....	23
4.2.5. Prikupljanje podataka.....	23

4.2.6. Statistička obrada podataka .....	24
5. REZULTATI.....	25
5.1. Antropometrijski, demografski i laboratorijski podaci ispitanika.....	25
5.2. Koncentracije biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 u serumu...28	
5.3. Povezanost koncentracija biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s upalnom aktivnosti.....	29
5.3.1. Povezanost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s endoskopskim pokazateljima upalne aktivnosti.....	29
5.3.2. Povezanost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s kliničkim i serumskim biokemijskim pokazateljima upalne aktivnosti.....	35
5.3.3. Povezanost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s fekalnim kalprotektinom.....	39
5.4. Korelacija biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s nespecifičnim laboratorijskim biomarkerima upalne aktivnosti.....	43
5.5. Korelacija biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s kliničkim endoskopskim i pokazateljima upalne aktivnosti.....	45
5.6. Osjetljivost i specifičnost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 u određivanju aktivnosti bolesti.....	47
5.7. Prediktori upalne aktivnosti.....	53
6. RASPRAVA.....	56
7. ZAKLJUČCI.....	66
8. SAŽETAK.....	68
9. SUMMARY.....	69
10. POPIS LITERATURE.....	70
11. BIOGRAFIJA .....	83

## POPIS OZNAKA I KRATICA

UC – ulcerozni kolitis (engl. *ulcerative colitis*)

CD – Crohnova bolest (engl. *Crohn's disease*)

IBD – upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel diseases*)

IBDU – neklasificirana upalna bolest crijeva (engl. *inflammatory bowel disease unclassified*)

CRP – C-reaktivni protein

SE – sedimentacija eritrocita

CDAI – engl. *Crohn's Disease Activity Index*

HBI – engl. *Harvey Bradshaw Index*

PMS – engl. *Partial Mayo Score*

TW – engl. *Truelowe and Witts' criteria*

SSCAI – engl. *Simple Colitis Clinical Activity Index*

FK – fekalni kalprotektin

IL-6 – interleukin 6

MES – engl. *Mayo Endoscopic Score*

UCEIS – engl. *Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity*

SES-CD – engl. *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*

MS – engl. *modified score*

EMS – engl. *extended modified score*

mMES – engl. *modified Mayo Endoscopic Score*

CDEIS – engl. *Crohn's Disease Activity Index of Severity*

AUC – površina ispod krivulje (engl. *area under curve*)

ECM – izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*)

BM – bazalna membrana

IM – intersticijski matriks

TNF- $\alpha$  – faktor tumorske nekroze alfa (engl. *tumour necrosis factor-alpha*)

DSS kolitis – engl. *dextran sulphate sodium colitis*

PTM – posttranslacijska modifikacija

PDGF – trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor*)

ITM – indeks tjelesne mase

PGA – engl. *physician global assesement*

TBM - tetrametilbenzidin



## 1. UVOD I SVRHA RADA

### 1.1. Upalne bolesti crijeva

#### 1.1.1. Definicija i podjela upalnih bolesti crijeva

Ulcerozni kolitis (engl. *ulcerative colitis*, UC) i Crohnova bolest (engl. *Crohn's disease*, CD) pripadaju skupini kroničnih upalnih bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD) čiji je tijek obilježen epizodama relapsa i remisije, upalnim promjenama, komplikacijama i ekstraintestinalnim manifestacijama koje mogu dovesti do značajnog pobola i smrtnosti. Neklasificirana upalna bolest crijeva (engl. *inflammatory bowel disease unclassified*) je termin koji se odnosi na bolesnike koji imaju kliničke i endoskopske znakove upalne bolesti crijeva u debelom crijevu, ali bez definitivnih histoloških ili drugih značajka CD ili UC (1-3). Bolesnici s UC i CD se u današnjoj kliničkoj praksi najčešće klasificiraju prema Montrealskoj klasifikaciji (3). Bolesnici s UC se tako klasificiraju prema proširenosti bolesti na ulcerozni proktitis, lijevostrani kolitis i ekstenzivni kolitis ili pankolitis, a prema težini bolesti na bolesnike u kliničkoj remisiji i bolesnike s blagom, umjerenom ili teškom bolesti. Bolesnici s CD se prema Montrealskoj klasifikaciji dijele prema lokalizaciji bolesti na bolest ileuma, kolona, ileuma i kolona zajedno te na izoliranu bolest gornjeg dijela probavnog trakta. Osobito je važna i podjela prema ponašanju bolesti na nestrikturirajući i nepenetrirajući, odnosno inflamatorni fenotip, zatim na strikturirajući fenotip i konačno na penetrirajući fenotip, uz posebno označavanje ima li bolesnik perianalnu bolest. Također, bolesnici s CD se još mogu podijeliti prema dobi u trenutku postavljanja dijagnoze (mlađi od 16 godina, između 17 i 40 godina te stariji od 40 godina) (3).

#### 1.1.2. Etiologija, patogeneza, epidemiologija

Upalne bolesti crijeva su bolesti još uvijek nedovoljno i nepotpuno razjašnjene etiologije i patogeneze. U patogenezi upalnih bolesti crijeva sudjeluju različiti kompleksni genski, okolišni i imunوسي čimbenici. Imunosna reakcija, koja podrazumijeva interakciju stanica imunosti sustava i različitih medijatora s proupalnim i protuupalnim djelovanjem, smatra se ključnim dijelom patogeneze te je predmetom pojačanog istraživanja zbog mogućnosti identifikacije novih molekula koje mogu doprinijeti dijagnostici i praćenju upalne aktivnosti ili terapijskog odgovora (4). Epidemiološke studije su dosad identificirale velik broj okolišnih i genskih čimbenika koji mogu utjecati na rizik IBD-a. U svojoj studiji Piovani i sur. su identificirali čimbenike

koji povećavaju rizik od IBD-a (život u urbanoj sredini, nedostatak vitamina D, izloženost antibioticima, upotreba oralnih kontraceptiva), CD-a (pušenje, apendektomija, tonzilektomija) i UC-a (konzumacija gaziranih pića). Kao zaštitni čimbenici identificirani su fizička aktivnost, visoke razine vitamina D, visoka razina folata, konzumacija čaja itd. (5). U posljednje je vrijeme osobito važna uloga crijevne mikrobiote i disbioze koja može doprinijeti patogenezi IBD-a (6). Osobe s IBD-om imaju smanjenu raznovrsnost crijevne mikrobiote sa smanjenim udjelom bakterija iz roda Bacteroides i Firmicutes. Međutim, je li disbioza uzrok ili posljedica IBD-a još nije do kraja razjašnjeno (7), ali je poznato kako na sastav crijevne mikrobiote utječe čitav niz okolišnih čimbenika poput prehrane, lijekova poput antibiotika i načina života općenito (7).

Danas se diljem svijeta prati porast incidencije i učestalosti IBD-a koje zbog svoje kronične naravi i potrebe za cjeloživotnim i kontinuiranim liječenjem i praćenjem aktivnosti upale predstavljaju velik terapijski i dijagnostički izazov (8-10). Incidencija i učestalost bolesti razlikuju se između, ali i unutar različitih geografskih područja. Najviša incidencija UC i CD je na sjeveru Europe i Sjeverne Amerike te u industrijaliziranim zemljama u usporedbi s manje industrijaliziranim zemljama. U Europi stopa incidencije za UC iznosi 0,9-24 na 100.000 osoba-godina, dok za CD iznosi 0,0-11,5 na 100.000 osoba-godina. Učestalost UC-a iznosi 2,4-294 slučajeva na 100.000 osoba, a CD-a 1,5-213 slučajeva na 100.000 osoba (10).

### 1.1.3. Klinička slika i dijagnoza

Crohnova bolest i UC su kronične upalne bolesti relapsno-remitirajućeg karaktera. U CD-u upala može zahvatiti bilo koji dio crijeva i može biti transmuralna, a najviše zahvaća terminalni ileum, dok se površinska upala u UC-u kontinuirano proteže od rektuma prema proksimalno te može zahvatiti i čitavo debelo crijevo. Najčešći simptom CD-a je kronični proljev, a simptomi koji još mogu biti prisutni su bol u abdomenu i značajan gubitak na tjelesnoj masi. Od sistemskih simptoma u slučaju težih upala može biti prisutna malaksalost, anoreksija ili povišena tjelesna temperatura (1,11). Kod UC-a najčešći simptom su učestale proljevaste stolice s primjesama krvi ili sluzi (3,12). Negativni prediktori ishoda u slučaju teškog relapsa UC-a su povećan broj stolica, povišena tjelesna temperatura, povišena srčana frekvencija i smanjena koncentracija hemoglobina te porast upalnih parametara poput C-reaktivnog proteina (CRP-a) ili sedimentacije eritrocita (SE). Navedeni parametri ujedno su korisni i u

postavljanju kliničke dijagnoze teškog relapsa UC-a (3). Kod postavljanja dijagnoze uvijek je potrebno detaljno pregledati bolesnika kako bi se uočila eventualna prisutnost ekstraintestinalnih manifestacija ili perianalne bolesti. Dijagnoza UC-a i CD-a se postavlja na temelju kliničke slike, endoskopske, radiološke i histološke obrade (2,3). Kod sumnje na IBD potrebno je učiniti kolonoskopiju s terminalnom ileoskopijom, a ako se sumnja na CD preporuča se učiniti i ezofagogastroduodenoskopiju (13,14). Endoskopski znakovi CD-a su tzv. „skip lezije“, odnosno područja normalne sluznice između koje se nalazi upaljena sluznica, zatim ulceracije longitudinalnog tijeka, kaldrmasta sluznica, fistulozni otvori ili strikture. Endoskopska upala u UC-u je kontinuirana, proteže se od rektuma prema oralno, a izgled ovisi o intenzitetu upale, tako da se u teškoj upali uočava spontano krvarenje i velike ulceracije, u umjerenoj upali frijabilnost, erozije, gubitak vaskularnog crteža i naznačeni eritem, a u blagoj upali blaga frijabilnost, smanjen vaskularni crtež i eritem (15). Histopatološki nalaz u UC-u nije specifičan, no nalaze se sljedeći znakovi: poremećaj arhitekture sluznice, abnormalnost epitela, infiltracija neutrofilima, kriptalni apscesi i promjena celularnosti lamine proprije (3). U CD-u mogu biti prisutne sljedeće histopatološke karakteristike: kronični upalni infiltrat (limfociti i plazma stanice), fokalna nepravilnost kripta i granulomi (2).

#### 1.1.4. Terapija

Liječenje upalnih bolesti crijeva usmjereno je na smanjivanje lokalne i sistemske upale, a cilj je postizanje dugotrajne remisije bez upotrebe glukokortikoida i smanjenje rizika od nastanka komplikacija. Dva osnovna načela terapije su farmakološki i kirurški (2,3,16,17). U farmakološku terapiju ubrajaju se glukokortikoidi, aminosalicilati, imunomodulatori i biološka terapija koja čini temelj liječenja, odnosno indukcije i održavanja remisije u većine bolesnika s kompliciranim tijekom bolesti.

Biološka terapija se sve češće primjenjuje u bolesnika s teškim oblicima bolesti rezistentnim na standardnu terapiju. U biološku terapiju se ubraja anti-TNF terapija, anti-integrinska protutijela i anti IL-12/23 protutijela (2,17). U terapiji se također koriste i male molekule poput JAK inhibitora (18). Biološka terapija je revolucionalizirala liječenje IBD-a, upravo time što omogućava liječenje teških i refraktornih oblika bolesti, ali i povećava vjerojatnost mukoznog cijeljenja (19). Upravo mukozno cijeljenje je današnji terapijski cilj u liječenju IBD-a. Mukozno cijeljenje smanjuje stopu hospitalizacija, kirurških zahvata, relapsa, a u UC-u smanjuje i rizik kolorektalnog

karcinoma (20-22). Nadalje, posljednjih godina se pojavio interes za koncept duboke remisije koja uključuje mukozno cijeljenje, kliničku i biokemijsku remisiju bolesti (23,24). Ranije uvođenje biološke terapije u bolesnika s potencijalno agresivnim oblikom bolesti ograničeno je nedostatkom kliničkih pokazatelja i laboratorijskih biomarkera (25). Važno je spomenuti strategiju *treat-to-target* koja se temelji na redovitoj procjeni aktivnosti bolesti pomoću kliničkih i biokemijskih biljega upale i sukladno tome donošenju odluka o eventualnoj promjeni terapije (eskalacija terapije, promjena lijeka itd.) (26).

Otkriće novih i pouzdanih biomarkera omogućilo bi bolju stratifikaciju i identifikaciju visokorizičnih bolesnika, što bi utjecalo na raniju promjenu terapijskog pristupa, a samim time i na promjenu prirodnog tijeka bolesti koja nerijetko vodi ireverzibilnim oštećenjima crijeva.

## 1.2. Upalna aktivnost i biomarkeri upalne aktivnosti

### 1.2.1. Klinički pokazatelji upalne aktivnosti

Postoji više vrsta kliničkih pokazatelja upalne aktivnosti kojima se nastoji kvantificirati njezina težina. Upalna aktivnost nastoji se kvantificirati temeljem različitih, često nespecifičnih, pokazatelja poput broja i konzistencije stolice, prisutnosti krvi u stolici, boli u abdomenu, febriliteta, općeg stanja bolesnika ili laboratorijskih nalaza. Glavni nedostatak takve procjene aktivnosti jest podložnost subjektivnoj procjeni i slaba korelacija s endoskopskim nalazom upale u sluznici crijeva (27).

Od kliničkih indeksa upalne aktivnosti u CD-u se u kliničkoj praksi najčešće koriste *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI) i *Harvey Bradshaw Index* (HBI). *Crohn's Disease Activity Index* je klinički indeks upalne aktivnosti koji se sastoji od 8 varijabli od kojih svaka doprinosi različitim brojem bodova te se pokušava odrediti stupanj aktivnosti bolesti temeljem tegoba unatrag 7 dana. Prema broju bodova definirane su različite skupine upalne aktivnosti (<150 označava remisiju, a >450 tešku upalu). Varijable koje se koriste u CDAI-u su broj stolica, bol u abdomenu, opće stanje bolesnika, postojanje komplikacija poput artritisa ili artralgijs, uveitisa ili iritisa, nodoznog eritema ili *pioderma gangrenosum*, parianalnih fistula, apscesa, drugih crijevnih fistula i povišena tjelesna temperatura (više od 37,8 °C) u proteklih tjedan dana (11,12). Nedostatak CDAI je taj što on nije pouzdan u određivanju aktivnosti perianalne CD ili fistulirajućeg tipa CD zato što perianalna i fistulirajuća bolest u manjoj mjeri doprinose ukupnom rezultatu, a s druge strane njihov utjecaj na bolesnikovo

stanje može biti velik. *Harvey Bradshaw Index* je klinički indeks upalne aktivnosti koji je jednostavniji za primjenu od CDAI-a, što olakšava prikupljanje podataka i izračun. Rezultati HBI-a dobro koreliraju s CDAI (28). *Harvey Bradshaw Index* ima pet komponenata kojima se procjenjuje upalna aktivnost (opće stanje bolesnika, intenzitet boli u abdomenu, broj tekućih stolica, prisutnost abdominalne mase i prisutnost komplikacija poput artralgijske, uveitisa, nodoznog eritema, aftoznih ulceracija, *pioderma gangrenosum*, analnih fisura, novih fistula, apscesa) (29). Podaci se prikupljaju za prethodni dan, stoga nije potrebno praćenje stolica tijekom sedam dana kao što je to slučaj u CDAI-u. Remisija je definirana kao HBI <5, dok je teška upala definirana kao HBI >16.

U UC-u također postoji više vrsta kliničkih indeksa upalne aktivnosti od kojih se najčešće upotrebljavaju *Partial Mayo Score* (PMS), *Truelowe and Witts' criteria*, (TW kriteriji) ili *Simple Colitis Clinical Activity Index* (SCCAI). *Partial Mayo Score* je najčešći klinički indeks upalne aktivnosti koji se koristi u istraživanjima. Jednostavan je za izračunavanje, a u obzir se uzimaju tri komponente: broj stolica više od uobičajenog, količina rektalnog krvarenja i procjena općeg stanja od strane liječnika (engl. *physician global assesment*, PGA). Upravo posljednja komponenta liječnikove procjene smatra se jednim od nedostataka zato što nije moguća neovisna i samostalna upotreba upitnika od strane ispitanika. Remisija je definirana kao PMS ≤1. Dodatkom endoskopske komponente može se izračunati kompletni *Mayo Score* (*Full Mayo Score*). Trueloweovi i Wittsovi kriteriji prihvaćeni su u kliničkoj praksi za prepoznavanje bolesnika s teškim relapsom UC-a koji zahtijevaju hospitalizaciju i liječenje intravenskom primjenom glukokortikoida. Kriteriji za akutni teški kolitis su 6 ili više stolica na dan s primjesama krvi i prisutnim barem još jednim od sljedećih kriterija: tjelesna temperatura 37,8 °C ili više, srčana frekvencija manja od 90/min, koncentracija hemoglobina niža od 10,5 g/L i SE viša od 30 mm/h ili vrijednosti CRP-a više od 30 mg/L (3). Bolesnici s više prisutnih kriterija za teški kolitis imaju veću vjerojatnost kolektomije tijekom hospitalizacije (30). Blaga bolest je definirana kao manje od 4 proljevasto-krvave stolice na dan, srčana frekvencija manja od 90/min, tjelesna temperatura niža od 37,5 °C, vrijednosti hemoglobina više od 11,5 g/L, CRP unutar referentnih vrijednosti ili SE niža od 30 mm/h (3).

### 1.2.2. Biokemijski pokazatelji upalne aktivnosti

Biokemijski pokazatelji upalne aktivnosti imaju važan doprinos u liječenju bolesnika s IBD-om i u procjeni upalne aktivnosti. Glavni nedostatak biokemijskih pokazatelja upalne aktivnosti jest njihova nespecifičnost, ali i činjenica da mogu biti povišeni u brojnim drugim upalnim stanjima. Primjerice, laboratorijski nalazi u UC-u mogu odražavati aktivnost upale i proširenost bolesti, dok u CD-u oni mogu biti odraz crijevne malapsorpcije, upravo zbog mogućnosti zahvaćanja tankog crijeva. U ovom poglavlju naglasak ćemo staviti na biokemijske pokazatelje upalne aktivnosti. U kliničkoj praksi se za procjenu upalne aktivnosti najčešće koriste CRP i SE. C-reaktivni protein i SE su biomarkeri koji imaju svoje mjesto u redovnom kliničkom radu zapravo u svim bolestima povezanim s nekim oblikom upale, a u području IBD-a su zanimljivi jer često mogu odražavati intenzitet upalne aktivnosti. Od ostalih nespecifičnih serumskih biokemijskih pokazatelja upalne aktivnosti vrijedi spomenuti trombocite, leukocite, fibrinogen, serumske albumine itd. Od fekalnih biomarkera danas najzastupljeniji u redovnom kliničkom radu je fekalni kalprotektin (FK).

C-reaktivni protein je reaktant akutne faze čija se koncentracija povećava tijekom upale. Sintetizira se u hepatocitima kao odgovor na interleukin-6 (IL-6), a u manjoj mjeri i na IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  (31,32). Zanimljiva je činjenica da se vrlo brzo nakon nastanka upale u proizvodnji CRP-a u relativno kratkom vremenu aktivira velik broj hepatocita (unutar 24-48 sati 500-1000 puta više od bazalnih vrijednosti). S druge strane i sniženje vrijednosti CRP-a je relativno brzo, čemu svakako doprinosi poluvrijeme života od 19 sati (33). Poluvrijeme života CRP-a je u većini slučajeva neovisno o fiziološkim ili patološkim uvjetima, a značajan čimbenik je stanje jetre, stoga se treba oprezno interpretirati u slučaju jetrenog zatajenja ili lijekova koji djeluju na jetrenu funkciju. Iz navedenih razloga CRP je vrijedan i koristan biomarker u dijagnostici i praćenju upale.

Sedimentacija eritrocita je također koristan biomarker upale koji odražava promjene u različitim proteinima akutne faze. Sedimentacija eritrocita je zapravo proces taloženja eritrocita nakon jednog sata u uzorku antikoagulirane krvi pod utjecajem gravitacije (34). Za razliku od CRP-a, SE je podložna utjecaju brojnih čimbenika poput anemije, oblika i veličine eritrocita, trudnoće, starije životne dobi, abnormalnosti proteina, tehničke obrade itd. Dok je CRP bolji pokazatelj upale unutar prva 24 sata, SE je

zadovoljavajući pokazatelj nakon prvih 24 sata (35). Nadalje, porast SE će ranije dosegnuti svoje vršne koncentracije, ali može biti potrebno i nekoliko dana da vrijednosti značajno padnu, što je važno imati na umu kod praćenja i interpretacije nalaza (36).

Koagulacijski status je narušen u bolesnika s IBD-om. Reaktivna trombocitoza je nespecifični marker upalne aktivnosti i mogući predisponirajući čimbenik tromboemboličkim događajima (37-39). Uz to, u procesu koagulacije sudjeluje i fibrinogen čija je razina također povišena u akutnoj upali (40). Uloga trombocita u patogenezi IBD-a potvrđena je i histološkim pronalaskom mikrovaskularnih tromba u crijevu bolesnika kao i identifikacijom cirkulirajućih agregata trombocita u aktivnoj fazi CD-a i UC-a (41-43). Bolesnici s IBD-om imaju tri puta veću vjerojatnost razvoja tromboze u usporedbi sa zdravom populacijom, a tromboembolički događaji mogu biti osobito životno ugrožavajući. Bolesnici s venskom tromboembolijom imaju dva puta veću stopu pobola, a podaci su pokazali da je sklonost trombozi usko povezana s upalnom aktivnosti kod bolesnika s IBD-om (44). Upravo su iz tog razloga u patofiziologiji IBD-a osobito zanimljivi trombociti koji su neposredno uključeni u proces upale i koji, uz to što sudjeluju u procesu zgrušavanja krvi, imaju ulogu u regulaciji intenziteta upale sluznice lučenjem brojnih medijatora. Trombociti nakon aktivacije luče velik broj biološki aktivnih molekula koje potencijalno doprinose trombozi i koje mogu pojačati upalnu aktivnost djelovanjem na različite stanične i molekularne mehanizme. Uloga trombocita kao stanica koje aktivno sudjeluju u upalnom procesu vidljiva je iz činjenice da proizvode i spremaju velike količine upalnih medijatora, da istodobno unakrsno djeluju na različite tipove stanica u upalnom procesu te da ih isto tako aktiviraju različiti upalni medijatori koje luče druge stanice tijekom upale, a vežu se na površinske receptore trombocita (45). Proupalna aktivnost trombocita je primarno posredovana biološki aktivnim molekulama spremljenim u unutarstaničnim spremišnim odjeljcima poput  $\alpha$ -granula. Biološki aktivne molekule koje luče aktivirani trombociti tako stupaju u interakciju i s receptorima cirkulirajućih stanica imunskog sustava ili endotelnih stanica na koje djeluju aktivirajuće te na taj način pojačavaju upalni odgovor. Neke od njih su histamin, prostaglandin E<sub>2</sub> i D<sub>2</sub>, trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF), tromboksan A<sub>2</sub> i serotonin, nukleotidi adenina, trombocitni faktor 4,  $\beta$ -tromboglobulin te još brojni medijatori koji između ostaloga potiču nakupljanje fibrinogena (VEGF, TGF- $\beta$ , RANTES, PAF, IL-1 $\beta$ ,

IL-7, faktor otpuštanja histamina) (46-49). Stoga u cijeloj koagulacijskoj kaskadi sudjeluje i fibrinogen, čija je koncentracija također povišena u stanju upale (40,50).

Od fekalnih biomarkera u kliničkoj praksi se koristi FK. Fekalni kalprotektin kao biomarker je koristan u postavljanju dijagnoze IBD-a, predikciji kliničkog relapsa i praćenju aktivnosti bolesti (51-54). Unatoč dobrom profilu FK-a kao biomarkera, studije su pokazale da vrijednosti FK-a nisu uvijek pouzdani pokazatelj upalne aktivnosti u bolesnika s IBD-om (55-57). Budući da kalprotektin otpuštaju neutrofilni na mjestu upale njegova je koncentracija u stolici izravno proporcionalna migraciji neutrofila u crijevo, što ga čini osjetljivim, ali i nespecifičnim markerom crijevne upale. Uz crijevnu upalu, na vrijednosti FK-a mogu utjecati i brojni drugi čimbenici poput crijevnih infekcija ili korištenja nesteroidnih protuupalnih lijekova, a koncentracije također mogu biti više u djece ili značajno varirati tijekom dana (58-60). U svojoj metaanalizi Jin-Feng Lin i sur. su procjenjivali dijagnostičku točnost FK u razlikovanju ispitanika s aktivnom bolesti od onih u remisiji. Analizirana su 744 ispitanika s UC-om i 727 ispitanika s CD-om te je u konačnici dobivena površina ispod krivulje (engl. *area under curve*, AUC) od 0,89 kod IBD-a, 0,93 kod UC-a i 0,88 kod CD-a. Nadalje, vrijednosti od 250 µg/g imale su osjetljivost od 80% (95% CI: 76%-84%) i specifičnost od 82% (95% CI: 77%-86%) (61). Općenito, FK dobro korelira s kliničkom, endoskopskom i histološkom aktivnosti u UC-u, dok je u CD-u ta korelacija nešto slabija. Zabilježen je trend bolje korelacije FK-a u bolesti koja zahvaća debelo crijevo od izolirane ilealne bolesti (62).

### 1.2.3. Endoskopski pokazatelji upalne aktivnosti

Mukozno cijeljenje je današnji terapijski cilj i pokazatelj uspješnosti liječenja IBD-a. Mukozno cijeljenje se definira kao odsutnost svih endoskopski vidljivih ulceracija i erozija. S obzirom na to da je upala u UC-u ograničena na sluznicu, mukozno cijeljenje predstavlja konačni terapijski cilj. Studije su pokazale da je mukozno cijeljenje povezano sa smanjenom upotrebom glukokortikoida, smanjenjem stopa hospitalizacije, održanom kliničkom remisijom te smanjenim rizikom za kolektomiju i kolorektalni karcinom (63-65). Mukozno cijeljenje u CD-u doprinosi smanjenju potrebe za glukokortikoidima, smanjuje broj hospitalizacija, doprinosi trajanju kliničke remisije i smanjuje potrebu za kirurškim zahvatima koji nerijetko mogu biti mutilirajući (63,66,67).



Najčešće korišteni pokazatelji u kliničkoj praksi za UC su *Mayo Clinic endoscopy subscore* (*Mayo endoscopic score*, MES) i *Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity* (UCEIS) (68,69). *Mayo endoscopic score* sastoji se od procjene sluznice crijeva prema prisutnosti eritema, smanjenog vaskularnog uzorka, frijabilnosti, erozija, spontanijih krvarenja ili ulceracija te se klasificira prema težini od 0-3 (70). Kao što je već i ranije spomenuto, dodatkom kliničke komponente (broja stolica, prisutnosti krvi u stolici i procjeni općeg stanja bolesnika) dobiva se kompletni *Mayo score* (69). Ovaj endoskopski pokazatelj ne uzima u obzir proširenost bolesti, što je jedan od značajnih nedostataka. Proširenost bolesti je osobito važna, jer ona doprinosi ukupnoj količini upale crijeva, a samim time može utjecati na ukupnu količinu biomarkera koji nastanu tijekom procesa upale. U CD-u, primjerice, *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease* (SES-CD) sadrži komponentu proširenosti bolesti u svom izračunu, dok to nije slučaj s MES-om. Nedostatak proširenosti bolesti može se prevladati prilagodbom postojećeg endoskopskog indeksa. Uvođenjem proširenosti bolesti u MES nastaje modificirani *Mayo endoscopic score* (engl. *modified Mayo endoscopic score*, mMES). *Modificirani Mayo score* u svoj izračun uzima maksimalnu proširenost, a izračunava se na sljedeći način (71): tijekom procjene upale mMES-om debelo crijevo se podijeli na pet dijelova: ascendentni kolon, transverzalni kolon, descendentni kolon, sigmoidni kolon i rektum. Za svaki od tih segmenata najprije se izračuna MES. Zbrajanjem vrijednosti MES svakog segmenta dobiva se tzv. *modified score* (MS) na ljestvici od 15 bodova. Nadalje, množenjem MS-a i duljine učinjene endoskopije u decimetrima dobiva se tzv. *extended modified score* (EMS). Konačno, mMES se dobiva dijeljenjem EMS s brojem upaljenih segmenata.

Postoji nekoliko validiranih endoskopskih indeksa za procjenu upale sluznice u bolesnika s CD-om. Najčešće upotrebljavani indeks jest SES-CD koji je zapravo pojednostavljena verzija *Crohn's Disease Activity Index of Severity* (CDEIS) (72,73). *Rutgeerts' Post-operative Endoscopic Index* se koristi za procjenu rizika povrata bolesti nakon ileokolične resekcije u CD-u (74).

*Crohn's Disease Activity Index of Severity* uzima u obzir četiri komponente: prisutnost dubokih ulceracija, površinske ulceracije, duljinu ulcerirane sluznice i duljinu sluznice zahvaćene bolešću u regijama debelog i tankog crijeva (rektum, sigmoidni i lijevi kolon, transverzalni kolon, desni kolon i ileum). Iako je CDEIS reproducibilan i validiran, kompliciran izračun čini ga glavnom zaprekom za rutinsku primjenu u kliničkoj praksi.

Za popunjavanje CDEIS-a potrebno je više od 30 unosa (72). Remisija je definirana kao CDEIS <3.

*Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease* dobro korelira s CDEIS-om, nešto je manje kompliciran s potrebnih preko 20 unosa za dobivanje konačnog rezultata, što također otežava primjenu u kliničkoj praksi (73). S druge strane, može biti od velike koristi u praćenju npr. odgovora na terapiju u bolesnika s IBD-om. Endoskopske karakteristike koje se uzimaju u obzir u izračunu su veličina ulceracija, površina zahvaćene sluznice ulceracijama, površina zahvaćene sluznice bolešću i prisutnost stenoza. Kao i u CDEIS-u, procjena se provodi u ileumu i debelom crijevu koje je podijeljeno u pet segmenata. Iznos SES-CD 0-2 označava remisiju bolesti, dok >15 predstavlja tešku endoskopsku upalnu aktivnost.

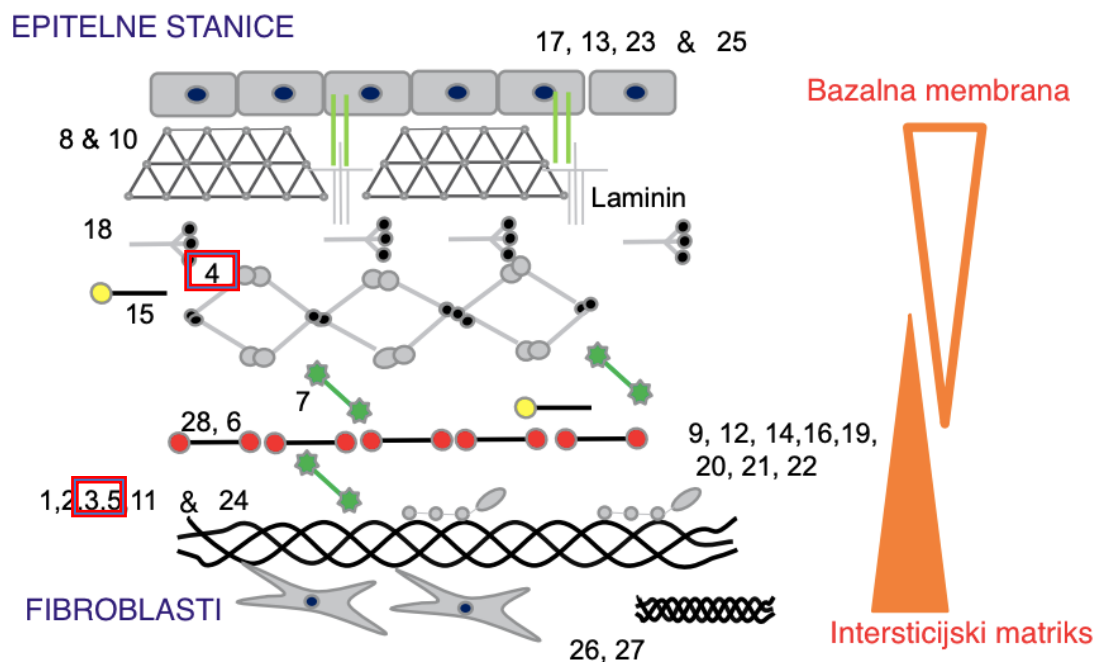
*Rutgeerts' Post-operative Endoscopic Index* određuje težinu endoskopskog recidiva bolesti na anastomozi u neoterminalnom ileumu nakon resekcije ileokolona i predviđa simptomatski recidiv bolesti (74). Indeks iznosi od i0 do i4, a viši iznos predstavlja teži recidiv bolesti. Komponente endoskopskog indeksa upalne aktivnosti su izgled i broj ulceracija u distalnom ileumu. Remisija je definirana kao iznos <i2.

### 1.3. Izvanstanični matriks i remodeliranje izvanstaničnog matriksa

#### 1.3.1. Definicija izvanstaničnog matriksa

Crijevna sluznica građena je od epitelnih stanica ispod kojih se nalazi izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM) koji je građen od intersticijskog matriksa (IM), bazalne membrane (BM), ali i stanica poput fibroblasta (75). Remodeliranje ECM-a ključni je proces tkivne homeostaze u kojem se stari i oštećeni proteini razgrađuju i zamjenjuju novima. Aktivnosti tkivne homeostaze su precizno koordinirane u fiziološkim situacijama. S druge strane, u patološkim uvjetima kao što su upala, fibroza ili malignomi dolazi do narušavanja ravnoteže između izgradnje i razgradnje ECM-a, što rezultira poremećenim remodeliranjem tkiva. Kod poremećenog remodeliranja tkiva fiziološki prisutni proteini ECM-a zamjenjuju se proteinima drukčijeg sastava. Takav proces vodi prvenstveno narušavanju strukture, kvalitete i funkcije ECM-a, što se manifestira disfunkcijom ciljnog organa. Uz proces remodeliranja visoke količine produkata razgradnje i izgradnje mogu biti otpuštene u sistemnu cirkulaciju u kojoj se njihove koncentracije mogu mjeriti i na taj način poslužiti kao biokemijski marker u serumu u raznim bolestima (76).

Glavni tipovi kolagena koji se mogu naći u ECM-u crijevne stijenke su tipovi kolagena I, III i IV (77,78). Zastupljenost različitih tipova kolagena u crijevu iznosi za kolagen I 68%, kolagen III 20% i kolagen V 12% (79). Kolageni I i III imaju glavnu ulogu u održavanju strukture i rigidnosti ECM-a, a kolagen III gradi retikularna vlakna koja omogućavaju gipkost organa koji mijenjaju veličinu i oblik poput crijeva. Kolagen IV je građevni protein BM-a (80), a kolagen V je pojačano izražen tijekom cijeljenja rane, fibrogeneze i razvojnog ciklusa tkiva (81).



Slika 1. Shematski prikaz strukture izvanstaničnog matriksa i smještaja određenih tipova kolagena. Brojevi označavaju različite tipove kolagena (prema 82).

### 1.3.2. Struktura izvanstaničnog matriksa

Izvanstanični matriks sastavljen je od strukturnih i funkcionalnih proteina koji tvore jedinstvenu tkivno-specifičnu cjelinu (82,83). Glavne sastavne komponente crijevnog ECM-a jesu različite vrste kolagena, laminina i proteoglikana, a sam ECM može se podijeliti na BM i IM (83,84). Bazalna membrana je smještena ispod epitelnih ili endotelnih stanica u području sluznice ili podsluznice, a glavne građevne komponente su kolagen IV i laminini. S druge strane, IM je smješten u lamini propriji i podsluznici crijevnog tkiva, a glavne građevne komponente IM-a su kolagen I, II, V i elastini (82,83,85) (slika 1).

Proteini BM-a sa svojim djelovanjem putem integrinskih receptora na epitelne stanice imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze crijevnog epitela u odgovoru na

oštećenje (86). Kolagen IV je najzastupljeniji kolagen BM-a i najvažniji strukturni protein BM-a koji međusobno integrira laminine, nidogene i ostale komponente BM-a (87,88). Kolagen IV primarno sintetiziraju mezenhimne i enteroendokrine stanice, ali tijekom ponovnog uspostavljanja BM-a epitelne stanice mogu također prolazno odlagati kolagen IV (89-91). Kolagen IV je smješten na granici BM-a i IM-a te na taj način razdvaja ta dva dijela (92). Ostali najzastupljeniji ne-kolagenski proteini BM-a jesu laminini koji održavaju strukturu, zatim proteoglikani sindekani i perlekani koji imaju ulogu u razvoju, proliferaciji i diferencijaciji stanica, staničnoj adheziji i migraciji (93-95). Nadalje, nidogen-1 je također glikoprotein crijevne BM koji u interakciji s kolagenom IV, lamininom i perlekanom ima ulogu u njihovom povezivanju, što je od osobite važnosti za adekvatnu strukturu, ali i funkciju BM-a (96).

Intersticijski matriks predstavlja dublji sloj tkiva i smješten je ispod BM-a u području lamine proprije i podsluznice. Strukturu IM-a čine različite vrste kolagena, a među njima su najznačajniji kolageni I i III. Kolagen I, koji se sastoji od dva  $\alpha 1$  lanca i jednog  $\alpha 2$  lanca, i kolagen III, koji se sastoji od tri  $\alpha 3$  lanca, sintetiziraju subepitelne mezenhimne stanice i fibroblasti, nakon čega se otpuštaju u ECM (82,97). Tijekom sinteze kolagena I i III  $\alpha$  lanci formiraju trostruku heliks uzvojnica koja se stabilizira hidroksilacijom prolina i lizina. Taj proces rezultira sekrecijom fibrilarnog kolagena i proteolizom N i C terminalnih krajeva prokolagena. Upravo je stvaranje fibrila i njihovo međusobno povezivanje od velike važnosti za adekvatnu stabilnost i funkciju kolagena (99). Kolagen I je najzastupljeniji kolagen koji formira oko 90% organske mase kosti i sastavni je dio tetiva, kože, ligamenata, rožnice itd. Kolagen III je homotrimer (tri  $\alpha 1$  lanca) koji se nalazi u tkivima bogatima kolagenom I, izuzev koštanog tkiva (82). Kolagen III je važna komponenta retikularnih vlakana u intersticijskom tkivu pluća, jetre, slezene, dermisa i žila, a zastupljen je i u elastičnom tkivu u kombinaciji s kolagenom I (100). Kolageni I i III kao fibrilarni kolageni pružaju stabilnost, čvrstoću i snagu IM-u, dok retikularna vlakna kolagena III omogućavaju konstantne promjene veličine i oblika koje su stalno prisutne u crijevu (82). Tijekom cijeljenja rane kolagen III se odlaže prije kolagena I, zatim ga kolagen I s vremenom dijelomice zamijeni (97). Nadalje, kolagen V je heterotrimer koji se sastoji od tri različita  $\alpha$  lanca ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$ ) (79). Kolagen V tipično formira heterofibrile s kolagenom I i III te je prisutan u organskom dijelu koštane mase, IM-u crijeva, ali i mišića, jetre, pluća i placente (79,101). S obzirom na to da se kolagen V ugrađuje u kolagenske fibrile i da je smješten u centralnom dijelu, on ima izravnu ulogu u sastavljanju fibrila i pravilnom

raspoređivanju kolagena I i III (82,101,102). Podaci ukazuju na to da se kolagen V pojačano izražava tijekom razvoja tkiva, cijeljenja rane i fibrogeneze (103,104). Elastin je glavna komponenta elastičnih vlakana koja pružaju elastičnost i fleksibilnost tkivu crijeva. Uz to, elastin omogućava elastičnost arterija i velikih krvnih žila, što doprinosi njihovoj otpornosti povišenom tlaku (105,106).

### 1.3.3. Remodeliranje izvanstaničnog matriksa

Remodeliranje ECM-a je normalan fiziološki proces koji je bitan za razvoj tkiva, njihov popravak i normalno funkcioniranje (107,108). Tkivo crijeva u fiziološkim uvjetima ima visok promet stanica (engl. *turnover*), što znači relativno brzu zamjenu starog epitela novim, otprilike jednom na tjedan, stoga je proces remodeliranja od velike važnosti za održavanje homeostaze crijeva (109). U normalnim fiziološkim uvjetima odnos između razgradnje i stvaranja proteina ECM-a je u ravnoteži, no u uvjetima narušene homeostaze dolazi do uništavanja tkiva i posljedično procesa cijeljenja. Kod upale visokog intenziteta, ponavljane ili kronične upale može doći do stvaranja novog tkiva koje nije adekvatno u strukturnom, ali i u funkcijskom smislu (75,110). Upravo u IBD-u postoji cijeli spektar upalne aktivnosti, od aktivne s njenim neposrednim posljedicama do kronične s posljedičnim stvaranjem fibroznog tkiva, striktura itd. Navedeni procesi upale u velikoj mjeri zahvaćaju upravo ECM (111,112). Visoka izraženost i pojačana aktivnost proteaza uslijed procesa cijeljenja može imati za posljedicu pojačano odlaganje proteina u ECM-u stijenke crijeva, odnosno narušeno remodeliranje tkiva. Na taj način učestali upalni procesi ili kronični upalni procesi mogu dovesti do stvaranja tkivnog ožiljka, odnosno fibroze (75,77,113).

Upala i fibroza, procesi pojačanog uništavanja tkiva i pojačanog odlaganja i formiranja fibroznog tkiva često se razmatraju kao dva odvojena procesa. Međutim, proces upale i proces fibroze međusobno su povezani i potaknuti su i aktivnom i kroničnom upalom s visokom aktivnosti proteaza. Glavno mjesto odvijanja tih procesa je ECM. Proteaze koje najviše doprinose remodeliraju intestinalnog ECM-a jesu matriks metaloproteinaza (MMP), neutrofilna elastaza (NE) i meprini (75,114,115). U upalnim bolestima crijeva na mjestu upale upalne stanice (T-stanice i makrofag) otpuštaju različite interleukine (IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23) i faktor tumorske nekroze alfa (*tumour necrosis factor-alpha*, TNF- $\alpha$ ) (116,117). Citokini služe kao medijatori koji održavaju proces kronične upale i pojačavaju aktivnost i otpuštanje MMP-a i NE-a, što pojačava, odnosno amplificira proteolitički učinak na ECM-u (114).

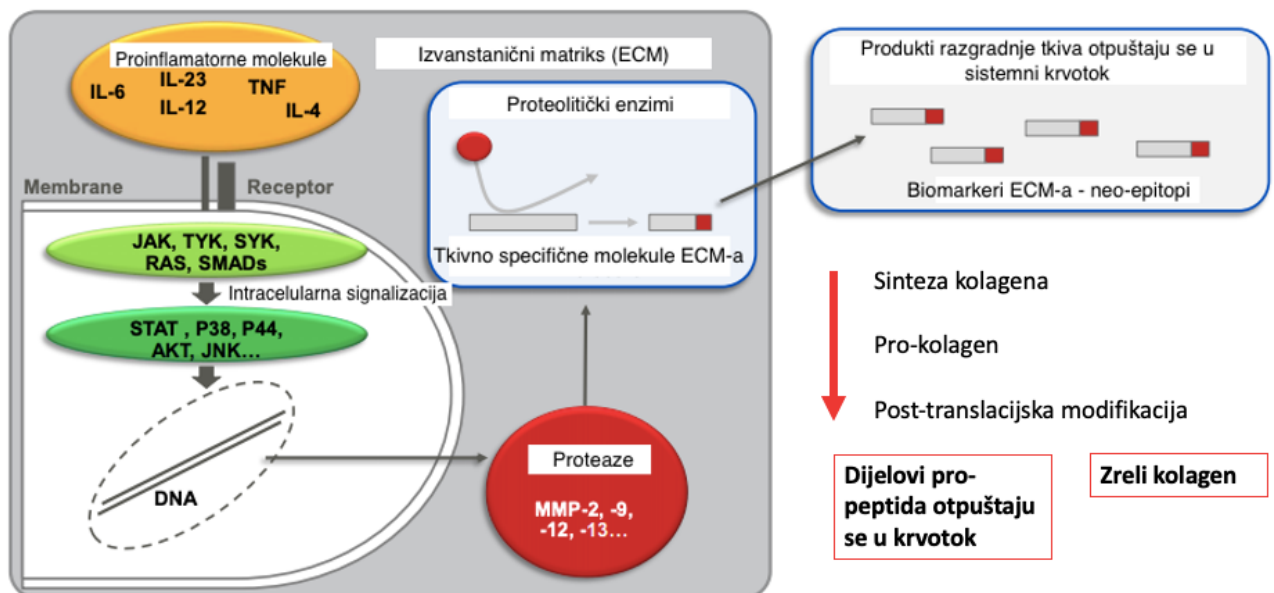
U tom procesu dolazi do remodeliranja tkiva na način da se razvije ožiljno tkivo i fibroza kao rezultat kroničnog upalnog procesa (118). Matriks metaloproteinaze također postoje i kao proteaze vezane za staničnu membranu. Enzimi poput MMP-3, -8, -9 i -7 su pojačano izraženi tijekom upale u upalnim bolestima crijeva i povezani su s težinom upale (110,112). Kako potiču oštećenje tkiva, oni su značajni čimbenici u patogenezi IBD-a tijekom upale. Eksperimentalne studije na mišjem modelu kolitisa (*dextran sulphate sodium colitis*, DSS kolitis) pokazale su da MMP-9 oštećuje tkivo crijeva i da je izražena kod ozljede crijeva. S druge strane, MMP-2 bi mogla imati zaštitnu ulogu u tom procesu, ali MMP-9 ga svojim učinkom nadvladava (119). U IBD-u specifični produkti razgradnje ECM-a nastaju djelovanjem MMP-a, dok se s druge strane sintetiziraju različiti proteini čime nastaju produkti izgradnje ECM-a.

#### 1.4. Biomarkeri razgradnje i stvaranja kolagena III, IV i V

##### 1.4.1. Produkti razgradnje i stvaranja proteina kao biomarkeri

Posljedica remodeliranja ECM-a je proizvodnja produkata razgradnje i izgradnje proteina koji se mogu mjeriti u krvi, a oni se nazivaju neoepitopi. Na primjer, neoepitopi tako mogu biti produkti razgradnje, odnosno degradacijski fragmenti proteina koji mogu biti specifični za određeno tkivo ili određeni enzim djelovanjem kojega oni nastaju. Iz tog razloga neoepitopi mogu poslužiti kao biomarkeri koji odražavaju remodeliranje ECM-a. Endopeptidaze poput MMP-a razgrađuju makromolekule kolagena i proteoglikana, što ima za posljedicu stvaranje neoepitopa (120). Također je važno naglasiti ulogu posttranslacijskih modifikacija (PTM) i njima uzrokovanih promjena na proteinima. Posttranslacijska modifikacija je fiziološki proces reguliran brojnim enzimima koji mijenjaju sastav i strukturu proteina, a njihovim djelovanjem također mogu nastati neoepitopi. Postoji čitav niz neoepitopa nastalih različitim mehanizmima PTM-a koji mogu poslužiti u identifikaciji novih i inovativnih biomarkera. U PTM se ne ubrajaju samo produkti nastali proteolitičkom aktivnošću, iako oni imaju veliku važnost u patofiziološkom smislu tijekom upale, već i drugi procesi poput hidroksilacije, razgradnje prokolagenskih peptida, izomerizacije, glikozilacije itd. Svi procesi PTM-a imaju utjecaj na protein na nekoj određenoj razini, tako da neke PTM mogu biti važne za održavanje strukture i funkcije tkiva, dok druge mogu biti destruktivne. Uz to, procesi PTM-a mogu biti specifični za određeno patološko stanje (76). Jedan takav primjer nekontroliranog remodeliranja ECM-a opisan je u procesu fibroze jetre. Tijekom nastanka fiboze jetre događaju se kvalitativne i kvantitativne

promjene ECM-a, povećava se udio fibroznog tkiva u jetri, a proces razgradnje postojećih proteina i izgradnje novih, odnosno pojačan promet proteina praćen je otpuštanjem fragmenata, odnosno neoepitopa u krvotok. Otpušteni neoepitopi mogu biti propeptidi kolagena tipa III koji nastaju tijekom procesa pojačanog stvaranja proteina ili s druge strane produkti razgradnje kolagena tipa I koji nastaju djelovanjem MMP-a (121-123). Kao posljedica ovih mehanizama produkti razgradnje i stvaranja proteina koji cirkuliraju u krvotoku mogu poslužiti kao biomarkeri za procjenu aktivnosti ili proširenosti bolesti, kao prognostički markeri ili za praćenje odgovora na terapiju (slika 2). Fragmenti razgradnje proteina kolagena tipa I i II su već i ranije opisani u drugim patološkim stanjima poput osteoporoze i osteoartritisa (123,124). U ovoj studiji proučavat ćemo biomarkere C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5 (slika 3).



Slika 2. Prikaz nastanka produkata razgradnje i stvaranja proteina koji cirkuliraju u krvotoku i koji mogu poslužiti kao biomarkeri za procjenu aktivnosti ili proširenosti bolesti (prema 80).

C3M	<ul style="list-style-type: none"> <li>• neoepitop i razgradni produkt kolagena tip III nastao djelovanjem proteolitičkog enzima MMP-9</li> </ul>
C4M	<ul style="list-style-type: none"> <li>• neoepitop i razgradni produkt kolagena tip IV alfa-1 lanca koji nastaje djelovanjem proteolitičkih enzima MMP-2, -9 i -12</li> </ul>
Pro-C3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• otpušteni N-terminalni propeptid kolagena tipa III i biomarker je izgradnje kolagena III</li> </ul>
Pro-C4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• epitop u 7S domeni kolagena tipa IV i biomarker je izgradnje kolagena tipa IV</li> </ul>
Pro-C5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• otpušteni C-terminalni propeptid kolagena tipa V i biomarker je izgradnje kolagena tipa V</li> </ul>

Slika 3. Popis biomarkera razgradnje i stvaranja kolagena III, IV i V koji će se proučavati u ovoj studiji i njihove glavne značajke.

#### 1.4.2. Biomarkeri razgradnje i stvaranja kolagena III (C3M i Pro-C3)

C3M je neoepitop i razgradni produkt kolagena tip III nastao djelovanjem proteolitičkog enzima MMP-9 (125). Pro-C3 je otpušteni N-terminalni propeptid kolagena tipa III i biomarker je izgradnje kolagena III (126). Cilj studije Barascuka i sur. bio je razvoj novog kompetitivnog ELISA testa za mjerenje proteolitičkog djelovanja MMP-9 na kolagen tip III u eksperimentalnom modelu jetrene fibroze (125). S obzirom na to da se tijekom fibrogeneze kolageni tip I i III povećavaju i do 8 puta te da MMP-2 i MMP-9 imaju ulogu u regulaciji procesa fibroze, pretpostavilo se da bi fragmenti nastali djelovanjem MMP-9 mogli poslužiti kao biomarker jetrene fibroze. U *ex vivo* kulturama stanica jetrenog tkiva zahvaćenog fibrozom potvrđeno je povećanje neoepitopa C3M te su autori zaključili da C3M može poslužiti kao biomarker razgradnje kolagena III. S druge strane, tijekom stvaranja fibrila N terminalni propeptid kolagena tipa III se cijepa specifičnim N-proteazama prije ugradnje u konačnu formu kolagena (126). U tom slučaju nastaju neoepitopi koji odražavaju aktivnost stvaranja kolagena tipa III i koji se također mogu mjeriti u krvotoku. Ponekad cijepanje propeptida nije potpuno i on ostane vezan za molekulu prokolagena, što rezultira abnormalnim proteinom podložnim brzom katabolizmu. Na taj način biomarker Pro-C3 može odražavati i pojačanu razgradnju, odnosno pojačan promet kolagena tipa III (127). Koncentracije biomarkera razgradnje i stvaranja kolagena tipa III (C3M i Pro-C3) i stvaranja kolagena



tipa III do sada su proučavane i u populaciji bolesnika s upalnim bolestima crijeva u nekoliko studija (128,129).

#### 1.4.3. Biomarkeri razgradnje i stvaranja kolagena IV (C4M i Pro-C4)

C4M je neoepitop i razgradni produkt kolagena tip IV alfa-1 lanca koji nastaje djelovanjem proteolitičkih enzima MMP-2, -9 i -12 (130). Pro-C4 je epitop u 7S domeni kolagena tipa IV i biomarker je izgradnje kolagena tipa IV (131). Ozljeda tkiva koja u slučaju učestalog ponavljanja ili kroničnog trajanja vodi fibrozi potiče lučenje raznih proupalnih i profibrogenih medijatora poput IL, TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$  (132). Posljedično tome, dolazi do pojačane proteazne aktivnosti enzima MMP-2 i MMP-9, a zatim i do nakupljanja makrofaga koji luče i MMP-12 (133,134). Spomenuti enzimi MMP-2, -9 i -12 razgrađuju kolagen IV i time narušavaju integritet BM-a. Svojim proteolitičkim djelovanjem stvaranju neoepitope na već ranije opisani način (130). Lemming i sur. su prikazali podatke o razvoju kompetitivne ELISA metode na 7S domeni kolagena IV te su zaključili da je taj neoepitop biomarker formiranja kolagena, odnosno marker fibrogeneze s obzirom na njegovu dinamiku porasta, što je bilo sukladno i količini kolagena u tkivu (131). Koncentracije biomarkera formiranja i stvaranja kolagena proučavane su u radu Mortensena i sur., gdje se pokazala njihova potencijalna uloga u razlikovanju različitih fenotipova upalnih bolesti crijeva (128).

#### 1.4.4. Biomarker stvaranja kolagena V (Pro-C5)

Pro-C5 otpušteni C-terminalni propeptid kolagena tipa V i biomarker je stvaranja kolagena tipa V (135). Vassiliadis i sur. izmjerili su razine C-terminalnog propeptida kolagena tipa V i testirali korelaciju s formiranjem kolagena tipa V u dva mišja modela fibroze jetre, u kojima je pokazan porast koncentracije proučavanog neoepitopa (135). Uloga remodeliranja kolagena tip V nije do kraja razjašnjena. Postoje studije u području IBD-a koje su doduše različite dizajnom, ali ni njihovi zaključci nisu jednoznačni (129,136).

## 2. HIPOTEZA

Koncentracije biomarkera remodeliranja izvanstaničnog matriksa C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5 u serumu ovisne su o upalnoj aktivnosti u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

### 3. CILJEVI RADA

#### OPĆI CILJ:

1. Istražiti ulogu biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5 u upalnoj aktivnosti u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

#### SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Utvrditi koncentracije biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5 u serumu.
2. Analizirati povezanost koncentracija biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5 u serumu s upalnom aktivnosti.
3. Analizirati korelaciju koncentracija biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5 u serumu s nespecifičnim biomarkerima upalne aktivnosti (CRP, SE, broj trombocita, kalprotektin, fibrinogen).
4. Analizirati korelaciju koncentracija biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5 u serumu s kliničkim i endoskopskim indeksima upalne aktivnosti (CDAI, *Harvey Bradshaw Index*, *Partial Mayo Score*, *Truelove and Witts Score*, *SES-CD* i *Mayo endoscopic score*).
5. Izračunati osjetljivost i specifičnost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5 u određivanju aktivne bolesti.
6. Odrediti prediktore upalne aktivnosti.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Materijali

#### 4.1.1. Ispitanici

U ovo presječno istraživanje uključen je slučajan uzorak od 162 ispitanika s IBD-om, 110 s CD i 52 s UC liječenih u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Uključujući kriteriji bili su odrasla dob i postavljena dijagnoza CD-a ili UC-a temeljena na opće prihvaćenim kliničkim, radiološkim, endoskopskim i histološkim kriterijima. Isključujući kriteriji bili su dob niža od 18 i viša od 65 godina, sistemska infekcija, crijevne infekcije (bakterije, virusi, paraziti), crijevne bolesti (divertikulitis, enterokolitis, ishemijski kolitis), disfunkcija jetre (ciroza, aktivni hepatitis), disfunkcija bubrega (kronična bubrežna insuficijencija), teška hipertenzija, koronarna bolest, bolest perifernih arterija, hematološke, maligne i autoimune bolesti, trudnoća i odbijanje sudjelovanja u istraživanju. Istraživanje su odobrila etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Prije uključivanja u istraživanje svi ispitanici bili su upoznati s ciljevima istraživanja i svaki ispitanik je potpisao informirani pristanak kojim je dobrovoljno pristao na sudjelovanje u istraživanju.

### 4.2. Metode

#### 4.2.1. Antropometrijski i klinički podaci

Iz postojeće medicinske dokumentacije i pripremljenog upitnika prikupili su se demografski podaci, podaci iz povijesti bolesti i podaci o proširenosti bolesti i vrsti terapije (aminosalicilati, glukokortikoidi, antibiotici, azatioprin, metotreksat ili biološka terapija). Tjelesna visina mjerena je u stojećem položaju bez obuće u centimetrima, a tjelesna masa bez teže odjeće u kilogramima. Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je kao omjer tjelesne mase u kilogramima i kvadrata tjelesne visine u metrima. Ispitanici su bili podijeljeni prema Montrealskoj klasifikaciji. Ispitanici s CD-om bili su prema lokalizaciji bolesti podijeljeni na bolest ileuma (L1), kolona (L2) ili ileuma i kolona zajedno (L3), dok su prema ponašanju bolesti bili podijeljeni na ne strikturirajući i ne penetrirajući, odnosno inflamatorni fenotip (B1), zatim na strikturirajući fenotip (B2) i konačno na penetrirajući fenotip (B3), uz posebno označavanje ima li bolesnik perianalnu bolest. Ispitanici s UC-om bili su podijeljeni prema proširenosti bolesti na ulcerozni proktitis (E1), lijevostrani kolitis (E2) i ekstenzivni kolitis ili pankolitis (E3).

#### 4.2.2. Laboratorijski podaci

Analiza uzoraka rutinskih laboratorijskih podataka obavljena je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb. Kompletna krvna slika (broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit, leukociti, trombociti i MPV) određeni su impedancijom s fotodinamičkim fokusiranjem (Sysmex XN-3000, Norderstedt, Njemačka). Fibrinogen, PV, PV-INR i APTV određeni su koagulometrijom, a D-dimeri lateks enzimimunokemijskom metodom (Sysmex CS-5100, Norderstedt, Njemačka), dok su biokemijski parametri u serumu (glukoza u krvi, ukupni i konjugirani bilirubin, ureja, kreatinin, AP, AST, ALT, GGT, K, Na, Ca, fosfati, Fe, UIBC, TIBC, feritin, kolesterol, trigliceridi, LDL, HDL, ukupni proteini, albumin) određeni na uređaju Roche Hitachi Cobas cee60000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka). C-reaktivni protein određen je metodom imunoturbidimetrije (Roche Hitachi Cobas cee60000, Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka), SE modificiranom metodom prema Westergrenu, a koncentracije fekalnog kalprotektina metodom CLIA Inova (BioFlash, Inova Diagnostics, Inc., San Diego, SAD).

#### 4.2.3. Procjena endoskopske, kliničke i laboratorijske aktivnosti upale

Kod ispitanika s CD-om endoskopska aktivnost bolesti procijenjena je pomoću SES-CD. Endoskopske karakteristike koje su se uzimale u obzir kod izračuna su veličina ulceracija, površina zahvaćene sluznice ulceracijama, površina zahvaćene sluznice bolešću i prisutnost stenoza. Svaka od komponenti donosila je 0-3 boda i svaka komponenta je bodovana za svaki pojedini dio crijeva (ileum, ascendentni kolon, transverzalni kolon, descendentni i sigmoidni kolon i rektum) (73). Iznos SES-CD-a 0-2 označavao je remisiju bolesti, 3-6 blagu aktivnost, 7-15 umjerenu aktivnost, dok je >15 predstavljao tešku endoskopsku upalnu aktivnost. Kod ispitanika s UC-om endoskopska aktivnost bolesti procijenila se koristeći MES i uvođenjem proširenosti upale modificiranim MES-om, odnosno mMES-om. Procjena upale sluznice crijeva za izračun MES-a provela se na temelju prisutnosti eritema, smanjenog vaskularnog crteža, frijabilnosti, prisutnosti erozija, spontanijih krvarenja ili ulceracija, a klasificirala se prema težini 0-3 (remisija, blaga aktivnost, umjerena i teška aktivnost) (70). Modificirani MES se izračunao tako da se debelo crijevo podijelilo na pet dijelova (ascendentni kolon, transverzalni kolon, descendentni kolon, sigmoidni kolon i rektum) i za svaki od tih segmenata se izračunao MES. Vrijednosti MES-a su se zbrojile za

svaki segment crijeva i rezultat je pomnožen s duljinom pregledanog dijela crijeva u decimetrima. Na kraju je dobiveni rezultat podijeljen s brojem upaljenih segmenata crijeva (71). Vrijednosti mMES 0-2 označavale su remisiju, 3-6 blagu aktivnost, 7-15 umjerenu, a više od 15 tešku aktivnost bolesti.

Klinička aktivnost upale u ispitanika s CD-om procijenjena je primjenom dvaju indeksa CDAI i HBI. Varijable koje se koristile u CDAI-u bile su broj stolica, bol u abdomenu, opće stanje bolesnika, postojanje komplikacija poput artritisa ili artralgijs, uveitisa ili iritisa, nodoznog eritema ili *pioderma gangrenosum*, perianalnih fistula, apscesa, drugih crijevnih fistula i povišena tjelesna temperatura (više od 37,8 °C) u proteklih tjedan dana (11,12). Klinički aktivna bolest bila je definirana kao vrijednosti CDAI-a 150 ili više. Kod procjene upalne aktivnosti pomoću HBI koristile su se informacije o općem stanju bolesnika, intenzitetu boli u abdomenu, broju tekućih stolica, prisutnosti abdominalne mase i prisutnosti komplikacija poput artralgijs, uveitisa, nodoznog eritema, aftoznih ulceracija, *pioderma gangrenosum*, analnih fisura, novih fistula, apscesa (29). Klinički aktivna bolest bila je definirana kao HBI 5 ili više.

Klinička aktivnost upale u ispitanika s UC-om procijenila se koristeći PMS i TW. Kod izračuna PMS-a u obzir se uzeo broj stolica više od uobičajenog, količina rektalnog krvarenja i procjena općeg stanja od strane liječnika (engl. *physician global assessment*, PGA) (69,70,137). Klinički aktivna bolest definirana je kao vrijednosti PMS 2 ili više. Kod procjene upalne aktivnosti koristeći kriterije TW dijagnoza blage bolesti bila je definirana kao manje od 4 proljevaste i krvave stolice na dan, srčana frekvencija niža od 90/min, tjelesna temperatura niža od 37,5 °C, vrijednosti hemoglobina više od 11,5 g/L i CRP unutar referentnih vrijednosti ili SE niža od 30 mm/h, dok su kriteriji za akutni teški kolitis bili 6 ili više stolica na dan s primjesama krvi i prisutnim barem još jednim od sljedećih kriterija: tjelesna temperatura 37,8 °C ili više, srčana frekvencija manja od 90/min, koncentracija hemoglobina niža od 10,5 g/L i SE viša od 30 mm/h ili vrijednosti CRP-a više od 30 mg/L (3). Klinički aktivna bolest definirana je kada su bili zadovoljeni kriteriji prema TW-u za blagu, srednje tešku ili tešku aktivnost bolesti.

Biokemijska ili laboratorijska aktivnost bolesti bila je definirana koristeći nespecifične pokazatelje upalne aktivnosti. Aktivna bolest definirana je kao koncentracija CRP-a iznad 5 mg/L, SE 23 mm/h ili više, broj trombocita  $424 \times 10^9/L$  ili više i koncentracija fibrinogena više od 4,1 g/L. Koncentracija FK od 250 µg/g ili više predstavljala je tešku upalu, a koncentracije manje od 50 µg/g remisiju.

#### 4.2.4. Analiza biomarkera C3M, Pro-C3, C4M, Pro-C4 i Pro-C5

Analiza koncentracija biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5 izvedena je metodom ELISA (VersaMAX; Molecular Devices, Wokingham Berkshire, Velika Britanija) u laboratoriju Nordic Bioscience, Biomarkers & Research, Herlev, Danska. Pločice s 96 jažica prethodno obložene streptavidinom (Roche Diagnostic, kat. Br. 11940279, Hvidovre, Danska) bile su prevučene biotiniziranim antigenom tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Svi su uzorci razrijeđeni u inkubacijskom puferu koji je sadržavao 1% goveđeg serumskog albumina (Sigma Aldrich, kat. A-7906, čistoća  $\geq 98$ ). Uzorci i kontrole inkubirani su s monoklonskim antitijelom konjugiranim peroksidazom iz hrena tijekom 1-3 sata na 4 °C/20 °C ili 20 sati na 4 °C uz miješanje na 300 okretaja u minuti, prema protokolima proizvođača. Nakon toga dodan je tetrametilbenzidin (TMB, Kem-En-Tec, kat. Br. 438OH, Taastrup, Danska) (100  $\mu$ l/jažica), pločice su inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi i miješane pri 300 okretaja u minuti. Pufer za zaustavljanje (1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dodan je za zaustavljanje TMB reakcije. Nakon svakog koraka inkubacije jažice su isprane puferom za pranje (25 mM TRIZMA, 50 mM NaCl, 0,036% Bronidox L5, 0,1% Tween 20) koristeći standardiziranu perilicu za pranje ploča ELISA (BioTek® Instruments, stroj za pranje mikro ploča, ELx405 Select CW, Winooski, SAD). Omjer vrijednosti C3M/Pro-C3 i C4M/Pro-C4 poslužio je za procjenu prevladavanja procesa razgradnje ili izgradnje kolagena III ili IV.

#### 4.2.5. Prikupljanje podataka

U istraživanje su bili uključeni ispitanici s postavljenom dijagnozom IBD-a koji su liječeni u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Ispitanici su bili uključivani u studiju tijekom redovitog pregleda u Dnevnoj bolnici ili tijekom ambulantne kontrole. Uz to, u studiju su bili uključeni i ispitanici hospitalizirani na Odjelu za upalne bolesti crijeva Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Tijekom pregleda prikupljene su osnovne informacije o trenutnim simptomima i znakovima bolesti, izmjereni su antropometrijski parametri i prikupljeni su podaci o trenutnoj terapiji te je učinjen fizikalni pregled ispitanika. Nakon pregleda ispitanici su ispunili upitnike za procjenu kliničke aktivnosti upale ovisno o fenotipu bolesti. Iz uzoraka krvi koji su uzeti natašte u jutarnjim satima određeni su standardni laboratorijski parametri, a 1-2 mL seruma

pohranjeno je na temperaturi -80 °C, prema specifikacijama testova za mjerenje biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5. Endoskopska aktivnost zabilježena je u ispitanika s učinjenom endoskopskom obradom unutar tri mjeseca od uključivanja u studiju.

#### 4.2.6. Statistička obrada podataka

U statističkoj analizi opisale su se skupine i rabile su se analitičke statističke metode. Kategorijske varijable su prikazane proporcijama i postocima, kontinuirane varijable prikazane su medijanom i interkvartilnim rasponom (25. i 75. percentil) kod nepravilne distribucije ili pak srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom kod pravilne distribucije. Pravilnost raspodjele numeričkih varijabla testirana je D'Agostino-Pearsonovim testom i grafički te su se naknadno primijenili parametrijski ili neparametrijski statistički testovi. Razlike u razdiobi kategoričkih varijabla i proporcija između skupina testirane su  $\chi^2$ -testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Za testiranje razlika između dviju nezavisnih skupina primijenjen je Studentov t-test ili Mann-Whitney U-test. Kod usporedbe više od dviju skupina kontinuiranih varijabla korišteni su ANOVA s Tukey post-hoc analizom za parametrijsku te Kruskal-Wallis s post-hoc Mann-Whitney U-testom za neparametrijsku analizu. Korekcija za multiple usporedbe izvedena je koristeći metodu *false discovery rate* (FDR=5%). Za analizu korelacije primijenjen je Pearsonov ili Spearmanov test korelacije. Dijagnostička točnost pojedinačnih biomarkera procijenjena je ROC analizom (engl. *receiver operating characteristic curve*), a metodom logističke regresije je izračunata dijagnostička točnost kombinacije biomarkera koja je bila prilagođena za sljedeće čimbenike zabune (engl. *confounding factors*): dob, spol, ITM, prethodni operativni zahvat, biološka terapija, klasifikacija po Montrealu za CD te dob, spol, ITM, biološka terapija i klasifikacija po Montrealu za UC. U analizi dijagnostičke točnosti umjereno do teške bolesti u UC-u prilagodba nije rađena zbog malog uzorka. Prediktori upalne aktivnosti analizirani su univarijatnom metodom logističke regresija, nakon čega su statistički značajne varijable unesene u multivarijatni model. U multivarijatnom modelu korištena je *backward* metoda logističke regresije. U statističkoj analizi korišten je MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgija). U svim je testovima vrijednost  $p < 0,05$  predstavljala razinu statističke značajnosti.



## 5. REZULTATI

### 5.1. Antropometrijski, demografski i laboratorijski podaci ispitanika

Ukupno su analizirana 162 ispitanika, od toga 110 s CD-om i 52 s UC-om. Antropometrijski i demografski podaci ispitanika s CD-om i UC-om prikazani su u tablici 1. Ispitanici s CD-om imali su prosječnu dob 36 (27,7-46) godina, 66 (60%) je bilo muškaraca, prosječni ITM 22,57 (20,3-26,6) kg/m<sup>2</sup>, a prosječno trajanje bolesti 9 (4-16) godina, što je bilo značajno više u usporedbi s trajanjem bolesti od 6,5 (3-10) godina u UC-u (p=0,018). Prema lokalizaciji CD-a 18% je imalo zahvaćen terminalni ileum (L1), 15,5% kolon (L2), 66,4% ileokolon (L3). Prema ponašanju CD-a 35,5% je imalo nestrikturirajući, nepenetrirajući (B1) oblik, 38,2% strikturirajući (B2) oblik i 26,3% penetrirajući (B3) oblik bolesti. Ukupno 59,09% ispitanika je uzimalo biološku terapiju, 30% imunomodulatornu terapiju, a 6,36% terapiju glukokortikoidima. Prema SES-CD-u 46,66% ispitanika je imalo aktivnu bolest, dok je klinički aktivnu bolest prema HBI-u i CDAI-u imalo 21,81% ispitanika. Prosječne vrijednosti laboratorijskih nalaza bile su unutar referentnih vrijednosti osim vrijednosti FK-a koje su iznosile 136 (29-358) µg/g (referentna vrijednost <50 µg/g) (tablica 2.). Prosječne vrijednosti serumskih nespecifičnih pokazatelja upalne aktivnosti bile su unutar referentnih vrijednosti: CRP 2,5 (0,8-5,7) mg/L, SE 12 (7-22) mm/h, broj trombocita 291,5 (236-349) x10<sup>9</sup>/L i fibrinogen 3,7 (3-4,1) g/L.

Ispitanici s UC-om imali su prosječnu dob 37 (24-49) godina, 28 (53,8%) je bilo muškaraca, a prosječni ITM iznosio je 23,86 (20,7-27,8) kg/m<sup>2</sup>. Prema proširenosti UC-a 7,6% je imalo proktitis (E1), 23,1% lijevostrani kolitis (E2), a 67,3% pankolitis (E3). Ukupno 53,84% ispitanika je uzimalo biološku terapiju, 30,76% imunomodulatornu terapiju, a 19,23% terapiju glukokortikoidima. Veći udio ispitanika s UC-om bio je liječen sistemnom glukokortikoidnom terapijom u usporedbi s CD-om (19,23% prema 6,36%, p=0,007). Prema endoskopskom pokazatelju upalne aktivnosti MES-u 81,81% ispitanika je imalo aktivnu bolest, dok je prema mMES-u to bio slučaj u 69,69% ispitanika. Klinički aktivnu bolest prema PMS-u imalo je 40,38%, a prema TW-u 63,46% ispitanika. Prosječne vrijednosti laboratorijskih nalaza bile su također unutar referentnih vrijednosti osim vrijednosti kalprotektina koje su iznosile 301 (133-1120) µg/g (referentna vrijednost <50 µg/g) (tablica 2.). Za izdvojiti su prosječne vrijednosti ostalih nespecifičnih pokazatelja upalne aktivnosti: CRP 3,2 (0,7-8,6) mg/L, SE 12,5 (5-26) mm/h, broj trombocita 293 (250-343) x10<sup>9</sup>/L i fibrinogen 3,64 (±1,50)

g/L. Razlike u laboratorijskim vrijednostima između CD-a i UC-a prikazane su u tablici 2.

Tablica 1. Antropometrijski i demografski podaci ispitanika s Crohnovom bolešću i ulceroznim kolitisom

Varijabla	Crohnova bolest (n=110)	Ulcerozni kolitis (n=52)	p
Dob, godine	36 (27,7-46)	37 (24-49)	0,144
Spol muški, n (%)	66 (60)	28 (53,8)	0,798
Trajanje bolesti, godine	9 (4-16)	6,5 (3-10)	0,018*
ITM, kg/m <sup>2</sup>	22,57 (20,3-26,6)	23,86 (20,7-27,8)	0,320
Pušači, n (%)	24 (21,81)	7 (13,46)	0,467
Lokalizacija bolesti, n (%) L1/L2/L3	20(18)/17(15,5)/73(66,4)	-	-
Ponašanje bolesti, n (%) B1/B2/B3	39(35,5)/42(38,2)/29(26,3)	-	-
Proširenost bolesti, n E1/E2/E3	-	4(7,6)/12(23,1)/35(67,3)	-
Resekcija crijeva, n (%) Ileum Kolon Ileokolon	10 (9,09) 6 (5,45) 39 (35,45)	- 5 (9,61) -	- - -
Perianalna bolest, n (%)	38 (34,5)	-	-
Terapija, n (%) Biološka terapija Imunomodulatori Glukokortikoidi	65 (59,09) 33 (30,00) 7 (6,36)	28 (53,84) 16 (30,76) 10 (19,23)	0,511 0,862 0,007*
Aktivna bolest, n (%) <i>Harvey Bradshaw Index</i> CDAI <i>Partial Mayo score</i> <i>Truelove and Witts</i> SES-CD MES mMES	24 (21,81) 24 (21,81) - - 28/60 (46.66) - -	- - 21 (40,38) 33 (63,46) - 27/33 (81,81) 23/33 (69,69)	

ITM-indeks tjelesne mase, L1-ileum, L2-kolon, L3-ileokolon, B1-ne strikturirajući, ne penetrirajući, B2-strikturirajući, B3-penetrirajući, CDAI-Crohn's disease activity index, SES-CD-simple endoscopic score for Crohn's disease, MES-Mayo endoscopic score, mMES-modified Mayo endoscopic score; \*p<0.05

Tablica 2. Laboratorijske karakteristike ispitanika s Crohnovom bolešti i ulceroznim kolitisom

Varijabla	Crohnova bolest	Ulcerozni kolitis	p
Eritrociti, x10 <sup>12</sup> /L	4,9 (4,4-5,2)	4,52 (4,1-5,0)	0,006*
Hemoglobin, g/L	137 (125,5-151)	131 (122-147)	0,186
Hematokrit, L/L	0,41 (0,38-0,44)	0,40 (0,37-0,44)	0,165
Leukociti, x10 <sup>9</sup> /L	7,0 (5,6-8,3)	6,8 (5,3-9,3)	0,469
Trombociti x10 <sup>9</sup> /L	291,5 (236-349)	293 (250-343)	0,600
MPV, fL	10,3 (9,7-10,9)	10,1 (9,5-10,9)	0,163
GUK, mmol/L	4,6 (4,3-5)	4,6 (4,2-5,2)	0,499
Ukupni bilirubin, μmol/L	9 (6-12)	7 (6-10,7)	0,266
Alkalna fosfataza, U/L	68 (58-87)	70 (56-84)	0,493
AST, U/L	23 (19-28,7)	21 (16-28)	0,103
ALT, U/L	21 (15-29,8)	21 (14-27)	0,400
GGT, U/L	18 (10,7-27,2)	17 (12-37)	0,464
Ureja, mmol/L	4,2 (3,3-5,1)	4,7 (3,4-6,0)	0,068
Kreatinin, μmol/L	71 (59-81,2)	73 (61-90,2)	0,169
Kalij, mmol/L	4,3 (4,1-4,5)	4,2 (4,1-4,5)	0,217
Natrij, mmol/L	141 (139-142)	140 (139-142)	0,648
Kalcij, mmol/L	2,3 (2,2-2,4)	2,3 (2,2-2,4)	0,127
Fosfati, mmol/L	1,02 (0,9-1,1)	1,1 (0,9-1,2)	0,036*
Željezo, μmol/L	11 (7,7-17,2)	11 (7,2-18)	0,870
UIBC, μmol/L	48,12 (±14,54)	40,29 (±15,31)	0,001*
TIBC, μmol/L	61,41 (±11,8)	54,55 (±12,46)	0,001*
Feritin, μg/L	41,6 (13,6-120)	47,8 (11,9-112)	0,944
Ukupni kolesterol, mmol/L	3,7 (3,3-4,5)	4,4 (3,6-5,3)	0,013*
Trigliceridi, mmol/L	1,10 (0,7-1,5)	0,95 (0,6-1,2)	0,023*
LDL, mmol/L	1,79 (1,4-2,3)	2,33 (1,9-3,1)	0,002*
HDL, mmol/L	1,36 (±0,43)	1,38 (1,2-1,6)	0,676
PV	1,14 (1-1,2)	1,10 (1,0-1,2)	0,232
PV-INR	0,95 (0,9-1,0)	0,97 (0,9-1,0)	0,940
APTV, s	23,3 (23,4-26)	25,2 (±2,80)	0,984
Fibrinogen, g/L	3,7 (3-4,1)	3,64 (±1,50)	0,767
D-dimeri mg/L	0,24 (0,17-0,36)	0,34 (0,25-0,63)	0,002*
CRP, mg/L	2,5 (0,8-5,7)	3,2 (0,7-8,6)	0,418
SE, mm/h	12 (7-22)	12,5 (5-26)	0,595
Ukupni proteini	72,5 (±5,7)	71,4 (±6,5)	0,369
Albumin	44,9 (42,2-47)	43,8 (±5,93)	0,530
Fekalni kalprotektin	136 (29-358)	301 (133-1120)	0,001*

MPV-srednji volumen trombocita, GUK-glukoza u krvi, AST-aspartat-aminotransferaza, ALT-alanin-aminotransferaza, GGT-gama-glutamiltransferaza,

UIBC-nezasićeni kapacitet vezanja željeza, TIBC-ukupni kapacitet vezanja željeza, LDL-lipoproteini niske gustoće, HDL-lipoproteini visoke gustoće, CRP-C-reaktivni protein, SE-sedimentacija eritrocita; \*p<0.05

## 5.2. Koncentracije biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 u serumu

Koncentracije biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 u serumu prikazane su u tablici 3. Prosječne vrijednosti biomarkera u CD-u iznosile su za C3M 12,21 (10,2-15,5) ng/mL, Pro-C3 10,18 (7,6-15,1) ng/mL, C3M/Pro-C3 1,20 (0,90-1,48), C4M 26,54 (17,8-35,5) ng/mL, Pro-C4 272,8 (171-453) ng/mL, C4M/Pro-C4 0,100 (0,07-0,13) i Pro-C5 557,6 (345-819,2) ng/mL. Prosječne vrijednosti biomarkera u UC-u iznosile su za C3M 13,19 (8,7-15,9) ng/mL, Pro-C3 10,46 (7,2-12,6) ng/mL, C3M/Pro-C3 1,26 (0,76-1,66), C4M 24,80 (18,0-32,9) ng/mL, Pro-C4 223,5 (163-395,2) ng/mL, C4M/Pro-C4 0,115 (0,09-0,14) i Pro-C5 442,5 (355,7-756,2) ng/mL. Nije bilo značajne razlike u koncentracijama navedenih biomarkera između CD-a i UC-a.

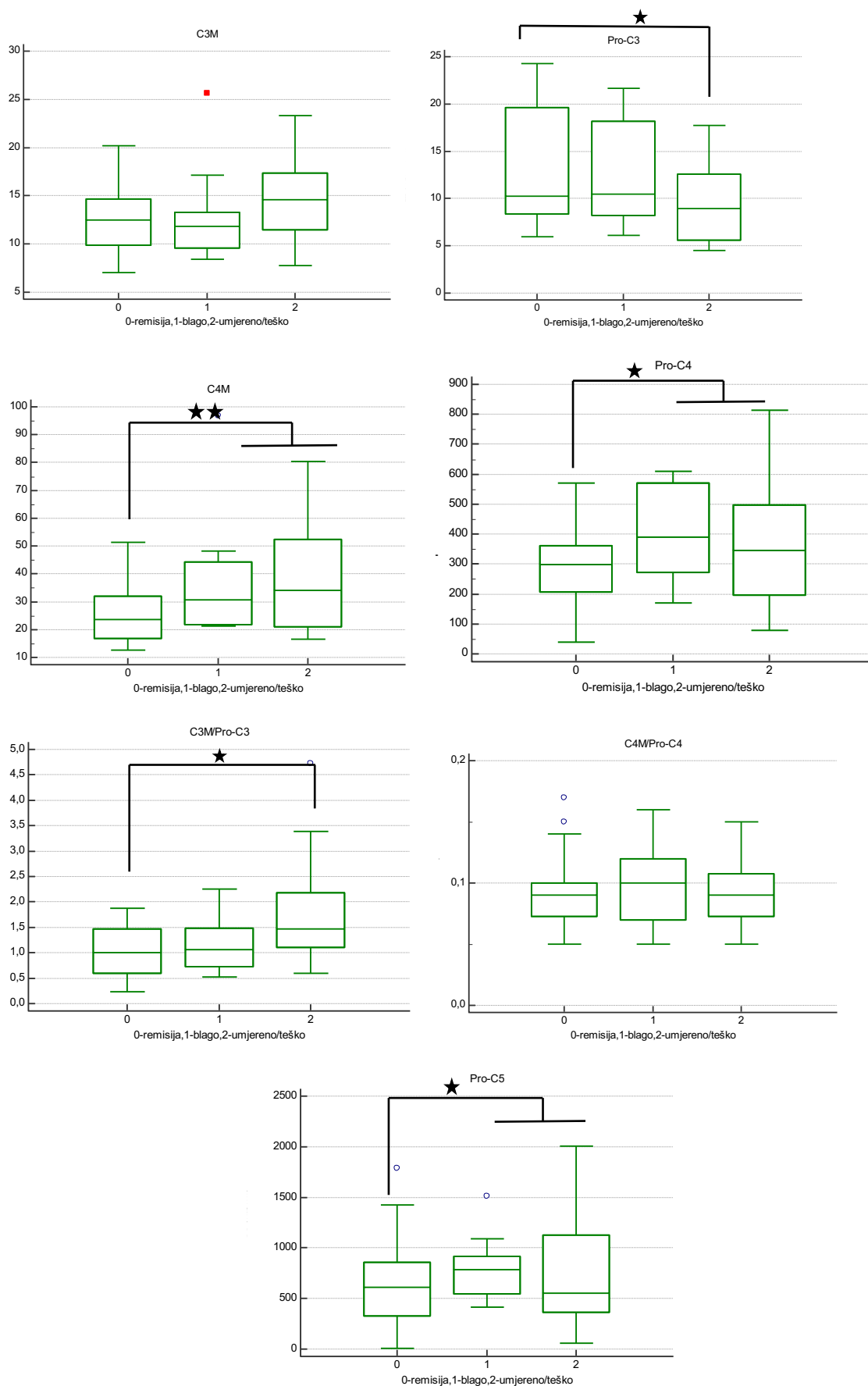
Tablica 3. Koncentracije biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 u serumu

Biomarker	Crohnova bolest	Ulcerozni kolitis	p
C3M, ng/mL	12,21 (10,2-15,5)	13,19 (8,7-15,9)	0,809
Pro-C3, ng/mL	10,18 (7,6-15,1)	10,46 (7,2-12,6)	0,583
C3M/Pro-C3	1,20 (0,90-1,48)	1,26 (0,76-1,66)	0,570
C4M, ng/mL	26,54 (17,8-35,5)	24,80 (18,0-32,9)	0,970
Pro-C4, ng/mL	272,8 (171-453)	223,5 (163-395,2)	0,389
C4M/Pro-C4	0,100 (0,07-0,13)	0,115 (0,09-0,14)	0,165
Pro-C5, ng/mL	557,6 (345-819,2)	442,5 (355,7-756,2)	0,464

5.3. Povezanost koncentracija biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s upalnom aktivnosti

5.3.1. Povezanost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s endoskopskim pokazateljima upalne aktivnosti u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu

Razlika koncentracija biomarkera ovisno o upalnoj aktivnosti prikazana je na slici 4. Serumske koncentracije biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 prema kategorijama endoskopske upalne aktivnosti u CD-u prikazane su u tablici 4. U CD-u nije bilo razlike između koncentracija C3M u odnosu na različite kategorije endoskopske upalne aktivnosti. Vrijednosti Pro-C3 bile su značajno više kod ispitanika u remisiji u odnosu na ispitanike s umjereno do teško aktivnom bolesti: 10,34 (8,4-19,7) prema 8,94 (5,6-12,6),  $p=0,040$ . Vrijednosti C4M bile su značajno više u skupini ispitanika s aktivnom bolesti (blaga i umjerena do teška) u odnosu na ispitanike u remisiji ( $p=0,011$ ), što je bio slučaj i za Pro-C4 ( $p<0,05$ ). Omjer razgradnje i stvaranja kolagena III (C3M/Pro-C3) bio je povećan u ispitanika s umjerenom do teško aktivnom bolesti u usporedbi s ispitanicima u remisiji ( $p=0,019$ ). Vrijednosti Pro-C5 su bile povišene u ispitanika s aktivnom bolesti (blaga i umjerena do teška) u usporedbi s ispitanicima u remisiji ( $p<0,05$ ) (slika 4., tablica 4.).



Slika 4. Povezanost biomarkera remodeliranja kolagena III, IV i V s endoskopskom upalnom aktivnosti (SES-CD) u Crohnovoj bolesti. ★-p<0,5, ★★-p<0,01.

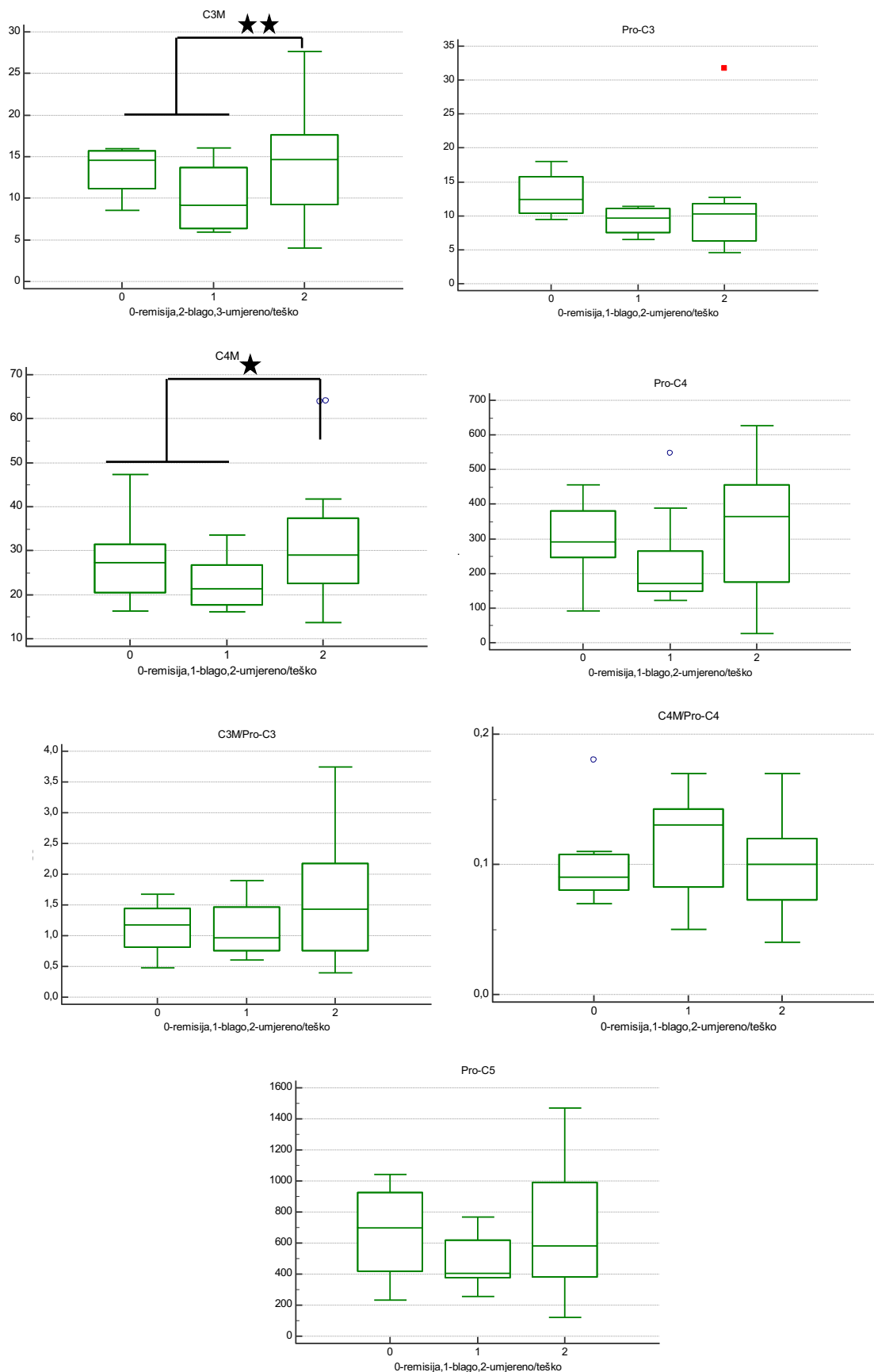
Tablica 4. Koncentracije biomarkera razgradnje i izgradnje kolagena III, IV i V prema kategorijama endoskopske upalne aktivnosti (SES-CD) u Crohnovoj bolesti

	Aktivnost bolesti, SES-CD		
	Remisija	Blaga	Umjerena/teška
C3M, ng/mL	12,48 (9,8-14,6)	11,80 (9,6-13,2)	14,5 (11,4-17,3)
Pro-C3, ng/mL	10,34 (8,4-19,7)	10,44 (8,2-18,1)	8,94 (5,6-12,6)
C3M/Pro-C3	1,01 (0,60-1,47)	1,05 (0,73-1,48)	1,47 (1,1-2,2)
C4M, ng/mL	23,71 (16,8-32)	30,6 (21,9-44,3)	34,04 (21-52,4)
Pro-C4, ng/mL	298,8 (207-361)	389,6 (273-569)	345,1 (195-496)
C4M/Pro-C4	0,09 (0,07-0,1)	0,1 (0,07-0,12)	0,1 (0,08-0,13)
Pro-C5, ng/mL	610,7 (326-856)	784,6 (544-917)	555,6 (360-1123)

Promatrajući endoskopsku aktivnost u UC-u mjerenu MES-om umjereni do teški oblik bolesti pokazao je značajno više vrijednosti biomarkera C3M i C4M u usporedbi s ispitanicima u remisiji i blagom aktivnosti ( $p=0,004$  i  $p=0,013$ ). Nije uočena značajna razlika u koncentracijama ostalih biomarkera niti u omjeru razgradnje i stvaranja kolagena III ili IV (tablica 5., slika 5.).

Tablica 5. Koncentracije biomarkera razgradnje i izgradnje kolagena III, IV i V prema kategorijama endoskopske upalne aktivnosti (MES) u ulceroznom kolitisu

	Aktivnost bolesti, MES		
	Remisija	Blaga	Umjerena/teška
C3M, ng/mL	14,60 (11,1-15,7)	9,45 (7,3-12,3)	16,04 (14,4-18,9)
Pro-C3, ng/mL	12,44 (10,4-15,7)	8,49 (6,9-11,2)	10,40 (5,9-12,5)
C3M/Pro-C3	1,18 (0,81-1,44)	1,04 (0,84-1,57)	1,57 (0,70-2,71)
C4M, ng/mL	27,22 (20,5-31,5)	23,82 (18-28,64)	31,87 (22,5-52,3)
Pro-C4, ng/mL	290,9 (246-380)	176,3 (128-245)	422,9 (300-480)
C4M/Pro-C4	0,09 (0,08-0,10)	0,13 (0,09-0,15)	0,09 (0,07-0,12)
Pro-C5, ng/mL	695,8 (419-925)	404,2 (377-589)	869,4 (435-1163)



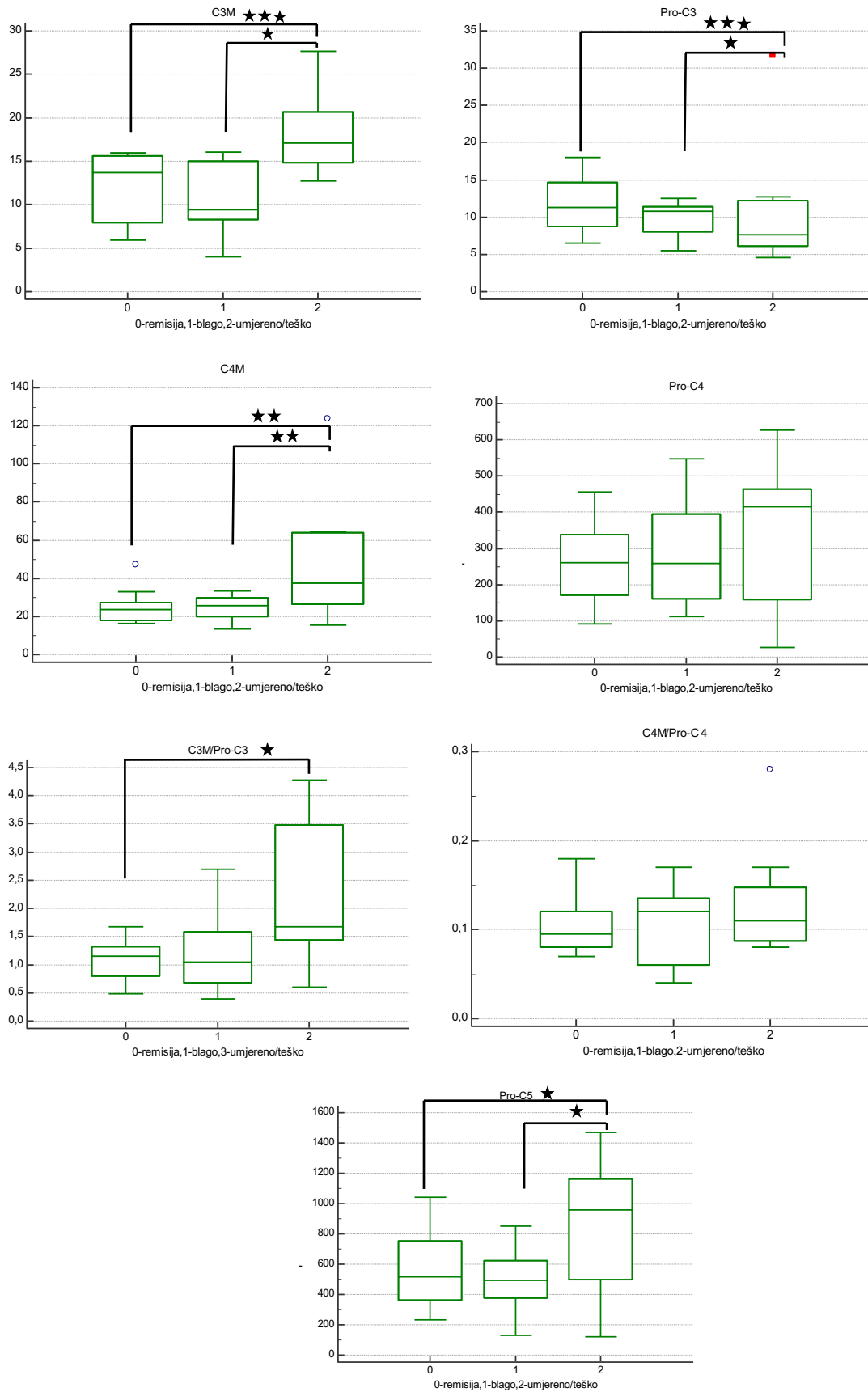
Slika 5. Povezanost biomarkera remodeliranja kolagena III, IV i V s endoskopskom upalnom aktivnosti (MES) u ulceroznom kolitisu. ★- $p < 0,5$ , ★★- $p < 0,01$ .



Uvođenjem proširenosti bolesti u endoskopsku upalnu aktivnost, odnosno koristeći mMES, vrijednosti biomarkera C3M u umjerenoj do teškoj bolesti bile su značajno više od ispitanika u remisiji i onih s blagom bolesti ( $p=0,042$  i  $p<0,001$ ). Vrijednosti Pro-C3 bile su niže u umjerenoj do teškoj bolesti u usporedbi s ispitanicima u remisiji i s blagom bolesti ( $p<0,001$ ,  $p<0,05$ ). Ispitanici s umjerenom do teškom bolesti pokazali su više vrijednosti prometa kolagena III (C3M/Pro-C3) od bolesnika u remisiji ( $p<0,05$ ). Vrijednosti C4M bile su više u ispitanika s umjerenom do teškom bolesti u usporedbi s ispitanicima u remisiji i blagom bolesti ( $p<0,01$ ). Vrijednosti Pro-C5 su također bile povišene kod ispitanika s umjerenom do teškom bolesti u odnosu na ispitanike s blagom bolesti i remisijom ( $p<0,05$ ). Vrijednosti Pro-C4 se nisu značajno razlikovale među skupinama, ali su pokazivale trend porasta s povećanjem upalne aktivnosti (tablica 6., slika 6.).

Tablica 6. Koncentracije biomarkera biomarkera razgradnje i izgradnje kolagena III, IV i V prema kategorijama endoskopske upalne aktivnosti (mMES) u ulceroznom kolitisu

	Aktivnost bolesti (mMES)		
	Remisija	Blaga	Umjerena/teška
C3M, ng/mL	13,69 (7,9-15,6)	9,45 (8,3-15,0)	17,12 (14,9-20,7)
Pro-C3, ng/mL	11,64 (8,7-14,6)	10,75 (8,1-11,4)	7,64 (6,1-12,2)
C3M/Pro-C3	1,12 (0,79-1,32)	1,04 (0,68-1,59)	1,67 (1,4-3,5)
C4M, ng/mL	23,44 (18-27,25)	25,69 (19,7-29,6)	37,4 (26,6-63,9)
Pro-C4, ng/mL	259,8 (171-337)	258,2 (161-394)	415,6 (158-464)
C4M/Pro-C4	0,09 (0,08-0,12)	0,12 (0,06-0,13)	0,11 (0,09-0,17)
Pro-C5, ng/mL	514,5 (364-751)	490,7 (377-622)	1025 (556-1248)



Slika 6. Povezanost biomarkera remodeliranja kolagena III, IV i V s endoskopskom aktivnosti (mMES) u ulceroznom kolitisu.  $*$ -p<0,5,  $**$ -p<0,01,  $***$ -p<0,001

5.3.2. Povezanost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s kliničkim i serumskim biokemijskim pokazateljima upalne aktivnosti u Crohnoj bolesti i ulceroznom kolitisu

U CD-u vrijednosti biomarkera Pro-C3 bile su niže u skupini ispitanika s aktivnom bolesti mjerenoj kliničkim indeksom upalne aktivnosti HBI ( $p=0,049$ ). Razlike nije bilo promatrajući CDAI (tablica 7.).

Tablica 7. Povezanost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s kliničkim pokazateljima upalne aktivnosti u Crohnoj bolesti

	<i>Harvey-Bradshaw Index</i>		
	<5	≥5	p
C3M, ng/mL	12,48 (10,5-15,6)	11,16 (9,4-15,3)	0,589
Pro-C3, ng/mL	10,21 (8,2-17,3)	7,48 (5,8-13,4)	0,049*
C3M/Pro-C3	1,10 (0,80-1,4)	1,47 (1,2-1,9)	0,122
C4M, ng/mL	27,26 (18,6-35,2)	21,41 (15,5-36)	0,452
Pro-C4, ng/mL	287,3 (188-454)	359,4 (140-326)	0,422
C4M/Pro-C4	0,10 (0,07-0,13)	0,10 (0,08-0,14)	0,452
Pro-C5, ng/mL	564,6 (346-897)	511,3 (338-660)	0,452
	<i>CDAI</i>		
	<150	≥150	p
C3M, ng/mL	12,21 (10,2-15,4)	12,0 (10,2-15,6)	0,907
Pro-C3, ng/mL	10,68 (8,1-16,0)	8,16 (6,1-10,4)	0,388
C3M/Pro-C3	1,11 (0,87-1,47)	1,35 (1,18-1,67)	0,388
C4M, ng/mL	24,70 (17,6-34,1)	28,19 (19,4-39)	0,586
Pro-C4, ng/mL	280,2 (172-454)	270,8 (157-367)	0,749
C4M/Pro-C4	0,10 (0,07-0,13)	0,10 (0,08-0,13)	0,466
Pro-C5, ng/mL	554,6 (344-898)	570,2 (349-733)	0,907

CDAI-Crohn's Disease Activity Index, \* $p<0,05$

U UC-u zabilježene su više vrijednosti Pro-C4 u ispitanika s aktivnom bolesti mjerenoj kliničkim indeksom upalne aktivnosti TW ( $p < 0,05$ ) (tablica 8.).

Tablica 8. Povezanost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s kliničkim pokazateljima upalne aktivnosti u ulceroznom kolitisu

	<i>Partial Mayo Score</i>		
	<2	≥2	p
C3M, ng/mL	10,75 (8,6-14,9)	15,5 (8,8-16,8)	0,238
Pro-C3, ng/mL	10,36 (8,7-11,4)	10,24 (6,6-12,5)	0,817
C3M/Pro-C3	1,04 (0,76-1,6)	1,37 (1,04-1,72)	0,393
C4M, ng/mL	22,94 (17,2-29,5)	29,47 (21,8-36)	0,123
Pro-C4, ng/mL	185,1 (141-287)	343,7 (184-449)	0,122
C4M/Pro-C4	0,12 (0,09-0,14)	0,11 (0,08-0,15)	0,817
ProC5, ng/mL	375,6 (290-548)	587,8 (412-922)	0,122
	<i>Truelove-Witts</i>		
	Remisija	Aktivno	p
C3M, ng/mL	11,02 (8,6-14,2)	13,5 (8,7-16,04)	0,607
Pro-C3, ng/mL	10,83 (7,8-16,8)	10,30 (6,7-11,5)	0,776
C3M/Pro-C3	1,02 (0,61-1,95)	1,32 (0,82-1,67)	0,635
C4M, ng/mL	21,85 (16,2-27)	26,12 (20,9-33)	0,127
Pro-C4, ng/mL	149,5 (122-231)	272,6 (184-431)	0,007*
C4M/Pro-C4	0,13 (0,12-0,17)	0,10 (0,08-0,13)	0,070
ProC5, ng/mL	370,7 (263-495)	577,7 (372-935)	0,049*

U CD-u i skupini s povišenim vrijednostima CRP-a bile su značajno više koncentracije C3M i C4M ( $p=0,009$  i  $p=0,003$ ). Također u toj skupini je bio povećan omjer razgradnje i stvaranja kolagena III (C3M/Pro-C3) ( $p=0,003$ ). U CD-u nisu postojale razlike u vrijednostima biomarkera kada su se ispitanici stratificirali prema SE, fibrinogenu ili broju trombocita (tablica 9.).

Tablica 9. Povezanost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 sa serumskim laboratorijskim pokazateljima upalne aktivnosti (CRP, SE, fibrinogen, trombociti) u Crohnovoj bolesti

	CRP			SE		
	Inaktivno <5 mg/L	Aktivno ≥ 5 mg/L	p	Inaktivno <23 mm/h	Aktivno ≥23 mm/h	p
C3M	11,7 (9,7-13,9)	14,88 (11,5-17,3)	0,009*	11,91 (9,6-14,6)	13,94 (11,3-17,6)	0,280
Pro-C3	10,42 (8,1-17)	9,36 (7,1-12,6)	0,194	10,23 (7,9-16,9)	10,14 (6,7-17,9)	0,947
C3M/Pro-C3	1,01 (0,76-1,4)	1,47 (1,2-1,9)	0,003*	1,09 (0,79-1,47)	1,3 (0,9-1,9)	0,522
C4M	22,45 (17-32,4)	33,10 (22,2-44)	0,003*	23,48 (17-32,1)	29,12 (21,2-45,1)	0,654
Pro-C4	270 (153-366)	350,1 (204-519)	0,113	270,1 (173-381)	391,6 (265-521)	0,280
C4M/Pro-C4	0,1 (0,08-0,13)	0,09 (0,07-0,13)	0,599	0,10 (0,07-0,12)	0,10 (0,06-0,13)	0,947
Pro-C5	544,6 (344-872)	615,2 (345-923)	0,588	543,4 (351-889)	586,2 (344-899)	0,919
	Fibrinogen			Broj trombocita		
	Inaktivno <4,1 g/L	Aktivno ≥4,1 g/L	p	Inaktivno <424x10 <sup>9</sup> /L	Aktivno ≥424 x10 <sup>9</sup> /L	p
C3M	12 (9,8-14,6)	14,6 (11,1-17,6)	0,207	12,0 (10-15,3)	15,7 (13,1-19,2)	0,336
Pro-C3	10,5 (8,4-15,6)	7,95 (6,8-12,7)	0,101	10,27 (7,7-15,5)	8,26 (5,6-10,6)	0,336
C3M/Pro-C3	1,1 (0,75-1,47)	1,36 (1,06-1,71)	0,084	1,18 (0,89-1,47)	1,82 (1,33-3,4)	0,336
C4M	24,6 (17,7-32)	29,25 (18,2-45,8)	0,259	24,98 (17,6-35)	31,69 (23,1-40)	0,336
Pro-C4	273 (174-386)	272,5 (165-512)	0,702	272,8 (172-453)	277,1 (162-472)	0,990
C4M/Pro-C4	0,1 (0,07-0,13)	0,10 (0,07-0,13)	0,702	0,10 (0,07-0,13)	0,11 (0,09-0,13)	0,644
Pro-C5	559 (325-856)	551,6 (343-949)	0,908	557,6 (345-891)	607,5 (341-945)	0,990

CRP-C-reaktivni protein, SE-sedimentacija eritrocita, \* $p<0,05$

U UC-u u skupini s povišenim vrijednostima CRP-a zabilježene su značajno više vrijednosti biomarkera C3M ( $p=0,021$ ). U UC-u nisu postojale razlike u vrijednostima biomarkera kada su se ispitanici stratificirali prema SE, fibrinogenu ili broju trombocita (tablica 10.).

Tablica 10. Povezanost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 sa serumskim laboratorijskim pokazateljima upalne aktivnosti (CRP, SE, fibrinogen, trombociti) u ulceroznom kolitisu

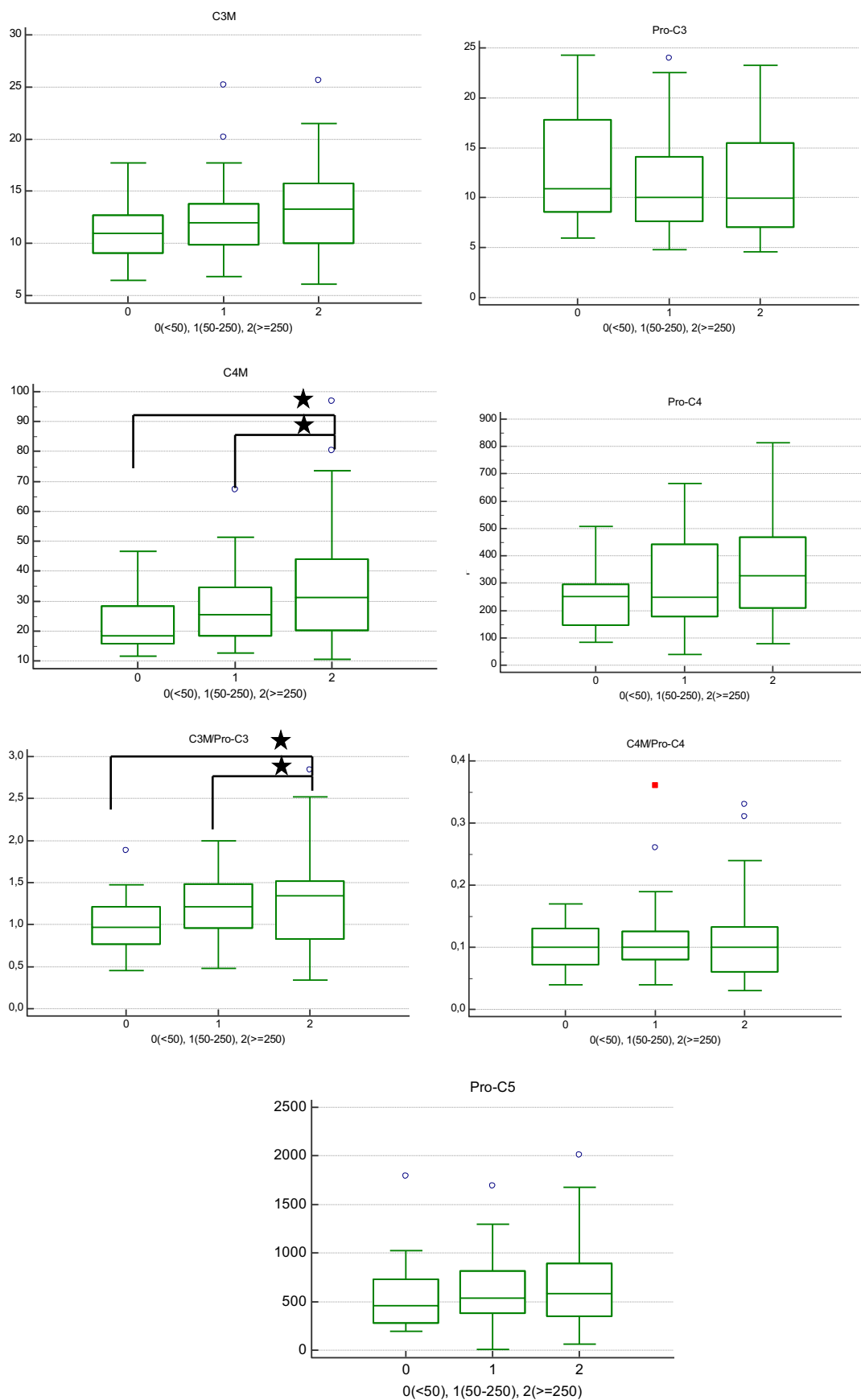
	CRP			p	SE		
	Inaktivno <5 mg/L	Aktivno ≥5 mg/L			Inaktivno <23 mm/h	Aktivno ≥23 mm/h	p
C3M	10,75 (8,6-13,9)	16,15 (15,6-20,7)	0,021*	11,05 (8,57-16,6)	16,0 (8,8-16,1)	0,124	
Pro-C3	10,36 (7,4-11,4)	10,75 (6,9-13,3)	0,795	10,73 (9,8-17,6)	7,61 (6,4-10,7)	0,165	
C3M/Pro-C3	1,04 (0,77-1,42)	1,48 (0,81-2,50)	0,201	0,97 (0,6-1,37)	1,68 (1,31-2,7)	0,124	
C4M	23,48 (17,5-31)	27,52 (19,5-44)	0,201	23,13 (17,8-31,8)	26,12 (18,9-30)	0,584	
Pro-C4	187,0 (155-286)	370,1 (169-480)	0,094	188,1 (159-325)	390 (224-434)	0,124	
C4M/Pro-C4	0,12 (0,09-0,14)	0,11 (0,08-0,14)	0,788	0,12 (0,09-0,14)	0,09 (0,06-0,11)	0,124	
Pro-C5	387,5 (355-586)	635,2 (326-1097)	0,201	386,9 (361-587)	638,3 (422-850)	0,124	
	Fibrinogen			p	Broj trombocita		
	Inaktivno <4,1 g/L	Aktivno ≥4,1 g/L			Inaktivno <424x10 <sup>9</sup> /L	Aktivno ≥424x10 <sup>9</sup> /L	
C3M	10,75 (8,6-14,8)	15,78 (14,6-18,9)	0,350	12,0 (8,7-15,9)	16,15 (15,6-24)	0,280	
Pro-C3	10,75 (7,4-12,5)	10,03 (6,4-13,5)	0,546	10,55 (8,3-12,5)	6,45 (6,08-11,7)	0,498	
C3M/Pro-C3	1,21 (0,68-1,52)	1,51 (0,84-2,69)	0,523	1,21 (0,67-1,60)	2,71 (1,5-3,88)	0,280	
C4M	22,94 (17,1-29)	30,21 (20,5-34,7)	0,479	24,80 (18,4-32,5)	31,65 (22,1-66)	0,498	
Pro-C4	188,2 (157-371)	233,6 (177-433)	0,523	215,7 (160-385)	396,5 (204-439)	0,498	
C4M/Pro-C4	0,11 (0,08-0,13)	0,11 (0,09-0,14)	0,546	0,12 (0,08-0,14)	0,11 (0,09-0,16)	0,894	
Pro-C5	387,5 (361-607)	510,6 (280-1039)	0,546	442,5 (361-734)	1025 (269-1505)	0,498	

CRP-C-reaktivni protein, SE-sedimentacija eritrocita, \* $p<0,05$

### 5.3.3. Povezanost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s fekalnim kalprotektinom u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu

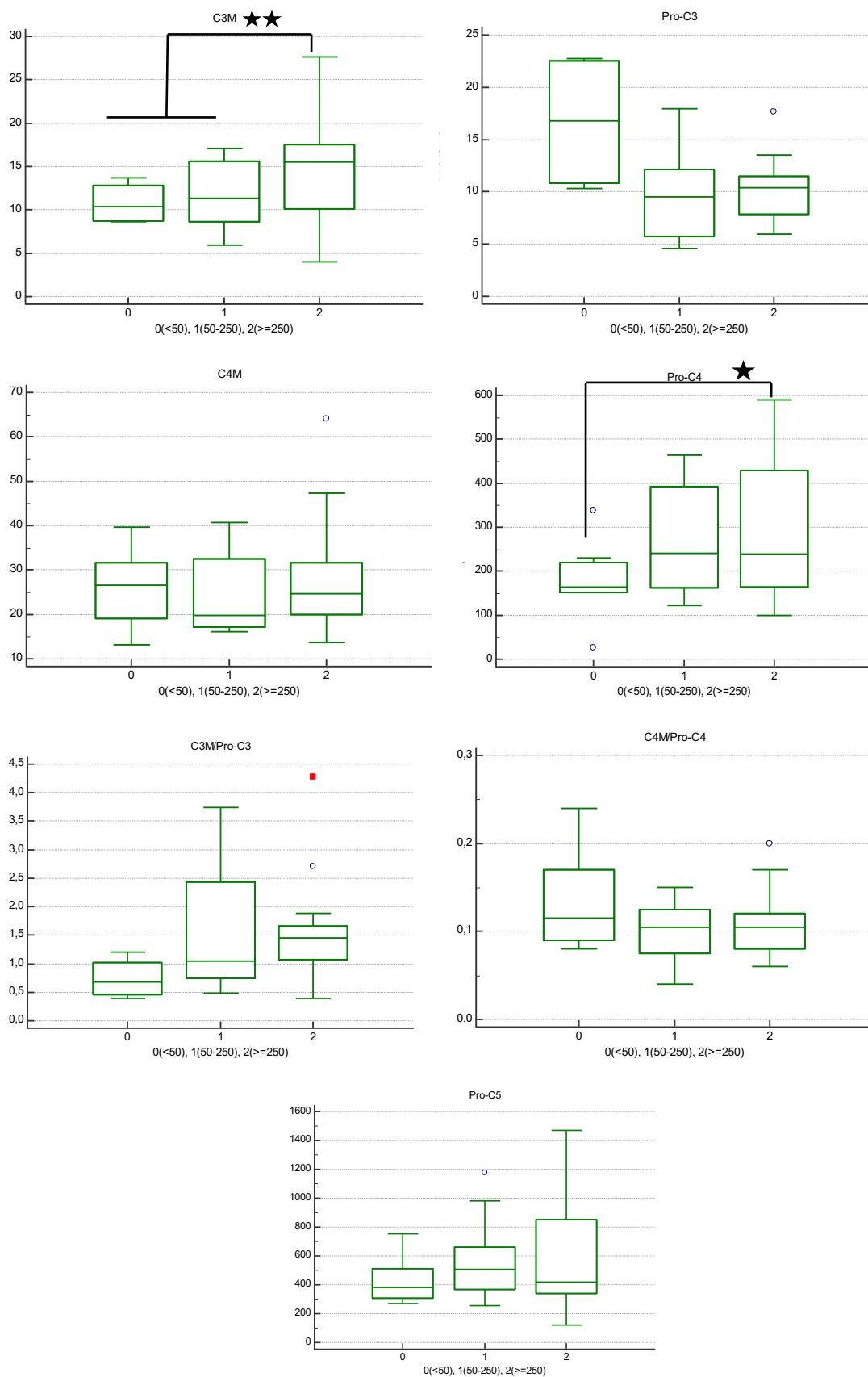
U CD-u je u ispitanika s vrijednostima FK 250  $\mu\text{g/g}$  ili više postojala značajno viša koncentracija biomarkera C4M i povišen omjer razgradnje i izgradnje kolagena III (C3M/Pro-C3) u usporedbi s ispitanicima čija je koncentracija FK bila  $<50 \mu\text{g/g}$  i 50-250  $\mu\text{g/g}$  ( $p < 0,05$ ). Uz to, zabilježen je trend povećanja koncentracije Pro-C4 prema kategorijama s višim koncentracijama FK ( $p = 0,063$ ) (slika 7., tablica 11.).

U UC-u ispitanika s vrijednostima FK 250  $\mu\text{g/g}$  ili više postojala je značajno viša koncentracija biomarkera Pro-C4 u usporedbi s ispitanicima čija je koncentracija FK bila  $<50 \mu\text{g/g}$  ( $p = 0,042$ ). Kod ispitanika s vrijednostima FK višim od 250  $\mu\text{g/g}$  postojala je značajno viša koncentracija biomarkera C3M u usporedbi s ispitanicima s koncentracijom manjom od 250  $\mu\text{g/g}$  ( $p = 0,004$ ). Omjer razgradnje i izgradnje kolagena III (C3M/Pro-C3) je imao trend prema višim vrijednostima s povećanjem prema kategorijama s višim koncentracijama FK ( $p = 0,052$ ) (slika 8., tablica 11.).



Slika 7. Povezanost biomarkera razgradnje i izgradnje kolagena III, IV i V s fekalnim kalprotektinom u Crohnovoj bolesti. ★-p<0,5





Slika 8. Povezanost biomarkera razgradnje i izgradnje kolagena III, IV i V s fekalnim kalprotektinom u ulceroznom kolitisu. ★-p<0,5, ★★-p<0,01

Tablica 11. Koncentracije biomarkera razgradnje i izgradnje kolagena III, IV i V prema kategorijama upalne aktivnosti fekalnog kalprotektina u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu

	Crohnova bolest		
	<50 µg/g	50-250 µg/g	≥250 µg/g
C3M, ng/mL	10,98 (9,1-12,7)	11,96 (9,9-13,8)	13,32 (10,0-15,7)
Pro-C3, ng/mL	11,17 (8,6-19,1)	10,06 (7,6-14,1)	9,93 (7,0-15,4)
C3M/Pro-C3	0,95 (0,63-1,16)	1,21 (0,96-1,48)	1,36 (0,87-1,58)
C4M, ng/mL	18,49 (15,7-29,6)	25,5 (18,3-34,5)	31,80 (20,1-44)
Pro-C4, ng/mL	255,9 (147-305)	249,1 (178-428)	325,8 (209-468)
C4M/Pro-C4	0,10 (0,07-0,13)	0,10 (0,08-0,12)	0,10 (0,06-0,13)
Pro-C5, ng/mL	455,3 (276-728)	538,8 (384-816)	548,2 (351-896)
	Ulcerozni kolitis		
	<50 µg/g	50-250 µg/g	≥250 µg/g
C3M, ng/mL	10,36 (8,6-12,8)	11,36 (8,6-15,6)	15,5 (10,1-17,5)
Pro-C3, ng/mL	16,81 (10,8-22,5)	9,50 (5,7-12,1)	10,45 (8-12,1)
C3M/Pro-C3	0,68 (0,46-1,02)	1,04 (0,75-2,4)	1,41 (0,93-1,66)
C4M, ng/mL	26,61 (19,0-31,5)	19,75 (17,1-32,5)	24,65 (21,4-36,7)
Pro-C4, ng/mL	164 (152-213)	240,3 (162-391)	259,1 (172-449)
C4M/Pro-C4	0,14 (0,09-0,22)	0,10 (0,07-0,12)	0,11 (0,08-0,13)
Pro-C5, ng/mL	379,1 (308-510)	508,8 (367-661)	580,7 (355-1030)

5.4. Korelacija biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s nespecifičnim laboratorijskim biomarkerima upalne aktivnosti u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu

U CD-u CRP je značajno pozitivno korelirao s C3M, C3M/Pro-C3, C4M i Pro-C4, kalprotektin s C3M/Pro-C3, C4M i Pro-C4, a fibrinogen s C3M/Pro-C3. Nije bilo značajne korelacije proučavanih biomarkera sa SE i brojem trombocita (tablica 12.).

Tablica 12. Korelacija koncentracija biomarkera C3M, Pro-C3, C3M/Pro-C3, C4M, Pro-C4, C4M/Pro-C4, Pro-C5 u serumu s nespecifičnim laboratorijskim biomarkerima upalne aktivnosti (CRP, SE, broj trombocita, fibrinogen, kalprotektin) u Crohnovoj bolesti

	CRP		SE		Kalprotektin	
	Koeficijent	p	Koeficijent	p	Koeficijent	p
C3M, ng/mL	0,448	<0,001*	0,154	0,242	0,206	0,151
Pro-C3, ng/mL	-0,177	0,150	-0,121	0,325	-0,206	0,151
C3M/Pro-C3	0,455	<0,001*	0,175	0,224	0,363	0,021*
C4M, ng/mL	0,277	0,007*	0,147	0,224	0,275	0,031*
Pro-C4, ng/mL	0,294	0,004*	0,234	0,168	0,250	0,046*
C4M/Pro-C4	-0,138	0,155	-0,151	0,224	-0,064	0,560
Pro-C5, ng/mL	0,180	0,094	0,151	0,224	0,150	0,198
	Broj trombocita		Fibrinogen			
	Koeficijent	p	Koeficijent	p		
C3M, ng/mL	0,153	0,285	0,186	0,211		
Pro-C3, ng/mL	-0,200	0,198	-0,265	0,087		
C3M/Pro-C3	0,262	0,161	0,328	0,035*		
C4M, ng/mL	0,167	0,198	0,179	0,168		
Pro-C4, ng/mL	0,124	0,285	0,093	0,506		
C4M/Pro-C4	-0,026	0,791	0,021	0,835		
Pro-C5, ng/mL	0,049	0,723	0,031	0,835		

CRP-C-reaktivni protein, SE-sedimentacija eritrocita, \*p<0,05

U UC-u CRP je značajno pozitivno korelirao s C3M, SE s C4M i Pro-C5, a kalprotektin s C3M. Nije bilo značajne korelacije proučavanih biomarkera s brojem trombocita i fibrinogenom (tablica 13.).

Tablica 13. Korelacija koncentracija biomarkera C3M, Pro-C3, C3M/Pro-C3, C4M, Pro-C4, C4M/Pro-C4, Pro-C5 u serumu s nespecifičnim laboratorijskim biomarkerima upalne aktivnosti (CRP, SE, broj trombocita, fibrinogen, kalprotektin) u ulceroznom kolitisu

	CRP		SE		Kalprotektin	
	Koeficijent	p	Koeficijent	p	Koeficijent	p
C3M, ng/mL	0,598	<0,001*	0,443	0,070	0,564	0,014*
Pro-C3, ng/mL	-0,159	0,485	-0,190	0,435	-0,107	0,694
C3M/Pro-C3	0,443	0,063	0,370	0,103	0,329	0,085
C4M, ng/mL	0,267	0,084	0,310	0,084	0,298	0,085
Pro-C4, ng/mL	0,305	0,072	0,423	0,017*	0,358	0,059
C4M/Pro-C4	0,020	0,891	-0,098	0,540	-0,042	0,786
Pro-C5, ng/mL	0,270	0,084	0,436	0,017*	0,257	0,134
	Broj trombocita		Fibrinogen			
	Koeficijent	p	Koeficijent	p		
C3M, ng/mL	0,181	0,356	0,349	0,074		
Pro-C3, ng/mL	-0,108	0,584	-0,071	0,725		
C3M/Pro-C3	0,118	0,549	0,190	0,341		
C4M, ng/mL	0,187	0,199	0,211	0,158		
Pro-C4, ng/mL	0,124	0,396	0,133	0,379		
C4M/Pro-C4	0,110	0,452	0,152	0,313		
Pro-C5, ng/mL	0,113	0,444	0,116	0,443		

CRP-C-reaktivni protein, SE-sedimentacija eritrocita, \*p<0,05

## 5.5. Korelacija biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s kliničkim i endoskopskim pokazateljima upalne aktivnosti u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu

U CD-u uočena je značajna korelacija biomarkera C4M i C3M/Pro-C3 s endoskopskim pokazateljem upalne aktivnosti SES-CD ( $r=0,299$ ,  $p=0,020$  i  $r=0,290$ ,  $p=0,040$ ). Od kliničkih pokazatelja upalne aktivnosti značajna korelacija je dobivena između HBI i Pro-C3 ( $r=-0,346$ ,  $p=0,002$ ). Kombinacija biomarkera C4M, C3M/Pro-C3 korelirala je sa SES-CD ( $r=0,43$ ,  $p=0,002$ ), a korelacija je bila bolja nakon prilagodbe za čimbenike zabune ( $r=0,56$ ,  $p<0,001$ ). CRP je značajno korelirao sa SES-CD ( $r=0,51$ ,  $p<0,001$ ) i CDAI ( $r=0,710$ ,  $p<0,001$ ) (tablica 14.).

U UC-u nije bilo značajne korelacije biomarkera ECM-a izvanstaničnog matriksa s MES-om, no uvodeći proširenost bolesti dobivena je značajna korelacija određenih biomarkera s mMES-om. Korelacija je bila značajna za C3M ( $r=0,600$ ,  $p=0,004$ ), C3M/Pro-C3 ( $r=0,532$ ,  $p=0,013$ ), C4M ( $r=0,361$ ,  $p=0,039$ ). Od kliničkih pokazatelja upalne aktivnosti značajna korelacija je bila između TW i C4M ( $r=0,31$ ,  $p=0,03$ ), Pro-C4 ( $r=0,47$ ,  $p=0,001$ ) i Pro-C5 ( $r=0,32$ ,  $p=0,02$ ). Kombinacija biomarkera C3M i C4M značajno je korelirala s mMES ( $r=0,49$ ,  $p=0,024$ ), dok je korelacija nakon prilagodbe bila bolja ( $r=0,66$ ,  $p=0,005$ ). Kombinacija biomarkera C4M, C3M/Pro-C3 također je značajno korelirala s mMES ( $r=0,63$ ,  $p=0,002$ ), dok je korelacija nakon prilagodbe bila bolja ( $r=0,82$ ,  $p<0,001$ ). CRP je najbolje korelirao s pMayo i TW ( $r=0,61$ ,  $p<0,001$  i  $r=0,62$ ,  $p<0,001$ ), a značajna korelacija je također dobivena s MES-om, dok je ona bila granična za mMES (tablica 14.).

Tablica 14. Korelacija biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 s endoskopskim i kliničkim pokazateljima upalne aktivnosti

	SES-CD		HBI		CDAI	
	Koeficijent	p	Koeficijent	p	Koeficijent	p
C3M, ng/mL	0,139	0,335	-0,155	0,183	0,001	0,991
Pro-C3, ng/mL	-0,257	0,071	-0,346	0,002*	-0,194	0,096
C3M/Pro-C3	0,290	0,040*	0,212	0,068	0,177	0,128
C4M, ng/mL	0,299	0,020*	0,097	0,318	0,168	0,084
Pro-C4, ng/mL	0,163	0,213	0,014	0,884	0,026	0,788
C4M/Pro-C4	0,115	0,380	0,058	0,553	0,138	0,158
Pro-C5, ng/mL	0,106	0,422	0,058	0,557	0,062	0,532
CRP	0,510	<0,001*	0,176	0,070	0,710	<0,001*
C4M, C3M/PRO-C3	0,430	0,002*	-	-	-	-
C4M, C3M/PRO-C3 <sup>a</sup>	0,560	<0,001*	-	-	-	-
	MES		mMES		pMayo/TW	
	Koeficijent	p	Koeficijent	p	Koeficijent	p
C3M, ng/mL	0,356	0,113	0,600	0,004*	0,19/0,36	0,35/0,07
Pro-C3, ng/mL	-0,272	0,233	-0,342	0,129	0,08/0,03	0,69/0,87
C3M/Pro-C3	0,265	0,264	0,532	0,013*	0,04/0,20	0,83/0,31
C4M, ng/mL	0,257	0,148	0,361	0,039*	0,12/0,31	0,42/0,03*
Pro-C4, ng/mL	0,303	0,086	0,256	0,150	0,28/0,47	0,05/0,001*
C4M/Pro-C4	-0,038	0,834	0,133	0,461	-0,14/-0,22	0,32/0,13
Pro-C5, ng/mL	0,168	0,359	0,320	0,074	0,18/0,32	0,21/0,02*
CRP	0,400	0,021*	0,330	0,058	0,61/0,62	<0,001*/<0,001*
C3M, C4M	-	-	0,490	0,024*	-	-
C3M, C4M <sup>a</sup>	-	-	0,660	0,005*	-	-
C4M, C3M/PRO-C3	-	-	0,630	0,002*	-	-
C4M, C3M/PRO-C3 <sup>a</sup>	-	-	0,820	<0,001*	-	-

SES-CD-simple endoscopic score for Crohn's, CDAI-Crohn's disease activity index, disease, HBI-Harvey-Bradshaw Index, MES-Mayo endoscopic score, mMES-modified Mayo endoscopic score, TW-Truelowe Witts kriteriji, \*p<0.05

## 5.6. Osjetljivost i specifičnost biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4, Pro-C5 u određivanju aktivnosti bolesti

Biomarkeri C3M, Pro-C3, C3M/Pro-C3 i Pro-C4 pokazali su značajnu dijagnostičku vrijednost u određivanju različitih kategorija endoskopske aktivnosti bolesti. U CD-u biomarkeri Pro-C3, C3M/Pro-C3 i C4M razlikovali su ispitanike s umjerenom do teškom bolesti u odnosu na bolesnike u remisiji (AUC 0,70 95%CI 0,53-0,83, AUC 0,73 95%CI 0,56-0,85, AUC 0,69 95%CI 0,54-0,81). Koncentracije biomarkera C4M mogu razlikovati aktivnu bolest od remisije (AUC 0,69 95%CI 0,56-0,80) (tablica 15.). Najbolja kombinacija biomarkera u razlikovanju umjerene do teške bolesti od remisije i aktivne bolesti od remisije bila je C4M and C3M/Pro-C3 (prilagođeni AUC 0,92 95%CI 0,66-0,90 i 0,80 95%CI 0,66-0,90).

Tablica 15. ROC analiza biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5 u određivanju endoskopski aktivne bolesti u Crohnoj bolesti

Biomarker	SES-CD				
	AUC (95% CI)	OS, %	SP, %	Cutoff	p
Remisija prema aktivno					
C3M	0,56 (0,41-0,69)	45,83	73,08	14,4	0,477
Pro-C3	0,63 (0,48-0,76)	95,83	30,77	18,56	0,096
C3M/PROC3	0,64 (0,50-0,77)	54,17	73,08	1,26	0,071
C4M	0,69 (0,56-0,80)	85,71	43,75	20,43	0,006*
Pro-C4	0,61 (0,48-0,73)	46,43	84,37	369,2	0,134
C4M/Pro-C4	0,57 (0,43-0,69)	42,86	75,00	0,10	0,357
Pro-C5	0,58 (0,44-0,70)	39,29	84,37	896,4	0,310
Remisija prema umjereno/teško					
C3M					
Pro-C3	0,70 (0,53-0,83)	78,57	38,46	14,02	0,028*
C3M/Pro-C3	0,73 (0,56-0,85)	64,29	73,08	1,26	0,007*
C4M	0,69 (0,54-0,81)	50,00	81,25	35,58	0,018*
Pro-C4	0,58 (0,43-0,71)	44,44	84,37	396,2	0,392
C4M/Pro-C5	0,59 (0,44-0,73)	33,33	87,50	0,12	0,309
Pro-C5	0,53 (0,38-0,67)	33,33	90,62	1027	0,704

AUC-površina ispod krivulje (engl. *area under curve*), OS-osjetljivost, SP-specifičnost, \*p<0.05

Analizirajući MES, biomarkeri nisu pokazali značajnost u prepoznavanju aktivne bolesti (tablica 16.). Analizirajući mMES, C3M, C3M/Pro-C3 i C4M imali su značajnu dijagnostičku točnost u razlikovanju umjerene do teške bolesti od remisije (AUC 0,86 (95% CI 0,54-0,98), AUC 0,80 (95%CI 0,48-0,97) i AUC 0,76 (95%CI 0,48-0,96)).

Tablica 16. ROC analiza biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5 u određivanju endoskopski aktivne bolesti (MES) u ulceroznom kolitisu

Biomarker	MES				
	AUC (95% CI)	OS, %	SP %	Cutoff	p
Remisija prema aktivno					
C3M	0,53 (0,30-0,75)	41,18	75,00	15,51	0,794
Pro-C3	0,76 (0,53-0,92)	47,06	75,00	9,50	0,045
C3M/Pro-C3	0,60 (0,36-0,80)	58,82	75,00	1,21	0,514
C4M	0,51 (0,32-0,68)	46,15	71,43	27,26	0,963
Pro-C4	0,51 (0,33-0,68)	46,15	85,71	222,4	0,925
C4M/Pro-C4	0,59 (0,40-0,76)	53,85	85,71	0,11	0,423
Pro-C5	0,54 (0,36-0,72)	60,00	71,43	580,7	0,743
Remisija prema umjereno/teško					
C3M	0,60 (0,34-0,82)	46,15	75,00	15,51	0,496
Pro-C3	0,75 (0,49-0,92)	46,15	75,00	9,50	0,072
C3M/Pro-C3	0,65 (0,39-0,86)	69,23	75,00	1,21	0,335
C4M	0,58 (0,37-0,78)	58,82	71,43	27,25	0,486
Pro-C4	0,59 (0,37-0,78)	47,06	85,71	395,2	0,473
C4M/Pro-C4	0,57 (0,35-0,77)	47,06	85,71	0,11	0,545
Pro-C5	0,51 (0,30-0,72)	25,00	85,71	1025	0,890

AUC-površina ispod krivulje (engl. *area under curve*), OS-osjetljivost, SP-specifičnost, \*p<0.05



Tablica 17. ROC analiza biomarkera C3M, C4M, Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5 u određivanju endoskopski aktivne bolesti i proširenosti (mMES) u ulceroznom kolitisu

Biomarker	mMES				
	AUC (95% CI)	OS, %	SP, %	Cutoff	p
Remisija prema aktivno					
C3M	0,64 (0,40-0,83)	43,75	80,00	15,94	0,303
Pro-C3	0,65 (0,41-0,84)	93,75	40,00	12,74	0,337
C3M/Pro-C3	0,63 (0,40-0,83)	62,50	80,00	1,21	0,309
C4M	0,63 (0,44-0,79)	52,17	80,00	27,25	0,218
Pro-C4	0,60 (0,41-0,76)	52,17	80,00	337,6	0,327
C4M/Pro-C4	0,59 (0,35-0,71)	52,17	70,00	0,11	0,700
PROC5	0,56 (0,37-0,73)	18,18	90,00	1043	0,593
Remisija prema umjereno/teško					
C3M	0,86 (0,54-0,98)	71,43	60,00	14,43	0,002*
Pro-C3	0,68 (0,36-0,91)	42,86	80,00	6,53	0,263
C3M/Pro-C3	0,80 (0,48-0,97)	85,71	80,00	1,21	0,037*
C4M	0,76 (0,48-0,96)	70,00	80,00	27,57	0,038*
Pro-C4	0,66 (0,41-0,85)	60,00	90,00	395,2	0,239
C4M/Pro-C4	0,65 (0,40-0,84)	40,00	80,00	0,12	0,236
Pro-C5	0,73 (0,48-0,90)	66,67	80,00	751,8	0,073

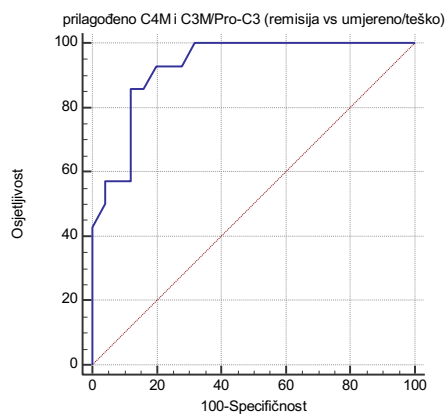
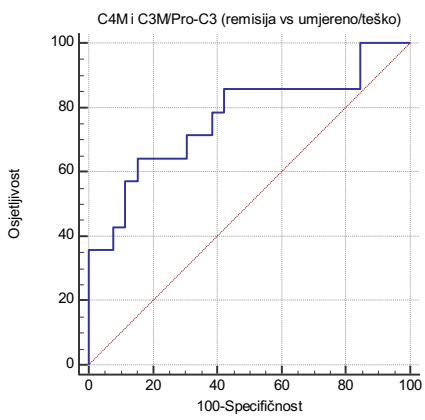
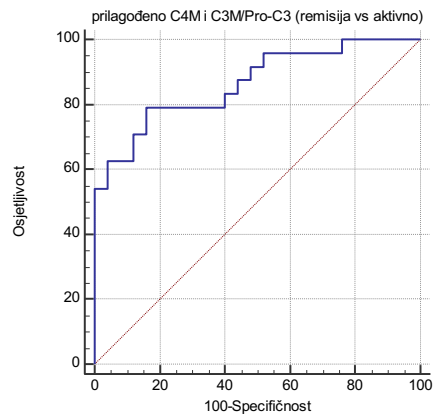
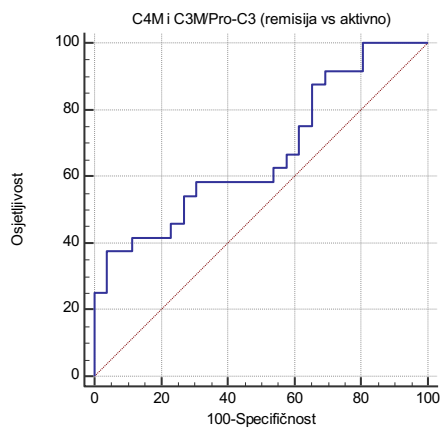
AUC-površina ispod krivulje (engl. *area under curve*), OS-osjetljivost, SP-specifičnost, \*p<0.05

Najbolja kombinacija biomarkera u razlikovanju umjerene do teške bolesti od remisije i aktivne bolesti od remisije u CD-u bila je C4M i C3M/Pro-C3 (prilagođeno AUC 0,93 (95%CI 0,66-0,90) i 0,80 (95%CI 0,66-0,90)) (tablica 18., slika 9.). Najbolja kombinacija biomarkera kod UC-a u razlikovanju aktivne bolesti od remisije bila je C3M i C4M (prilagođeno AUC 0,95 95%CI 0,79-1) te C4M i C3M/PRO-C3 (prilagođeno AUC 0,93 95%CI 0,72-0,99). Nadalje, u razlikovanju umjerene do teške bolesti od remisije najbolja je bila kombinacija C4M i C3M/PROC3 (AUC 0,94 95%CI 0,65-0,99) (tablica 18., slika 10).

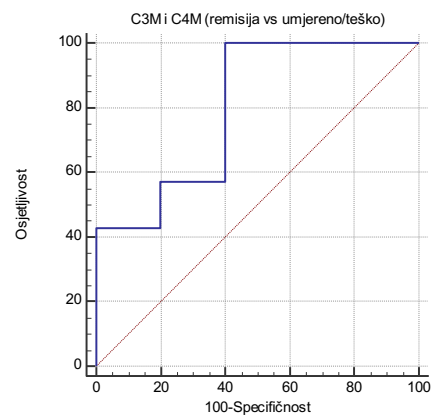
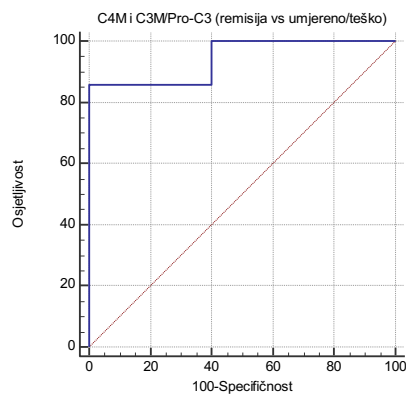
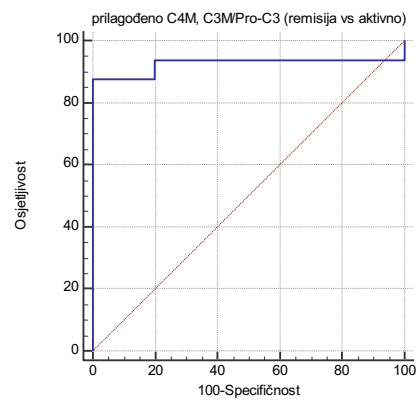
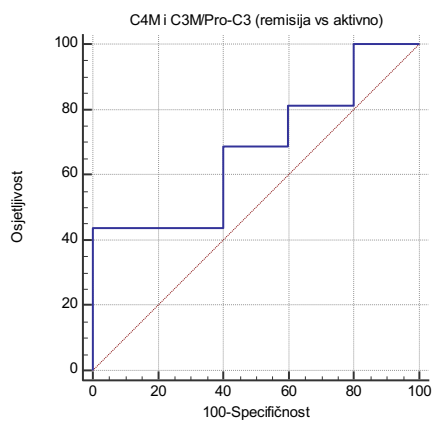
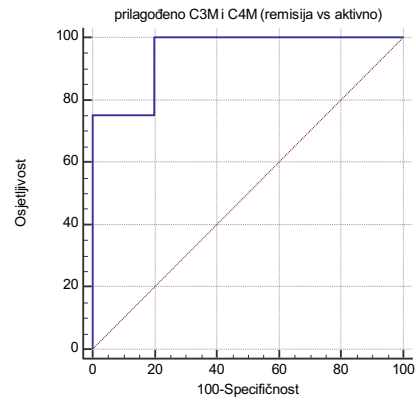
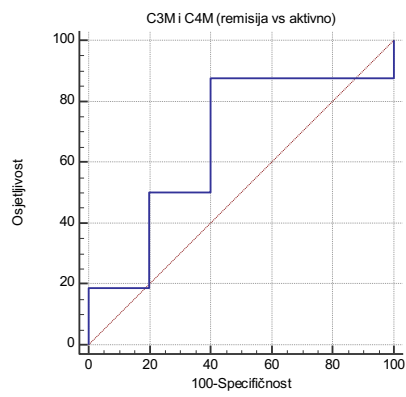
Tablica 18. ROC analiza kombinacije biomarkera u određivanju endoskopski aktivne bolesti

	AUC (95% CI)	OS, %	SP, %	p
CD (remisija prema aktivno)				
C4M, C3M/Pro-C3	0,67(0,40-0,81)	41,76	88,46	0,029*
C4M, C3M/Pro-C3 <sup>a</sup>	0,80 (0,66-0,90)	79,17	84,00	<0,001*
CD (remisija prema umjereno/teško)				
C4M, C3M/Pro-C3	0,77 (0,60-0,89)	64,29	84,62	0,002*
C4M, C3M/Pro-C3 <sup>a</sup>	0,93 (0,66-0,90)	93,00	80,00	<0,001*
UC (remisija prema aktivno)				
C3M, C4M	0,66 (0,43-0,85)	87,50	60,00	0,303
C3M, C4M <sup>a</sup>	0,95 (0,79-1,00)	100,0	80,00	<0,001*
C4M, C3M/Pro-C3	0,65 (0,45-0,86)	43,75	60,00	0,198
C4M, C3M/PRO-C3 <sup>a</sup>	0,93 (0,72-0,99)	88,00	100,0	<0,001*
UC (remisija prema umjereno/teško)				
C3M, C4M	0,80 (0,48-0,96)	100,0	60,00	0,039*
C4M, C3M/Pro-C3	0,94 (0,65-0,99)	86,00	100,0	<0,001*

AUC-površina ispod krivulje (engl. *area under curve*), OS-osjetljivost, SP-specifičnost, \*p<0,05, <sup>a</sup>analiza je prilagođena za čimbenike zabune



Slika 9. Grafički prikaz površine ispod krivulje (AUC) za kombinacije biomarkera u Crohnovoj bolesti.



Slika 10. Grafički prikaz površine ispod krivulje (AUC) za kombinacije biomarkera u ulceroznom kolitisu.

## 5.7. Prediktori upalne aktivnosti u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu

U univarijatnoj analizi značajni prediktori aktivne bolesti u CD-u bili su biološka terapija, biomarkeri C3M/Pro-C3, C4M, HBI, CRP i fibrinogen. U multivarijatnoj analizi prilagođenoj prema dobi, spolu, ITM-u, uzimanju biološke terapije, HBI-u i koncentraciji CRP-a značajni nezavisni prediktori upalne aktivnosti bili su HBI i C4M kao pozitivni prediktori i biološka terapija kao negativni prediktor (tablica 19.). U UC-u u univarijatnoj analizi značajni prediktori bili su C4M i Pro-C5, dok je u multivarijatnoj analizi prilagođenoj prema dobi, spolu, ITM-u, primanju biološke terapije, PMS-u, koncentracijama CRP-a i fekalnog kalprotektina značajan pozitivan prediktor upalne aktivnosti bio C4M (tablica 20.).

Tablica 19. Prediktori upalne aktivnosti u Crohnovoj bolesti

	$\beta$	OR (95% CI)	p	$\beta$	OR (95% CI)	p
ITM, kg/m <sup>2</sup>	0,003	1,001 (0,89-1,13)	0,963			
Godine bolesti	-0,021	0,98 (0,91-1,04)	0,528			
Ponašanje (B1 ref.)	0,076	1,08 (0,38-3,06)	0,887			
Lokalizacija (L1 ref.)	0,647	1,9 (0,48-7,61)	0,359			
Perianalna bolest	-0,208	0,81 (0,28-2,3)	0,696			
Kirurški zahvat	-0,872	0,41 (0,15-1,20)	0,105			
Pušenje	1,576	4,83 (0,91-25,6)	0,064			
Biološka terapija	-1,686	0,18 (0,06-0,56)	0,003*	-2,50	0,08 (0,01-0,51)	0,007*
Imunosupresivi	-0,879	0,41 (0,12-1,39)	0,155			
Glukokortikoidi	0,869	2,38 (0,20-27,8)	0,488			
C3M	0,087	1,01 (0,94-1,26)	0,241			
Pro-C3	-0,075	0,93 (0,84-1,02)	0,121			
C3M/Pro-C3	1,032	2,8 (1,01-7,8)	0,048*			
C4M	0,053	1,05 (1,01-1,1)	0,014*	0,075	1,07 (1,01-1,16)	0,041*
Pro-C4	0,003	1,003 (0,99-1,006)	0,067			
C4M/Pro-C4	4,297	7,3 (0,1-14,5)	0,335			
Pro-C5	0,001	1,001 (0,99-1,002)	0,250			
HBI	0,286	1,33 (1,05-1,68)	0,017*	0,811	1,84 (1,10-3,08)	0,020*
CRP	0,069	1,07 (1,01-1,14)	0,028*			
SE	0,019	1,02 (0,98-1,06)	0,368			
Broj trombocita	0,003	1,001 (0,99-1,011)	0,437			
Fibrinogen	0,551	1,73 (1,07-2,81)	0,026*			
Kalprotektin	0,001	1,01 (0,99-1,02)	0,123			

$\beta$ –koeficijent regresije, ITM-indeks tjelesne mase, B1-ne strikturirajući, ne penetrirajući oblik bolesti, L1-terminalni ileum, HBI-Harvey Bradshaw index, CRP-C-reaktivni protein, SE-sedimentacija eritrocita, \* $p < 0,05$ . Multivarijatna analiza je prilagođena prema dobi, spolu, ITM-u, uzimanju biološke terapije, operativnom zahvatu, HBI-u i koncentraciji CRP-a.

Tablica 20. Prediktori upalne aktivnosti u ulceroznom kolitisu

Varijabla	Univarijatna analiza			Multivarijatna analiza		
	$\beta$	OR (95% CI)	p	$\beta$	OR (95% CI)	p
ITM, kg/m <sup>2</sup>	-0,045	0,96 (0,82-1,11)	0,561			
Godine bolesti	-0,189	0,83 (0,65-1,05)	0,120			
Proširenost bolesti	1,100	3 (0,60-14,93)	0,179			
Pušenje	-0,300	0,71 (0,07-8,13)	0,806			
Biološka terapija	-0,103	0,36 (0,08-1,64)	0,185			
Imunosupresivi	0,636	1,89 (0,39-9,08)	0,427			
Glukokortikoidi	0,711	2,04 (0,36-11,5)	0,421			
C3M	0,511	1,67 (0,98-2,81)	0,055			
Pro-C3	0,027	1,03 (0,88-1,20)	0,736			
C3M/Pro-C3	1,306	3,69 (0,98-13,7)	0,052			
C4M	0,099	1,10 (1,01-1,20)	0,029*	0,112	1,10 (0,96-1,27)	0,027*
Pro-C4	0,003	1,001 (0,99-1,01)	0,207			
C4M/Pro-C4	10,79	4,8 (0,3-8,8)	0,205			
Pro-C5	0,003	1,01 (1,001-1,02)	0,029*			
PMS	0,221	1,24 (0,93-1,67)	0,144			
CRP	0,031	1,03 (0,99-1,07)	0,140			
SE	0,011	1,01 (0,98-1,04)	0,482			
TRC	0,007	1,01 (0,99-1,02)	0,084			
Fibrinogen	0,199	1,22 (0,69-2,13)	0,486			
Kalprotektin	0,001	1,01 (0,99-1,02)	0,999			

$\beta$ –koeficijent regresije, ITM-indeks tjelesne mase, PMS-Partial Mayo Score, CRP-C-reaktivni protein, SE-sedimentacija eritrocita, \*p<0,05. Multivarijatna analiza je prilagođena prema dobi, spolu, ITM-u, biološkoj terapiji, PMS-u, koncentracijama CRP-a i fekalnog kalprotektina.

## 6. RASPRAVA

Zbog svog tijeka bolesti koji je karakteriziran epizodama relapsa i remisije bolesnici s IBD-om zahtijevaju kontinuiranu evaluaciju aktivnosti bolesti koja omogućuje pravodobno i rano planiranje daljnje terapije s ciljem poboljšanja kvalitete života bolesnika i sprječavanja neželjenih ishoda. U procjeni upalne aktivnosti IBD-a danas se koristimo kombinacijom kliničkih simptoma i znakova, laboratorijskih nalaza te endoskopskih i radioloških pretraga (138,139). Učestale i ponavljane endoskopske pretrage su često potrebne kako bi se točno procijenila aktivnost upale i proširenost bolesti, što ujedno predstavlja i današnji zlatni standard. Dodatno tomu, pravilna procjena upalne aktivnosti ključna je za odabir primjerene terapije. Endoskopski pregled crijeva je neugodan za bolesnika, predstavlja velik utrošak vremena, ali i ekonomski teret za sustav i bolesnika. Serumski pokazatelji upalne aktivnosti kao jednostavna, jeftina i neinvazivna metoda mogu pomoći u lakšoj i bržoj procjeni upalne aktivnosti i time doprinijeti donošenju odluka o daljnjem terapijskom ili dijagnostičkom postupanju. Pronalazak lako dostupnog surogat markera za praćenje upalne aktivnosti bolesti važan je i zbog mogućnosti praćenja pojave upalnih promjena u području crijeva koje nije dostupno endoskopskom pregledu, poput ulceracija u proksimalnom ileumu ili jejunumu. Iz tog razloga biološki markeri ili biomarkeri imaju važnu dijagnostičku i terapijsku ulogu u bolesnika s IBD-om. Potencijalna uloga biomarkera uključuje otkrivanje IBD-a, praćenje tijeka i upalne aktivnosti bolesti, utvrđivanje odgovora na terapiju i predviđanje tijeka bolesti, odnosno predviđanje relapsa (138,140). U ovoj studiji prikazani su sveobuhvatni rezultati povezanosti biomarkera razgradnje kolagena III (C3M), stvaranja kolagena III (Pro-C3), razgradnje kolagena IV (C4M), stvaranja kolagena IV (Pro-C4) i stvaranja kolagena V (Pro-C5) s endoskopskim, kliničkim i biokemijskim pokazateljima upalne aktivnosti u osoba s IBD-om. Prevladavanje procesa razgradnje kolagena III ili IV bilo je procijenjeno omjerom vrijednosti C3M/Pro-C3 i C4M/Pro-C4.

Suvremeni terapijski cilj liječenja IBD-a je mukozno cijeljenje, odnosno odsutnost svih ulceracija i erozija vidljivih endoskopskim metodama. Važnost mukoznog cijeljenja je u smanjenju stopa hospitalizacije, održanju kliničke remisije, smanjenju upotrebe glukokortikoida i smanjenju rizika za operativne zahvate, kolektomiju i kolorektalni karcinom (63-65). U endoskopskoj procjeni upalne aktivnosti važno je uzeti u obzir i



proširenost bolesti, jer se na taj način kvantificira ukupna količina upale kod ispitanika koja može utjecati na koncentraciju biomarkera ECM-a. Primjerice, SES-CD u CD-u uzima u obzir proširenost bolesti, dok to nije slučaj s MES-om. Stoga, podatke u UC-u smo uz primjenu MES-a analizirali i modificiranjem MES-a, odnosno uvođenjem proširenosti bolesti, dobivši tako mMES (71). Upoređujući endoskopsku aktivnost, a promatrajući samo intenzitet upale koristeći MES postojala je značajna razlika u koncentraciji C3M i C4M, no uvođenjem kriterija proširenosti dodatno je otkrivena razlika između koncentracija biomarkera Pro-C3, Pro-C4 i Pro-C5. Nadalje, uspoređujući korelacije biomarkera ECM-a koristeći MES i mMES uočila se značajna korelacija biomarkera C3M, C3M/Pro-C3 i C4M nakon uvođenja kriterija proširenosti upale. U studiji Ferrantea i sur. prikazana je značajna korelacija mMES-a s kliničkim (PMS,  $r=0,535$ ,  $p<0,001$ ), biokemijskim (CRP i FK,  $r=0,238$ ,  $r=0,730$ ,  $p<0,001$ ) i histološkim (*Geboes score*,  $r=0,615$ ,  $p<0,001$ ) pokazateljima upalne aktivnosti (44). Uz to, s povećanjem vrijednosti MES-a i FK-a povećavale su se vrijednosti mMES-a ( $p<0,001$ ) (71). Stoga, uz SES-CD i MES, opravdano je u procjeni upale koristiti i mMES s obzirom na to da se osim intenziteta upale uzima u obzir i kriterij proširenosti upale, čime se kvantificira ukupna količina upale. Uz endoskopske pokazatelje upalne aktivnosti analizirani su i rezultati povezanosti kliničkih (CDAI, HBI, PMS i TW) i biokemijskih (CRP, SE, broj trombocita, fibrinogen, FK) pokazatelja upalne aktivnosti s biomarkerima remodeliranja ECM-a.

Kolagen III je jedan od glavnih tipova kolagena ECM-a crijevne stijenke čija zastupljenost iznosi oko 20%, a njegova je glavna uloga održanje fleksibilnosti i elastičnosti crijeva (77-79). Upala koja zahvaća IM može dovesti do narušavanja strukture i funkcije elastičnih retikularnih vlakana kolagena III koje omogućavaju gipkost i konstantnu promjenu oblika crijeva. Uz strukturnu ulogu kolagen III ima ulogu i u cijeljenju rana i fibrozi (97,79). U našoj studiji serumske koncentracije biomarkera stvaranja kolagena III (Pro-C3) bile su povišene u ispitanika s CD-om u endoskopskoj remisiji. Posljedično tome, omjer razgradnje i izgradnje kolagena III (C3M/Pro-C3) bio je povišen u ispitanika s umjerenom do teškom endoskopski aktivnom bolesti. Od kliničkih i biokemijskih pokazatelja upalne aktivnosti sličan profil remodeliranja kolagena III zabilježen i u slučaju kad je upala definirana HBI-om i CRP-om. Naime, serumske razine biomarkera Pro-C3 bile su niže u ispitanika s povišenim HBI-om, dok su u ispitanika s povišenim koncentracijama CRP-a bile povišene vrijednosti C3M/Pro-

C3, i to na račun povišenih vrijednosti biomarkera C3M. Haaften i sur. proučavali su serumske koncentracije biomarkera razgradnje i stvaranja kolagena u 112 ispitanika s CD-om lokalizacije u terminalnom ileumu i kod 24 zdrave kontrolne osobe. Biokemijska aktivnost bolesti bila je definirana koncentracijom CRP-a u krvi iznad 5 mg/L. Koncentracije biomarkera C3M bile su povišene u ispitanika s aktivnom CD u usporedbi s ispitanicima u remisiji i zdravim kontrolama (129). U istoj studiji izračunat je omjer Pro-C3/C3M čije su vrijednosti bile niže u ispitanika s aktivnom bolesti. S obzirom na to da je u navedenoj studiji prikazan omjer izgradnje i razgradnje, što je obrnuto od prikaza u našoj studiji, možemo zaključiti da se rezultati naše studije podudaraju s rezultatima navedene studije u kojoj su zabilježene povišene koncentracije biomarkera C3M i povišen omjer C3M/Pro-C3 u ispitanika s biokemijski aktivnom bolesti definiranoj prema vrijednostima CRP-a. Uz serumske biokemijske pokazatelje upalne aktivnosti važan doprinos ovoj studiji bile su paralelno izmjerene vrijednosti FK-a. U skupini s vrijednostima FK-a 250 µg/g i više također je bio povišen omjer C3M/Pro-C3, što je dodatna potvrda činjenice da tijekom upale u CD-u dolazi do pojačane razgradnje kolagena III.

Promatrajući endoskopsku aktivnost upale u UC-u, serumske koncentracije C3M i Pro-C3 pokazale su sličan trend kao i u CD-u, a to su povišene koncentracije C3M i snižene koncentracije Pro-C3, odnosno pojačana razgradnja kolagena III (povišen omjer C3M/Pro-C3). Nije bilo značajne razlike promatrajući kliničke pokazatelje upalne aktivnosti u UC-u, dok su u ispitanika s povišenim vrijednostima CRP-a vrijednosti C3M bile značajno više. Nedavno je objavljena studija Lindholma i sur. na dvanaest miševa s DSS kolitisom i devet kontrola (141). U toj studiji mjerene su koncentracije biomarkera C3M, rPro-C3 (Pro-C3 u glodavaca, engl. *rodent Pro-C3*), C4M i Pro-C4 u početnoj točki praćenja i u šestom, sedmom i šesnaestom danu. Tijekom prvih pet dana aplicirana je 5% DSS otopina, a tijekom preostalih jedanaest dana obična voda. Aktivnost bolesti je kvantificirana i procijenjena konzistencijom stolice, rektalnim krvarenjem, prisutnosti krvi u fecesu i gubitkom na tjelesnoj masi. Koncentracije C3M bile su povišene u DSS štakora u sedmom i šesnaestom danu u usporedbi s kontrolama, dok su koncentracije rPro-C3 pokazale trend pada nakon indukcije kolitisa, a porast nakon aplikacije obične vode. To je dovelo do porasta omjera C3M/PRO-C3, što znači da je u aktivnoj bolesti prevladala razgradnja kolagena III. Stoga se rezultati i ove studije podudaraju s rezultatima naše studije. Dodatno,

pojačana razgradnja kolagena III potvrđena je i višim koncentracijama biomarkera C3M u skupini ispitanika s vrijednostima FK-a 250  $\mu\text{g/g}$  i više.

Naša studija ima značajan doprinos trenutnom znanju o ulozi kolagena III u IBD-u, jer endoskopijom kao današnjim zlatnim standardom ne samo da potvrđuje rezultate ranijih istraživanja, već donosi i nove zaključke. Prvo, ovo je prva studija koja je pokazala da u endoskopski aktivnoj bolesti u ispitanika s IBD-om prevladava proces razgradnje kolagena III, što se može zaključiti iz povećane koncentracije biomarkera C3M u UC-u i povećanog omjera C3M/Pro-C3 u endoskopski aktivnoj bolesti u CD-u i UC-u. Drugo, u fazi remisije prevladava proces stvaranja kolagena III, što se može zaključiti iz povećane koncentracije biomarkera Pro-C3 i smanjenog omjera biomarkera C3M/Pro-C3 kod ispitanika s IBD-om u remisiji. Treće, od biokemijskih i kliničkih pokazatelja upalne aktivnosti, povišene vrijednosti CRP-a, FK-a i HBI-a mogu odražavati pojačanu razgradnju kolagena III. Četvrto, vrijednosti Pro-C3 u IBD-u nisu ni na približno visokoj razini koje su zabilježene u ispitanika s fibrozom jetre i koje se smatraju indikatorom fibroze (142). Naime, više vrijednosti biomarkera Pro-C3, iznad 22,4 ng/L, se smatraju snažnim prediktorom progresije fibroze jetre (142). S druge strane, uzimajući u obzir činjenicu da je nakon aplikacije obične vode u spomenutoj studiji Lindholma i sur. došlo do povećanja biomarkera rPro-C3, mogli bismo pretpostaviti da bi se vrijednosti Pro-C3 ispod 20 ng/L mogle smatrati pokazateljem faze cijeljenja u IBD-u.

Kolagen IV je najzastupljeniji kolagen BM-a i najvažniji strukturni protein BM-a, smješten je iznad IM-a i predstavlja granicu prema epitelu crijeva (87,88). Biomarkeri razgradnje i stvaranja kolagena IV su se i ranije proučavali, ali ne u kontekstu upalne aktivnosti u bolesnika s IBD-om. U ranije spomenutoj studiji Lindholma i sur. su koncentracije biomarkera C4M i Pro-C4 bile povišene u DSS štakora u usporedbi s kontrolama u sedmom danu, nakon čega su koncentracije padale tijekom vremena apliciranja obične vode, što je slična dinamika kakvu je imao i biomarker C3M, ali ne i Pro-C3 (141). U našoj studiji ispitanici s CD-om i endoskopski aktivnom bolesti, odnosno blagom i umjerenom do teškom aktivnosti imali su više koncentracije biomarkera C4M i Pro-C4 u usporedbi s ispitanicima u remisiji. Kod ispitanika s UC-om koncentracije C4M bile su najviše u ispitanika s umjerenom do teškom endoskopskom upalnom aktivnosti. Nisu dobivene značajne razlike u kliničkim pokazateljima upalne aktivnosti u CD-u, dok su u UC-u više koncentracije Pro-C4 bile

zabilježene u ispitanika s aktivnom upalom prema TW-u. Koristeći biokemijske pokazatelje upalne aktivnosti u serumu nije dobivena značajna razlika, no ispitanici s CD-om i vrijednostima FK-a 250 µg/g i više imali su značajno više vrijednosti biomarkera C4M, dok su ispitanici s UC-om imali značajno više vrijednosti biomarkera Pro-C4. Stoga, u aktivnoj bolesti kod ispitanika s IBD-om zastupljeni su i procesi razgradnje i procesi stvaranja kolagena IV, što je vidljivo iz povećane koncentracije biomarkera C4M i Pro-C4 u ispitanika s endoskopski aktivnom bolesti i jednakog omjera C4M/Pro-C4 u ispitanika s remisijom i aktivnom bolesti i što je sukladno rezultatima ranije opisane studije (141). Zaključno, ovim rezultatima smo pokazali da upala u UC-u i CD-u, uz to što zahvaća IM koji je smješten u dubljem sloju, zahvaća i BM koja je smještena u površinskom sloju stijenke crijeva. Nadalje, možemo pretpostaviti da bi serumski biomarkeri remodeliranja BM-a, odnosno kolagena IV mogli poslužiti kao pokazatelji epitelne i sluzničke upale. Kako bismo potkrijepili ovu tvrdnju možemo istaknuti podatak da je kod UC-a, gdje je prisutna površinska upala, koncentracija biomarkera C4M bila značajno viša u ispitanika s umjereno do teško aktivnom bolesti od skupine s blagom aktivnosti i u remisiji, dok to nije slučaj u CD-u gdje je razlika postojala samo između skupine s aktivnom bolesti i remisijom.

Kolagen V je heterotrimer koji formira heterofibrile s kolagenom I i III, prisutan je u IM-u crijeva i ima izravnu ulogu u sastavljanju fibrila i pravilnom raspoređivanju kolagena I i III. Studije koje su dosad proučavale biomarker Pro-C5 upotrebljavale su biokemijske ili kliničke pokazatelje upalne aktivnosti s različitim zaključcima, stoga je ovo prva studija koja je proučavala povezanost biomarkera stvaranja kolagena V s upalnom aktivnosti u CD-u i UC-u. Prema dosadašnjim studijama, povišene koncentracije biomarkera Pro-C5 bile su zabilježene u bolesnika s CD-om i bolesti u području ileuma kada je upalna aktivnost definirana CRP-om iznad 5 mg/L (129). Druga studija provedena je na ispitanicima s CD-om i UC-om. Ispitanici s CD-om i klinički blagom upalnom aktivnosti imali su povišene koncentracije biomarkera Pro-C5, a razlike nije bilo u ispitanika s UC-om (136). U našoj studiji koncentracije biomarkera Pro-C5 bile su povišene u endoskopski aktivnoj bolesti (blagoj i umjerenoj do teškoj) u CD-u i u umjereno do teškoj bolesti u UC-u. Koristeći kliničke pokazatelje upalne aktivnosti koncentracije Pro-C5 bile su više u skupini aktivnog UC-a prema TW kriterijima te nije bilo značajne razlike u koncentracijama Pro-C5 u usporedbi s biokemijskim pokazateljima upalne aktivnosti.

Proučavajući rezultate dosadašnjih studija i naše studije važno je istaknuti nekoliko činjenica vezanih za biomarker Pro-C5. Prvo, koristeći endoskopske pokazatelje upalne aktivnosti u UC-u otkrivene su povišene koncentracije biomarkera Pro-C5 u aktivnoj fazi bolesti, što nije zabilježeno u dosadašnjim studijama. Drugo, koncentracije biomarkera Pro-C5 odražavaju upalnu aktivnost i u CD-u i u UC-u. Kako se kolagen V sintetizira u procesu cijeljenja rane i procesu fibrogeneze, njegove bi koncentracije mogle biti odraz upravo tih procesa (80,81). Potrebna su daljnja istraživanja uloge kolagena V u ispitanika s IBD-om.

Nakon opisa razlika u koncentracijama različitih kategorija upalne aktivnosti slijede korelacije biomarkera ECM-a s endoskopskim, kliničkim i biokemijskim pokazateljima upalne aktivnosti kao još jednu mjeru povezanosti. U dosadašnjim studijama zabilježena je pozitivna korelacija aktivnosti bolesti u DSS induciranog kolitisa štakora za C3M, Pro-C3 i njihov omjer, što nije zabilježeno za biomarkere C4M i Pro-C4 (141). Opisana je i značajna korelacija biomarkera Pro-C5 s CDAI u ranije opisanoj studiji Mortensena i sur., dok korelacija nije bila značajna u UC-u (136).

U našoj studiji u UC-u mMES je pokazao umjerenu korelaciju s biomarkerom C3M i C3M/Pro-C3 te slabu s C4M, dok korelacija nije bila značajna s CRP-om. S druge strane, MES nije značajno korelirao s biomarkerima ECM-a, nego samo s CRP-om, što znači da su pojedinačni biomarkeri ECM-a (C3M i C3M/Pro-C3) umjereno dobar pokazatelj intenziteta upale i njene ekstenzije, dok je CRP slab pokazatelj intenziteta upale u UC-u. Na taj način je također potvrđena važnost uzimanja u obzir proširenosti upale kod proučavanja biomarkera ECM-a. Uz to, biomarkeri ECM-a mogli bi predstavljati izravnu mjeru količine remodeliranja tkiva, jer proširenost upale utječe na njihovu koncentraciju.

Promatrajući pojedinačne biomarkere u CD-u, slaba pozitivna korelacija sa SES-CD-om dobivena je za C3M/Pro-C3 i C4M, dok je korelacija s CRP-om bila umjerena. S obzirom na navedeno izrađen je model kombinacije biomarkera C4M i C3M/Pro-C3, čime je korelacija poboljšana do visoke u UC-u i umjerene i CD-u. Zaključno, biomarkeri ECM-a snažnije koreliraju s endoskopskim pokazateljem upalne aktivnosti u UC-u nego u CD-u, a korelacija je bolja kod korištenja kombinacije biomarkera C4M i C3M/Pro-C3. Dodatno tome, CRP značajno korelira s upalnom aktivnosti u CD-u, što nije slučaj za UC. Serumski biomarkeri upale poput CRP-a, SE i broja trombocita su

nespecifični i često ne koreliraju s endoskopskim nalazom i kliničkom slikom, stoga njihova klinička primjena u upalnim bolestima crijeva ponekad može biti ograničena (138). Primjerice, bolesnici s UC-om i visokim vrijednostima CRP-a (npr. 10 mg/mL) mogu imati histološki nalaz jake upale sluznice, no bolesnici s UC-om i niskim vrijednostima CRP-a nemaju nužno histološki nalaz odsutnosti upale ili nalaz blage upale (143). U CD-u se, primjerice, mogu pronaći mukozne lezije u bolesnika s niskim vrijednostima CRP-a i povišenim vrijednostima CDAI-a. U tom slučaju niske vrijednosti CRP-a nužno ne isključuju postojanje mukoznih lezija u crijevu (144). U CD-u od biokemijskih pokazatelja CRP i FK su značajno korelirali s biomarkerima remodeliranja kolagena III i IV, što je djelomično podudaranje s endoskopskim pokazateljima upale. S druge strane, u UC-u te podudarnosti nije bilo te su biokemijski markeri CRP i FK odražavali samo remodeliranje kolagena III, a ne kolagena IV. Uz to, i klinički pokazatelji upalne aktivnosti poput CDAI-a imaju svoj nedostatak, a to je podložnost subjektivnoj procjeni i slaba korelacija s endoskopskom upalnom aktivnosti (27). Od kliničkih pokazatelja upalne aktivnosti C4M, Pro-C4 i Pro-C5 su slabo korelirali s TW-om, a korelacija Pro-C3 s HBI-om je također bila slaba. S druge strane, korelacija CDAI-a i CRP-a je bila visoka. Slično kao i kod usporedbe koncentracija biomarkera ECM-a ovisno o endoskopskim, kliničkim i biokemijskim kategorijama upalne aktivnosti, i kod analize korelacija postoji značajna razlika u profilu biomarkera ovisno o načinu određivanja upalne aktivnosti. To u praktičnom smislu znači da bi korištenjem samo kliničkih ili biokemijskih pokazatelja upalne aktivnosti neki procesi remodeliranja ECM-a koji su prisutni u endoskopski aktivnoj upali mogli biti previđeni, odnosno promjene u koncentracijama biomarkera ECM-a mogle bi ostati neprepoznate. Stoga bi u budućim studijama bilo poželjno koristiti endoskopiju s jasno definiranim načinom određivanja upalne aktivnosti. Biomarkeri ECM-a koji su izravna mjera remodeliranja tkiva mogli bi biti klinički korisni jer omogućavaju dodatnu informaciju o stanju crijevnog tkiva, a njihovim se praćenjem potencijalno može pratiti i strukturni učinak liječenja, obzirom da je kolagen jedan od glavnih strukturnih proteina.

Budući da kalprotektin otpuštaju neutrofilni na mjestu upale u crijevu, njegove su vrijednosti proporcionalne s količinom akutne upale, odnosno migracijom neutrofila u crijevo. Iako su nespecifičnost i utjecaj brojnih drugih stanja na koncentracije FK-a njegov glavni nedostatak, u našoj studiji definirani su isključujući i uključujući kriteriji

čime je vjerojatnost lažno pozitivnih nalaza svedena na minimum (58-60). Općenito, FK dobro korelira s kliničkom, endoskopskom i histološkom aktivnosti u UC-u, dok je u CD-u ta korelacija slaba. Uz to, postoje podaci o boljem trendu korelacije FK-a u bolesti koja zahvaća debelo crijevo od izolirane ilealne bolesti (61,62). U našoj studiji u kategorijama s vrijednostima FK-a 250 ili više bile su značajno više koncentracije C4M i C3M/Pro-C3 kod CD-a i C3M i C4M kod kod UC-a. Nadalje, u CD-u je kalprotektin značajno korelirao s C3M/Pro-C3, C4M i Pro-C4, dok je u UC-u korelirao s C3M. Navedeni podaci o povezanosti biomarkera ECM-a s upalnom aktivnosti definiranoj prema vrijednostima FK-a govore u prilog činjenici da intenzitet crijevne upale dovodi do povećane razgradnje kolagena III i povećane razgradnje i izgradnje kolagena IV.

Po pitanju korištenja kombinacije biomarkera C3M, Pro-C3 i C4M naši rezultati bi mogli biti korisni u razlikovanju ispitanika s umjerenom do teškom endoskopski aktivnom bolesti od ispitanika u remisiji. Konkretno, kod CD-a pojedinačni biomarkeri C4M, Pro-C3 i C3M/Pro-C3 imali su AUC od 0,69-0,73, a vrijednosti su bile više u kombinaciji C4M i C3M/Pro-C3 (AUC 0,77) i nakon prilagodbe za čimbenike zabune (AUC 0,93). Kod UC-a, C3M, C3M/Pro-C3 i C4M imali su AUC 0,76-0,86 u razlikovanju ispitanika u remisiji i onih s umjerenim do teškim oblikom aktivne bolesti prema mMES-u, dok koristeći samo MES nije postignuta statistička značajnost. U kombinaciji C3M i C4M te C4M i C3M/Pro-C3 i nakon prilagodbe imali su AUC 0,93-0,95. Utjecaj upalne aktivnosti na dijagnostičku točnost biomarkera EMC-a prikazana je u studiji Mortensena i sur. (128). U spomenutoj studiji prikazana je najbolja kombinacija biomarkera u razlikovanju UC-a od CD-a (C3M, C4M i VICM – AUC 0,90) i UC-a od ispitanika bez IBD-a (C3M, VICM – AUC 0,98). Oba modela bila su prilagođena za čimbenike zabune, a njihova se točnost poboljšala kada su se analizirali bolesnici s aktivnom bolesti (definiranoj kao CRP >5) (128). Promatrajući naše rezultate možemo izvesti nekoliko zaključaka. S obzirom na to da je veća dijagnostička točnost biomarkera ECM-a u razlikovanju umjerenom do teške aktivne bolesti od ispitanika u remisiji, potencijalna uloga biomarkera C4M, C3M i Pro-C3 i njihove kombinacije u svakodnevnoj kliničkoj praksi mogla bi biti u prepoznavanju ispitanika s visokom aktivnosti bolesti. Nadalje, kombinacija biomarkera ECM-a s većom će točnošću prepoznati ispitanike s umjerenom do teškom upalnom aktivnosti u UC-u.

Kako bismo mogli proučiti povezanost biomarkera ECM-a s upalnom aktivnosti, za ovo istraživanje izrađen je model analize prediktora upalne aktivnosti. Zanimljiva je činjenica da su u endoskopskoj upali u univarijatnoj analizi u CD-u uz očekivane i poznate prediktore poput biološke terapije, HBI, CRP i fibrinogena dodatno statistički značajni bili biomarkeri C4M i C3M/Pro-C3. Multivarijatna analiza prilagođena prema dobi, spolu, ITM-u, uzimanju biološke terapije, HBI-u i koncentraciji CRP-a pokazala je kao značajne nezavisne prediktore upalne aktivnosti CD-a HBI i C4M kao pozitivne prediktore, a biološku terapiju kao negativni prediktor. U UC-u su u univarijatnoj analizi značajni bili C4M i Pro-C5, dok je multivarijatna analiza prilagođena prema dobi, spolu, ITM-u, primanju biološke terapije, PMS-u, koncentracijama CRP-a i fekalnog kalprotektina pokazala biomarker C4M kao značajan pozitivni prediktor endoskopske upalne aktivnosti. Konačno, ovi podaci potvrđuju povezanost biomarkera remodeliranja kolagena III i IV s upalnom aktivnosti u CD-u a biomarkera remodeliranja kolagena IV u CD-u.

Ova studija uz brojne prednosti ima i neke nedostatke. Prvo, skupina proučavanih ispitanika prikupljena je u tercijarnom centru gdje se liječe kompliciraniji slučajevi bolesti. To ilustrira činjenica da je više od polovice ispitanika liječeno biološkom terapijom te da je više od 50% ispitanika s CD-om liječeno kirurški. Iz tog razloga se ovi rezultati ne mogu ekstrapolirati na cijelu populaciju bolesnika s IBD-om. S obzirom na to da bi prethodni operativni zahvat resekcije crijeva mogao utjecati na koncentraciju biomarkera, taj je čimbenik, uz ostale potencijalne čimbenike zabune, uvršten u regresijski model. Značajno bi bilo i analizirati utjecaj duljine reseciranog crijeva na koncentraciju biomarkera no to nije bilo moguće iz praktičnih razloga, stoga bi takva analiza mogla biti predmet istraživanja u budućim studijama. Drugo, postoji znatna heterogenost populacije ispitanika s CD-om, što je očekivano s obzirom na različite fenotipove bolesti. Iz tog razloga je kod dijagnostičke točnosti kombinacije biomarkera učinjena prilagoba i po fenotipu CD-a koji može utjecati na razine biomarkera ECM-a (129,145).

Glavna prednost naše studije je uključivanje endoskopskih parametara, što predstavlja današnji zlatni standard u procjeni upalne aktivnosti. Važnost korištenja endoskopije pokazana je i u ovoj studiji gdje klinički i biokemijski definirana upala u većini slučajeva nije pokazala potpunu sliku remodeliranja biomarkera ECM-a. Ovo je



prva studija na ovako opsežnom broju biomarkera koja je analizirala endoskopske pokazatelje upalne aktivnosti zajedno s kliničkim i biokemijskim pokazateljima. Nadalje, prednost naše studije je i uključenje proširenosti upale u procjenu endoskopske upalne aktivnosti. U SES-CD-u u izračun je uključena proširenost bolesti, no to nije slučaj s MES-om, stoga je korištenje mMES-a još jedna prednost studije, jer bi u suprotnom povezanost nekih biomarkera s upalnom aktivnosti ostala neprepoznata.

Zaključno, ovom studijom je prvi puta dokazano da remodeliranje ECM-a, kvantificirano biomarkerima razgradnje i stvaranja kolagena III, IV i V, odražava endoskopski aktivnu bolest u CD-u i UC-u. Kombinacija biomarkera C4M, C3M i Pro-C3 mogla bi poslužiti u prepoznavanju bolesnika s umjereno do teško aktivnom bolesti. Potrebne su daljnje prospektivne studije na većem broju ispitanika kako bi se dodatno razjasnila uloga biomarkera remodeliranja ECM-a u bolesnika s IBD-om, a koja bi u konačnici pomogle u stratifikaciji rizika i težine bolesti.

## 7. ZAKLJUČCI

1. U aktivnoj upali bolesnika s upalnim bolestima crijeva prevladavaju procesi razgradnje kolagena III i IV i procesi stvaranja kolagena IV i V, dok u fazi remisije prevladava proces izgradnje kolagena III.
2. Postoji razlika u profilu biomarkera izvanstaničnog matriksa u upalnim bolestima crijeva ovisno da li se upala definira koristeći endoskopske, kliničke ili biokemijske pokazatelje upalne aktivnosti.
3. Klinički ili biokemijski pokazatelji upalne aktivnosti nisu pouzdan pokazatelj procesa remodeliranja izvanstaničnog matriksa. Korištenjem isključivo kliničkih ili biokemijskih pokazatelja upale neki procesi remodeliranja izvanstaničnog matriksa u aktivnoj upali mogli bi ostati neprepoznati.
4. Kombinacija biomarkera C4M i C3M/Pro-C3 vrlo dobro korelira s endoskopskom upalnom aktivnosti u ulceroznom kolitisu i umjereno u Crohnovoj bolesti.
5. Biomarkeri remodeliranja izvanstaničnog matriksa uglavnom slabo koreliraju s kliničkim i biokemijskim pokazateljima upalne aktivnosti, osim CRP-a i kalprotektina čija je korelacija u ulceroznom kolitisu umjerena.
6. Dijagnostička točnost biomarkera remodeliranja kolagena III i IV je viša kod razlikovanja ispitanika s umjereno do teško aktivnom bolesti od onih u remisiji nego kod razlikovanja aktivne bolesti od remisije.
7. Biomarkeri C3M, Pro-C3 i C4M i njihova kombinacija mogli bi biti korisni u razlikovanju ispitanika s umjerenom do teškom endoskopski aktivnom bolesti od ispitanika u remisiji.
8. Povezanost biomarkera izvanstaničnog matriksa s upalnom aktivnosti važno je analizirati primjenom endoskopskih pokazatelja upalne aktivnosti koji imaju uključen kriterij proširenosti bolesti u svoj izračun kako bi se na taj način procijenila ukupna

količina upale koja utječe na koncentracije biomarkera remodeliranja izvanstaničnog matriksa.

9. Biomarkeri ECM-a koji su izravna mjera remodeliranja tkiva mogli bi biti klinički korisni jer omogućavaju dodatnu informaciju o stanju crijevnog tkiva, a njihovim bi se praćenjem potencijalno mogao pratiti strukturni učinak liječenja.

## 8. SAŽETAK

Ulcerozni kolitis (UC) i Crohnova bolest (CB) zahtijevaju kontinuiranu evaluaciju aktivnosti bolesti. Izvanstanični matriks (ECM) se sastoji od bazalne membrane koja se sastoji većinom od kolagena IV i intersticijskog matriksa u čijem se sastavu nalaze kolageni I, III i V. Patološko okruženje dovodi do narušenog remodeliranja, strukture, kvalitete i funkcije ECM-a. Naš cilj je bio istražiti biomarkere razgradnje i stvaranja kolagena i njihovu povezanost s aktivnosti bolesti u ispitanika s upalnim bolestima crijeva. U ovoj presječnoj studiji biomarkeri remodeliranja ECM-a izmjereni su u 162 ispitanika (110 CB i 52 UC). Biomarkeri razgradnje kolagena III (C3M) i stvaranja (Pro-C3), razgradnje kolagena IV (C4M) i stvaranja (Pro-C4) i stvaranja kolagena V (Pro-C5) izmjereni su metodom ELISA. Upalna aktivnost procijenjena je klinički, biokemijski i endoskopski. U aktivnoj upali prevladavaju procesi razgradnje kolagena III i IV i procesi stvaranja kolagena IV i V, dok u fazi remisije prevladava proces izgradnje kolagena III. Postoji razlika u profilu biomarkera izvanstaničnog matriksa u upalnim bolestima crijeva kada se upala definira koristeći endoskopske, kliničke ili biokemijske pokazatelje upalne aktivnosti. Biomarkeri C3M, Pro-C3 i C4M i njihova kombinacija mogli bi biti korisni u razlikovanju ispitanika s umjerenom do teškom aktivnosti bolesti od ispitanika u remisiji.

Ključne riječi: izvanstanični matriks, kolagen, upala, upalne bolesti crijeva

## 9. SUMMARY

### **Biomarkers of degradation and formation of collagen III, IV and V in serum as markers of inflammatory activity in patients with inflammatory bowel disease**

Viktor Domislović, 2021.

Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) require continuous evaluation of disease activity. Extracellular matrix (ECM) consists of basement membrane and interstitial matrix, which consist mainly of type IV collagen and types I, III and V collagen, respectively. Pathological environment leads to impaired remodeling, structure, quality and function of ECM. Our aim was to investigate biomarkers of collagen degradation and formation and their association with disease activity in patients with IBD. In this cross-sectional study, we have measured five biomarkers of ECM remodelling in 162 IBD patients (110 CD and 52 UC). Biomarkers of type III collagen degradation (C3M) and formation (Pro-C3), type IV collagen degradation (C4M) and formation (Pro-C4), and type V collagen formation (Pro-C5) were measured in serum by ELISA. Inflammatory activity was assessed using clinical, biochemical and endoscopic scores. We report pronounced process of collagen type III and IV degradation and collagen type IV and V formation in active disease, and formation of type III collagen in remission. There is a difference in ECM remodelling profile in IBD using clinical, biochemical and endoscopic activity indices. Combination of biomarkers C3M, Pro-C3 and C4M could be useful in differentiation patients with moderate to severe active disease from patients in remission.

Keywords: extracellular matrix, collagen, inflammation, inflammatory bowel disease

## 10. POPIS LITERATURE

1. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: Controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006;55(6):749–53.
2. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO i sur. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 1: Diagnosis and medical management. *J Crohn's Colitis*. 2017;11(1):3–25.
3. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M i sur. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: Definitions, diagnosis, extra-intestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders. *J Crohn's Colitis*. 2017;11(6):649–70.
4. Park JH, Peyrin-Biroulet L, Eisenhut M, Shin J II. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules. *Autoimmun Rev*. 2017;16(4):416–26.
5. Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology*. 2019;157(3):647–659.
6. Mukhopadhyay I, Hansen R, El-Omar EM, Hold GL. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(4):219–30.
7. Matijašić M, Meštrović T, Perić M, Čipčić Paljetak H, Panek M, Vranešić Bender D i sur. Modulating Composition and Metabolic Activity of the Gut Microbiota in IBD Patients. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4):578.
8. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G i sur. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46–54.
9. Burisch J, Pedersen N, Čuković-Čavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D i sur. East–West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut* 2014;63(4):588–97.
10. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2015;50(8):942–51.

11. Best WR, Becktel JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976;70(3): 439-44.
12. Jørgensen LG, Fredholm L, Hyltoft Petersen PH, Hey H, Munkholm P, Brandslund I. How accurate are clinical activity indices for scoring of disease activity in inflammatory bowel disease (IBD)? *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(4):403–11.
13. Annese V, Daperno M, Rutter MD, Amiot A, Bossuyt P, East J i sur. European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7(12):982-1018.
14. Coremans G, Rutgeerts P, Geboes K, Van den Oord J, Ponette E, Vantrappen G i sur. The value of ileoscopy with biopsy in the diagnosis of intestinal Crohn's disease. *Gastrointest Endosc*. 1984;30(3):167-72.
15. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J i sur. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2005;353(23):2462-76.
16. Gionchetti P, Dignass A, Danese S, Magro Dias FJ, Rogler G, Lakatos PL i sur. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 2: Surgical management and special situations. *J Crohns Colitis*. 2017;11(2):135–49.
17. Harbord M, Eliakim R, Bettenworth D, Karmiris K, Katsanos K, Kopylov U i sur. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 2: Current management. *J Crohns Colitis*. 2017;11(7): 769–84.
18. Weisshof R, Aharoni Golan M, Sossenheimer PH, El Jurdi K, Ollech JE, Pekow J i sur. Real-world experience with tofacitinib in IBD at a Tertiary Center. *Dig Dis Sci*. 2019;64(7):1945-51.
19. Neurath MF, Travis SP: Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut*. 2012;61(11):1619–35.
20. Baert F, Moortgat L, Van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, De Vos M i sur. Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2010;138(2):463–8.
21. Schnitzler F, Fidler H, Ferrante M, Noman M, Arijs I, Van Assche G i sur. Mucosal healing predicts long-term outcome of maintenance therapy with infliximab in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(9):1295–301.

22. 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.
23. Panaccione R, Colombel JF, Louis E, Peyrin-Biroulet L, Sandborn WJ. Evolving definitions of remission in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(8):1645–53.
24. Sandborn WJ, Hanauer S, Van Assche G, Panes J, Wilson S, Peterson J i sur. Treating beyond symptoms with a view to improving patient outcomes in inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis*. 2014;8(9):927– 35.
25. D'Haens GR. Top-down therapy for IBD: Rationale and requisite evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(2):86–92.
26. Bouguen G, Levesque BG, Feagan BG, Kavanugh A, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF, i sur. Treat to target: a proposed new paradigm for the management of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(6):1042–50.
27. Cellier C, Sahmoud T, Froguel E, Adenis A, Belaiche J, Bretagne JF i sur. Correlations between clinical activity, endoscopic severity, and biological parameters in colonic or ileocolonic Crohn's disease. A prospective multicentre study of 121 cases. The Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives. *Gut*. 1994;35(2):231–5.
28. Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, Dubois C, Rutgeerts P. Correlation Between the Crohn's Disease Activity and Harvey-Bradshaw Indices in Assessing Crohn's Disease Severity. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(4):357–63.
29. Harvey RF, Bradshaw JM. A Simple Index of Crohn's Disease Activity. *Lancet*. 1980;1(8167):514.
30. Dinesen LC, Walsh AJ, Protic MN, Heap G, Cummings F, Warren BF i sur. The pattern and outcome of acute severe colitis. *J Crohn's Colitis*. 2010;4(4):431–7.
31. Du Clos TW, Mold C. The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2001;14(3):289-93.
32. Darlington GJ, Wilson DR, Lachman LB. Monocyte-conditioned medium, interleukin-1, and tumor necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells in vitro. *J Cell Biol*. 1986;103(3):787-93.
33. Mazlam MZ, Hodgson HJ. Why measure C reactive protein? *Gut*. 1994;35(1):5-7
34. Gabay C, Kushner I. Correction: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999; 29;340(17):1376.



35. Stuart J, Whicher JT. Tests for detecting and monitoring the acute phase response. *Arch Dis Child*. 1988;63(2):115-7.
36. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*. 2006;55(3):426-31.
37. Harries A, Fitzsimons E, Fifield R, Dew J, Rhodes J. Platelet count: a simple measure of activity in Crohn's disease. *Br Med J*. 1983;286(6376):1476.
38. Webberley MJ, Hart MT, Melikian V. Thromboembolism in inflammatory bowel disease: role of platelets. *Gut*. 1993;34(2):247-51.
39. Bollen L, Vande Casteele N, Ballet V, Van Assche G, Ferrante M, Vermeire S i sur. Thromboembolism as an important complication of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2016;28(1):1-7.
40. Matowicka-Karna J. Markers of inflammation, activation of blood platelets and coagulation disorders in inflammatory bowel diseases. *Postepy Hig Med Dosw*. 2016;70:305-312
41. Collins CE, Rampton DS, Rogers J, Williams NS. Platelet aggregation and neutrophil sequestration in the mesenteric circulation in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1997;9(12):1213-7.
42. Wakefield AJ, Sawyerr AM, Dhillon AP, Pittilo RM, Rowles PM, Lewis AAM i sur. Pathogenesis of Crohn's Disease: Multifocal Gastrointestinal Infarction. *Lancet*. 1989;2(8671):1057-62.
43. Dhillon AP, Anthony A, Sim R, Wakefield AJ, Sankey EA, Hudson M i sur. Mucosal capillary thrombi in rectal biopsies. *Histopathology*. 1992;21(2):127-33.
44. Murthy SK, Nguyen GC. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease: An epidemiological review. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(4):713-8.
45. Danese S, de la Motte C, Fiocchi C. Platelets in Inflammatory Bowel Disease: Clinical, Pathogenic, and Therapeutic Implications. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(5):938-45.
46. Senchenkova E, Seifert H, Granger DN. Hypercoagulability and Platelet Abnormalities in Inflammatory Bowel Disease. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41(6):582-9.
47. Mannaioni PF, Bello MG Di, Masini E. Platelets and inflammation: Role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res*. 1997;46(1):4-18.

48. Brandt E, Brandt E. Platelet-derived CXC chemokines : old players in new games. *Immunol Rev.* 2000;177:204-16.
49. Stokes KY, Granger DN. Platelets: A critical link between inflammation and microvascular dysfunction. *J Physiol.* 2012;590(5):1023–34.
50. Dolapcioglu C, Soylu A, Kendir T, Tuzun Ince A, Dolapcioglu H, Purisa S i sur. Coagulation parameters in inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7(5):1442-8
51. Mao R, Xiao YL, Gao X, Chen BL, He Y, Yang L i sur. Fecal calprotectin in predicting relapse of inflammatory bowel diseases: A meta-analysis of prospective studies. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(10):1894–9.
52. Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L, Bellini M, Romano MR, Sterpi C i sur. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut.* 2005;54(3):364–8.
53. Louis E. Fecal calprotectin: towards a standardized use for inflammatory bowel disease management in routine practice. *J Crohns Colitis.* 2015;9(1):1–3.
54. van Rheeën PF, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 2010;341:c3369–c3369.
55. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L i sur. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(12):2218–24.
56. Goutorbe F, Goutte M, Minet-Quinard R, Boucher A-L, Pereira B, Bommelaer i sur. Endoscopic Factors Influencing Fecal Calprotectin Value in Crohn's Disease. *J Crohns Colitis.* 2015;9(12):1113–9.
57. Dumoulin EN, Van Biervliet S, Langlois MR, Delanghe JR. Proteolysis is a confounding factor in the interpretation of faecal calprotectin. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(1):65–71.
58. Du L, Foshaug R, Huang VW, Kroeker KI, Dieleman LA, Halloran BP i sur. Within-Stool and Within-Day Sample Variability of Fecal Calprotectin in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Prospective Observational Study. *J Clin Gastroenterol.* 2018;52(3):235-240.
59. Meling TR, Aabakken L, Roseth A, Osnes M. Faecal calprotectin shedding after short-term treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Scand J Gastroenterol.* 1996;31(4):339–44.

60. Canani RB, Rapacciuolo L, Romano MT, de Horatio T, Terrin G, Manguso F i sur. Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Dig Liver Dis.* 2004;36(7):467–70.
61. Lin JF, Chen JM, Zuo JH, Yu A, Xiao ZJ, Deng FH i sur. Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity, *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(8):1407-15.
62. Schroder O, Naumann M, Shastri Y, Povse N, Stein J. Prospective evaluation of faecal neutrophil-derived proteins in identifying intestinal inflammation: combination of parameters does not improve diagnostic accuracy of calprotectin. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(7):1035–42.
63. Frøslie KF, Jahnsen J, Moum BA, Vatn MH. Mucosal Healing in Inflammatory Bowel Disease: Results From a Norwegian Population-Based Cohort. *Gastroenterology.* 2007;133(2):412–22.
64. Ardizzone S, Maconi G, Russo A, Imbesi V, Colombo E, Bianchi Porro G. Randomised controlled trial of azathioprine and 5-aminosalicylic acid for treatment of steroid dependent ulcerative colitis. *Gut.* 2006;55(1):47–53.
65. 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.
66. Schnitzler F, Fidder H, Ferrante M, Noman M, Arijs I, Van Assche G i sur. Mucosal healing predicts long-term outcome of maintenance therapy with infliximab in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(9):1295–301.
67. Rutgeerts P, Diamond RH, Bala M, Olson A, Lichtenstein GR, Bao W i sur. Scheduled maintenance treatment with infliximab is superior to episodic treatment for the healing of mucosal ulceration associated with Crohn's disease. *Gastrointest Endosc.* 2006;63(3):433–42.
68. Travis SPL, Schnell D, Krzeski P, Abreu MT, Altman DG, Colombel JF i sur. Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: The Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut.* 2012;61(4):535–42.
69. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med.* 1987;317(26):1625-1629.

70. Ruuthgerts I, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johans J i sur. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2005;353(23):2462-2476
71. Lobatón T, Bessissow T, De Hertogh G, Lemmens B, Maedler C, Van Assche G i sur. The Modified Mayo Endoscopic Score (MMES): A New Index for the Assessment of Extension and Severity of Endoscopic Activity in Ulcerative Colitis Patients. *J Crohns Colitis* 2015;9(10):846-52.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):786-801.
76. Karsdal MA, Henriksen K, Leeming DJ, Woodworth T, Vassiliadis E, Bay-Jensen AC. Novel combinations of Post-Translational Modification (PTM) neo-epitopes provide tissue-specific biochemical markers-are they the cause or the consequence of the disease? *Clin Biochem.* 2010;43(10-11):793-804.
77. Latella G, Rogler G, Bamias G, Breynaert, Florholmen J, Pellino G i sur. Results of the 4th scientific workshop of the ECCO (I): Pathophysiology of intestinal fibrosis in IBD. *J Crohns Colitis.* 2014;8(10):1147-65.
78. Matthes H, Herbst H, Schuppan D, Stallmach A, Milani S i sur. Cellular localization of procollagen gene transcripts in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 1992;102(2):431-42.
79. Graham MF, Diegelmann RF, Elson CO, Lindblad WJ. Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1988;94(2):257-65.
80. Karsdal MA, Nielsen MJ, Sand JM, Henriksen K, Genovese F, Bay-Jensen C i sur. Extracellular Matrix Remodeling: The Common Denominator in Connective Tissue Diseases. Possibilities for Evaluation and Current Understanding of the Matrix as More

Than a Passive Architecture, but a Key Player in Tissue Failure. *Assay Drug Dev Technol.* 2013;11(2):70–92.

81. Vassiliadis E, Veidal SS, Simonsen H, Larsen DV, Vainer B, Chen X i sur. Immunological detection of the type V collagen propeptide fragment, PVCP-1230, in connective tissue remodeling associated with liver fibrosis. *Biomarkers.* 2011;16(5):426–33.

82. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens -- Structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12):1531–46.

83. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 2003;200(4):423–428.

84. Reinboth B, Hanssen E, Cleary EG, Gibson MA. Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1. *J Biol Chem.* 2002;277(6):3950–7.

85. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 24):4195–200.

86. Hussey GS, Keane TJ, Badylak SF. The extracellular matrix of the gastrointestinal tract: a regenerative medicine platform. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(9):540-552.

87. Leinonen A, Mariyama M, Mochizuki T, Tryggvason K, Reeders ST. Complete primary structure of the human type IV collagen alpha 4(IV) chain. Comparison with structure and expression of the other alpha (IV) chains. *J Biol Chem.* 1994;269(42):26172–7.

88. Oka Y, Naito I, Manabe K, Sado Y, Matsushima H, Ninomiya Y i sur. Distribution of collagen type IV alpha1-6 chains in human normal colorectum and colorectal cancer demonstrated by immunofluorescence staining using chain-specific epitope-defined monoclonal antibodies. *J Gastroenterol. Hepatol.* 2002;17(9):980–6.

89. Simon-Assmann P, Bouziges F, Arnold C, Hafften K, Kedinger M i sur. Epithelial-mesenchymal interactions in the production of basement membrane components in the gut. *Development.* 1988;102(2):339-47.

90. Kirkland SC, Henderson K. Collagen IV synthesis is restricted to the enteroendocrine pathway during multilineage differentiation of human colorectal epithelial stem cells. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 11):2055–64.

91. Groulx JF, Gagné D, Benoit YD, Martel D, Basora N, Beaulieu JF. Collagen VI is a basement membrane component that regulates epithelial cell-fibronectin interactions. *Matrix Biol.* 2011;30(3):195–206.
92. Kuo HJ, Maslen CL, Keene DR, Glanville RW. Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. *J Biol Chem.* 1997;272(42):26522-9.
93. Teller IC, Beaulieu JF. Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev Mol Med.* 2001;3(24):1–18.
94. Iozzo RV. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(8):646–56.
95. Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. Proteoglycans in health and disease: The multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J.* 2010;277(19):3876–89.
96. Simon-Assmann P, Keding M, De Arcangelis A, Rousseau V, Simo P. Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia.* 1995;51(9-10):883–900.
97. Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm. Bowel Dis.* 2001;7(1):16–26.
99. Kivirikko KI, Myllyla R. Posttranslational enzymes in the biosynthesis of collagen: intracellular enzymes. *Methods Enzymol.* 1982;82 Pt A:245–304.
100. Von der Mark K. Localization of collagen types in tissues. *Int Rev Connect Tissue Res.* 1981;9:265-324.
101. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Linsenmayer TF. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol.* 1988;106(3):999-1008.
102. Birk DE. Type V collagen: Heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron.* 2001;32(3):223–37.
103. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta.* 2007;381(2):107–13.
104. Breuls RGM, Klumpers DD, Everts V, Smit TH. Collagen type V modulates fibroblast behaviour dependent on substrate stiffness. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380(2):425-9.
105. Wise SG, Weiss AS. Tropoelastin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(3):494– 7.

106. Lowery MC, Morris CA, Ewart A, Brothman LJ, Zhu XL, Leonard CO, et al. Strong correlation of elastin deletions, detected by FISH, with Williams syndrome: evaluation of 235 patients. *Am J Hum Genet.* 1995;57(1):49–53.
107. Stramer BM, Mori R, Martin P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol.* 2007;127(5):1009– 17.
108. Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut.* 2007;56(1):130–9.
109. Creamer B, Shorter RG, Bamforth J. The turnover and shedding of epithelial cells. I. The turnover in the gastro-intestinal tract. *Gut.* 1961;2(2):110–8.
110. Shimshoni E, Yablecovitch D, Baram L, Dotan I, Sagi I. ECM remodelling in IBD: Innocent bystander or partner in crime? The emerging role of extracellular molecular events in sustaining intestinal inflammation. *Gut.* 2015;64(3):367–72.
111. Mortensen JH, Lindholm M, Langholm LL, Kjeldsen J, Bay-Jensen AC, Karsdal MA i sur. The intestinal tissue homeostasis - the role of extracellular matrix remodeling in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;13(10):977-93.
112. Karsdal MA, Nielsen SH, Leeming DJ, Langholm LL, Nielsen MJ, Manon-Jensen T i sur. The good and the bad collagens of fibrosis – their role in signaling and organ function. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;121:43-65.
113. Petrey AC, de la Motte CA. The extracellular matrix in IBD. A dynamic mediator of inflammation. *Curr Opin Gastroenterol.* 2017;33(4):234–8.
114. O Shea NR, Smith AM. Matrix Metalloproteases Role in Bowel Inflammation and Inflammatory Bowel Disease: An up to Date Review. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(12):2379-93.
115. Bond JS, Matters GL, Banerjee S, Dusheck. Mepripin metalloprotease expression and regulation in kidney, intestine, urinary tract infections and cancer. *FEBS Lett.* 2005;579(15):3317–22.
116. Monteleone G, Caruso R, Fina D, Peluso I, Gioia V, Stolfi C i sur. Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21. *Gut.* 2006;55(12):1774–80.
117. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(5):329–42.

118. Latella G, Di Gregorio J, Flati V, Rieder F, Lawrance IC. Mechanisms of initiation and progression of intestinal fibrosis in IBD. *Scand J Gastroenterol*. 2015;50(1):53-65. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*.
119. Garg P, Vijay-Kumar M, Wang L, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(2):G175-84.
120. Zhen EY, Brittain IJ, Laska DA, Mitchell PG, Sumer EU, Karsdal MA i sur. Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 2008;58(8):2420–31
121. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Arch A Pathol Anat. Histopathol*. 1993;423(1):1–11.
122. Veidal SS, Bay-Jensen AC, Tougas G, Karsdal MA, Vainer B. Serum markers of liver fibrosis: combining the BIPED classification and the neo-epitope approach in the development of new biomarkers. *Dis Markers*. 2010;28(1):15–28.
123. Karsdal MA, Henriksen K, Leeming DJ, Mitchell P, Duffin K, Barascuk N i sur. Biochemical markers and the FDA Critical Path: how biomarkers may contribute to the understanding of pathophysiology and provide unique and necessary tools for drug development. *Biomarkers*. 2009;14(3):181–202.
- 124 Schaller S, Henriksen K, Hoegh-Andersen P, Sondergaard BC, Sumer EU, Tanko LB, i sur. In vitro, ex vivo, and in vivo methodological approaches for studying therapeutic targets of osteoporosis and degenerative joint diseases: how biomarkers can assist? *Assay Drug Dev Technol*. 2005;3:553–80.
125. Barascuk N, Veidal SS, Larsen L, Larsen DV, Larsen MR, Wang J i sur. A novel assay for extracellular matrix remodeling associated with liver fibrosis: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for a MMP-9 proteolytically revealed neo-epitope of type III collagen. *Clin Biochem*. 2010;43(10-11):899–904.
126. Nielsen MJ, Nedergaard AF, Sun S, Veidal SS, Larsen L, Zheng Q i sur. The neo-epitope specific PRO-C3 ELISA measures true formation of type III collagen associated with liver and muscle parameters. *Am J Transl Res*. 2013;5(3):303–15.
127. Niemela O, Risteli L, Parkkinen J and Risteli J. Purification and characterization of the N-terminal propeptide of human type III procollagen. *Biochem J*. 1985;232(1): 145-50.



128. Mortensen JH, Godskesen LE, Jensen MD, Van Haaften WT, Klinge LG, Olinga P i sur. Fragments of Citrullinated and MMP-degraded Vimentin and MMP-degraded Type III Collagen Are Novel Serological Biomarkers to Differentiate Crohn's Disease from Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis*. 2015;9(10):863–72.
129. Van Haaften WT, Mortensen JH, Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Dijkstra G, Olinga P. Misbalance in type III collagen formation/degradation as a novel serological biomarker for penetrating (Montreal B3) Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46(1):26–39.
130. Sand JM, Larsen L, Hogaboam C, Martinez F, Han M, Larsen MR i sur. MMP mediated degradation of type IV collagen alpha 1 and alpha 3 chains reflects basement membrane remodeling in experimental and clinical fibrosis -- Validation of two novel biomarker assays. *PLoS One*. 2013;8(12):e04934.
131. Leeming DJ, Nielsen MJ, Dai Y, Viedal SS, Vassiliadis E, Zhang C i sur. Enzyme-linked immunosorbent serum assay specific for the 7S domain of collagen type IV (P4NP 7S): A marker related to the extracellular matrix remodeling during liver fibrogenesis. *Hepato Res*. 2012;42(5):482–93.
132. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. 2007;117(3):524-9.
133. Corbel M, Theret N, Caulet-Maugendre S, Germain N, Lagente V, Clement B i sur. Repeated endotoxin exposure induces interstitial fibrosis associated with enhanced gelatinase (MMP-2 and MMP-9) activity. *Inflamm Res*. 2001;50(3):129-35.
134. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem*. 1993;268(32):23824-9.
135. Vassiliadis E, Veidal SS, Simonsen H, Larsen DV, Vainer B, Chen X i sur. Immunological detection of the type V collagen propeptide fragment, PVCP-1230, in connective tissue remodeling associated with liver fibrosis. *Biomarkers*. 2011;16(5):426–33.
136. Mortensen JH, Manon-Jensen T, Jensen MD, Hagglund P, Klinge LG, Kjeldsen J, et al. Ulcerative colitis, Crohn's disease, and irritable bowel syndrome have different profiles of extracellular matrix turnover, which also reflects disease activity in Crohn's disease. *PLoS One* 2017;12(10):e0185855.
137. Lewis JD, Chuai S, Nessel L, Lichtenstein GR, Aberra FN, Ellenberg JH. Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in

- ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(12):1660-6.
138. Mosli M, Fahmy M, Garg SK, Feagan SG, Baker KA, Zou G, et al. Biomarkers for assessing disease activity in inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(11).
139. Meuwis MA, Fillet M, Geurts P, de Seny D, Lutteri L, Chapelle J *et al*. Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(9):1422–33.
140. Bennike T, Birkelund S, Stensballe A, Andersen V. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: Current status and proteomics identification strategies. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(12):3231–44.
141. Lindholm M, Manon-Jensen T, Madsen GI, Krag A, Karsdal MA, Kjeldsen J, et al. Extracellular Matrix Fragments of the Basement Membrane and the Interstitial Matrix Are Serological Markers of Intestinal Tissue Remodeling and Disease Activity in Dextran Sulfate Sodium Colitis. *Dig Dis Sci*. 2019;64(11):3134–42.
142. Karsdal MA, Hjuler ST, Luo Y, Rasmunssen DGK, Nielsen MJ, Nielsen SH, et al. Assessment of liver fibrosis progression and regression by a serological collagen turnover profile. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2019;316(1):G25-G31.
143. Rosenberg L, Nanda KS, Zenlea T, Gifford A, Lawlor GO, Falchuk KR, et al. Histologic markers of inflammation in patients with ulcerative colitis in clinical remission. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(8):991–6.
144. Denis MA, Reenaers C, Fontaine F, Belaïche J, Louis E. Assessment of endoscopic activity index and biological inflammatory markers in clinically active Crohn's disease with normal C-reactive protein serum level. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(9):1100–5.
145. Goffin L, Fagagnini S, Vicari A, Mamie C, Melhem H, Weder B, et al. Anti-MMP-9 Antibody: A Promising Therapeutic Strategy for Treatment of Inflammatory Bowel Disease Complications with Fibrosis. *Inflamm Bowel Dis* 2016;22(9):2041–57.

## 11. BIOGRAFIJA

Viktor Domislović rođen je 1991. godine u Trbovlju u Republici Sloveniji. Završio je prirodoslovno matematičku gimnaziju u Varaždinu. Nakon mature u Prvoj gimnaziji Varaždin, 2010. godine upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem je diplomirao 2016. godine s odličnim uspjehom. Tijekom studija nagrađen je Dekanovom nagradom za najboljeg studenta 3. godine studija, Dekanovom nagradom za najbolji znanstveni rad "Kontinuirano mjerenje arterijskog tlaka – značajan doprinos kvalitetnijem liječenju hipertoničara" i Posebnom Rektorovom nagradom za organizaciju međunarodnog projekta „Ljetna škola hitne medicine u Dubrovniku“. Bio je demonstrator na Katedri za anatomiju, predsjednik Europske udruge studenata medicine u Zagrebu (EMSA Zagreb) i potpredsjednik Studentske sekcije Hrvatskog liječničkog zbora (SSHLZ). Od 2018. godine zaposlen je kao specijalizant gastroenterologije i hepatologije na Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb. Autor je 20 znanstvenih radova od kojih su 6 publicirana u časopisima indeksirana u *Current Contents* bibliografskoj bazi i oko 65 sažetaka koji su bili predstavljeni većinom na europskim i svjetskim kongresima. Član je Zdravstvene i anti-doping komisije Hrvatskog atletskog saveza. Znanstveni i stručni interesi su mu upalne bolesti crijeva, klinička prehrana i nealkoholna masna bolest jetre.